

**DIE TRANSLASIE VAN REOVIRUS-RNA IN OËSIETE VAN
XENOPUS LAEVIS -
'N VERGELYKENDE STUDIE**

**DANIËL PETRUS JACOBUS OPPERMAN
B.Sc. Honns. (Biochemie)**

**Verhandeling goedgekeur as gedeeltelike nakoming van die
vereistes vir die graad Magister Scientiae in Biochemie
in die Fakulteit Natuurwetenskappe van die
Potchefstroomse Universiteit vir Chistelike Hoër Onderwys**

**Studieleier: Prof. dr. C.J. Reinecke
Hulpleier: Mnr. M.P.K. van der Walt**

**Potchefstroom
Junie 1988**

"U trou is van geslag tot geslag;
U het die aarde gemaak, en dit staan vas.
Ja, wat U bepaal het, staan vandag nog vas,
alles is aan U onderworpe."

Psalm 119:90-91

Aan my ouers
Sandra en die kinders.

ABSTRACT

THE TRANSLATION OF REOVIRUS-RNA IN OOCYTES OF XENOPUS LAEVIS - A COMPARATIVE STUDY

(Original title: Die translasië van reovirus-RNA in oösiëte van
Xenopus laevis - 'n Vergelykende studie)

An approach commonly employed in the study of molecular biology is initially to study a simple system as a model in order to comprehend more complex systems. An example of this principle is the elucidation of the mechanism of protein synthesis mainly by studying prokaryotes. Likewise, research in molecular virology has to a great extent contributed to the current knowledge of gene expression in eukaryotes.

Extensive studies of the molecular biology of reovirus have already been done. The reovirus genome consists of ten double-stranded RNA segments which are transcribed to ten messenger RNA species by a conservative mechanism. The enzyme activities catalyzing this viral mRNA synthesis reside in the inner capsid core proteins. The double-stranded RNA genome segments are surrounded by an inner capsid core and an outer capsid shell. During multiplication of the reovirus the host cell translation apparatus is used to translate the reovirus mRNA.

In this study the translation of reovirus mRNA and denatured dsRNA is investigated in *Xenopus laevis* oocytes. The primary aim of this study is to evaluate the fidelity in the translation of reovirus RNA in the oocyte system. In this way a contribution can be made in the development of a suitable whole-cell system to elucidate aspects of the molecular reovirology. In the first instance adequate quantities of reovirus mRNA were synthesized by in vitro-transcription and dsRNA was isolated from reovirions. In a comparative study the translation of above-mentioned

RNA was investigated in both a cell-free wheat germ system and the oocyte system. The denatured dsRNA was successfully translated in the wheat germ system, but it was established that this procedure is not as suitable for translation in the oocyte system. This phenomenon may be the result of the renaturation of plus- and minus-stranded RNA. The reovirus specific translation products synthesized in the oocytes were then analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis after immunoisolation. It was found that the ratio between the reovirus translation products formed in the oocytes was comparable to the translation efficiency of the reovirus mRNA *in vivo*.

The peptide profile of the putative $\sigma 3$ translation products formed in the oocytes is identical to that of the authentic reovirus protein. In contrast with results obtained from the wheat germ system protein $\mu 1C$ was formed in the oocyte system by the correct post-translational cleavage of the primary gene product $\mu 1$. These observations indicate a high degree of fidelity in the translation of reovirus mRNA in the oocyte system, which suggest that this system may provide a means for studying aspects in molecular biology.

OPSOMMING

DIE TRANSLASIE VAN REOVIRUS-RNA IN OÖSIETE VAN XENOPUS LAEVIS - 'N VERGELYKENDE STUDIE

'n Algemene benaderingswyse wat dikwels in die bestudering van die molekulêre biologie gevolg word, is die aanvanklike bestudering van 'n eenvoudiger sisteem as model om die meer komplekse sisteme te verstaan. So is die hoofmomente van proteïensintese grootliks deur die bestudering van prokariote opgeklaar. Op dieselfde wyse het navorsing in die molekulêre virologie in 'n groot mate bygedra tot die huidige stand van kennis ten opsigte van die meganisme van geenuitdrukking in eukariote.

Die molekulêre biologie van reovirus is reeds deeglik bestudeer. Die reovirusgenoom bestaan uit tien segmente dubbelstring-RNA(dsRNA) wat via 'n konserwatiewe meganisme tot tien boodskapper-RNA's getranskribeer word. Die ensiemaktiwiteite wat hierdie sintese van virale mRNA kataliseer, is in die proteïene van die binneste kernkapsied gesetel. Die binneste kernkapsied wat die genomiese dsRNA omsluit, word verder deur 'n buitenste proteïenkapsel omring om 'n volledige reovirion te vorm. In die vermeerderingsiklus van reovirus word van die translasië-apparaat van die gasheersel gebruik gemaak om die reovirus-mRNA te transleer.

In hierdie studie is die translasië van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA in die oösiëte van *Xenopus laevis* ondersoek. Die primêre doel van hierdie studie is om die betroubaarheid van die translasië van reovirus-RNA in die oösiëtsisteem te evalueer. Sodoende kan 'n bydraë gelewer word tot die ontwikkeling van 'n geskikte heelselsisteem waarin aspekte van die molekulêre reovirologie ondersoek kan word. In die eerste plek is voldoende hoeveelhede reovirus-mRNA deur in vitro-transkripsie gesintetiseer en dsRNA uit reovirions geïsoleer. In 'n vergelykende studie is die translasië van hierdie reovirus-RNA in beide

'n selvrye koringkiemsisteem en die oösietsisteem ondersoek. Die gedenatureerde dsRNA wat suksesvol in die koringkiemsisteem getransleer is, was nie as sodanig geskik vir translase in die oösietsisteem nie. Laasgenoemde is waarskynlik toe te skryf aan die renaturering van die plusstring- en minusstring-RNA.

Daar is met behulp van elektroforetiese analise ná immuno-isolering van die reovirusspesifieke translasiëprodukte aangetoon dat die onderlinge verhouding van die reovirustranslasiëprodukte wat in die oösiete gesintetiseer is, vergelykbaar is met die translasië-effektiwiteit van die reovirus-mRNA in vivo. Na gedeeltelike proteolitiese vertering van die translasiëproduk met dieselfde elektroforetiese mobiliteit as die virale $\sigma 3$ -proteïen, is 'n peptiedpatroon verkry wat identies is aan die patroon van die ooreenstemmende natuurlike virusproteïen. Proteïen $\mu 1C$ is in die oösiete gevorm, in teenstelling met die koringkiemsisteem, deur die korrekte post-translasionele splyting van die primêre geenproduk $\mu 1$. Uit hierdie waarnemings volg dat die oösietsisteem geskik is vir betroubare translasië van reovirus-mRNA en dus benut kan word om aspekte in die molekulêre biologie te ondersoek.

BEDANKINGS

My opregte dank aan:

- Prof. C.J. Reinecke onder wie se leiding hierdie studie gedoen is. Aan u 'n besondere woord van dank.
- Mnr. M.P.K. van der Walt wat tydens hierdie studie as hulpleier opgetree het, vir al die hulp en belangstelling.
- Prof. H. Huisman, dr. A.A. van Dijk en die personeel van die afdeling Biochemie, Onderstepoort, vir hulp met die kweking van die virus en vrugbare samesprekings.
- Vriende en kollegas van die Departement Biochemie, PU vir CHO, vir hul belangstelling en ondersteuning.
- Mev. A.E.M. Marais en mnr. L.R. Tiedt vir die tegniese versorging van die figure.
- Mev. M. Scott vir die geduld en tik van die verhandeling.
- Die personeel van die Ferdinand Postmabiblioteek vir u hulp.
- Mnr. J.H. Langenhoven, dr. P.J. Pretorius, prof. J. van der Elst en prof. J.L. van der Walt vir hulp met die taalkundige versorging.
- Personeel van Rekenaardienste, PU vir CHO, vir die samewerking met die tik en druk van die verhandeling.
- My gesin en ouers vir hulle voortdurende belangstelling, ondersteuning en liefde.

Wat kan 'k die Heer vir al sy guns vergeld?

Wat kan 'k Hom bring uit dank vir sy genade?

LYS VAN GESELEKTEERDE AFKORTINGS

A	adenosien
ATP	adenosientrifosfaat
A ₂₆₀	absorpsie by 260 nm
A ₇₀₀	absorpsie by 700 nm
C	sitosien
cap	5'-terminale blokkeringstruktuur van eukariotiese mRNA's
cDNA	polideoksiribonukleotied gesintetiseer onder leiding van RNA-afhanklike DNA-polimerase
CTP	sitosientrifosfaat
DNA	deoksiribonukleïensuur
DMSO	dimetielsulfoksied
dsRNA	dubbelstringribonukleïensuur
EDTA	etileendiamientetra-asynsuur
esRNA	enkelstringribonukleïensuur
G	guanosien
g	gravitasiekrag (gravitasie-eenheid)
G ^m	metielguanosien
GTP	guanosientrifosfaat
ISVP	intermediêre subvirale partikel
MAK	metielalbumienkieselgoer
met-tRNA _F	formileerbare metioniel-tRNA
m7Gppp	7-metielguanosien-5'-trifosfaat
Mr	waarskynlike molekulêre massa
mRNA	boodskapper-RNA
opm	omwentelinge per minuut
PAGE	poliakrielamiedgelelektroforese
POPOP	2,2'-p-feniel-bis-(5-fenieloksasool)
PPO	2,5-difenieloksasool
RNA	ribonukleïensuur
RNase	ribonuklease
SAM	S-adenosielmetionien
SDS	natriumdodesielsulfaat

SVP	subvirale partikel
TCA	trichloorasynsuur
TEMED	NNN'N'-tetrametieletileendiamien
TMV	tabakmosaïekvirus
tpm	tellings per minuut
tRNA	oordrag-RNA
U	uridien
UTP	uridientrifosfaat

INHOUDSOPGAWE

HOOFSTUK 1: INLEIDING	1
HOOFSTUK 2: LITERATUUROORSIG	3
2.1 INLEIDING	3
2.2 REOVIRUSGENOOM	4
2.2.1 Strukturele eienskappe van die reovirusgenoom	4
2.2.2 Nukleotiedvolgordes van die reovirusgene en boodskapper-RNA	6
2.2.3 Informasie-inhoud van die tien reovirusgene	10
2.3 PROTEÏENE VAN REOVIRUS	14
2.3.1 Inleiding	14
2.3.2 Die λ -proteïene	15
2.3.3 Die μ -proteïene	16
2.3.4 Die σ -proteïene	18
2.3.5 Ensiemaktiwiteite van reovirus	22
2.4 TRANSKRIPSIE VAN DIE REOVIRUSGENOOM	27
2.4.1 Inleiding	27
2.4.2 Transkripsie in vivo	28

2.4.3	Transkripsie in vitro	29
2.5	TRANSLASIE VAN REOVIRUS-mRNA	30
2.5.1	Inleiding	30
2.5.2	Proteïensintese in virusgeïnfekteerde selle	31
2.5.3	Translasie van reovirus-mRNA in vitro	34
2.6	REOVIRUSMORFOGENESE	40
2.7	PROBLEEMSTELLING EN BENADERINGSWYSE	42
HOOFSTUK 3: BEREIDING EN ISOLERING VAN REOVIRUS-mRNA en -dsRNA		
3.1	INLEIDING	49
3.2	ISOLERING VAN REOVIRUS	50
3.2.1	Kweking van reovirus	50
3.2.2	Suiwering van reovirus	50
3.2.3	Bereiding van radioaktiewe reovirus	53
3.3	BEREIDING VAN REOVIRUS-mRNA	53
3.3.1	Inleiding	53
3.3.2	In vitro-transkripsie	54
3.3.3	Suiwering van reovirus-mRNA	57
3.3.4	Karakterisering van reovirus-mRNA	58

3.4	EKSTRAKSIE VAN REOVIRUS-dsRNA	61
3.4.1	Inleiding	61
3.4.2	Ekstraksie van dsRNA uit gesuiwerde reovirus	61
3.4.3	Ekstraksie van dsRNA uit geïnfekteerde selle	61
3.4.4	Karakterisering van dsRNA	64
3.5	FRAKSIONERING VAN REOVIRUS-dsRNA	67
3.5.1	Inleiding	67
3.5.2	Elektroforetiese skeiding van dsRNA	67
3.5.3	Eluering van dsRNA	68
3.5.4	Suiwering van gefraksioneerde dsRNA	69
3.6	SAMEVATTING	69
 HOOFSTUK 4: TRANSLASIE VAN REOVIRUS-RNA IN 'N SELVRYE KORINGKIEMSISTEEM		
4.1	INLEIDING	72
4.2	STANDAARDISERING VAN 'N IN VITRO-KORINGKIEMSISTEEM	73
4.2.1	Bereiding van 'n koringkiemekstrak	73
4.2.2	Samestelling van die koringkiemsisteem vir in vitro-translasie	74
4.2.3	Aktiwiteitsbepaling met konynglobien-mRNA	75

4.3	'N VERGELYKING VAN SEKERE OPTIMALE KONDISIES VIR DIE TRANSLASIE VAN REOVIRUS-mRNA EN GEDE-NATUREERDE dsRNA IN DIE KORINGKIEMSISTEEM	77
4.3.1	Inleiding	77
4.3.2	Bepaling van die optimale kondisies vir die trans-lasie van reovirus-mRNA	78
4.3.3	Bepaling van die optimale kondisies vir die trans-lasie van gedenateerde reovirus-dsRNA	81
4.3.3.1	Denaturering van dsRNA	81
4.3.3.2	Bepaling van die optimale kondisies	81
4.3.4	'n Vergelyking van die translasië-aktiwiteit van dsRNA in die koringkiemsisteen na denaturering van reovirus-dsRNA in 80% of 90% DMSO	85
4.4	'N VERGELYKENDE ANALISE VAN DIE TRANSLASIE-PRODUKTE van REOVIRUS-mRNA EN GEDENATUREERDE dsRNA NA TRANSLASIE IN DIE KORINGKIEMSISTEEM	87
4.4.1	Inleiding	87
4.4.2	Translasie met die oog op produkanalise	88
4.4.3	PAGE en fluorografie	89
4.4.4	Translasieprodukte van ongefraksioneerde reovirus-mRNA en gedenateerde dsRNA	90
4.4.4.1	Inleiding	90
4.4.4.2	Produkanalise na translasië van mRNA en	

	gedenatureerde dsRNA by hul onderskeie optimale kondisies	90
4.4.4.3	'n Vergelyking van die aktiwiteit en translasielprodukte van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA	93
4.5	ENKELE ANDER BENADERINGS OM TRANSLASIE IN DIE SELVRYE KORINGKIEMSISTEEM TE ONDERSOEK	98
4.5.1	Inleiding	98
4.5.2	Elektroforetiese analise na 'n tydsafhanklike translasiel van reovirus-mRNA	98
4.5.3	Gradiëntanalise van die translasiemengsels NA translasiel van reovirus-mRNA in die selvrye koringkiemsisteem	101
4.5.4	Elektroforetiese analise van die translasielprodukte na bereiding van 'n postribosomale supernatant	103
4.5.5	Elektroforetiese analise van die translasielprodukte van die kleiner dsRNA-spesies	106
4.7	SAMEVATTING	108
	HOOFSTUK 5: TRANSLASIE VAN REOVIRUS-mRNA EN GEDENATUREERDE dsRNA IN DIE OÖSIETE VAN XENOPUS LAEVIS	
5.1	INLEIDING	110
5.2	MIKRO-INSPUITING VAN OÖSIETE VAN XENOPUS LAEVIS	111

5.3	VOORBEREIDING VIR PRODUKANALISE	112
5.3.1	Bereiding van antiserum teen reovirus	112
5.3.2	Suiwering van reovirusspesifieke transla- sieprodukte	112
5.3.2.1	Inleiding	112
5.3.2.2	Indirekte immunopresipitering	113
5.3.2.3	Proteïen A-affiniteitschromatografie	113
5.4	PRODUKANALISE NA TRANSLASIE VAN REOVIRUS- mRNA IN DIE OÖSIETSISTEEM	115
5.4.1	Produkanalise na indirekte immunopresipitering	115
5.4.2	Produkanalise na proteïen A-affiniteits- chromatografie	117
5.5	TRANSLASIE VAN GEDENATUREERDE dsRNA IN DIE OÖSIETSISTEEM	119
5.5.1	Inleiding	119
5.5.2	Die invloed van ingespuite DMSO op die translasie-aktiwiteit van die oösietsisteem	120
5.5.3	Die invloed van ingespuite DMSO op die translasie van eksogene mRNA in die oösietsisteem	121
5.5.4	Verskillende benaderings vir die translasie van gedenateerde reovirus-dsRNA in die oösiets- sisteem	123

5.5.4.1	Inleiding	123
5.5.4.2	Translasie van ongefraksioneerde dsRNA na denaturering	123
5.5.4.3	Translasie van gedenatureerde subspesies dsRNA van reovirus	125
5.6	EVALUERING VAN DIE BETROUBAARHEID VAN TRANSLASIE IN DIE SELVRYE KORINGKIEMSISTEEM EN DIE OÖSIETSISTEEM VAN XENOPUS LAEVIS	126
5.7	SAMEVATTING	129
HOOFSTUK 6: ALGEMENE BESPREKING		
6.1	INLEIDING	131
6.2	DIE VERHOUDING VAN DIE REOVIRUSTRANSLASIE-PRODUKTE	131
6.3	PRODUKANALISE	136
6.4	POST-TRANSLASIONELE MODIFIKASIE	138
6.5	EVALUERING	139
BIBLIOGRAFIE		143
BYLAAG A		164

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Op die terrein van molekulêr-biologiese navorsing neem virusse 'n sentrale posisie in. Trouens Molekulêre Biologie as dissipline het self in 'n groot mate by die bestudering van verskeie aspekte van bakteriële virusse (bakteriofage) gebaat. Navorsers het vanaf die laat 1930's die unieke eienskappe van bakteriofage benut om een van die destydse uitstaande probleme in die biologie te ondersoek, naamlik die karakterisering van die fisiese en chemiese aard van gene. Kwantitatiewe genetiese eksperimente kon relatief vinnig uitgevoer word, omdat hierdie virusse vinnig vermeerder en omdat maklik vir hulle teenwoordigheid getoets kan word. Verder het die grootte van virusse aanleiding gegee tot die konsep dat die struktuur van virusse relatief eenvoudig behoort te wees en dat virusse dus as goeie modelle vir fisiologiese en biochemiese studies kon dien. Gevolglik kon verskeie navorsers voldoende inligting versamel om die wyse waarop genetiese informasie in die gene vasgelê is, te verstaan. Hierdie basiese kennis het ook gedien as stimulus vir die bestudering van replisering, transkripsie en translase van genetiese informasie.

Die bestudering van dier- en plantvirusse is grootliks deur navorsers in die mediese, veeartsenykundige en landboukundige dissiplines in die laaste helfte van die negentiende eeu geïnisieer. Die ontdekking van hierdie virusse het voortgevloei uit die bestudering van aansteeklike siektes wat nie deur bakterieë of protosoë veroorsaak is nie. Die invoering van nuwe weefselkultuurtegnieke in die vroeë 1950's was 'n groot voorwaartse stap in die ontwikkeling van diervirologie as 'n toegepaste vakterrein sowel as 'n vertakking van molekulêre biologie. Die geweldige tegnologiese ontwikkelings van die afgelope jare het bygedra tot 'n groot toename in die kennis van die molekulêre virologie.

Verskeie diervirusse is reeds as sisteme vir die bestudering van geenuitdrukking in eukariote benut. Reovirus beskik oor besondere eienskappe wat daartoe gelei het dat hierdie virus een van die bes

bestudeerde diervirusse is. Die dubbelstringkarakter en gesegmenteerde aard van die genomiese RNA, en ook die feit dat reovirus genoegsaam in beskikbare sellyne vermeerder, het uitgebreide ondersoeke in die reovirologie gestimuleer (Joklik, 1983). Weens die beskikbare materiaal en uitgebreide kennis oor reovirus word hierdie virus steeds vir die bestudering van transkripsie en translase benut. Hierdie biochemiese prosesse is hoofsaaklik in soogdierselle of verskillende selvrye sisteme bestudeer en het in baie opsigte ook bygedra tot 'n beter begrip van die molekulêre biologie van eukariote in die algemeen (Shatkin en Kozak, 1983). Dit is vanselfsprekend dat 'n dieper kennis van alle aspekte van virusse, veral op molekulêre vlak, nie alleen van belang is vir nuwe basiese kennis nie, maar ook ontwikkeling in toegepaste gebiede kan stimuleer, soos byvoorbeeld die ontwerp van antivirale middels.

Reoviruspartikels bestaan uit 'n aantal proteïensubeenhede waarin 'n aantal stabiele ensiemaktiwiteite gesetel is. Onder geskikte in vitro-inkubasiekondisies is hierdie ensieme in staat om die sintese van groot hoeveelhede van die tien verskillende virale mRNA's te kataliseer (kyk 2.4). Hierdie virale mRNA's en gedenatureerde genomiese RNA kan in translasesisteme getransleer word tot outentieke virale polipeptiede (kyk 2.5). Na 'n uitgebreide literatuurstudie is sekere leemtes in die bestaande kennis van die reovirologie aangetoon (hoofstuk 2) wat as begroning vir die probleemstelling van hierdie ondersoek gedien het (kyk 2.7). In hierdie ondersoek is die translase van reovirus-mRNA en gedenatureerde dubbelstring-RNA van reovirus in die oösiete van *Xenopus laevis* ondersoek. Die doel was om 'n bydrae te lewer tot die ontwikkeling van 'n geskikte heelselsisteem waarin vrae ten opsigte van die molekulêre biologie van reovirus onder in vivo-toestande bestudeer kan word.

In hoofstuk 3 word die eksperimentele metodes vir die bereiding en isolering van mRNA en dubbelstring-RNA van reovirus beskryf. Die translase van die mRNA en gedenatureerde dsRNA is vervolgens in 'n selvrye koringkiemsisteem (hoofstuk 4) en die oösietsisteem (hoofstuk 5) ondersoek. Die resultate van hierdie ondersoek word samevattend in hoofstuk 6 bespreek.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1 INLEIDING

Reovirus, 'n lid van die dubbelstring-RNA-virusse, is reeds deeglik op molekulêre vlak bestudeer, maar soos dit uit die literatuuroorsig na vore sal kom, is daar steeds sekere fundamentele vrae oor verskeie aspekte van die virus. So bestaan daar onder andere leemtes in die kennis oor die rol van sekere van die reovirusproteïene in die verskillende prosesse wat betrokke is by virusvermeerdering.

Hoewel baie van die Reoviridae belangrike patogene is, is hoofsaaklik die soogdierreovirus vir die bestudering van die molekulêre biologie van die virusfamilie benut. Die belangrikste redes hiervoor is dat reovirus eerste in soogdiere ontdek is en omdat hierdie groep baie maklik in weefselkulture vermeerder en dus gekweek kan word. Die soogdierreovirusse word immunologies in drie serotipes (1, 2 en 3) ingedeel (Rosen, 1960). Vir die doel van hierdie ondersoek word hoofsaaklik op serotipe 3 (Dearing-stam) gekonsentreer omdat die eksperimentele werk slegs met materiaal van hierdie serotipe uitgevoer is. Die reovirusse is almal lede van die genus *Orthoreovirus* van die familie Reoviridae. Ander genera van hierdie virusfamilie sluit in die Orbivirusse, die Rotavirusse, die Cypovirusse en twee genera plantvirusse (Joklik, 1985).

Die genoom van elk van hierdie virusse van die familie Reoviridae vertoon gemeenskaplike strukturele eienskappe. Dit is saamgestel uit 10, 11 of 12 segmente dubbelstring-RNA (dsRNA) en die virusse beskik oor ensieme wat hierdie segmente via 'n konserwatiewe meganisme in enkelstring-RNA (esRNA) transkribeer. Hierdie esRNA is dus identies in volgorde aan die plusstring van die dsRNA-segmente, die 5'-termini is geblokkeer, maar die 3'-termini is nie gepoli-adenileer nie. Verder funksioneer die esRNA as boodskapper-RNA en dien as templaar vir die sintese van transkripte waarmee hulle geassosieer bly om sodoende die volgende generasie van

dsRNA-segmente te vorm. Die genoom van hierdie virusse word met 'n dubbele kapsel van virusproteïene omsluit om 'n volledige reovirion te vorm.

Die volgende aspekte van soogdierreovirusse (in besonder serotipe 3) wat op hierdie verhandeling betrekking het, word vervolgens bespreek:

1. reovirusgenoom,
2. struktuur en funksie van reovirusproteïene,
3. transkripsie van reovirus-RNA,
4. translase van reovirus-mRNA en
5. reovirusmorfogenese.

Hierdie literatuurbespreking dien as agtergrond vir die formulering van die probleemstelling van hierdie ondersoek. Die hoofstuk word afgesluit met 'n beskrywing van die benaderingswyse wat gevolg is om die gestelde probleem te ondersoek.

2.2 REOVIRUSGENOOM

2.2.1 Strukturele eienskappe van die reovirusgenoom

Die ontdekking deur Gomatos en Tamm (1963) dat die genomiese RNA van reoviruspartikels in die vorm van dubbelstring-RNA bestaan, was die eerste beskrywing van sodanige stabiele dsRNA wat natuurlik voorkom. Verdere gegewens het vinnig geakkumuleer en daaruit is aangetoon dat die reovirusgenoom in die vorm van 'n versameling individuele en unieke segmente, die gene, voorkom.

Ongeag die metode waarmee die genoomsegmente geïsoleer is, het die reovirus-RNA drie grootte-klasse segmente vertoon wanneer dit op suksedigtheidsgradiënte geanaliseer is (Bellamy et al., 1967; Shatkin, 1965; Watanabe en Graham, 1967). Hierdie drie klasse (L = groot; M = medium; S = klein) sedimenteer onderskeidelik met sedimentasie-koëffisiënte van 14S, 12S en 10,5S. Hierdie waardes is versoenbaar met molekulêre massas van ongeveer 2,7-, 1,4- en 0,7 miljoen dalton

onderskeidelik of ongeveer 4500, 2300 en 1200 nukleotiedbasepare. Die feit dat die dsRNA-molekules nie onderling hibridiseer nie en verder ook tot spesifieke spesies mRNA in geïnfekteerde selle getranskribeer word, het bevestig dat die molekules in die drie klasse eerder individuele segmente is as fragmente wat op 'n stogastiese wyse van groter molekules afkomstig is (Bellamy en Joklik, 1967; Bellamy et al., 1967; Watanabe et al., 1967). Hierdie drie klasse is verder elektroforeties in tien individuele en unieke molekulêre spesies geskei (Shatkin et al., 1968). Finale gegewens oor die gesegmenteerde aard van die reovirusgenoom is gelewer deur aan te toon dat die RNA binne-in elke reoviruspartikel twintig 3'-termini besit (Millward en Graham, 1970).

Hoewel daar nou nie meer twyfel bestaan oor die gesegmenteerde aard van die tien reovirusgene nie is die aard van die rangskikking van die genoomsegmente binne die viruspartikels nog nie volledig opgeklaar nie. Kavenoff et al. (1975) was in staat om die genomiese RNA uit die partikels vry te stel in die vorm van spinnekopagtige rangskikkings. Al die genoomsegmente was aan 'n gemeenskaplike punt aan mekaar gebind. Hierdie outeurs postuleer dat die tien genoomsegmente binne-in die viruspartikels deur middel van nie-kovalente RNA-proteïeninteraksies gekoppel is. In hierdie verband moet 'n spesifieke meganisme, wat moontlik die assosiasie van die genoomsegmente met proteïenmolekules insluit, verantwoordelik wees vir die saamstelling (Eng.: assembly) van tien individuele RNA-spesies in elke viruspartikel (kyk ook 2.6). Volgens Spendlove et al. (1970) moet hierdie meganisme baie doeltreffend wees, omdat die verhouding van reoviruspartikels tot infektiewe eenhede onder optimale kondisies baie naby aan een is. Die wyse waarop transkripsie van die individuele gene binne-in die reoviruskernpartikels plaasvind, is egter meer in ooreenstemming met die siening dat die individuele genoomsegmente nie aan mekaar gekoppel is nie. Die gene word nié teen gelyke frekwensies getranskribeer nie, maar teen frekwensies wat omgekeerd eweredig is aan hulle groottes (Skehel en Joklik, 1969). Analise deur X-straalkristallografie dui daarop dat die dsRNA-gene binne-in die reoviruskernpartikels in 'n goed geordende parakristallyne pakkingsformaat voorkom met die naasliggende helikse parallel langs mekaar (Harvey et al., 1981).

2.2.2 Nukleotiedvolgordes van die reovirusgene en boodskapper-RNA

Die eerste pogings om die nukleotiedvolgordes van reovirusgene te bepaal, was daarop gerig om komplementêre volgordes in hulle eindpunte te soek wat moontlik 'n rol in die assosiasie van 'n stel genoomsegmente tydens morfogenese vervul. In die vroeë 1970's was dit met die beskikbare metodes moontlik om slegs enkele terminale residue van die reovirus-RNA te identifiseer. Dit was egter voldoende om die moontlikheid van terminale komplementariteit uit te skakel.

Nadat Nichols et al. (1972) die volgorde van die eerste 25 5'-terminale residue van die s4-mRNA bepaal het, het Kozak en Shatkin die inisiasiegebiede van reovirus-mRNA waaraan ribosomale subeenhede van koringkiem bind, ondersoek. Deur 'n reeks ondersoeke tot in 1982 is die nukleotiedvolgordes van hierdie gebiede, wat die 5'-terminus sowel as die inisiasiekodon insluit, van 9 van die 10 mRNA-spesies van reovirus serotipe 3 bepaal (Kozak, 1977; Kozak en Shatkin, 1977a en b; Kozak, 1982a en b). In die geval van 'n aantal van die reovirus-mRNA's is aangetoon dat die 40S-inisiasiekomplekse 'n groter fragment van die RNA (36-54 nukleotiede lank, afhangende van die spesifieke boodskapper) as die 80S-inisiasiekomplekse (26-35 nukleotiede lank) teen RNase T₁ beskerm. In agt van die reovirusboudskappers beskerm die ribosome 'n enkele bindingsetel (en inisieer waarskynlik translase daarby) wat die 5'-proksimale AUG-kodon insluit. Die enigste uitsondering is die s1-boudskapper wat twee ribosoombeskermdesetels lewer. Hierdie twee setels is rondom die eerste en tweede AUG-kodons gerangskik (Kozak 1982a). Benewens die konsensusvolgorde A/GNNAUG(G) en die 5'-terminale volgorde m7GpppG^mCUA het die 5'-proksimale inisiasiesetels van die reovirus-mRNA's baie min in gemeen. Die afstand tussen die cap-struktuur en die eerste AUG-kodon is relatief kort en wissel van 13 tot 33 nukleotiede. Kozak en Shatkin (1978) het bevestig dat die 5'-terminale cap-struktuur saam met die AUG-kodon die vorming van inisiasiekomplekse met koringkiemribosome bevorder. In 'n vergelykende ondersoek van 'n hele aantal (153) eukariotiese mRNA's het Kozak (1981) waargeneem dat die inisiasiekodons van die meerderheid (151) van die mRNA's 'n purien in posisie -3 (dit is 3 nukleotiede 5' tot die AUG-kodon)

mRNA's 'n purien in posisie -3 (dit is 3 nukleotide 5' tot die AUG-kodon) of 'n G in posisie +4, of beide besit (dit wil sê die konsensusvolgorde A/GNNAUG(G) volgens Kozak, 1981). Die meeste nie-funksionele AUG's of inisiasiekodons wat relatief minder gebruik word, het pirimidiene in bogenoemde posisies. Hierdie aspek sal later saam met die waarnemings van Antczak et al. (1982) in samehang met die translasië-effektiwiteit van die reovirus-mRNA's bespreek word.

Twee meer resente benaderings tot die bepaling van die nukleotiedvolgordes van die reovirusgenoom is onlangs gevolg, naamlik 'n vinnige chemiese tegniek (Antczak et al., 1982) en die klonering van die reovirusgene waarna die nukleotiedvolgordes van die gekloneerde gene bepaal is (Cashdollar et al., 1984). Antczak et al. (1982) het met behulp van die vinnige chemiese tegniek die RNA-volgordes van ongeveer 80 residue aan die 3'-terminale kant van beide die plus- en minusstring van al tien gene van reovirus serotipe 3 (Dearing-stam) bepaal. Aangesien die plus- en minusstringe van die dsRNA-genoomsegmente presies ewe lank is (Li et al., 1980), kon uit hierdie inligting die volgordes van beide eindpunte van die gene verkry word. Hieruit is ook die volgordes van beide termini van al tien reovirus-mRNA's wat identies aan die plusstringe is (Li et al., 1980), afgelei. Al die genoomsegmente van reovirus (serotipe 3) besit die tetranukleotied GCUA aan die 5'-termini en die pentanukleotied UCAUC aan die 3'-termini van hulle plusstringe. Al tien die plusstringe beskik oor 'n eerste inisiasiekodon binne 33 residue vanaf die 5'-eindpunt, terwyl verskeie gene addisionele inisiasiekodons in fase en uit fase in die 3'-rigting besit. In die laaste 80 residue van die 3'-terminale gebied besit al tien die gene ook meerdere termineringskodons in al drie leesrame.

Antczak en medewerkers (1982) het verder ook die terminale nukleotiedvolgordes van die reovirusgene met behulp van 'n rekenaarprogram vir potensiële funksionele eienskappe ondersoek. Die doel daarvan was eerstens om vas te stel of daar moontlike verwantskap tussen spesifieke nukleotiedvolgordes en die frekwensie van translasië (translasië-effektiwiteit) van die reovirus-mRNA's is. Verder is vir eienskappe in die volgordes gesoek wat betrokke mag wees by die seleksie

van identiese stelle van 10 mRNA's tydens morfogenese. Die nukleotiedvolgordebepalings van die eindpunte van die gene het ook deel gevorm van 'n program om die reovirusgene te kloneer.

Die gene bevat in hierdie terminale nukleotiedvolgordes van die plusstringe ongeveer 20 gebiede van 20 tot 30 residue wat betekenisvolle homologie of simmetrie vertoon. Dit is ooreenkomste in dieselfde ($5' \rightarrow 3'$) of teenoorgestelde ($3' \rightarrow 5'$) rigting met volgordes in die plusstringe van enige van die ander gene van reovirus. Die oorsprong of betekenis daarvan is egter nog nie duidelik nie. Sommige van hierdie volgordes wat in al die gene behalwe die S1-geen teenwoordig is, toon ooreenkomste met twee of selfs drie ander volgordes in ander reovirusgene van dieselfde of verskillende klasse (L-, M- en S-klas).

Antczak et al. (1982) het twee faktore gevind wat met die relatiewe frekwensie van translase (kyk ook 2.5.2) van die reovirus-mRNA's korreleer. Dit is bekend dat sommige mRNA-spesies, veral m1, s1 en moontlik ook λ 1, teen 'n heelwat laer frekwensie as die ander mRNA's van reovirus getransleer word (Joklik, 1981). Al die reovirus-mRNA's wat met 'n hoë of medium effektiwiteit getransleer word (sowel as m1), besit die voorkeurvorgorde A/GXXAUGG by die inisiasiekodon, soos deur Kozak (1981) voorgestel. Twee van die drie mRNA's wat met lae effektiwiteit getransleer word, vertoon afwykings in hierdie volgorde (sogenaamde swak inisiasiekodons). Die lang oopleesraam van s1 (wat kodeer vir σ 1) besit 'n pirimidien in posisie -3, terwyl λ 1 'n pirimidien in posisie +4 besit. Tweedens besit slegs die mRNA's wat met 'n hoë frekwensie getransleer word AG-ryke gebiede stroomop en naby die eerste inisiasiekodon in die 3'-rigting. Dit is duidelik dat ander faktore (sover onbekend) ook 'n rol mag speel in die bepaling van die translase-effektiwiteit van die reovirus-mRNA's.

Verdere analyses van die nukleotiedvolgordes het getoon dat die termini van die reovirusgene wel in staat is om deur middel van baseparing met mekaar te reageer. Dit is egter onwaarskynlik dat sodanige interaksies die nodige spesifisiteit besit om die basis te vorm van 'n hoogs selektiewe assosiasieproses. 'n Meganisme waarvolgens een kopie elk van die 10

plusstringe in 'n onvolwasse virale kompleks versamel kan word, kon nie uit die beskikbare gegewens afgelei word nie. Dit wil dus voorkom asof sodanige herkenningevolgordes nie in die terminale gebiede teenwoordig is nie of dat hierdie versameling (Eng.: assembly) van die 10 RNA-spesies ook op RNA-proteïeninteraksies berus (vergelyk ook bespreking van σ NS in 2.3.4). Benewens die terminale tetra- en pentanukleotide besit die eindpunte van die tien reovirusgene geen verdere konsensusvolgordes wat ooreenstemmend genoeg is om as proteïenbindingsetels (ook vir polimerases) beskou te kan word nie.

Die tweede benadering wat vir die opklaring van die totale volgordes van die genoomsegmente gevolg word, behels die vooraf klonering van die gene. Cashdollar en medewerkers (1984) het al tien gene van reovirus serotipe 3 (Dearing-stam) volledig in pBR322-plasmiede gekloneer. Die uiteindelijke doelwit is die plasing van die gene in uitdrukkingsvektore, sodat voldoende hoeveelhede proteïene, vir die bestudering van die struktuur en funksies, verkry kan word. Die nukleotiedvolgordes van al vier die S-klas genoomsegmente van serotipe 3 is reeds volledig bepaal (kyk Joklik, 1985 vir 'n oorsig). In al hierdie gevalle is die eerste AUG-kodon aan die begin van 'n lang oopleesraam wat volgens getuienis van in vitro-translasie vir 'n bekende reovirusproteïen kodeer (McCrae en Joklik, 1978). Verskeie genoomsegmente beskik oor korter oopleesrame. So besit die S2-geen 'n 85 kodon oopleesraam in sy buitengewoon lang 3'-ongetransleerde gebied (Cashdollar et al., 1982), maar geen proteïen wat daarmee korreleer is tot dusver aangetoon nie. In die S1-geen kom daar ook 'n kort oopleesraam van 120 kodons voor waarvan die nukleotiedvolgordes die sintese van 'n klein basiese proteïen voorspel (Nagata et al., 1984; Bassel-Duby et al., 1987; Cashdollar et al., 1985). Cenatiempo et al. (1984) het met behulp van dipeptidsintese aangetoon dat die inisiasiekodon van hierdie oopleesraam wel funksioneel is. In daaropvolgende ondersoeke is bevestig dat 'n proteïen met 'n molekulêre massa van ongeveer 14 000 dalton in geïnfekteerde selle gevorm word en dat hierdie proteïen (σ 1S of σ 1bNS) 'n in vitro-translasieproduk van die s1-mRNA is (Ernst en Shatkin, 1985; Jacobs en Samuel, 1985). Hierdie kleiner proteïen (σ 1S) word in groter hoeveelhede as σ 1 in geïnfekteerde selle gevorm as wat die voorstelling

van Kozak (1981) ten opsigte van "sterk" en "swak" inisiasiekodons bevestig. Die leesraam wat vir σ 1S kodeer, besit 'n sogenaamde "sterk" inisiasiekodon AXXAUGG, terwyl die langer oopleesraam wat vir σ 1 kodeer 'n sogenaamde "swak" inisiasiekodon CXXAUGG besit (Kozak, 1982a). Volgens hierdie model beweeg die meeste 40S-ribosomale subeenhede verby die "swak" inisiasiekodon tot by die "sterk" (tweede) inisiasiekodon waar inisiasie meer effektief is en dus teen 'n relatief hoër frekwensie plaasvind (kyk ook 2.5.1).

Die volledige nukleotiedvolgordes van die genoomsegmente M2 en L2 is ook onlangs opgeklaar (Jayasuriya et al., 1988; Seliger et al., 1987). Die afleiding van die aminosuurvolgordes van die betrokke proteïene is nuttig vir 'n beter begrip van die molekulêre basis van die funksies van hierdie proteïene.

2.2.3 Informasie-inhoud van die tien reovirusgene

In die laat 1960's is daar vasgestel dat die drie klasse van die reovirusgene (L, M en S) vir die drie grootte-klasse reovirusproteïene, te wete λ -, μ - en σ -proteïene, kodeer (Smith et al., 1969). Twee verskillende benaderings is in die laat 1970's gevolg om die informasie-inhoud van die individuele gene te bepaal.

Die eerste benadering behels translasië in 'n in vitro-sisteem. 'n Direkte manier om die informasie-inhoud van die reovirusgene te bepaal, sou wees om die tien individuele mRNA's wat in vitro deur reoviruskernpartikels getranskribeer is te isoleer en in 'n proteïensintesesisteem te transleer. Deur die individuele boodskappers aan die verskillende genoomsegmente te hibridiseer, kan bepaal word van watter geen elke mRNA-spesie getranskribeer is. Dit is egter tegnies moeilik om veral die groter mRNA-spesies in voldoende hoeveelhede te isoleer (Levin en Samuel, 1980). Die benadering wat daarom deur McCrae en Joklik (1978) gevolg is, was om die tien dsRNA-genoomsegmente self te isoleer en die plusstringe as boodskappers aan te wend. Die individuele genoomsegmente is in 90% dimetiëlsulfoksied (DMSO) by 50°C gedenatureer en dan in 'n selvrye koringkiemsisteem verdun waar die plusstringe getransleer is.

Sodoende kon die translasiëprodukte aan spesifieke gene toegeken word. Renaturering het onder die spesifieke toestande stadig genoeg plaasgevind, sodat selfs die λ -klas mRNA's tot volledige proteïene getransleer is. Karakterisering van die translasiëprodukte is op grond van ko-migrering met outentieke reovirusproteïene gedoen. Die identifikasie van die proteïene is deur middel van peptiedkartering na gedeeltelike vertering met V8-protease bevestig.

Die spesifisiteit van hierdie protease van *Staphylococcus aureus* is sodanig dat die selektiewe proteolise van die meeste proteïene 'n beperkte aantal peptiedfragmente oplewer (Houmard en Drapeau, 1972). Hoewel die ensiem die hidrolise van peptiedbande waarin dikarboksiliese aminosure betrokke is, kataliseer, word glutamoïelbindings by voorkeur gesplyt. Boonop is glutamoïelbindings waarin aminosure met relatief groot hidrofobe sykettings betrokke is in 'n mate weerstandbiedend teen hidrolise in die teenwoordigheid van V8-protease. Hierdie kenmerke van die ensiem maak dit 'n geskikte protease vir peptiedkartering (Cleveland et al., 1977). Levin en Samuel (1980) het ook dieselfde ensiem benut vir die finale karakterisering van die spesifieke translasiëprodukte van die individuele s-klas mRNA's van reovirus. Sodoende kon Levin en Samuel (1980) die koderingstoekennings van die vier s-klas mRNA's van reovirus bepaal. Hulle resultate het dié van McCrae en Joklik (1978) bevestig.

In die ondersoek van McCrae en Joklik (1978) is ook vasgestel dat daar nie noodwendig 'n direkte verband tussen die relatiewe grootte van die genoomsegment en die proteïen bestaan nie. Die benadering van McCrae en Joklik (1978) om die gedenatureerde dsRNA as bron van boodskappers te gebruik, het die grondslag gevorm vir een van die ondersoeke in hierdie studie (kyk 2.4).

Mustoe en medewerkers (1978) het dieselfde probleem met 'n totaal ander benadering bestudeer. Soos reeds genoem, bestaan daar drie serotipes van die soogdierreovirus, naamlik serotipes 1, 2 en 3. Daar bestaan geringe verskille in die elektroforetiese mobiliteit van beide die dsRNA-genoomsegmente en die ooreenstemmende proteïene van die drie verskillende serotipes. Die gene van hierdie drie serotipes ondergaan

hersortering in gemengde geïnfekteerde selkulture. Dit is dus moontlik om geselekteerde hergesorteerde klone na gelyktydige infeksie deur twee serotipes elektroforeties te analiseer. Deur 'n vergelyking van die elektroforeseprofile van die RNA- en proteïenspesies kan bepaal word watter proteïenveranderings ooreenkom met spesifieke geenveranderings. Hierdie benadering word dikwels in die literatuur as intertipiese genoomsegmenthersorteringsanalise beskryf. Sulke nuutgevormde virusse met genetiese materiaal wat van twee serotipes afkomstig is, word rekombinante reovirus genoem (Sharpe en Fields, 1982). Die geen-proteïentoeënnings wat met behulp van hierdie metode bepaal is, stem ooreen met die toeënnings wat met die direkte in vitro-translasiemetode van McCrae en Joklik (1978) verkry is. Gevolglik kan die geen-proteïentoeënnings as finaal beskou word. Die nomenklatuur wat vir die reovirusproteïene volgens die voorstelling van McCrae en Joklik (1978) vasgestel is, word in hierdie verhandeling gebruik.

In meer onlangse ondersoeke (Ernst en Shatkin, 1985; Jacobs en Samuel, 1985) is met behulp van translasie-eksperimente bevestig dat die S1-geen, behalwe vir $\sigma 1$, ook vir 'n kleiner proteïen ($\sigma 1S$ of $\sigma 1bNS$) met 'n molekulêre massa van ongeveer 14 000 dalton, kodeer. 'n Opsomming van die informasie-inhoud van die gene van reovirus tipe 3 word in tabel 2.1 getoon.

TABEL 2.1

EIENSKAPPE VAN REOVIRUSPROTEÏENE (Saamgestel uit Zarbl en Millward (1983) en Joklik (1985))

Genoomsegmente	Lengte (nukleotiede)	Proteïen	Mr	Aantal mole= kules per viruspartikel	Posisie in viruspartikel	Funksionele rol	Verwysings= nommer *
L1	~3825	λ3	135 000	≤12	Kern	Virale transkriptase (spesifiseer pH-optimum)	1
L2	~3825	λ2	140 000	~90	Kernprojeksie ("spike")	Guanilietransferase	2&3
L3	~3825	λ1	155 000	~105	Kern		3
M1	~2300	μ2	70 000	≤12	Kern		
M2	~2180	μ1	80 000	~20	Kern		
		μ1C	72 000	~550	Buitekapsied	1. Regulering van virale transkriptase en weer= stand van virus teen proteolitiese vertering	1
						2. Weefsel tropisme en virulensie	4
M3	~2240	μNS	75 000		Nie-strukturele proteïen	Morfogenese	5
S1	1436	σ1	48 000	~ 24	Buitekapsied	1. Selhegtingsproteïen, seltropisme	6
						2. Virale heemagglutininien	7
						3. Produksie van tipe-spesifieke neutrali= seringsantiliggame	8
						4. Assosiasie van virion met mikrotubules	9
						5. Opwekking van gasheer immuunrespons en virulensie	4
						6. Inhibisie van gasheer DNA-replisering (?)	10
		σ1S(σ1bNS)	14 000		Nie-strukturele proteïen	Inhibisie van gasheer DNA-replisering (?)	10&5
S2	1329	σ2	38 000	~200	Kern		
S3	1198	σNS	41 000		Nie-strukturele proteïen	1. Morfogenese (bind esRNA)	11&5
						2. Poli(C)-afhanklike RNA-polimerase	12
S4	1196	σ3	41 000	~900	Buitekapsied	1. Inhibisie van gasheer RNA- en proteïensin= tese, stimuleer virale proteïensintese	13&14
						2. Bind dsRNA en morfogenese (?)	11

Verwysings: 1. Drayna en Fields, 1982a; 2. Shatkin en Kozak, 1983; 3. Cleveland *et al.*, 1986; 4. Fields en Greene, 1982; 5. Joklik, 1985; 6. Weiner *et al.*, 1977 en Lee *et al.*, 1981b; 7. Weiner *et al.*, 1978; 8. Weiner en Fields, 1977; 9. Sharpe *et al.*, 1982; 10. Sharpe en Fields, 1981; 11. Huismans en Joklik, 1976; 12. Gomatos *et al.*, 1980; 13. Sharpe en Fields, 1982; 14. Lemieux *et al.*, 1987.

* Die verwysings geld slegs vir die funksionele rol van die proteïene.

2.3 PROTEÏENE VAN REOVIRUS

2.3.1 Inleiding

Die proteïensamestelling van reoviruspartikels is eerste deur Loh en Shatkin (1968) en Smith et al. (1969) ondersoek. Die nomenklatuur vir reovirusproteïene (λ -, μ - en σ -klas) is ook deur laasgenoemde groep ontwikkel en word algemeen in die vakliteratuur oor reovirus gebruik. Die belangrikste eienskappe van die reovirusproteïene (soos tans bekend) word ook in tabel 2.1 weergegee.

Ten minste drie van die reovirusproteïene ondergaan post-translasionele modifikasie in die vorm van ensimatiese splyting. 'n Klein gedeelte van $\lambda 2$ word na $\lambda 2C$ (ongeveer 120 000 dalton) gesplyt en ongeveer die helfte van μNS word na μNSC (ongeveer 70 000 dalton) gesplyt (Lee et al., 1981a). Die funksies van hierdie twee splytingsprodukte wat in geïnfekteerde selle met behulp van antiliggamete opgespoor is, is nog nie bekend nie.

Zweerink en Joklik (1970) het lankal reeds vasgestel dat die strukturele proteïene, nou genoem $\mu 1C$, 'n ensimatiese splytingsproduk van $\mu 1$ is. Die grootste gedeelte van die primêre geenproduk $\mu 1$ word blykbaar deur 'n sellulêre protease post-translasioneel na $\mu 1C$ gesplyt. Hierdie splyting is essensieel vir die samestelling van funksionele reovirions, aangesien $\mu 1C$ deel vorm van die buitekapsel van die virus. Verdere splyting van $\mu 1C$ vind tydens aktivering van virale transkripsie plaas (2.4).

Reoviruspartikels is uit nege verskillende proteïenspesies saamgestel wat elk in unieke hoeveelhede voorkom (kyk tabel 2.1). Die proteïene vorm diskrete morfologiese subeenhede of kapsomere wat in twee proteïenkapsels gerangskik is. Die partikel sonder 'n buitekapsel staan as 'n kernpartikel bekend. Die buitekapsel is uit drie proteïenspesies saamgestel. Die hoofkomponente $\mu 1C$ (splytingsproduk van $\mu 1$) en $\sigma 3$ maak gesamentlik meer as 60% van die massa van die reoviruspartikel uit, terwyl $\sigma 1$ in kleiner hoeveelhede voorkom (ongeveer 24 molekules per partikel) (Smith et al., 1969). Die kernpartikel bevat ses proteïenspesies en maak

omtrent een derde van die reoviruspartikel se proteïenmassa uit. Daar is drie hoofkomponente, te wete $\lambda 1$, $\lambda 2$ en $\sigma 2$, terwyl $\lambda 3$, $\mu 1$ en $\mu 2$ in kleiner hoeveelhede teenwoordig is. Die res van die reovirusproteïene is nie-strukturele proteïene, naamlik μNS (en sy splytingsproduk μNSC), σNS en $\sigma 1bNS$ ($\sigma 1S$). Tot dusver is reovirusproteïene hoofsaaklik deur middel van eendimensionele gelelektroforese gekarakteriseer. Ewing et al. (1985) het meer onlangs met behulp van tweedimensionele gelelektroforese aangetoon dat die meeste strukturele reovirusproteïene in 'n reeks subspesies met verskillende isoëlektriese punte geskei kan word. Hieruit kan afgelei word dat daardie reovirusproteïene post-translasioneel gemodifiseer word, maar die presiese aard en betekenis van hierdie verandering is nog onbekend. In die lig van laasgenoemde word hierdie modifikasies nie by die bespreking van die proteïene wat hierna volg in ag geneem nie. Sommige van die strukturele, antigeniese en ensimatiese funksies van reovirusproteïene sal nou bespreek word.

2.3.2 Die λ -proteïene

McCrae en Joklik (1978) kon met hulle koderingstoekennings aantoon dat die genoomsegmente L1, L2 en L3 onderskeidelik vir die proteïene $\lambda 3$, $\lambda 2$ en $\lambda 1$ kodeer (kyk tabel 2.1). Al drie die λ -proteïene is komponente van die reoviruskernpartikels. Die proteïene $\lambda 1$ en $\lambda 2$ is die hoofkomponente, terwyl baie min van $\lambda 3$ voorkom (ongeveer 12 molekules per partikel). Oor die funksie van $\lambda 1$ is min bekend, behalwe dat dit oënskynlik die buite-oppervlak van die kernpartikel vorm (White en Zweerink, 1976). Ralph et al. (1980) het aangetoon dat elke projeksie (Eng.: spike) van die kernpartikels 'n pentameer van $\lambda 2$ is. Volgens Gillies et al. (1971) word die enkelstringtranskripte wat vanaf die reovirusgene in die kernpartikels gesintetiseer word deur bogenoemde projeksies vrygestel. Aangesien die hoof groepspesifieke neutraliserende antiliggamte in reovirusantisera teen $\lambda 2$ gerig is, moet aangeneem word dat die kernprojeksies deur die buitekapsel na die oppervlak van die viruspartikel strek (Hayes et al., 1981). Die $\lambda 3$ -proteïen mag moontlik 'n komponent van die reovirustranskriptase wees, omdat dit die pH-optimum van die transkriptase beïnvloed (Drayna en Fields, 1982a). Tans bestaan daar nog nie oortuigende gegewens oor die identiteit van

al die mRNA-blokkeringsensieme in die kernpartikels nie. Twee groepe het onlangs aangetoon dat die inkubasie van reoviruskernpartikels saam met [α - 32 P]-GTP die oordraging van [32 P]-GMP na 'n virale proteïen tot gevolg het. Die GMP-groep is kovalent aan die proteïen deur middel van 'n fosfo-amiedbinding gekoppel. Die virale proteïen is deur direkte biochemiese analise as $\lambda 2$ geïdentifiseer (Shatkin en Kozak, 1983; Cleveland et al., 1986).

2.3.3 Die μ -proteïene.

Proteïene $\mu 1$ en $\mu 1C$

Die M2-genoomsegment kodeer vir die primêre geenproduk $\mu 1$ (McCrae en Joklik, 1978). Die meeste van hierdie proteïen word naby die N-terminus gesplyt om $\mu 1C$ te lewer (Zweerink en Joklik, 1970; Jayasuriya et al., 1988). Die $\mu 1$ -proteïen vorm deel van die kernpartikel, maar die presiese plek waar die proteïen voorkom en sy funksie is nog onbekend. Die $\mu 1C$ -proteïen is die hoofkomponent van die buitenste proteïenkapsel, moontlik met $\sigma 3$ gebind in die vorm van kapsomere met die samestelling $1n \mu 1C:2n \sigma 3$ (met die afgeleide waarde van n gelyk aan twee) (Smith et al., 1969; Joklik, 1983). Onlangs is 'n nuwe bepaling van die relatiewe aantal molekules van $\mu 1C$ en $\sigma 3$ per partikel gedoen wat dui op 'n verhouding van een (Jayasuriya et al., 1988). Hierdie data stel dus voor dat gelyke hoeveelhede van die twee proteïene in die reovirions teenwoordig is. Hierdie bepalings is meer akkuraat omdat die afgeleide primêre struktuur wat nou bekend is in ag geneem is by die interpretasie van die resultate. Die twee proteïene $\mu 1C$ en $\sigma 3$ besit baie hoë onderlinge affiniteit sodat hulle selfs in die sitoplasma van geïnfekteerde selle as komplekse gevind word (Huisman en Joklik, 1976). Dit is verder bevestig deurdat sekere monoklonale antiligggame teen $\mu 1C$ of $\sigma 3$ nie alleen met die antigeniese proteïen reageer nie, maar met beide $\mu 1C$ en $\sigma 3$ (Lee et al., 1981a). Lee en medewerkers het verder voorgestel dat $\mu 1$ na $\mu 1C$ gesplyt word gedurende kompleksvorming met $\sigma 3$. Dit is interessant dat nie een van die monoklonale antiligggame teen $\mu 1$ of $\mu 1C$ wat komponente van die buitenste kapsel is infektiwiteit neutraliseer of heemagglutineringsinhibeer nie (Hayes et al., 1981).

Aangesien $\mu 1C$ een van die belangrikste reovirusoppervlaktekomponente is, speel die proteïen 'n belangrike rol in die wyse waarop reoviruspartikels met die onmiddellike milieu waarin dit voorkom, reageer. Drayna en Fields (1982b) het met behulp van rekombinante reovirusse (2.2.3) bevind dat sensitiviteit vir etanol en fenol deur die M2-genoomsegment (waarskynlik $\mu 1C$) beheer word. Verder is $\mu 1C$ baie nou by die aktivering van die transkripsieproses van reovirus betrokke. Hierdie proses sluit onder andere proteolitiese afbraak van $\mu 1C$ in. Deur gebruik te maak van die benadering van Mustoe et al. (1978) (kyk 2.2.3) is vasgestel dat die differensiële sensitiviteit vir proteolitiese afbraak by die verskillende serotipes herleibaar is na die M2-genoomsegment (Drayna en Fields, 1982a).

Reoviruspatogenisiteit word ook deur $\mu 1C$ beïnvloed (Fields en Greene, 1982). Die patogenisiteit hou weer verband met reovirusvirulensie en weefsel tropisme (kyk Sharpe en Fields, 1983 vir 'n oorsig).

Proteïen $\mu 2$

Baie min is bekend ten opsigte van die funksie van die kleinste μ -klas proteïen $\mu 2$. McCrae en Joklik (1978) het aangetoon dat die M1-genoomsegment vir $\mu 2$ kodeer. Hierdie komponent van die kernpartikel kom in klein hoeveelhede voor, ongeveer 12 per viruspartikel. Net soos by $\lambda 3$ en $\mu 1$ is dit nie bekend of $\mu 2$ 'n komponent van die proteïenkapsel van die kernpartikel is en of dit vry in die sentrale ruimte binne-in die kernpartikel gelokaliseer is nie. Hierdie drie proteïene mag moontlik direk of indirek verantwoordelik wees vir sekere van die ensimatiese aktiwiteite waarvoor die kernpartikels beskik (2.3.5) of hulle mag betrokke wees by morfogenese (2.6) (Joklik, 1981).

Proteïen μNS

Die M3-genoomsegment kodeer vir die grootste nie-strukturele reovirusproteïen μNS (McCrae en Joklik, 1978). Dit is opvallend dat groot hoeveelhede van hierdie nie-strukturele proteïen in geïnfekteerde selle

gesintetiseer word. Geïnfekteerde selle bevat omtrent gelyke hoeveelhede van μ NS en die ensimatiese splytingsproduk μ NSC (Lee et al., 1981a).

Die funksies van beide hierdie proteïene (μ NS en μ NSC) is nog onbekend maar onlangse resultate dui daarop dat μ NS in die vroegste stappe van morfogenese betrokke mag wees (kyk 2.6). Dit wil voorkom asof μ NS affiniteit vir σ NS besit, omdat monoklonale antiligggame teen enige van die twee proteïene gewoonlik ook 'n klein hoeveelheid van die ander proteïen presipiteer (Lee et al., 1981a).

2.3.4 Die σ -proteïene

Proteïen σ 1

Die S1-geen kodeer vir die grootste σ -proteïen σ 1 (McCrae en Joklik, 1978). Hierdie komponent van die buitenste kapsel is slegs in baie klein hoeveelhede teenwoordig (Smith et al., 1969). Tog is die biologiese belangrikheid van σ 1 bekend, aangesien σ 1 in 'n groot mate betrokke is by die beheer van die interaksie tussen reoviruspartikels en hulle gasheerselle (Fields en Greene, 1982).

Lee et al. (1981b) het met behulp van antiligggame aangetoon dat σ 1 op die oppervlakte van die reoviruspartikel, waar die projeksies van die kernpartikels deur die buitenste kapsel steek, geleë is. Ten minste twee subeenhede van σ 1 is blykbaar met elk van hierdie strukture geassosieer.

Die basevolgorde van die S1-geen segmente is bekend (kyk 2.2.1). Die afgeleide aminosuurvolgorde van σ 1 besit 'n heptapeptiedherhalingsvolgorde tussen aminosure 28 en 158 waarin die eerste en vierde aminosure hidrofobies is (Bassel-Duby et al., 1985). Dit is verder opvallend dat geen prolien of aromatiese aminosure in hierdie gebied van heptapeptiedherhalingsvolgordes voorkom nie. Hierdie eienskappe van die gebied is tipies van 'n α -heliese superheliksstruktuur (McLachlan en Stewart, 1975). In die lig van die betrokkenheid van die σ 1-proteïen by virus-gasheerinteraksies het Bassel-Duby en medewerkers (1985) 'n model voorgestel om die struktuur-funksieverwantskap van

hierdie virusproteïen ($\sigma 1$) voor te stel. Met behulp van rekenaaranalises is die sekondêre struktuur van $\sigma 1$ vanuit die afgeleide primêre struktuur voorspel. Hierdie groep postuleer dan dat die N-terminale domein van $\sigma 1$ in die vorm van 'n α -heliks bestaan en dat die α -helikse van minstens twee $\sigma 1$ -proteïenmolekules om mekaar gedraai is om 'n spoelagtige (Eng.: coiled) superheliese struktuur te vorm. Die opgedraaide heliksgebiede is in die reovirusprojeksies ingebed en dien as anker terwyl die C-terminale domein van $\sigma 1$ in die vorm van 'n globulêre struktuur na die buitekant van die viruspartikel gerig is. Die globulêre gebied kan moontlik as die selhegtingsetel funksioneer. Heel onlangse biochemiese waarnemings van Bassel-Duby et al. (1987) toon dat die funksionele vorm van die $\sigma 1$ -proteïen 'n multimeer is, waarskynlik 'n tetrameer. 'n Meer definitiewe beskrywing van die driedimensionele struktuur van die $\sigma 1$ -multimeer benodig verdere ondersoek.

Soos reeds genoem, speel $\sigma 1$ 'n belangrike rol in die interaksies van die reoviruspartikels met gasheerselle. Eerstens is $\sigma 1$ die selhegtingsproteïen en dus ook die heemagglutinin (Lee et al., 1981b; Weiner et al., 1978). Hierdie hegting van die $\sigma 1$ -proteïene vind aan spesifieke selreseptore plaas (Paul en Lee, 1987). Tweedens is $\sigma 1$ verantwoordelik vir die vorming van neutraliserende antiliggamete wat minimaal tussen serotipes kruisreageer (Weiner en Fields, 1977). Studies met behulp van monoklonale antiliggamete het aangetoon dat die gebied op $\sigma 1$ met laasgenoemde funksie duidelik verskil van die gebied wat aan die seloppervlakreseptore bind (Burstin et al., 1982; Hayes et al., 1981). Derdens vind assosiasie van reovirus met sellulêre mikrotubules deur middel van $\sigma 1$ plaas (Sharpe et al., 1982). Deur gebruik te maak van delesiemutante van die S1-geen het Nagata et al. (1987) onlangs aangetoon dat die funksionele domeine van $\sigma 1$ in verskillende gebiede van die proteïen teenwoordig is.

As die selhegtingsorgaan beheer $\sigma 1$ die integrasie van reovirus met selle van die immuunsisteem en spesifiseer ook sel- en weefsel-tropisme (Fields en Greene, 1982). Proteïen $\sigma 1$ is ook saam met $\mu 1C$ betrokke by virulensie (kyk Sharpe en Fields, 1983 vir 'n oorsig).

Proteïen $\sigma 1S$ ($\sigma 1bNS$)

Die kort ooplesraam in die S1-genoomsegment kodeer vir hierdie klein proteïen (Ernst en Shatkin, 1985; Jacobs en Samuel, 1985). Sharpe en Fields (1981) het aangetoon dat die S1-genoomsegment die tempo beheer waarteen reovirusinfeksie DNA-sintese van die gasheer inhibeer. Een van die twee geenprodukte $\sigma 1$ of $\sigma 1S$ mag hierby betrokke wees. Omdat $\sigma 1$ gewoonlik met die seloppervlak reageer en $\sigma 1S$ 'n klein basiese proteïen is (Cashdollar et al., 1985) wat makliker na die nukleus sal kan beweeg, is $\sigma 1S$ die meer waarskynlike kandidaat om hierdie funksie te vervul.

Die meganisme waardeur reovirus die inisiasie van sellulêre DNA-replikasie inhibeer, is nog nie duidelik nie. Roner en Cox (1985) het onlangs voorgestel dat die inhibisie nie is as gevolg van 'n permanente verandering in die replikasiekompleks nie, maar omkeerbaar is deur daardie kompleks te skei van die faktore wat uniek is aan die geïnfekteerde sel.

Proteïen $\sigma 2$

Die S2-genoomsegment kodeer vir hierdie komponent van die kernpartikel (McCrae en Joklik, 1978). Daar is ongeveer 200 $\sigma 2$ -proteïenmolekules in elke reoviruspartikel (Smith et al., 1969). Aangesien $\sigma 2$ minder geredelik as $\lambda 1$ geïdoneer word in die teenwoordigheid van laktoperoksidase (White en Zweerink, 1976) wil dit voorkom asof $\sigma 2$ eerder op die binne- as buite-oppervlak van die kernpartikel gelokaliseer is. Cashdollar en medewerkers (1982) het reeds die S2-geen gekloneer en die volgorde bepaal, maar oor die funksies van die betrokke proteïen is nog niks bekend nie. Proteïen $\sigma 2$ mag wel 'n indirekte rol by mRNA-sintese speel (kyk 2.3.5 vir die bespreking van ensiemaktiwiteite).

Proteïen σNS

Die S3-genoomsegment kodeer vir hierdie nie-strukturele reovirusproteïen (McCrae en Joklik, 1978). Proteïen σNS word net soos die ander nie-strukturele proteïene (μNS en $\sigma 1bNS$) in opvallende groot hoeveelhede

in geïnfekteerde selle gesintetiseer. Huismans en Joklik (1976) het voorgestel dat σ NS hoë affiniteit vir esRNA besit en in geïnfekteerde selle in assosiasie met sellulêre of virale RNA mag voorkom. Gomatos et al. (1980) het bevind dat partikels met poli(C)-afhanklike RNA-polimerase-aktiwiteit in reovirusgeïnfekteerde selle akkumuleer. Die enigste proteïen in hierdie kompleks is σ NS. Daar bestaan wel 'n mate van spesifisiteit in die binding van hierdie partikels aan poli(C) of reovirus-esRNA (Stamatos en Gomatos, 1982). Meer onlangs is monoklonale antiligggame teen reovirusproteïene gebruik om onvolledige reoviruspartikels uit geïnfekteerde selle te isoleer. Die vroegste komplekse wat aangetoon kon word, het al 10 spesies plusstring-RNA saam met die proteïene μ NS en σ NS bevat (Joklik, 1985). Dit mag dus wees dat σ NS 'n rol speel in die versameling van reovirusplusstringe as een van die eerste stappe tydens morfogenese. Die moontlike betrokkenheid van σ NS in die beheer van die translase van reovirus-mRNA is egter nie uitgesluit nie.

Proteïen σ 3

Die kleinste genoomsegment S4 kodeer vir die σ 3-proteïen (McCrae en Joklik, 1978). Hierdie proteïen (σ 3) is die ander hoofkomponent van die buitekapsel van die reoviruspartikel. Proteïen σ 3 besit hoë affiniteit vir μ 1C, waarmee dit komplekse vorm (soos reeds bespreek by proteïen μ 1C). Hoewel die twee proteïene sterk met mekaar geassosieer is, is hulle tog by afsonderlike funksies betrokke. In teenstelling met μ 1C lei antiligggame teen σ 3 tot neutralisering van infektiwiteit en inhibisie van heemagglutinerings (Hayes et al., 1981). Wanneer die buitekapsel van reoviruspartikels in teenwoordigheid van chimotripsien afgebreek word, is bevind dat σ 3 eers van die viruspartikels verwyder word voordat μ 1C afgebreek word (Joklik, 1972). Laasgenoemde gebeure stem ooreen met die veranderings wat met reoviruspartikels na infeksie plaasvind (Silverstein et al., 1972).

Huismans en Joklik (1976) het vasgestel dat σ 3 sterk affiniteit vir dsRNA besit. Die betekenis van hierdie eienskap, wat merkwaardig is vir 'n komponent van die buitekapsel, is nog nie bekend nie. Proteïen σ 3 mag

moontlik 'n rol tydens morfogenese speel. Sharpe en Fields (1982) het vasgestel dat reovirus tipe 2 die RNA- en proteïensintese van L-fibroblast selle vinniger en meer effektief inhibeer as tipe 3. Deur gebruik te maak van rekombinante reovirusse (2.2.3) is vasgestel dat die S4-genoomsegment verantwoordelik is vir bogenoemde inhibisie. Hierdie genoomsegment kodeer vir $\sigma 3$, waaruit dus voorgestel word dat $\sigma 3$ betrokke is by die inhibisie van RNA- en proteïensintese van die gasheersel. Die meganisme waarvolgens $\sigma 3$ hierdie funksies mag vervul, is tans nog onbekend. Lemieux et al. (1987) het onlangs die betrokkenheid van $\sigma 3$ by die stimulering van die translase van die "laat" virale mRNA (sonder cap-struktuur) aangetoon. Die resultate van hierdie groep wil daarop dui dat $\sigma 3$ 'n rol speel as inisiasiefaktor van "laat" virale mRNA. Daar is aanduidings dat hierdie proteïen nie direk betrokke is by die inhibisie van die translase van gasheer-mRNA nie.

2.3.5 Ensiemaktiwiteite van reovirus

In 1968 is ensiemaktiwiteite wat met reoviruspartikels geassosieer is die eerste keer waargeneem. Hierdie ensiemaktiwiteite speel 'n belangrike rol in die vermeerderingsiklus van reovirus. In hierdie gedeelte van die literatuuroorsig word die moontlike betrokkenheid van reovirusproteïene by hierdie ensiemaktiwiteite bespreek.

Borsa en Graham (1968) en Shatkin en Sipe (1968) het onafhanklik van mekaar die eerste reovirusgeassosieerde ensiem, naamlik 'n transkriptase, in reoviruskernpartikels waargeneem. Die funksie van hierdie ensiem is die transkripsie van die virusgenoom (dsRNA) na boodskapper-RNA. Daarom kan die ensiem ook gedefinieer word as 'n dubbelstringafhanklike $\rightarrow$ enkelstring(ds $\rightarrow$ es)RNA-polimerase of "transkriptase". Hierna het Kapuler et al. (1970) en Borsa et al. (1970) die teenwoordigheid van nukleosiedtrifosfaatfosfohidrolase-aktiwiteit in reoviruskernpartikels aangetoon. Teen 1975 het Furuichi en Shatkin en hulle medewerkers vasgestel dat terminale guanilietransferase en die ensieme wat die cap-guanien en die ribose van die oorspronklike 5'-terminale nukleotied metileer ook in die virale kernpartikels teenwoordig is (Shatkin, 1974; Furuichi et al., 1975). Gesamentlik vorm hierdie ensieme 'n meganisme

waardeur die tien gene tot tien mRNA-spesies met cap-strukture transkribeerbaar is.

Yamakawa et al. (1982) het aangetoon dat reovirions (volwasse partikels) wel oor die vermoë beskik om die sintese van G-getermineerde oligonukleotiede te kataliseer. Hoewel die meeste oligonukleotiede ongeblokkeer is, is die vier blokkeringsensieme wel aktief in reoviruspartikels maar teen relatief lae vlakke. In die kernpartikels is hierdie aktiwiteite nie alleen hoër nie, maar word volledige transkripte (met ander woorde mRNA's) gesintetiseer. Nogtans word oligonukleotiede (onvoltooide mRNA) steeds in 'n groot mate deur kernpartikels gevorm (Zarbl et al., 1980a). Die hooftrekke van die reovirustranskripsieproses sal verder in 2.4 bespreek word.

Die probleme by die bestudering van hierdie ensiemaktiwiteite word deur die volgende stelling van Joklik (1983) beklemtoon:

"Nothing is known concerning the nature of the transcriptase or of the four capping-function enzymes, since all enzyme activities are lost when cores or reovirus particles are disrupted."

Joklik (1983) stel dus voor dat die virale ensieme komponente van die kernkapsel is en dat die gene by die katalitiese setels van die transkriptase op die binne-oppervlak van die kernpartikels verby beweeg. Hierdie setels is moontlik by die basis van die projeksies gesetel, sodat die dubbelstringtemplate binne-in die kernpartikels bly, terwyl die transkripte deur die projeksies na buite beweeg. Indien hierdie voorstelling geld, is dit moontlik dat gebiede op beide $\lambda 2$ en naasliggende proteïenmolekules ($\lambda 1$ en $\sigma 2$) in die katalitiese setel van die transkriptase betrokke is. Die blokkeringsfunksies behoort dan op $\lambda 2$ in die projeksiekanale geleë te wees. Morgan en Kingsbury (1980) het dan ook waargeneem dat wanneer kernpartikels dsRNA in die teenwoordigheid van radioaktiefgemerkte piridoksalfosfaat transkribeer, beide $\lambda 1$ en $\lambda 2$ gemerk word en al vier blokkeringsensieme geïnhibeer word. Dit dui op die moontlikheid dat transkripsie en modifikasie van mRNA deur 'n topografies verwante groep ensieme bewerkstellig word. 'n Alternatiewe voorstelling

is dat verandering van $\lambda 2$ deur binding aan piridoksalfosfaat lei tot blokkering van die RNA-kanale, wat lei tot terugvoerinhibisie van al die mRNA-vormende aktiwiteite. Gegewens dat ander proteïene ook op 'n indirekte manier by virale mRNA-sintese betrokke mag wees is reeds gepubliseer. Cross en Fields (1972) het byvoorbeeld aangetoon dat infeksie van selle met reovirus-mutante, met veranderings in $\sigma 2$ of $\lambda 3$, lei tot die sintese van verlaagde hoeveelhede virale RNA by nie-permissiewe temperature. Aangesien die funksies van die proteïene wat in klein hoeveelhede in die kernpartikel voorkom, naamlik $\lambda 3$, $\mu 1$ en $\mu 2$, nog onbekend is, mag hulle betrokke wees by transkripsie en/of blokkering van die mRNA. In aansluiting hierby het Drayna en Fields (1982a) reeds aangetoon dat die pH-optimum van die transkriptase deur die L1-geen wat vir $\lambda 3$ kodeer, gespesifiseer word. Powell et al. (1984) het met behulp van fotochemiese kruisbinding vasgestel dat die proteïen wat aan RNA gekruisbind word tydens die verlenging van RNA $\lambda 1$ is. Proteïen $\lambda 1$ is dus moontlik die transkriptase of vorm 'n deel daarvan. Daar is reeds melding gemaak (2.3.2) van die twee groepe navorsers wat aangetoon het dat die guanilielgroep vanaf GTP aan 'n kernproteïen bind. Dit impliseer dat die proteïen guanilieltransferase mag wees. Hierdie proteïen is as $\lambda 2$ geïdentifiseer (Shatkin en Kozak, 1983; Cleveland et al., 1986). Die bevinding van Yamakawa et al. (1982) dat kernpartikels die guanilering en metilering van eksogene mRNA-molekules kan kataliseer, vermeerder die vrae betreffende die presiese lokalisering van hierdie ensiemaktiwiteite.

Die onaktiewe transkriptase in intakte virions moet deur 'n aktiveringsprosedure geaktiveer word (Borsa en Graham, 1968; Shatkin en Sipe, 1968). Proteolise van die virion is betrokke in 'n eerste stap in beide in vitro (Joklik, 1972) en geïnfekteerde selle (Silverstein et al., 1972). In hierdie stap verloor die virions die $\sigma 3$ - en $\sigma 1$ -proteïene, terwyl die $\mu 1C$ -proteïene tot δ -proteïene (~60 000 dalton) gesplyt word. Die partikel wat na hierdie eerste stap gevorm is, besit steeds infektiwiteit, maar nog nie verhoogde transkripsie-aktiwiteit nie en word 'n intermediêre subvirale partikel (ISVP) genoem. Die tweede stap van aktivering behels 'n meganisme (waarskynlik ensimaties) wat endogeen aan die SVP is en deur fisiologiese konsentrasie van K^+ of botsings van

ISVP's geïnisieer kan word. Verdere proteolise van so 'n geaktiveerde subvirale partikel (SVP) lei tot vrystelling van die δ -polipeptied sodat slegs die kernpartikel wat steeds transkripsie-aktiwiteit besit, ontstaan. (Borsa et al., 1981). Ewing et al. (1985) het met behulp van tweedimensionele elektroforese aangetoon dat die aktivering van die transkriptasefunksie in die tweede stap met 'n verandering in die elektroforetiese gedrag van een polipeptiedkomponent ($\delta 1$) korreleer. Astell et al. (1972) het aangetoon dat reassosiasie van $\sigma 3$ met moeder-SVP's in vitro lei tot inaktivering van die transkriptase-aktiwiteit. Die betrokkenheid van $\mu 1C$ en $\sigma 3$ by die regulering van die aktiwiteit van die virale transkriptase word uit hierdie waarnemings afgelei (kyk ook bespreking by 2.3 oor proteïene $\mu 1C$ en $\sigma 3$).

Intakte viruspartikels en infektiewe ISVP's beskik verder oor 'n oligo(A)-polimerase-aktiwiteit (Stoltzfus et al., 1974). Silverstein et al. (1974) het vasgestel dat oligo-adenilate gedurende die laaste stadiums van morfogenese in nassente viruspartikels gesintetiseer word. Hy het voorgestel dat die oligo(A)-polimerase-aktiwiteit moontlik 'n alternatiewe aktiwiteit van die virale transkriptase is wat deur die hegting van buitekapselproteïene gereguleer word.

Biochemiese, strukturele en genetiese waarnemings dui daarop dat die enkelstring-RNA wat vanaf die moeder-SVP's getranskribeer word in een of ander vorm van provirion wat replikase-aktiwiteit vertoon, afgesonder word (sien Zarbl en Millward, 1983 vir 'n oorsig). Hierdie replikase-aktiwiteit, streng gesproke bekend as 'n esRNA-afhanklike dsRNA-polimerase (es $\rightarrow$ dsRNA-polimerase), is verantwoordelik vir die sintese van minusstringe op die plusstringtemplate wat dan die nuwe dsRNA-genoomsegmente van die nageslagreovirus vorm (Zweerink et al., 1972). Die replikasepartikels sintetiseer dsRNA-segmente opeenvolgend in partikels met toenemende sedimentasiekoëffisiënte (Zweerink, 1974). Die klein-, medium- en grootklas-genoomsegmente word in partikels wat respektiewelik by ongeveer 250S, 450S en 550S sedimenteer, gesintetiseer. Waarskynlik vind replisering en morfogenese gelyktydig plaas deur die toevoeging van proteïene en moontlike herrangskikking as gevolg van veranderinge in die RNA-proteïeninteraksies binne-in die

partikels (Zweerink et al., 1972). Oor die skeiding van replikase- en transkriptase-aktiwiteite bestaan daar nog nie absolute duidelikheid nie. Wanneer minusstringsintese voltooi is, mag die voltooide dsRNA onmiddellik as 'n templaar vir mRNA-sintese benut word.

Morgan en Zweerink (1975) het aangetoon dat die replikase- en transkriptase-aktiwiteit van reovirus moontlik met afsonderlike partikels geassosieer mag wees. Die replikasepartikels met 'n sedimentasiekoëffisiënt van 180S bevat die volgende kernpartikelproteïene: $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\mu 1$ en $\sigma 2$. Die teenwoordigheid van die buitekapselproteïene $\mu 1C$, $\sigma 1$ en $\sigma 3$ is ook aangetoon, maar die relatiewe hoeveelhede het verskil van dié hoeveelhede in intakte reoviruspartikels. Daar word gepostuleer dat die replikase-aktiwiteit en virale transkriptase alternatiewe aktiwiteite van dieselfde ensiem is (Drayna en Fields, 1982a). Drayna en Fields (1982a) het die betrokkenheid van $\lambda 3$ wat deur die L1-genoomsegment gekodeer word, by reovirustranskripsie aangetoon. Defektiewe virions waarby die L1-genoomsegment afwesig is, was nie tot dsRNA-sintese in staat nie, hoewel normale mRNA's van die ander nege genoomsegmente getranskribeer is (Spandidos et al., 1976). Hierdie waarneming impliseer sterk dat die L1-geen vir beide virale RNA-polimerases kodeer.

Volgens Zarbl en Millward (1983) ondersteun die meeste eksperimentele bevindings die siening dat σNS betrokke is by die koppeling en afsondering van esRNA in replikasepartikels tydens 'n vroeë stadium van morfogenese. Die poli(C)-afhanklike RNA-polimerase-aktiwiteit wat met σNS verband hou (Gomatos et al., 1980), is reeds in 2.3.4 (onder σNS) bespreek. Hierdie aktiwiteit mag verantwoordelik wees vir die sintese van 'n voorvoerder vir die replikase-ensiem, maar hieroor bestaan nog geen duidelikheid nie.

2.4 TRANSKRIPSIE VAN DIE REOVIRUSGENOOM.

2.4.1 Inleiding.

In die eksperimentele gedeelte van hierdie projek is reovirus-mRNA in vitro gesintetiseer (kyk hoofstuk 3) deur gebruik te maak van chimotripsienbehandelde reovirus wat virale transkriptase-aktiwiteit (ds → esRNA-polimerase-aktiwiteit) besit. Om hierdie rede word dit nodig geag om die reovirustranskripsieproses, soos dit huidig bekend is, kortliks te behandel. Die verskillende ensiemaktiwiteite wat met die sintese van reovirus-mRNA geassosieer is en die moontlike funksionele betrokkenheid van die reovirusproteïene daarby is reeds in 2.3 bespreek.

Elke dsRNA-genoomsegment van reovirus word volledig na 'n esRNA met dieselfde polariteit as mRNA getranskribeer (Bellamy en Joklik, 1967; Watanabe et al., 1967). Die in vitro-transkripte het ook dieselfde polariteit en eienskappe as die in vivo-transkripte (Hay en Joklik, 1971). Die reovirus-mRNA kan met behulp van sentrifugering in 'n suksedigheidsgradiënt in drie klasse geskei word, naamlik ℓ , m en s (25S, 18S en 12S) soos wat hulle respektiewelik vanaf genoomsegmente van die L-, M- en S-klas getranskribeer word (Bellamy en Joklik, 1967). Hoewel die skeiding van mRNA in individuele spesies tegnies steeds moeilik bly, is die reovirus-boodskappers wel elektroforeties skeibaar in tien spesies, naamlik ℓ 1-3, m1-3, en s1-4 (Floyd et al., 1974; Schuerch et al., 1975). Met behulp van hibridiseringsanalises is die benamings van die esRNA-spesies gedoen ($L1 \rightarrow \ell$ 1 ens.) en hieruit was dit duidelik dat die m2-spesie vinniger migreer as m3. Van die spesies het 'n neiging tot ko-elektroforese (byvoorbeeld m2 en m3). As gevolg van hierdie inherente probleme met die skeiding van reovirus-mRNA is die koderingstoekenings (RNA-proteïen) ook finaal met die genoomsegmente uitgevoer (kyk 2.2.3). Levin en Samuel (1980) het die volledige koderingstoekenings van die S-klas genoomsegmente met individuele mRNA's as volg vasgestel: $S1 \rightarrow s1 \rightarrow \sigma$ 1; $S2 \rightarrow s2 \rightarrow \sigma$ 2; $S3 \rightarrow s3 \rightarrow \sigma$ NS; $S4 \rightarrow s4 \rightarrow \sigma$ 3 (dsRNA → esRNA → polipetied). Gaillard en Joklik (1985) het aangetoon dat die ℓ 1-mRNA van reovirus serotipe 3 ook in 2% agarosegelle vinniger as ℓ 2 migreer. Die volgorde van migrasietempo van

die λ -klas mRNA was dus $\lambda_2 < \lambda_1 < \lambda_3$. Aangesien al tien reovirus-mRNA's identies aan die plusstringe van die ooreenstemmende dsRNA-genoomsegmente is (Li et al., 1980), is die nukleotiedvolgordes en informasie-inhoud van die dsRNA wat in 2.2.2 en 2.2.3 bespreek is ook van toepassing op die enkelstring-mRNA soos wat dit daar aangedui word.

2.4.2 Transkripsie in vivo

Nadat reovirus 'n gasheersel tydens infeksie binne gedring het, vind proteolise daarvan in die lisosome plaas. Hierdie afbraak resulteer in die verwydering van die buitekapselproteïene σ_1 en σ_3 en splyting van μ_1C tot 'n 65 000 dalton polipeptied δ (Silverstein et al., 1972). Hierdie moeder-SVP's bevat dus die kernpartikelproteïene λ_1 , λ_2 , μ_1 en σ_2 , asook variërende hoeveelhede van δ (Silverstein et al., 1972). Volgens Drayna en Fields (1982a) moet hierdie SVP's λ_3 bevat, aangesien hulle waarnemings (kyk 2.3.5) daarop dui dat λ_3 by die virale transkriptase betrokke is. Die presiese meganisme waarvolgens die reovirus transkriptase "geaktiveer" word, is nog nie duidelik nie. Borsa en medewerkers (1981) stel voor dat die gebeure in ten minste twee stappe plaasvind (2.3.5). Die ds $\rightarrow$ esRNA-polimerase (transkriptase) in die SVP's is hoogs aktief, sodat mRNA-sintese na vrystelling van die SVP's in die sitoplasma van die geïnfekteerde sel plaasvind. Gedurende die vroeë fase van reovirus-infeksie vind virusspesifieke transkripsie van hoofsaaklik genoomsegmente L1, M3, S3 en S4 plaas (Nonoyama et al., 1974), maar binne 6 tot 8 ure is die transkripsie van al tien segmente waarneembaar (Zweerink en Joklik, 1970). Die grootte van die templaar-RNA bepaal in 'n groot mate die relatiewe frekwensie van transkripsie, sodanig dat 20 keer meer s3- en s4-spesies mRNA as die λ -klas transkripte 2 tot 8 ure na infeksie van muis-L-selle gesintetiseer word. Resultate van in vitro-eksperimente (Banerjee en Shatkin, 1970) dui daarop dat individuele genoomsegmente gelyktydig getranskribeer word met die volgende relatiewe snelhede, $s > m > \lambda$. Hierdie waardes is in ooreenstemming met die relatiewe molêre produksie van die verskillende in vivo-gesintetiseerde mRNA's (kyk ook Joklik, 1981 vir 'n opsomming). Die transkripsie van die dsRNA-genoomsegmente is asimmetries (slegs

plusstringe word gesintetiseer) en konserwatief (die eerste plusstringe wat gevorm word, is reeds die boodskapper) (Hay en Joklik, 1971; Joklik, 1981).

Reovirus-mRNA wat vanaf geïnfecteerde muis-L-selle geïsoleer is, is geblokkeer en gemetileer (Shatkin, 1974) (kyk ook 2.4.3). Skup en medewerkers (1981) het aangetoon dat die mRNA wat deur die nageslag-SVP's op 'n later stadium van die vermeerderingsiklus (~ 12 ure na infeksie) van reovirus in geïnfecteerde selle gesintetiseer word nie oor die geblokkeerde 5'-terminale cap-struktuur beskik nie. Hoewel daar nog nie eenstemmigheid oor die presiese rol van hierdie ongeblokkeerde transkripte is nie, is daar wel aanduidings dat hierdie gebeure betrokke is by die regulering van translase tydens die vermeerderingsiklus van reovirus. Dit is verder belangrik om daarop te let dat reovirus-mRNA nie die algemene 3'-terminale poli(A)-segmente besit nie (Stoltzfus et al., 1973).

2.4.3 Transkripsie in vitro

Die meeste werk wat gepubliseer is oor die in vitro-sintese van reovirus-mRNA is met chimotripsienbehandelde reovirus uitgevoer. Volledige verwydering van die buitekapsel ($\sigma 3$, $\mu 1C$ en $\sigma 1$) omvorm virions tot virale kernpartikels ("cores") met soortgelyke transkripsie-aktiwiteit as SVP's (2.3.5). Die vier blokkeringsensieme wat saam met die transkriptase die kernpartikels in staat stel om die tien reovirusgene in tien mRNA-spesies met cap-strukture te transkribeer, is reeds in 2.3.5 bespreek. Hierdie ensiemaktiwiteit is wel ook funksioneel in reovirions (Yamakawa et al., 1982). In die intakte virions lei die aktiwiteite tot die produksie van slegs kort oligonukleotiede wat ooreenstem met die 5'-terminale volgordes van al tien reovirus-mRNA's. Dit wil dus voorkom asof die "aktivering" van die reovirions deur proteolise nodig is vir die opheffing van beperkings op die verlenging van geïnisieerde nassente RNA-kettings (Joklik, 1985). Kernpartikels produseer ook 'n hoeveelheid van hierdie inisieerder-oligonukleotiede tydens in vitro-transkripsie (Yamakawa et al., 1981). Hierdie gegewens gee aanleiding tot die voorstelling van die transkripsie-aktiwiteit as 'n twee-stapproses:

herhalende inisiasie wat gevolg word deur die verlenging van 'n klein fraksie van die gevormde oligonukleotiede.

In ooreenstemming met die noue assosiasie tussen die transkriptase en die dsRNA-template, kan die sintese van mRNA deur virale kernpartikels vir lang periodes voortgaan (Levin et al., 1970). Die stabiliteit van die transkriptase-aktiwiteit word verder geïllustreer deur die hoë optimale temperatuur vir mRNA-sintese van 45 tot 50°C (Kapuler, 1970). Die transkripte wat gedurende die vroeë fase van die reovirus-vermeerderingsiklus of in vitro in die teenwoordigheid van S-adenosielmetionien (SAM) gesintetiseer word, is geblokkeer en gemetileer met die volgende 5'-terminale struktuur: $m^7G(5')ppp(5')G^mpCp$ (Furuichi et al., 1975; Shatkin, 1974). Furuichi en Shatkin (1977) het aangetoon dat blokkering en metilering van reovirus-mRNA nie noodwendig direk met die transkripsieproses gekoppel is nie (kyk ook 2.3.5).

Shatkin en Kozak (1983) en Joklik (1985) is dit eens dat daar nog baie onduidelikhede rondom die transkripsiegebeure van reovirus bestaan, wat in 'n groot mate steeds geldend is.

2.5 TRANSLASIE VAN REOVIRUS-mRNA

2.5.1 Inleiding

Die aanvanklike gebeure tydens die translase van reovirus-mRNA's is in redelike besonderhede deur Kozak en Shatkin ondersoek (kyk Shatkin en Kozak, 1983 vir 'n oorsig). Dit is interessant om daarop te let dat die reovirussisteem in die middelpunt gestaan het van 'n aantal nuwe fundamentele gegewens betreffende die struktuur en funksie van eukariotiese boodskapper-RNA's. Die translase van reovirus-mRNA stem grootliks ooreen met die algemene meganisme van eukariotiese proteïensintese. Laasgenoemde word omvattend in onlangse oorsigartikels bespreek (Moldave, 1985; Pain, 1986).

Die eerste stap in die translase van reovirus-mRNA is die binding van 40S-ribosomale subeenhede aan die 5'-termini van die mRNA's (Kozak,

1977). Hierdie aanvanklike binding is blykbaar spesifiek vir die 5'-terminus aangesien geen interne binding plaasvind nie al is die RNA vooraf gedenateer (Kozak, 1980). Die affiniteit van die 40S-subeenhede vir geblokkeerde RNA's is groter as vir die meeste mRNA's sonder 'n cap-struktuur (Kozak en Shatkin, 1978). 'n Redelike groot gedeelte van die mRNA (50 tot 60 residue) word deur die binding aan die 40S-ribosomale subeenheid afgeskerm. Na binding aan die 5'-terminus beweeg die 40S-subeenhede langs die mRNA af tot by die eerste funksionele inisiasiekodon. By die inisiasiekodon (AUG) bind die 40S-ribosomale subeenhede met 60S-ribosomale subeenhede, met-tRNA_f en die nodige inisiasiefaktore om 'n 80S-inisiasiekompleks te vorm. Die vertraging van die 40S-ribosomale subeenhede by die eerste AUG-kodon is 'n kritiese stap in die translasieproses wat blykbaar ook afhanklik is van die sekondêre struktuur van die mRNA (Kozak, 1980). Die verlengingsfase en termineringsgebeure is nie spesifiek vir die translasie van reovirus-mRNA nagegaan nie, maar stem sover bekend grootliks ooreen met die meganisme van eukariotiese proteïensintese. Vir die doel van hierdie ondersoek word die translasie van reovirus-mRNA in virusgeïnfekteerde selle eers kortliks bespreek en daarna die in vitro-translasie van reovirus-mRNA.

2.5.2 Proteïensintese in virusgeïnfekteerde selle

Die sintese van reovirusproteïene in geïnfekteerde selle begin direk na die aanvang van mRNA-sintese. Nuut gesintetiseerde reovirusproteïene kan gewoonlik vanaf 2 ure na infeksie waargeneem word. Reoviruspesifieke proteïene is met behulp van poliakrielamiedgelelektroforese (PAGE) ondersoek, nadat geïnfekteerde muis-L-selle in medium wat radioaktiewe aminosure bevat, geïnkubeer is. Vir die analise van die translasieprodukte vroeg na infeksie is spesiale manipulasies nodig om die virale proteïene van die selproteïene te onderskei. Deur gebruik te maak van aktinomisien D om proteïensintese van die gasheerselle te onderdruk (Lau et al., 1975) of deur immunopresipitering van reovirusproteïene met virusspesifieke antiserum (Cross en Fields, 1976) is vier van die reovirusproteïene tydens die vroeë fase van infeksie waargeneem, naamlik $\lambda 2$, μ NS, σ NS en $\sigma 3$.

Akkurate bepaling van die aantal en relatiewe hoeveelhede van die reovirusgekodeerde proteïene verbeter tydens later stadiums van infeksie wanneer virale proteïene in groter hoeveelhede gesintetiseer word.

Die analitiese tegnieke van 'n paar jaar gelede het tot die identifikasie van nege reovirusspesifieke proteïene gelei, waarvan agt primêre geenprodukte is ($\lambda 1$, $\lambda 2$, μNS , $\mu 1$, $\sigma 1$, $\sigma 2$, σNS en $\sigma 3$) en een ($\mu 1C$) 'n splytingsproduk van $\mu 1$ is (Zweerink en Joklik, 1970). Verbeterings in die tegniek van gelelektroforese en die gebruik van radioaktiewe aminosure met hoë spesifieke aktiwiteite het die identifisering van twee addisionele proteïene $\lambda 3$ en $\mu 2$ moontlik gemaak. (Both et al, 1975; Cross en Fields, 1976). Sodoende is tien primêre translasiëprodukte gedurende die laat stadium in virusgeïnfekteerde selle waargeneem. Vier van die kleinste proteïene kom ooreen met die koderingskapasiteit van die klein genomiese RNA-spesies. Hierdie proteïene is $\sigma 1$, σNS , $\sigma 2$ en $\sigma 3$ in volgorde van hulle migrasiesnelheid in 'n Laemmli-poliakrielamiedgelsisteem. In die mediumklas is drie primêre translasiëprodukte geïdentifiseer, naamlik $\mu 1$, μNS en $\mu 2$. Zweerink en Joklik (1970) het vasgestel dat die vierde medium-klaspolipeptied $\mu 1C$ 'n splytingsproduk van $\mu 1$ is deur die reovirusproteïene van twee kulture geïnfekteerde L-selle met mekaar te vergelyk. Beide selkulture is 17 ure na infeksie met reovirus vir 30 minute in die teenwoordigheid van radioaktiewe valien geïnkubeer. Hierna is die een groep selle dadelik geoes, terwyl die tweede groep na byvoeging van natuurlike valien tot twee maal die normale konsentrasie in groeimedium vir 'n verdere 90 minute geïnkubeer is. Skeiding en identifisering van die drie groot proteïenspesies ($\lambda 1$, $\lambda 2$ en $\lambda 3$) is moontlik gemaak deur elektroforesekondisies wat verskil het van dié soos gebruik vir die karakterisering van die σ - en μ -proteïene (Both et al., 1975).

Met behulp van hoë resolusie, diskontinue gelelektroforese het Both et al. (1975) sestien reovirusspesifieke proteïene waargeneem. Aangesien die koderingskapasiteit van die tien genoomsegmente met die tien genoemde virale proteïene korreleer (kyk 2.2.3), bestaan die neiging om die addisionele polipeptiedbande wat gereeld in gelle na die skeiding van reovirusproteïene sigbaar is by die formele benaming van virale proteïene

te ignoreer. Hierdie "ekstra" polipeptiede mag moontlik toegeskryf word aan splyting van die primêre translasiëprodukte, maar voldoende begroning vir hierdie interpretasie bestaan nog nie behalwe vir die goed gekarakteriseerde $\mu 1$ - $\mu 1C$ -paar. Alternatiewe verduidelikings sluit die moontlikheid van meerdere inisiasiepunte in 'n gegewe boodskapper of translasië van 'n geprosesseerde (gesplyte) boodskapper in. Vir eersgenoemde is daar onlangs ondersteunende gegewens gevind met die aantoning van $\sigma 1S$ ($\sigma 1bNS$), wat deur die di-sistroniese $s1$ -mRNA gekodeer word (Jacobs en Samuel, 1985). Hierdie 12 000 dalton polipeptied is egter heelwat kleiner as die meeste ander intermediêre grootte polipeptiede wat gewoonlik voorkom.

Verdere heterogeniteit in reovirusgekodeerde polipeptiede word teweeggebring deur post-translasionele modifikasies soos glikosilering (Krystal et al., 1976), fosforilering (Krystal et al., 1975), ADP-ribosilering en poli-adenilering (Carter et al., 1980). Hierdie modifikasies is by slegs daardie proteïene van reovirions waargeneem wat uit geïnfekteerde selle geïsoleer is. Hierdie modifikasies is hoofsaaklik by die λ -proteïene (fosforilering) en μ -proteïene waargeneem. Dit is dus nie bekend of hierdie modifikasies in ander sisteme moontlik is nie en presies wanneer dit plaasvind nie. Bestudering van die patroon van post-translasionele modifikasies van nuut gesintetiseerde virale polipeptiede gedurende die groeisyklus van reovirus is nodig om die modifikasieprosesse te kan karakteriseer en met funksies te kan korreleer. Hoewel die betekenis van hierdie gemodifiseerde vorme van die reovirusproteïene nog nie bekend is nie, dui dit tog daarop dat die aantal funksionele polipeptiede in reovirusgeïnfekteerde selle wel meer as tien kan wees.

Hierdie genoemde modifikasies mag die akkurate kwantifisering van die reoviruspolipeptiede bemoeilik. Alle virale proteïene word blykbaar ook nie ewe effektief deur immunopresipitering geïsoleer nie (Cross en Fields, 1976). Shatkin en Kozak (1983) spekuleer ook dat die oplosbaarheid van die strukturele proteïene 'n differensiële verlies tydens ekstraksieprosedures van virale proteïene tot gevolg mag hê. Hierdie faktore is sover baie min in ag geneem by die bespreking van die

reovirusproteïene (Joklik, 1985) (ook 2.3), maar dit is duidelik dat dit wel gekwantifiseerde resultate, soos byvoorbeeld die aantal molekules per viruspartikel (tabel 2.1), kan beïnvloed. Die onsekerheid wat hiermee geassosieer word, noodsaak die versigtige interpretasie van sodanige resultate.

Ten spyte van hierdie potensiële probleme is dit duidelik uit metings wat gedoen is dat sekere mRNA-spesies van reovirus baie meer effektief (met ander woorde teen 'n hoër frekwensie) getransleer word as ander. Hierdie gegewens is deur Joklik (1985) saamgevat en daaruit is dit duidelik dat die relatiewe hoeveelhede reovirusproteïene wat in vivo gemaak word nie bloot die verhouding van die template in die mRNA-poel weerspieël nie. Die meganisme waarvolgens sekere virale mRNA-spesies (veral die wat kodeer vir die proteïene $\sigma 3$, σNS , $\mu 1$, μNS , $\lambda 1$ en $\lambda 2$) meer effektief as ander getransleer word, is nog nie ten volle opgeklaar nie (Joklik, 1985). Dit is tog interessant om daarop te let dat dieselfde verskynsel betreffende translasië-effektiwiteit ook waargeneem word wanneer reovirus-mRNA in vitro getransleer word (Levin en Samuel, 1980). Moontlike faktore wat die translasië-effektiwiteit van die reovirus-mRNA's mag beïnvloed, is in 2.2.2 bespreek.

2.5.3 Translasie van reovirus-mRNA in vitro

Voldoende hoeveelhede gesuiwerde reovirus-mRNA, wat geskik is vir translasiestudies, kan geredelik vanuit in vitro-transkripsiereaksies verkry word (kyk 2.4.3). 'n Alternatiewe bron van reovirus-esRNA, wat ook vir translasië geskik is, is die benutting van die plusstring-RNA na denaturering van die genomiese RNA van reovirus (McCrae en Joklik, 1978) (2.2.3). Reovirus-mRNA is reeds in selvrye proteïensintesesisteme wat van soogdier- sowel as plantaardige oorsprong is, getransleer. Sommige van die besonderhede van hierdie translasië-ondersoeke word in tabel 2.2 saamgevat.

TABEL 2.2
VERGELYKING VAN *IN VITRO*-TRANSLASIE VAN REOVIRUS-RNA

Sisteem	Kondisies	Polipeptiede waargeneem	Metode vir produkanalise en identifikasie	Tydperk aktief	Verwysing
Askiet en HeLa	86mM KCl; 3mM mag=nesiumasetaat; 10mM DTT	- μ NS, μ 1, σ 2, σ NS, σ 3	Ko-elektroforese	60 min	McDowell <i>et al.</i> , 1972
Muis-L en CHO	86mM KCl; 3mM mag=nesiumasetaat; 10mM DTT	λ 1, λ 2, μ NS, μ 1, σ 2, σ NS, σ 3	Ko-elektroforese	60 min	McDowell <i>et al.</i> , 1972
Konynretikulosiet	70mM KCl; 1,5mM magnesiumasetaat	λ 1, λ 2, μ NS, μ 1, σ 1, σ 2, σ NS, σ 3	Ko-elektroforese	10 min	McDowell <i>et al.</i> , 1972
Koringkiem	90mM KCl; 3mM mag=nesiumasetaat; 2mM DTT	λ 1, λ 2, λ 3, μ NS, μ 1, μ 2, σ 1, σ 2, σ NS, σ 3	Ko-elektroforese	120 min	Both <i>et al.</i> , 1975
Koringkiem (gedenatureerde dsRNA)	65mM +50mM KCl (soutsprong) 2,5mM magnesium=asetaat 1mM DTT	λ 1, λ 2, λ 3 μ NS, μ 1, μ 2 σ 1, σ 2, σ NS, σ 3	Ko-elektroforese en peptiedkartering	120 min	McCrae en Joklik, 1978

McDowell et al. (1972) het 'n paar selvrye ekstrakte van soogdierselle berei wat na preïnkubasie slegs eksogene mRNA getransleer het. In selvrye ekstrakte van askiet- en HeLa-selle kon hierdie groep vyf virale polipeptiede identifiseer, terwyl sewe polipeptiede waargeneem is in ekstrakte van muis-L-selle en CHO-selle. Hierdie virale produkte is in die selvrye sisteme gesintetiseer na die toevoeging van reovirus-mRNA. Deur gebruik te maak van konynretikulosiete wat nie vooraf gepreïnkubeer is nie kon McDowell en medewerkers (1972) die sintese van agt reovirusproteïene aantoon. Both et al. (1975) het die translase van reovirus-mRNA in die heteroloë, selvrye koringkiemsisteem aangetoon. Verbetering van elektroforesekondisies het hierdie groep in staat gestel om tien primêre translasiëprodukte te identifiseer. Die splytingsproduk μ 1C is nie in een van hierdie in vitro-sisteme waargeneem nie. Hierdie sisteme is dus beperk in die vermoë tot post-translasionele modifikasie van die translasiëprodukte van reovirus. McCrae en Joklik (1978) het ook 'n selvrye koringkiemsisteem gebruik om die koderingstoekennings van die tien reovirusgenoomsegmente op te klaar. Die individuele dsRNA-spesies is na denaturering in 'n koringkiemsisteem getransleer en so is spesifieke reoviruspolipeptiede aan elk van die tien genoomsegmente toegeken (kyk 2.2.1). Die sintese van reovirusproteïene is ook waargeneem na die mikro-inspuiting van reovirus-mRNA in die oösiëte van *Xenopus laevis* (Van der Walt, 1978; McCrae en Woodland, 1981).

Die ondersoek van McCrae en Woodland (1981) was gerig op die bepaling van die stabiliteit van reovirus-mRNA's, wat nie 3'-poli(A)-gebiede besit nie, in die oösiëte van *Xenopus laevis*. Met behulp van hibridiseringsanalise en gelelektroforese het hierdie groep aangetoon dat al 10 mRNA's van reovirus 'n halfleeftyd van langer as 3 dae in die oösiëte het. Daarom kan die reovirus-mRNA beskou word as 'n stabiele klas van die natuurlik voorkomende poli(A)-vrye mRNA. Die analise van translasiëprodukte na die mikro-inspuiting van oösiëte met reovirus-mRNA het wel 'n aanduiding van die teenwoordigheid van virusspesifieke proteïene gegee. As gevolg van sekere tekortkominge in die metode van produkanalise is dit baie moeilik om betroubare afleidings te maak ten opsigte van die translase van reovirus-mRNA in die oösiëtsisteem (kyk

ook 2.7). Van der Walt (1978) kon deur van selektiewe immunopresipitering gebruik te maak oënskynlik vier virusspesifieke polipeptiede na translase van reovirus-mRNA in die oösiete identifiseer. Die produkanalise was hier vanweë die hoë agtergrond egter ook nie optimaal nie.

Hoewel die sintese van sekere reovirusproteïene beter as ander aantoonbaar was, wil dit voorkom asof sukses nie soseer van die tipe selvrye sisteem as van sekere ander parameters afhanklik is nie. Hierdie faktore sluit in die uitskakeling van nuklease-aktiwiteit (wat veral die produksie van groot proteïene verlaag), verhoging van die K^+ -konsentrasie om voltooiing van polipeptiedverlenging te bevorder (inisiase van translase vind egter beter by laer K^+ -konsentrasies plaas) (kyk McCrae en Joklik, 1978) en seleksie van elektroforesekondisies wat identifisering van al die translaseprodukte moontlik maak (Both et al., 1975). Die stel van tien reovirusproteïene wat in vivo gesintetiseer word (2.5.2), kan dus ook onder optimale kondisies in vitro gesintetiseer word. Die ooreenkoms tussen in vitro- en in vivo-gesintetiseerde reovirusspesifieke polipeptiede is deur ko-elektroforese (McDowell et al., 1972; Both et al., 1975), immunopresipitering (Graziadei et al., 1975) en karakterisering van peptiedprofile na gedeeltelike proteolitiese vertering (McCrae en Joklik, 1978) bevestig. Behalwe vir die tien oënskynlik outentieke reovirusproteïene, bevat die poliakrielamiedgelprofile dikwels addisionele bande, moontlik polipeptiedkettings wat as gevolg van premature terminering ontstaan (Hunter et al., 1977). Die moontlikheid dat sommige van die korter polipeptiede as gevolg van vals inisiasiegebeure in die middel van intakte mRNA's ontstaan, lyk onwaarskynlik omdat die analise van ribosoombeskermde volgordes gewoonlik slegs een inisiasiepunt per boodskapper toon. Met hierdie benadering kon Kozak (1982a) vir slegs die s1-mRNA twee inisiasiesetels aantoon. Eers nadat vasgestel is dat beide hierdie inisiasiepunte funksioneel is (Cenatiempo et al., 1984) en die nukleotiedvolgordes van die S1-geen bepaal is (Cashdollar et al., 1985), is die teenwoordigheid van 'n tweede primêre translaseproduk van s1-mRNA bevestig (Ernst en Shatkin, 1985; Jacobs en Samuel, 1985). Hierdie klein polipeptied ($\pm 12\ 000$ dalton) is ook in 'n selvrye sisteem van

muis-L-selle wat met reovirus-mRNA of gedenatureerde reovirus-dsRNA geprogrammeer is, gesintetiseer (Jacobs en Samuel, 1985). Die ontstaan van mRNA-fragmente deur nukleolitiese splyting tydens inkubasie mag wel aanleiding gee tot binding van ribosome aan foutiewe interne inisiasiesetels (Kozak, 1980).

Hierdie moontlikheid om reovirus-mRNA in vitro met hoë effektiwiteit te transleer, is benut om vrae ten opsigte van die molekulêre biologie van reovirus, sowel as meer algemene vrae oor die meganisme van eukariotiese proteïensintese te ondersoek. In hierdie verband is reeds melding gemaak van die bepaling van die geen-proteïenkoderingstoekenings (McCrae en Joklik, 1978) en die identifikasie van ribosoombindingsetels in reovirus-mRNA's (Kozak, 1982a en b). Verder is die funksie van die 5'-terminale cap-struktuur tydens die translase van reovirus-mRNA in selvrye sisteme ondersoek (kyk Shatkin en Kozak, 1983 vir 'n oorsig). Die presiese meganisme waarvolgens die cap-struktuur inisiasie bevorder bly nog steeds onduidelik. Die klem moet op die woord "bevorder" val, aangesien die teenwoordigheid van die cap-struktuur nie absoluut essensieel vir binding van die 40S-ribosomale subeenhede en daaropvolgende translase van die mRNA is nie. Die ribosome van retikulosiet- en askietsellisate diskrimineer tydens inisiasie minder teen boodskappers sonder cap-strukture as die koringkiemsisteem. Daar mag dus verskille wees in die spesifisiteit van die ribosome of die faktore betrokke by translase (veral inisiasie) in hierdie sisteme wat die heterogene aard van hierdie heteroloë (plant en dier) sisteme beklemtoon (Shatkin en Kozak, 1983). Dit beteken dat afleidings oor die translase van boodskappers in heteroloë sisteme met versigtigheid hanteer moet word. Weber et al. (1977b) het egter aangetoon dat die variasie in afhanklikheid van die cap-struktuur tydens in vitro-translase van eukariotiese mRNA's die gevolg mag wees van die kondisies tydens die samestelling van die selvrye sisteme. Die gebondenheid aan die teenwoordigheid van 'n cap-struktuur is dus afhanklik van beide die soort proteïensintesesisteem (retikulosiet- en askietsellisate is minder cap-afhanklik as koringkiemekstrakte) en die aard van die mRNA (sekere mRNA's soos poliovirus-RNA het geen cap-struktuur nie) (Shatkin en Kozak, 1983). Die meganisme wat voorgestel word vir die fasiliterende

werking van die cap-struktuur maak voorsiening vir die betrokkenheid van cap-bindingsproteïene. Hierdie proteïene besit affiniteit vir die cap-struktuur en bewerkstellig die ATP-afhanklike ontvouing van die sekondêre struktuur by die 5'-termini van mRNA's, waardeur binding van die 40S-ribosomale subeenhede bevoordeel word (Lee et al., 1983).

Die reovirussisteem bied ook geleentheid vir die bestudering van faktore wat die frekwensie van mRNA-translasie beheer. Dit is moontlik omdat die tien reovirus-mRNA's ook in vitro met verskillende translasie-effektiwiteite getransleer word. Levin en Samuel (1980) het hierdie verskille in translasie-effektiwiteit vir die vier s-klas mRNA-spesies in 'n selvrye koringkiemsisteem aangetoon. Daar is tans min direkte leidrade wat lig werp op die oorsake van hierdie reguleringsaspekte soos in 2.2.2 aangetoon is. Kozak (1981) het vasgestel dat die eienskap wat die beste met die translasiefrekwensie van eukariotiese mRNA's korreleer, die teenwoordigheid van 'n "sterk" inisiasiekodon (kyk 2.2.2) is. Hierdie verskynsel word vir al die mRNA-spesies behalwe m1 waargeneem. Antczak et al. (1982) het die 5'-terminale nukleotiedvolgordes (70 tot 80 nukleotiede) van al tien reovirus-mRNA's vir moontlike leidrade ondersoek. Die translasiefrekwensie korreleer ook nie met die lengte van die 5'-ongetransleerde gebied nie, maar wel met die teenwoordigheid van AG-ryke gebiede rondom die inisiasiekodon. Slegs vier van die mRNA-spesies besit sterk Shine-Dalgarno-volgordes wat in staat is tot baseparing met die 3'-terminale konsensusvolgordes van soogdier 18S-ribosomale RNA. Sulke volgordes is egter ook tussen die 3'-proksimale residue van sommige mRNA-spesies waargeneem. Slegs een mRNA-spesie kan 'n stabiele haarnaaldboog naby die inisiasiekodon vorm. Dit is dus duidelik dat selfs uit die nukleotiedvolgordes van die tien reovirus-mRNA's geen eenvoudige leidrade ten opsigte van die verskille in translasiefrekwensie afgelei kan word nie. Lawson et al. (1986) het meer onlangs aangetoon dat verhoogde sekondêre struktuur in die 5'-termini van mRNA's tot translasie-inhibisie van die mRNA's kan lei.

Aangesien al die reovirusgene reeds gekloneer is (Cashdollar et al., 1984) behoort rekombinante DNA-tegnieke deur die invoering van delesies, invoegings en substitusies dit in die toekoms moontlik te maak om die

nukleotiedvolgordes wat translasierekwensie reguleer beter te kan definieer. Atwater en medewerkers (1987) het aangetoon dat die effektiwiteit van uitdrukking van die cDNA's van die S1- en S4-geen van reovirus in getransfekteerde dierselle op die vlak van translasië verskil wat verder daarop dui dat die differensiële translasië van s1- en s4-mRNA's in vivo deur intrinsieke eienskappe van die individuele mRNA's bepaal word. Die data van Munemitsu en Samuel (1988) in 'n onlangse ondersoek dui daarop dat die verskil in translasië-effektiwiteit van die reovirus-mRNA's nie in die volgordes wat die inisiasiekodon omring, lê nie. Dit wil dus voorkom asof hierdie eienskappe eerder in die 5'-ongetransleerde gebied opgesluit is.

2.6 REOVIRUSMORFOGENESE

Een van die mees interessante aspekte in reovirologie is die meganisme van reovirusmorfogeenese. Daar bestaan steeds fundamentele vrae oor die presiese wyse waarop die afsonderlike komponente van reovirus saamgestel word. Ongeveer vier ure na infeksie, moontlik wanneer voldoende hoeveelhede virale transkripte en reovirusproteïene gesintetiseer is, word komplekse gevorm wat plusstring-RNA en verskeie reovirusproteïene bevat. Die RNA in hierdie komplekse wat virale proteïene $\lambda 1$, $\lambda 2$ (waarskynlik ook $\lambda 3$), $\mu 1C$, $\sigma 1$, $\sigma 2$ en $\sigma 3$ bevat, is ribonukleasesensitief (Morgan en Zweerink, 1975). Soos reeds in 'n vorige afdeling bespreek (2.3.5), blyk dit dat reovirusmorfogeenese aan die replisering van die genoom gekoppel is. Hierdie vroeë partikels (provirions) met $es \rightarrow dsRNA$ -polimerase-aktiwiteit is heterogene populasiepartikels wat tussen 180S en 550S sedimenteer. Die digtheid van hierdie partikels is nogtans relatief eenvormig in CsCl met 'n gemiddelde van $1,34 \text{ g cm}^{-3}$ (Zweerink, 1974; Morgan en Zweerink, 1975). Dit wil dus voorkom asof die groter partikels uit die kleiner partikels gevorm word deur opeenvolgende replisering van genoomsegmente en toevoeging of uitruiling van virale polipeptiede (Zweerink et al., 1976). Die replisering in die provirions vind plaas deurdat die plusstringe slegs een maal in minusstringe getranskribeer word. Die minusstring bly dan met die plusstring geassosieer om die dsRNA-genoomsegmente van die nageslagvirions te vorm.

Sodra replisering voltooi is, ondergaan die partikels blykbaar 'n reeks ongekarakteriseerde herrangskikkings waardeur subvirale partikels (SVP's) gevorm word. Hierdie SVP's is baie soortgelyk aan die in vitro-bereide kernpartikels ("cores") en beskik oor aktiewe ds $\rightarrow$ esRNA-polimerase-aktiwiteit (Morgan en Zweerink, 1975). Die dsRNA in hierdie partikels is nou weerstandbiedend teen ribonuklease, selfs by lae soutkonsentrasies (Acs et al., 1971). Hierdie partikels het 'n digtheid soortgelyk aan reoviruskernpartikels ($1,42 \text{ g cm}^{-3}$), maar sedimenteer ook as 'n heterogene populasie (Morgan en Zweerink, 1975; Zweerink et al., 1976). Verskillende eksperimentele gegewens dui daarop dat hierdie verskillende SVP's voorgangers is in die vorming van die volwasse nageslag-reovirions (Zweerink et al., 1976; Morgan en Zweerink, 1974). Een klas SVP's (400S) bevat die polipeptiede van die kernpartikels, sowel as die nie-strukturele polipeptied μ NS, maar vertoon nie die projeksies soos wat by die moeder-SVP's teenwoordig is nie. Dit is waarskynlik hierdie nageslag-SVP's wat vir die transkripsie van 95% van die totale virale mRNA in geïnfekteerde selle verantwoordelik is. Hierdie reovirus-mRNA word blykbaar sonder 5'-terminale cap-strukture gesintetiseer (Skup en Millward, 1980). Die 400S-partikels word deur toevoeging van die buitekapselproteïene en die twaalf projeksies (saamgestel uit λ 2) omvorm na partikels met 'n sedimentasiekoëffisiënt van 600S. Hierdie gebeure gaan waarskynlik gepaard met verplasing van die μ NS-proteïene. Die 600S-partikels ontwikkel vervolgens tot volwasse reovirions. Volgens Joklik (1981) maak die toevoeging van σ 3 blykbaar deel uit van die laaste fase van morfogenese. Dit is interessant om daarop te let dat hegting van σ 3 die inhibering van die transkriptase-aktiwiteit tot gevolg het (Astell et al., 1972).

Daar is tans nog baie min bekend oor die meganisme waarmee reovirus saamgestel word. Die vorming van die twee proteïenkapsels van reovirus is waarskynlik onafhanklik van dsRNA-sintese, hoewel die twee gebeure gelyktydig plaasvind. Hierdie voorstelling word deur die feit dat leë (sonder RNA) kapsiede of "topkomponent" gedurende die verloop van normale infeksies gevorm word, geïllustreer. Hierdie leë partikels is moontlik ekwivalent aan virions ten opsigte van hulle proteïensamestelling en morfologie (Smith et al., 1969). Hierdie waarnemings mag daarop dui

dat die samestelling van virions primêr van proteïen-proteïeninteraksies afhanklik is. In hierdie verband het Lee et al. (1981a) vasgestel dat twee van die buitekapselproteïene $\mu 1$ (of $\mu 1C$) en $\sigma 3$ as 'n kompleks in geïnfekteerde selle voorkom. Daar bestaan nog geen direkte leidrade betreffende die aard en bron van die buitengewone spesifisiteit wat in die vorming van die heel vroegste komplekse (met tien unieke plusstring-RNA) betrokke is nie. Nadat Antczak et al. (1982) die 5'- en 3'-terminale nukleotiedvolgordes van die tien plusstring-RNA's ondersoek het, het hulle voorgestel dat benewens RNA-RNA-interaksies ook RNA-proteïeninteraksies by hierdie spesifisiteit betrokke mag wees.

Tot dusver was dit baie moeilik om die vroegste virale partikels waarin die tien esRNA-spesies versamel is te isoleer en te karakteriseer. Die rede hiervoor is dat hulle baie onstabiel en kompleks van aard is. Joklik en medewerkers het 'n nuwe benadering gevolg om hierdie probleme te ondersoek (Joklik, 1985). Ekstrakte van geïnfekteerde selle is met monoklonale antiligggame, gerig teen die verskillende reovirusproteïene, behandel. Hiervolgens is dan bepaal watter antiligggame met esRNA-bevattende komplekse reageer. Drie monoklonale antiligggame is so geïdentifiseer, naamlik die antiligggame teen μNS , σNS en die kompleks $\mu 1C/\sigma 3$. Daar is ook op hierdie wyse vasgestel dat meerdere komplekse met verskillende substelle van die tien esRNA's in die selle voorkom. Hierdie strategie mag dus bydra om 'n volledige morfogeneseweg vir reovirus voor te stel deur partikels met toenemende kompleksiteit uit geïnfekteerde selle te isoleer.

2.7 PROBLEEMSTELLING EN BENADERINGSWYSE

In die voorafgaande literatuuroorsig is sekere leemtes in die bestaande kennis oor reovirus aangetoon. In hierdie afdeling word vervolgens 'n aantal geselekteerde aspekte verder beskou ten einde die probleemstelling vir hierdie ondersoek te begrond. Daarna word die benaderingswyse vir die eksperimentele deel van die ondersoek uiteengesit.

Uit die literatuurbespreking is dit duidelik dat die proses van morfogenese van reovirus een van die belangrike aspekte is waar nog

groot leemtes in die kennis oor reovirus bestaan. Oor die wyse waarop samestelling van die virus plaasvind, is daar eweneens nog min bekend. Dit sluit fundamentele vrae oor die betrokkenheid van virale proteïene by die selektiewe versameling van 'n volledige stel van tien unieke plusstring-RNA-molekules in, soos deur die volgende aanhaling geïllustreer (Joklik, 1981):

"However RNA-RNA interactions alone are unlikely to provide the sole source of specificities involved in the reovirus plus strand assembly process; RNA-protein interactions are also likely to be involved. ... It seems that this problem is unlikely to be solved until reovirus morphogenesis can be studied in vitro with pure species of native reovirus proteins" (Joklik, 1985).

Die vroegste partikels in die weg van reovirusmorfogenese is baie onstabiel en kompleks van aard wat ook die bestudering van die virale proteïene wat as ensieme funksioneer, bemoeilik. Van hierdie probleme word in die volgende aanhaling weerspieël:

"From the information currently available, no firm conclusion can be made about which polypeptide(s) catalyzes reovirus RNA synthesis. Perhaps it will be possible to identify the polymerase by in vitro reconstitution, for example, by using dsRNA and extracts of cells transfected with cloned complementary DNA's of the genes for the individual core polypeptides" (Shatkin en Kozak, 1983).

Alhoewel bepaalde virale proteïene met spesifieke ensiemaktiwiteite geassosieer is, is die standpunt wat in hierdie aanhaling weergegee word nog grotendeels geldend. Om die morfogenese van virusse te bestudeer, kan van verskillende benaderingswyses gebruik gemaak word. In die eerste plek kan morfogenese bestudeer word deur die in vivo-samestelling van reovirus te ondersoek. Hiervan is die nuwere benadering van Joklik en medewerkers (Joklik, 1985) soos bespreek in 2.6 'n voorbeeld. Ekstrakte van reovirus-geïnfekteerde selle is met monoklonale antiligggame behandel. Hierna is die antiligggame wat met spesifieke virale partikels gereageer het, gekarakteriseer.

'n Tweede benadering om morfogenese te bestudeer, is deur in vitro-rekonstitusie. Reeds so vroeg as 1955 het Fraenkel-Conrat en Williams aangetoon dat die proteïen- en RNA-komponente van TMV (tabakmosaïekvirus) in vitro gerekonstitueer kan word om aktiewe viruspartikels te vorm (kyk Richards en Williams, 1976 vir 'n oorsig). 'n TMV-partikel is saamgestel uit 2200 identiese proteïensubeenhede met 'n molekulêre massa van 17 500 dalton en 'n enkele string RNA met 'n molekulêre massa van 2×10^6 dalton. So 'n TMV-partikel is onder die regte kondisies in staat tot selfsamestelling in vitro. Hierdie gegewe is in die lig van die nou bekende reëlmatige struktuur van die heliksvormige virus nie verrassend nie. Die rekonstitusie van TMV was nogtans 'n belangrike prestasie wat die basis gevorm het vir uitgebreide ondersoeke om die meganisme van TMV-samestelling te bestudeer. Dit is duidelik dat sekere virusse deur selfsamestelling vanaf nukleïensuur en herhalende proteïensubeenhede onder die regte kondisies in vitro gevorm kan word. 'n Belangrike voorwaarde om rekonstitusie van eenvoudige isometriesse virusse te ondersoek, is die suksesvolle dissosiasie van die virions in die afsonderlike strukturele komponente (nukleïensuur en proteïene) op so 'n wyse dat die vrygestelde komponente die vermoë tot hersamestelling en uiteindelijke infektiwiteit behou. Hoewel 'n hele aantal RNA-virusse deur in vitro-rekonstitusie bestudeer is, is die in vivo-samestelling in die meeste gevalle nog nie ten volle opgeklaar nie.

Om die komplekse probleem van morfogenese verder te ontrafel, kan ook van 'n gekoppelde sisteem gebruik gemaak word. In so 'n sisteem word veronderstel dat samestelling gekoördineerd met die transkripsie en/of translase van die virale mRNA sal plaasvind. Hoewel die meeste in vitro-sisteme waarin translase plaasvind tot die getroue translase van mRNA in staat is, soos aangetoon vir reovirus (2.5.3), is daar fundamentele probleme wat die gebruik van hierdie sisteme vir bogenoemde benadering beperk. 'n Inherente probleem van die meeste selvrye sisteme is die relatiewe vroeë staking van die inisiasieproses (tabel 2.2). Verder vind in die meeste selvrye sisteme baie beperkte post-translasionele modifikasies plaas. Die vereistes vir die toepassing van die voorgestelde benadering op reovirus noodsaak dus die gebruik van 'n geskikte heelselsisteem. Die mikro-inspuiting van biologiese

materiaal in die oösiëte van *Xenopus laevis* was een van die eerste sisteme waar die invloed of metabolisme van ingespuite materiaal in 'n lewende sel ondersoek is (kyk Lane, 1983 en Gurdon en Wickens, 1983 vir 'n oorsig). Hierdie sisteem het die besondere voordeel dat biologiese prosesse direk onder in vivo-toestande bestudeer kan word. Verdere voordele in die gebruik van die oösiëte van *Xenopus laevis* is die werkbaarheid en manipuleerbaarheid van die sisteem. Die vermoë van die oösiëtsisteem tot post-translasionele modifikasies en selfs assemblering van multimeriese proteïene (vergelyk die bespreking deur Lane, 1983) beklemtoon die bruikbaarheid van hierdie sisteem. Onlangse ondervinding van Standring et al. (1986) met die mikro-inspuiting van sintetiese mRNA van hepatitis B virus ondersteun verder die gebruik van oösiëte van *Xenopus laevis* as 'n nuttige sisteem vir die bestudering van die morfogenese van virale strukture.

In die literatuuroorsig (2.2.2 en 2.5) is ook daarop gewys dat die tien mRNA-spesies van reovirus met verskillende effektiwiteite in vivo getransleer word en dat 'n ooreenstemmende beeld ook in vitro gevind is (Levin en Samuel, 1980). Soos aangetoon in 2.2.2 is die meganisme waarvolgens sekere van die virale mRNA's teen 'n hoër frekwensie getransleer word nie duidelik nie. Dit is ook opvallend dat daar nog nie veel aandag gegee is aan die redes waarom hierdie verskille in translasië-effektiwiteit by reovirus bestaan nie. Soos voorgestel vir die RNA-bakteriofage (byvoorbeeld MS2), mag die regulering van translasië wel 'n rol speel by die samestelling van 'n aktiewe viruspartikel (Hung, 1976). Uit 'n vergelyking van die translasië-effektiwiteit van reovirus met die aantal proteïene per reovirion (tabel 2.3) wil dit tog voorkom asof daar 'n verband tussen translasië-effektiwiteit en die samestelling van die virale partikels is. Dit blyk dat die produkte van die mRNA's wat meer effektief getransleer word in groter hoeveelhede in die reovirions teenwoordig is. Bestudering van die translasië van reovirus-mRNA in samehang met samestelling van die virus behoort ook lig op hierdie vrae te werp.

TABEL 2.3 'n Vergelyking van die relatiewe translasië-effektiwiteit van reovirus-mRNA in vivo met die voorkoms van proteïene in die reovirion

Genoomsegment	Translasie-effektiwiteit	Proteïen	Aantal molekules per virion
L1	< 2	$\lambda 3$	≤ 12
L2	28	$\lambda 2$	~ 90
L3	24	$\lambda 1$	~ 105
M1	< 3	$\mu 2$	≤ 12
M2	67	$\mu 1$	~ 20
		$\mu 1C$	~ 550
M3	32	μNS	-
S1	8	$\sigma 1$	~ 24
S2	47	$\sigma 2$	~ 200
S3	41	σNS	-
S4	100	$\sigma 3$	~ 900

Saamgestel uit Joklik (1985).

Om die oösiëte van *Xenopus laevis* as 'n sisteem te kan gebruik waarin translasië gekoppeld met die samestelling van die virus plaasvind, is dit in die eerste plek belangrik dat die reovirus-mRNA betroubaar en ook verteenwoordigend van die normale in vivo-gebeure getransleer word. Dit beteken dat translasië korrek en in die regte verhouding moet plaasvind en verder dat die nodige post-translasionele modifikasies van die reovirusproteïene in die oösiëte moet plaasvind. Die aanwending van die oösiëtsisteem vir die translasië van reovirus-mRNA is reeds in 2.5.3 beskryf. McCrae en Woodland (1981) het 'n belangrike bydrae gelewer deur aan te toon dat al tien reovirus-mRNA's 'n hoë stabiliteit in die oösiëte het, wat vergelykbaar is met dié van tipiese poli(A)-ryke mRNA.

Hierdie waarneming beteken dus dat al tien die reovirus-mRNA's vir 'n tydperk van langer as drie dae na inspuiting in die oösiere beskikbaar is vir translasië. Dit verhoog die kans vir betroubare translasië. Hierdie groep het ook voorgestel dat sekere reovirus-mRNA's minder effektief as ander in die oösiere getransleer word, trouens sodanig so dat die produkte van sekere reovirus-mRNA's glad nie opspoorbaar was nie. Hierdie voorstelling is gebaseer op 'n vergelykende elektroforetiese ondersoek van polipeptiede wat in ongespuite oösiere en in oösiere na mikro-inspuiting met reovirus-mRNA gevorm is. Die proteïene van die twee groepe oösiere is na ekstraksie van dooierproteïene direk op poliakrielamiedgelle gefraksioneer. Die virale proteïene wat in die oösiere gesintetiseer is, is daarna geïdentifiseer deur die gelprofile van die radioaktiewe proteïene van mekaar af te trek. McCrae en Woodland (1981) het egter nie volledig aangedui watter translasiëprodukte wel reovirusproteïene is en watter produkte nie in die oösiere opspoorbaar was nie. Vanweë die hoë endogene translasië-aktiwiteit van die oösiere en die ko-migrasie van oösietprodukte met sekere reovirus-spesifieke proteïene kon daar nie finale afleidings vanaf bogenoemde resultate ten opsigte van die translasië-effektiwiteit van die reovirus-mRNA gemaak word nie.

Hoewel die werk van McCrae en Woodland (1981) aangehaal word as gesaghebbend op die gebied van translasië van reovirus-mRNA (Lane, 1983) is dit tans nog nie duidelik of reovirus-mRNA in die oösietstelsel betroubaar en verteenwoordigend van die *in vivo*-gebeure getransleer word nie.

In die lig van hierdie gegewens is hierdie studie onderneem om die translasië van reovirus-RNA in die oösiere van *Xenopus laevis* verder te ondersoek ten einde 'n bydrae te lewer tot die ontwikkeling van 'n stelsel wat uiteindelik vir die bestudering van molekule-biologiese aspekte van reovirus benut kan word.

Die spesifieke doelstelling wat die probleemstelling vir hierdie ondersoek vorm, is as volg geformuleer:

Die verdere ontwikkeling van die oösietsisteem vir die translase van reovirus-mRNA in opvolging van die eerste ondersoeke van Van der Walt (1978) en McCrae en Woodland (1981).

Die spesifieke aspekte wat die belangrikste huidige leemtes is en wat in hierdie verhandeling aandag sal kry, is die volgende:

1. Om te bepaal of die translase van reovirus-mRNA in die oösiete verteenwoordigend is van translase in vivo, met ander woorde of die verhouding van die reovirus-translasieprodukte wat in die oösiete gesintetiseer word vergelykbaar is met die translase-effektiwiteit van die verskillende reovirus-mRNA's in vivo.
2. Die evaluering van die korrektheid van die translase van reovirus-mRNA's in die oösietsisteem.
3. Om te bepaal of post-translasionele modifikasie van die virusspesifieke proteïene in die oösiete plaasvind al dan nie.

Hierdie aspekte is eksperimenteel ondersoek deur van die volgende benaderingswyses gebruik te maak:

1. In die eerste plek is beide in vitro-getranskribeerde mRNA en gedenatureerde dsRNA van reovirus as bron van boodskapper-RNA benut (hoofstuk 3).
2. 'n Vergelyking is getref tussen die translaseprodukte van reovirus wat in die selvrye koringkiemsisteem gesintetiseer is en die produkte wat in die oösiete van *Xenopus laevis* gevorm is (hoofstukke 4 en 5).
3. Verdere karakterisering van sekere translaseprodukte is uitgevoer om die korrektheid van translase te evalueer (hoofstuk 5).

Die bevindinge wat uit hierdie ondersoek verkry is, word samevattend in hoofstuk 6 behandel.

HOOFSTUK 3

BEREIDING EN ISOLERING VAN REOVIRUS-mRNA EN -dsRNA

3.1 INLEIDING

Met die oog op 'n vergelyking van die translase van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA (hoofstukke 4 en 5) was dit eerstens nodig om voldoende hoeveelhede mRNA en dsRNA te bekom. In hierdie hoofstuk word die eksperimentele metodes vir die bereiding en isolering van reovirus-mRNA en -dsRNA beskryf.

As 'n beginpunt vir hierdie ondersoek word die kweking en isolering van reovirus beskryf, wat in noue samewerking met die Afdeling Biochemie van die Navorsingsinstituut vir Veeartsenykunde te Onderstepoort uitgevoer is. Nadat Skehel en Joklik (1969) vasgestel het dat die viriongeassosieerde transkriptase na behandeling van reovirus met chimotripsien die in vitro-sintese van reovirus-mRNA kataliseer, word hierdie benadering by voorkeur vir die bereiding van groot hoeveelhede reovirus-mRNA benut (Schuerch et al., 1975; Both et al., 1975; Levin en Samuel, 1980; McCrae en Joklik, 1978). 'n Groot voordeel van hierdie metode, soos ook toegepas in hierdie ondersoek, is dat die suiweringsprosedure relatief eenvoudig is, aangesien die reovirus-mRNA nie met sellulêre RNA gekontamineer is nie.

Aangesien die genomiese dubbelstring-RNA van reovirus nooit in vrye vorm sonder 'n proteïenkapsel in geïnfekteerde selle bestaan nie (Gomatos, 1967), is fenolekstraksie in teenwoordigheid van SDS 'n vereiste vir die isolering van dsRNA. In hierdie ondersoek is twee metodes aangewend vir die ekstraksie van reovirus-dsRNA. Die dsRNA kan in die eerste plek uit gesuiwerde reovirus geëkstraheer word, waarna dit dan slegs nodig is om die dsRNA van virale oligonukleotiede te skei (Schuerch en Joklik, 1973). Wanneer die dsRNA egter direk uit geïnfekteerde selle geïsoleer word, is dit nodig om die dsRNA ná die fenolekstraksie van die sellulêre tRNA te skei. Een van die benaderings van hierdie ondersoek was om die translase van individuele

gedenatureerde genoomsegmente in die selvrye koringkiemsisteem (hoofstuk 4) en in die oösietsisteem (hoofstuk 5) te ondersoek. Die elektroforetiese fraksionering van die reovirus-dsRNA en die daaropvolgende suiweringsprosedure word dus ook in hierdie hoofstuk behandel.

3.2 ISOLERING VAN REOVIRUS

3.2.1 Kweking van reovirus

Die Dearing-stam van reovirus tipe 3 is in muis-L-fibroblastselle gekweek. Na infeksie is die selle vir 48 uur by 37°C in Eagle se gemodifiseerde medium wat met 5% beesserum aangevul is (Verwoerd et al., 1967), geïnkubeer. Aangesien die reovirusnageslag onder bogenoemde kondisies baie min in die medium vrygestel word, maar selgeassosieerd bly selfs nadat die selle ge-oes is, kan twee derdes van die groeimedium direk gedekanteer word. Verdere homogenisering van die geïnfekteerde selle is dus noodsaaklik.

3.2.2 Suiwering van reovirus

Die isolering van die reovirus is volgens die metode van Smith et al. (1969) uitgevoer, soos gewysig deur Van der Walt (1978). Die suiweringsprosedure word in skema 3.1 in die vorm van 'n vloeidiagram saamgevat. Die bewerkings is almal by 4°C uitgevoer, tensy anders vermeld. Die ge-oeste muis-L-fibroblastselle is deur sentrifugering in 'n Beckman JA14-rotor teen 3000 × g vir 30 minute gesedimenteer. Die sediment is in 2 mM Tris-HCl (pH 8,8) gesuspendeer (1,5 ml per Rouxfles) en vir 60 sekondes met behulp van 'n Ultra Turrax-homogeniseerder gehomogeniseer. Aangesien reovirus stabiel in gehalogeneerde koolwaterstowwe is, kan Freonekstraksie benut word om die sellulêre proteïene te denatureer. Na die byvoeging van 'n halwe volume Freon 113 en 'n honderdste volume 5% Sephadex (G200 Superfyn) is die homogenisering herhaal. Die Sephadex word bygevoeg om die viskositeit van die homogeniseringsmengsel te verhoog, waardeur die skeurspanning verlaag word. Die homogenaat is dan teen 5000 × g

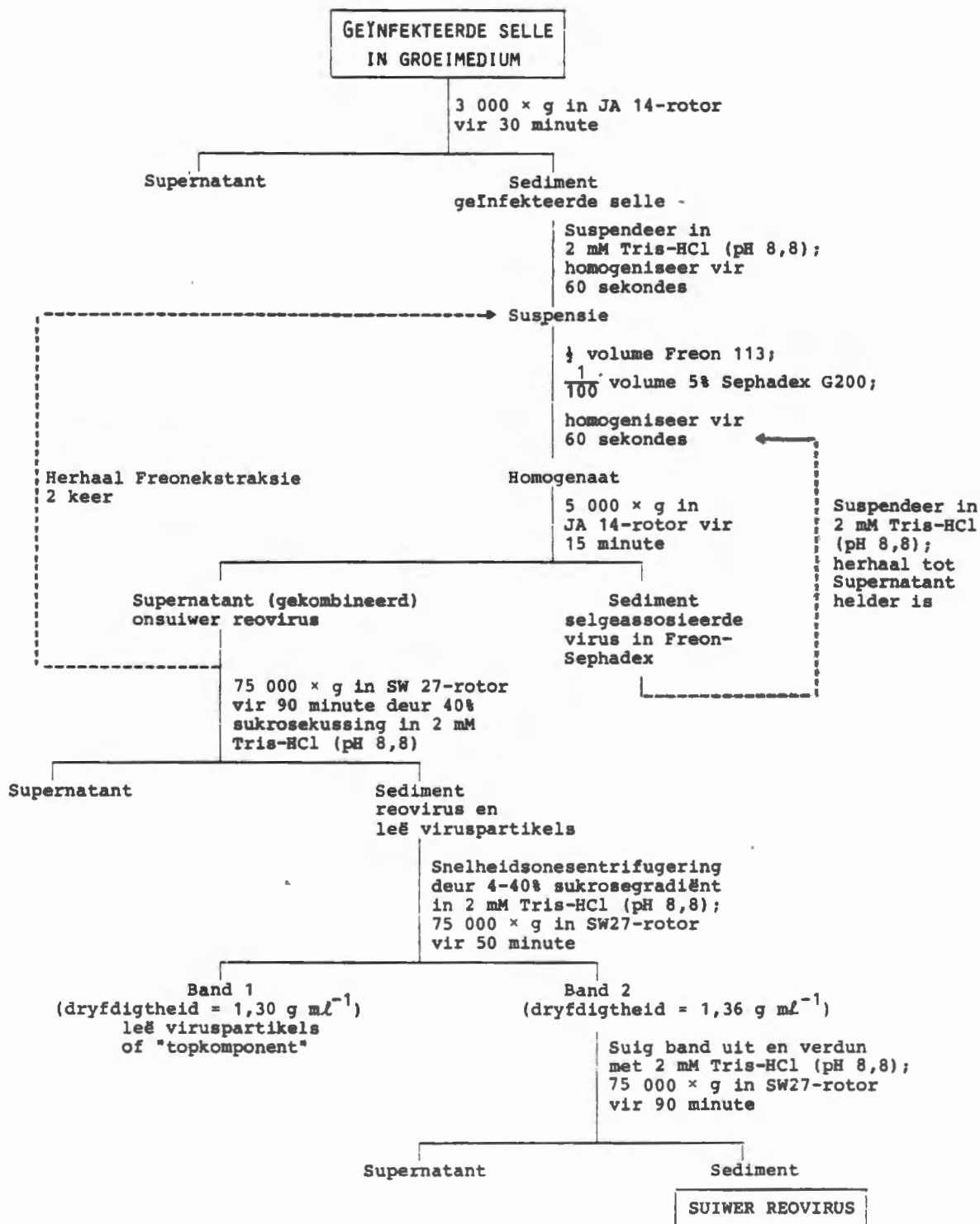
gesentrifugeer waarna die supernatant afgesuig en bewaar is. Die supernatant het die vrygestelde reoviruspartikels in onsuier vorm bevat, terwyl die sediment nog selgeassosieerde reovirus saam met die Freon-Sephadexfase bevat het. Die gedenateerde sellulêre proteïene akkumuleer op die tussenfase. Die opbrengs van reovirus is verhoog deur die homogenisering van die sediment in 2 mM Tris-HCl (pH 8,8) en daaropvolgende sentrifugering drie keer te herhaal. Die supernatante is almal gekombineer en weer twee keer met Freon geëkstraheer terwyl die sedimente met ekwivalente volumes 2 mM Tris-HCl (pH 8,8) gewas is. Die teenwoordigheid van reovirus in die Freon-Sephadexsediment het afgeneem, terwyl die vrye reovirus in die supernatant geakkumuleer het.

Die reovirus in die supernatant is vervolgens gekonsentreer deur die supernatant op 'n sesde volume 40% sukrose in 2 mM Tris-HCl (pH 8,8) te plaas en in 'n Beckman SW27-rotor vir 90 minute teen $75\,000 \times g$ te sentrifugeer. Die reoviruspresipitaat is in 2 mM Tris-HCl (pH 8,8) gesuspendeer en in 3 ml volumes op 'n 4-40% lineêre sukrosegadiënt in 2 mM Tris-HCl (pH 8,8) geplaas. Deur sentrifugering vir 50 minute teen $75\,000 \times g$ is twee opaalagtige bande sigbaar. Hierdie bande is kenmerkend van reovirus (Joklik, 1972). Die boonste band of "topkomponent" verteenwoordig reoviruspartikels sonder genetiese materiaal. Die onderste band wat die intakte reovirions bevat, is met 'n steriele spuit uitgesuig en twee maal met 2 mM Tris-HCl (pH 8,8) verdun. Gewoonlik vorm virusaggregate 'n sediment wat weer in 2 mM Tris-HCl (pH 8,8) gesuspendeer kan word. Deur die gradiëntsentrifugering te herhaal, word weer bande (soos hierbo) verkry. Nadat die virusbevattende bande uitgesuig en verdun is, is die suspensies gekombineer. Die verdunde virussuspensie is teen $75\,000 \times g$ vir 90 minute gesentrifugeer. Die sediment van gesuiwerde reovirus is in 2 mM Tris-HCl (pH 8,8) gesuspendeer tot 'n eindkonsentrasie van 5 mg reovirus ml^{-1} . Die uitwissingskoëffisiënt is volgens Smith et al. (1969) as 5,42 geneem.

Die gemiddelde opbrengs van reovirus wat volgens hierdie isoleringsprosedure verkry word, was ongeveer 1,0 mg reovirus per Rouxfles. Die reovirus is by 4°C vir 'n maksimum van 60 dae bewaar.

SKEMA 3.1

VIRUSSUIWERING



3.2.3 Bereiding van radioaktiewe reovirus

Die strukturele proteïene van reovirus, waarin [^{35}S]-metionien ingebou is, is as standaard vir die elektroforetiese analise van die translasiëprodukte gebruik. Die prosedure vir die kweking van hierdie viruspreparate is soortgelyk aan die beskrywing in 3.2.1.

Die selle is met 'n hoër konsentrasie reovirus geënt en vir 16 ure by 31°C in Eagle se groeimedium geïnkubeer. Nadat die selle met 'n metionien-vrye medium gespoel is, is 15 ml medium met [^{35}S]-metionien ($6\ \mu\text{Ci ml}^{-1}$) by elke Rouxfles gevoeg en vir 'n verdere 20 ure geïnkubeer. Hierna is 30 ml normale medium by elke Rouxfles gevoeg, gevolg deur 'n inkubasietyd van 12 ure, waarna die selle ge-oes en virussuiwering uitgevoer is soos beskryf in 3.2.2.

'n Gemiddelde virusopbrengs van 0,3 mg reovirus per Rouxfles, met 'n spesifieke merking van $8\ 000\ [\text{S}^{35}]\text{-tpm}\ \mu\text{g}^{-1}$ reovirus is verkry.

3.3 BEREIDING VAN REOVIRUS-mRNA

3.3.1 Inleiding

Groot hoeveelhede reovirus-mRNA kan in vitro berei word deur gebruik te maak van die viriongeassosieerde RNA-afhanklike RNA-polimerase (Shatkin en Sipe, 1968). Die transkriptase-aktiwiteit kan geaktiveer word deur gesuiwerde virus met chimotripsien te behandel (Skehel en Joklik, 1969). Hierdie benaderingswyse is ook gebruik vir die bereiding van reovirus-mRNA in hierdie ondersoek.

3.3.2 In vitro-transkripsie

Vir die in vitro-transkripsie van reovirus-RNA is die metode van Both et al. (1975) met enkele wysigings gebruik. Hierdie metode verskil in hoofsaak van die metode van Schuerch et al. (1975) deurdat die reoviruskerne na die chimotripsienbehandeling nie eers van die chimotripsien geskei word voordat met die transkripsie voortgegaan word

nie. Schuerch en medewerkers (1975) het hulle transkripsiemengsel vir 8 ure by 37°C geïnkubeer, terwyl Both en medewerkers (1975) transkripsie vir twee tydperke van 60 minute elk by 45°C uitgevoer het. Na die eerste 60 minute inkubasietydperk is die reoviruskernpartikels na sedimentering in 'n vars transkripsiemengsel gesuspendeer en vir 'n verdere 60 minute by 45°C geïnkubeer. Aangesien die klem in hierdie ondersoek, soos by Both et al. (1975), op die verkryging van volledige transkripte geval het, is die benadering van Both gekies vir die sintese van reovirus-mRNA. Uit vorige ondersoeke in die plaaslike laboratorium (Van der Walt, 1978) is gevind dat die tempo van transkripsie na die eerste 30 minute geleidelik begin afneem om na 5 ure 'n plato te bereik. Hierdie afname is waarskynlik 'n gevolg van die uitputting van ribonukleosiedtrifosfate (Levin et al., 1970), weens verlies aan aktiwiteit van die energie-regenereringsstelsel (kreatienkinase en kreatienfosfaat). 'n Tweede voordeel van twee korter inkubasieperiodes tydens transkripsie is dat die gesintetiseerde mRNA vir korter periodes aan hoë temperature blootgestel is. Die twee inkubasieperiodes is in hierdie ondersoek gewoonlik tot 2 ure en 4 ure verleng. Die redes hiervoor sal in die bespreking van figuur 3.1 gemotiveer word. Die relatief milde suiweringsprosedure van Both et al. (1975) vir die isolering van die reovirus-mRNA na transkripsie is ook benut (kyk 3.3.3).

Die samestelling van die transkripsiemengsel word in tabel 3.1 weergegee.

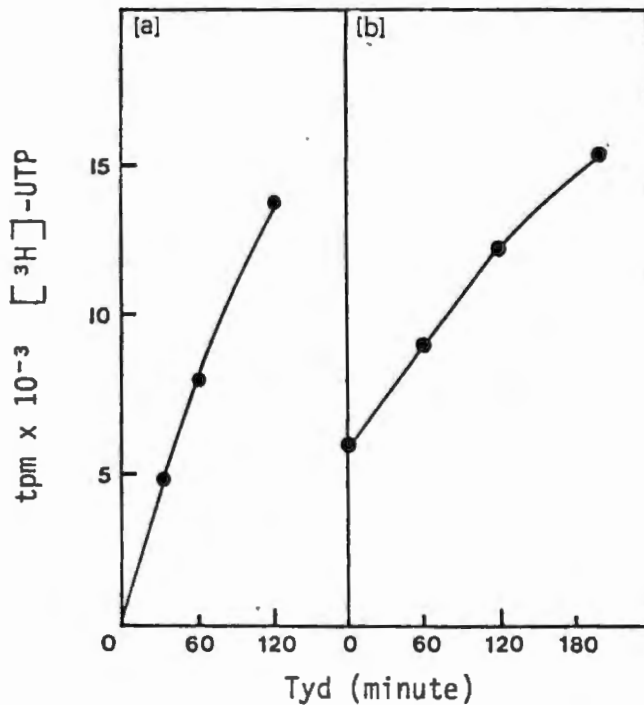
TABEL 3.1 Transkripsiemengsel

Komponente	Eindkonsentrasie
reovirus	400 $\mu\text{g ml}^{-1}$
chimotripsien	200 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Tris-HCl (pH 8,0)	70 mM
KCl	50 mM
magnesiumasetaat	7,5 mM
kreatienfosfaat	0,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$
bentoniet (Zarbl et al., 1980b)	0,5 mg ml^{-1}
ATP, GTP, CTP en UTP	2 mM
SAM (Levin en Samuel, 1977)	10 μM
Finale volume:	5,0 ml

Hierdie reaksiemengsel is vir 30 minute by 45°C geïnkubeer om die transkriptase te aktiveer. Hierna is kreatienkinase tot 'n konsentrasie van 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ by die mengsel gevoeg en 500 μl van die reaksiemengsel onttrek. By die 500 μl reaksiemengsel is [^3H]-UTP tot 'n eindwaarde van 2,5 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ bygevoeg om die transkripsiereaksie kineties te kan volg. Die twee reaksiemengsels is saam vir 'n verdere 2 ure by 45°C geïnkubeer. Vanuit die radioaktiewe mengsel is na opeenvolgende tydsintervalle telkens 50 μl onttrek en by 100 μl draer RNA (2 mg ml^{-1}) gevoeg. Die RNA is gepresipiteer deur 3 ml 10% TCA by te voeg, waarna die presipitaat op nitrosellulose-filters (Millipore HA 0,45 μm) versamel is en 4 keer met 5 ml 5% TCA gewas is. Na droging is die filters in 'n TPP-mengsel (0,7 g% (m/v) PPO en 5 mg% (m/v) POPOP in toluen) aan vloeistofsintillasiespektroskopie onderwerp om die radioaktiwiteit te bepaal (figuur 3.1a).

Die resultate in figuur 3.1(a) toon die verloop van die transkripsieproses vir die eerste inkubasieperiode van 2 uur. Aangesien die radioaktiewe mengsel (500 μl) saam met die 4,5 ml transkripsiemengsel geïnkubeer is,

kan aangeneem word dat hierdie resultate 'n goeie maatstaf van die reaksieverloop in die groter volume is. Vir 'n tydperk van 2 uur was die reaksiesnelheid nog konstant. Dus is die inkubasietydperk van 60 minute soos voorgestel deur Both et al. (1975) na 120 minute verleng.



FIGUUR 3.1 Kinetiek van in vitro-transkripsie. Die prosedure is in 3.3.1 beskryf. Die eerste inkubasiëperiode word in (a) getoon en die tweede in (b).

Om die RNA-transkripte uit die 4,5 ml transkripsiemengsel te isoleer, is die viruskernpartikels saam met die bentoniet na die twee uur inkubasietyd gesedimenteer deur die reaksiemengsel vir 20 minute teen $31\ 000 \times g$ in 'n SW41-rotor te sentrifugeer. Die bentoniet ($0,5\text{ mg ml}^{-1}$) is vooraf bygevoeg om as inhibeerder van RNase op te tree. Die supernatant (Sup1) is by 4°C bewaar. Die sediment is weer in vars reaksiemengsel (sonder virus, chimotripsien en bentoniet) gesuspendeer. Van hierdie mengsel is ook $500\ \mu\text{l}$ onttrek en by die oorblywende radioaktiewe mengsel gevoeg om die transkripsie-aktiwiteit verder te kan

volg. Net soos tydens die eerste inkubasieperiode is 50 μl op gegewe tydsintervalle uit die radioaktiewe transkripsiemengsel onttrek en die radioaktiwiteit in die TCA-onoplosbare materiaal bepaal (kyk figuur 3.1b).

Die kinetiese verloop van die transkripsieproses tydens die tweede inkubasietydperk word in figuur 3.1(b) weergegee. Die radioaktiewe transkripsiemengsel van die eerste inkubasieperiode is aanvanklik met 500 μl van die tweede mengsel verdun. Daarom begin die radioaktiwiteit (in tpm) wat by tyd nul van die tweede inkubasieperiode gemeet is (figuur 3.1b) laer as die laaste lesing in figuur 3.1(a). Die resultate in figuur 3.1(b) toon dat die inkorporasie van [^3H]-UTP in TCA-onoplosbare materiaal aanvanklik lineêr toeneem vir die eerste 120 minute. Daarna begin die sintesetempo stadig afplat, wat 'n geleidelike afname in die snelheid van die transkripsiereaksie vanaf tyd 120 minute tot by die beëindiging van die reaksie na 240 minute impliseer.

Die transkripsiereaksie in die groot reaksiemengsel (4,5 ml) is dan ook na 4 ure van die tweede inkubasietydperk beëindig deur die reoviruskernpartikels met behulp van sentrifugering (soos reeds beskryf) te sedimenteer. Die supernatant (Sup2) is saam met Sup1 by 4°C bewaar met die oog op verdere suiwing van die reovirus-mRNA (kyk 3.3.3).

3.3.3 Suiwing van reovirus-mRNA

Die supernatantfraksies, Sup1 en Sup2, is gekombineer en met 'n gelyke volume waterversadigde fenol geëkstraheer. Die waterfase is daarna volgens die metode van Both et al. (1975) deur Sephadex G50 (2,5 cm $\times$ 30 cm kolom) met 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) geëlueer om materiaal met 'n lae molekulêre massa daaruit te verwyder. KCl is by die uitsluitingsvolume gevoeg tot 'n eindkonsentrasie van 0,15 M waarna die RNA met 2 volumes etanol by -20°C gepresipiteer is. Die RNA is deur sentrifugering vir 20 minute teen 52 000 $\times$ g gesedimenteer. Die sediment is opgelos in STE-buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM NaCl en 1 mM EDTA). Om esRNA selektief te presipiteer is LiCl tot 'n finale konsentrasie van 2 M bygevoeg en oornag by 4°C gelaat. Deur sentrifugering vir 15 minute

teen 25 500 × g is die RNA gesedimenteer. Om die RNA verder te suiwer is die sediment in 90% etanol (-20°C) gesuspendeer, waarna die sentrifugering herhaal is. Die RNA-sediment is tot 'n finale konsentrasie van 1 mg RNA mL⁻¹ in water opgelos.

So 'n transkripsieprosedure het tot 'n gemiddelde opbrengs van 0,6 mg reovirus-mRNA gelei. Die mRNA is in vloeibare N₂ bewaar met die oog op latere translasiestudies (hoofstukke 4 en 5).

3.3.4 Karakterisering van reovirus-mRNA

Digtheidsgradiëntsentrifugering is dikwels vir die karakterisering van die transkripsieprodukte van reovirus benut (Skehel en Joklik, 1969; Van der Walt, 1978). Die resolusie van die reovirus-RNA na skeiding met behulp van hierdie metode is egter sodanig dat slegs die drie hoofklasse mRNA onderskei kan word. Daarom is die reovirus-mRNA met behulp van elektroforese volgens Floyd et al. (1974) gekarakteriseer. Die samestelling van die polimeriseringsmengsel in Loening E-buffer (Loening, 1969) word in tabel 3.2 aangedui.

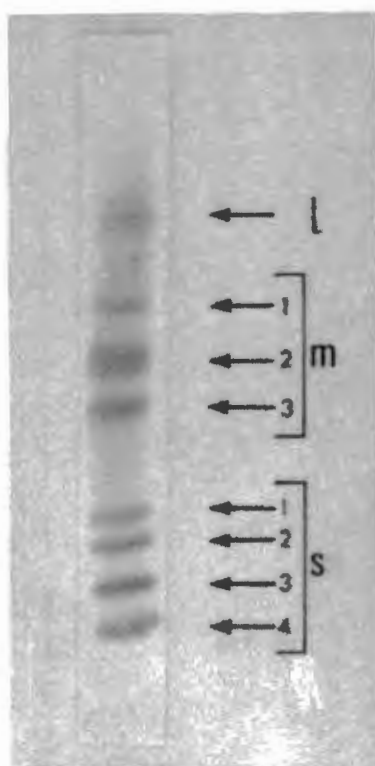
TABEL 3.2 Samestelling van gel vir skeiding van reovirus-mRNA

Komponente	Finale konsentrasie
akrielamied	2%
bisakrielamied	0,1%
agarose	0,6%
ureum	6 M
litiumdodesielsulfaat	0,1%
TEMED	0,1%
ammoniumpersulfaat	0,1%

Hierdie mengsel is soos volg berei: Die agarose is gesmelt deur dit in water te kook waarna dit stadig tot 45°C afgekoel is. Die akrielamied-bisakrielamiedmengsel, met die res van die komponente, is in 'n aparte houer tot 45°C verhit. Die twee mengsels is gekombineer en gemeng tot 'n eenvormige mengsel. Die TEMED en persulfaat is laaste bygevoeg net voordat die mengsel in Perspexbuisegegiet is. As voorsorgmaatree teen die werking van RNases is die buise waarin die gelle gegiet word vooraf oornag in 1% SDS laat lê. Die gelle is vir 3 ure by 25°C gelaat, sodat polimerisering van die akrielamied kan plaasvind. Daarna is die buise met pypgelle oornag by 4°C gelaat, sodat die agarose kan stol. Veertig mikrogram mRNA is op 'n pypgel geplaas en vir 10 ure by 4°C teen 120 V geëlektroforeer met Loening E-buffer in die reservoirs. Die gelle is in 0,01% metileenblou vir 2 ure by 25°C gekleur en in water by 37°C vir 18 ure ontkleur.

'n Fotografiese weergawe van die gel met die gefraksioneerde reovirus-mRNA word in figuur 3.2 aangetoon.

Wanneer die elektroforeseprofiel in figuur 3.2 met soortgelyke gepubliseerde resultate (Floyd et al., 1974; Schuerch et al., 1975; Levin en Samuel, 1977, 1980) vergelyk word, kan die volgende waargeneem word. Al drie hoofklasse (ℓ, m en s) van die mRNA's is gesintetiseer. Die ℓ-klas mRNA's van reovirus is, net soos in die gepubliseerde resultate, omtrent glad nie van mekaar geskei nie. Die teenwoordigheid van die 3 ℓ-spesies is in 'n mRNA-bereiding van reovirus met 'n soortgelyke skeiding deur Floyd et al. (1974) met behulp van hibridisering aan dsRNA aangetoon. Hierdie benadering is egter nie in hierdie ondersoek gevolg nie en uit figuur 3.2 kan daar slegs afgelei word dat ℓ-klas mRNA wel in die transkripsieprodukte teenwoordig is. By die m-klas mRNA kan drie bande in die gel (figuur 3.2) onderskei word. Net soos by Floyd en Schuerch en hulle medewerkers kom die middelste band (band 2) van die m-klas in 'n oënskynlike dubbelband voor.



FIGUUR 3.2 Gefraksioneerde reovirus-mRNA na elektroforetiese skeiding. Die prosedure word in die teks beskryf. Die l, m en s stel die verskillende klasse van reovirus-mRNA voor.

Schuerch et al. (1975) het die aard van die m-klas mRNA's in 'n soortgelyke gel met behulp van hibridisering aan reovirus-dsRNA bepaal. Hieruit het laasgenoemde aangetoon dat die stadigste m-band slegs die m1-mRNA bevat het, die middelste band het 33% m2- en 67% m3-mRNA bevat en die vinnigste m-band het slegs m2-mRNA bevat. Volgens Schuerch en medewerkers (1974) het hierdie effekte nie in gelle wat 2% formaldehyd bevat het, voorgekom nie. Aangesien die gebruik van formaldehyd die vermoë van mRNA tot hibridisasie en translase nadelig beïnvloed, is fraksionering in teenwoordigheid van formaldehyd nie gedoen nie. Op die oog af is die resolusie van die vier s-klas mRNA's in figuur 3.2 baie goed. Levin en Samuel (1980) het egter gevind dat drie van die mRNA-spesies (s1, s2 en s3) gewoonlik gekontamineer was met die vinniger migrerende subspesies. Hierdie resultate dui aan dat die oënskynlike homogeniteit van esRNA-bande deur die kriteria van

mobiliteit na elektroforese (Floyd et al. (1974) met versigtigheid benader moet word.

3.4 EKSTRAKSIE VAN REOVIRUS-dsRNA

3.4.1 Inleiding

In hierdie projek is die genoomsegmente van reovirus self ook as moontlike bron van boodskapper-RNA ondersoek. Hierdie benadering is deur McCrae en Joklik (1978) gevolg om die aard van die polipeptied waarvoor elke individuele segment kodeer te bepaal. Die dsRNA-segmente migreer as digte bande tydens elektroforese in poliakrielamiedgelle en individuele spesies kan in redelike hoeveelhede geïsoleer word (Schuerch et al., 1975). Na die inkubasie van dsRNA in 90% DMSO onder geskikte kondisies vir denaturering (kyk 4.3.3.1), is die dsRNA in 'n selvrye koringkiemsisteem getransleer (McCrae en Joklik, 1978). Hierdie benadering is in hoofstuk 4 gevolg en sal daar behandel word. Vervolgens word die ekstraksie van die dsRNA bespreek.

3.4.2 Ekstraksie van dsRNA uit gesuiwerde reovirus

Wanneer genoegsame hoeveelhede gesuiwerde reovirus beskikbaar was, is 'n geringe gewysigde metode van McCrae en Joklik (1978) vir die isolering van dsRNA gebruik.

Reovirus is in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) tot 'n finale konsentrasie van 1 mg ml⁻¹ gesuspendeer. SDS is tot 'n eindkonsentrasie van 1% bygevoeg en die virus is twee keer by 55°C en een keer by 25°C met gelyke volumes waterversadigde fenol geëkstraheer. Die waterfase is vier keer met gelyke volumes eter geëkstraheer, NaCl is tot 'n finale konsentrasie van 0,15 M bygevoeg en die RNA is deur die toevoeging van twee volumes etanol by -20°C gepresipiteer. Na 3 ure is die presipitaat deur sentrifugering versamel, een keer met 90% etanol (-20°C) gespoel en gevriesdroog. Vir elektroforese is die RNA in Loening E-buffer (Loening, 1969) tot 'n eindkonsentrasie van 1 tot 2 mg ml⁻¹ gesuspendeer. Met die oog op die translase van totale dsRNA is die RNA in 5 mM Tris-HCl (pH 8,0)

gesuspender en deur 'n Sephadex G75-kolom geëlueer om die oligonukleotiede te verwyder (Schuerch en Joklik, 1973). Die dsRNA in die uitsluitingsvolume is met 2 volumes etanol by -20°C gepresipiteer. Na sentrifugering is die presipitaat in water opgelos, sodanig dat die eindkonsentrasie 1 mg RNA mL^{-1} was. Hiervan is $50 \text{ }\mu\text{g}$ en $100 \text{ }\mu\text{g}$ RNA-hoeveelhede gevriesdroog en by -20°C bewaar.

Die opbrengs van dsRNA uit gesuiwerde reovirus was gemiddeld $1,3 \text{ mg dsRNA uit } 10 \text{ mg reovirus}$, gebaseer op 'n ekstinksiekoëffisiënt van 16,67 (Ito en Joklik, 1972).

3.4.3 Ekstraksie van dsRNA uit geïnfekteerde selle

Hierdie is 'n meer ekonomiese benadering as die vorige (3.4.1), aangesien die volledige suiwing van reovirus nie nodig is voordat die ekstraksie van dsRNA uitgevoer word nie. Die ekstraksie van dsRNA uit reovirusgeïnfekteerde muis-L-fibroblast selle is gebaseer op die metodes van Bellamy et al. (1967), Oda en Joklik (1967) en Ito en Joklik (1972).

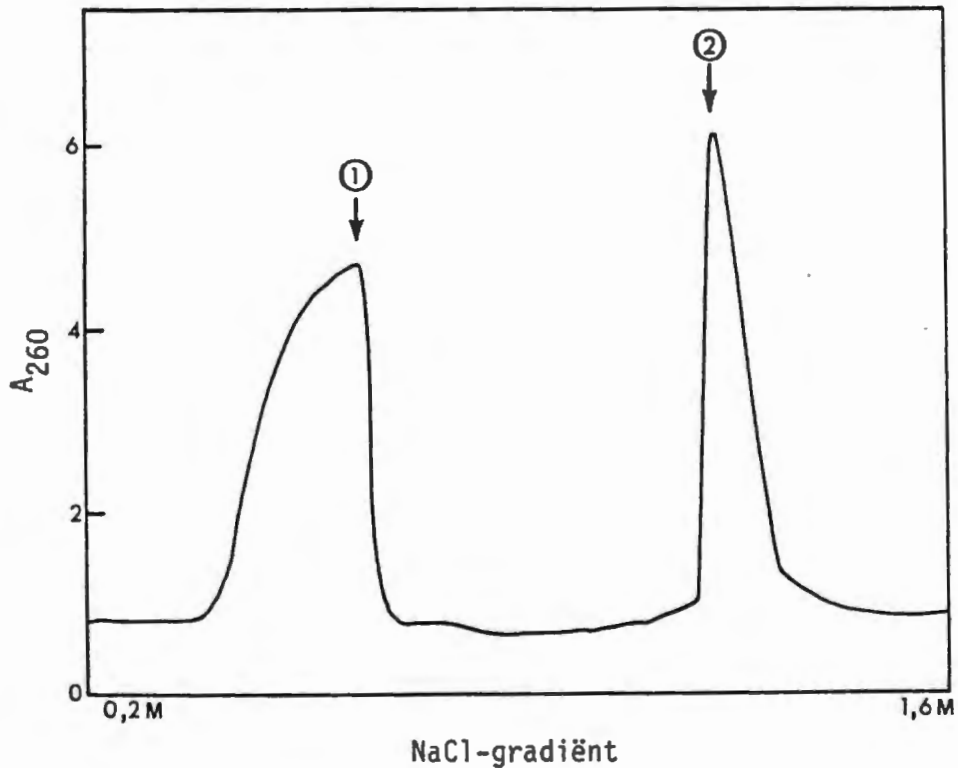
Die geïnfekteerde selle is in RSB-buffer (10 mM NaCl , $1,5 \text{ mM MgCl}_2$ en 10 mM Tris-HCl by pH 7,4) gesuspender en vir 10 minute by 4°C gelaat. Hierby is SDS tot 'n finale konsentrasie van 1% en natriumasetaat en EDTA elk tot 'n konsentrasie van $0,01 \text{ M}$ gevoeg. Nadat die mengsel heftig vir 5 minute geskud is, is 25% asynsuur tot 'n finale pH van 5,0 toegevoeg. By hierdie pH is die sellulêre DNA swak oplosbaar. Die RNA-oplossing is een keer by 55°C en een keer by 25°C met gelyke volumes waterversadigde fenol geëkstraheer. Die waterfase is met twee volumes eter geëkstraheer om die fenol te verwyder. Nadat NaCl tot 'n eindkonsentrasie van $0,1 \text{ M}$ bygevoeg is, is die RNA deur toevoeging van twee volumes etanol by -20°C gepresipiteer. Na sentrifugering is die RNA-presipitaat in $0,01 \text{ M STE}$ opgelos en die esRNA, soos beskryf in 3.3.3, met 2 M LiCl selektief gepresipiteer. Die supernatant wat die dsRNA bevat, is egter nog met sellulêre tRNA gekontamineer.

Vir die skeiding van hierdie twee komponente is affiniteitschromatografie op 'n gemetileerde albumien-kieselgoerkolom (MAK-kolom) baie geskik.

Hierdie metode word algemeen vir die suiwering van virale dsRNA aangewend (Shatkin en Rada, 1967; Shatkin et al., 1968; Verwoerd en Huismans, 1969; Van Dijk, 1985). Hoewel tRNA en dsRNA aan MAK by lae NaCl-konsentrasies (0,1 tot 0,2 M, pH 6,7) bind, word tRNA reeds by ongeveer 0,4 M NaCl vrygestel, terwyl dsRNA eers by hoër soutkonsentrasies uit die kolom verplaas word. Hierdie verskynsel vorm die basis vir die skeiding van tRNA en dsRNA na die LiCl-presipiteringstap in die suiweringsprosedure.

Die supernatant is na verdunning met agt volumes water deur 'n MAK-kolom met 'n 0,2 M tot 1,6 M NaCl-gradiënt in 0,05 M Tris-HCl (pH 6,7) geëlueer. Figuur 3.3 toon 'n tipiese skeiding van nukleïensure op 'n MAK-kolom tydens die suiweringsprosedure van reovirus-dsRNA. Die teenwoordigheid van RNA is deur meting van die optiese digtheid by 260 nm gemonitor.

Die eerste piek in figuur 3.3 bevat hoofsaaklik sellulêre tRNA. Die eluaat van die tweede piek, wat die gesuiwerde dsRNA bevat, is versamel. Die dsRNA is deur toevoeging van twee volumes etanol by -20°C gepresipiteer. Die RNA-presipitaat is in 50 μg en 100 μg hoeveelhede gevriesdroog. Die gemiddelde opbrengs uit so 'n suiweringsproses was 0,1 mg dsRNA per Rouxfles. Tussen hierdie gevriesdroogde dsRNA en dié van 3.4.2 was daar dus uiteindelik na volledige suiwering teoreties geen verskil nie. Die dsRNA van albei hierdie suiweringsprosedures is later in hoofstukke 4 en 5 vir translasiestudies benut.



FIGUUR 3.3 Chromatogram van RNA tydens fraksionering op 'n MAK-kolom. Onsuier dsRNA is met 'n 0,2 tot 1,6 M NaCl-gradiënt in 0,05 M Tris-HCl (pH 6,7) geëluëer. Die eluaat is vir die teenwoordigheid van A_{260} -absorberende materiaal gemonitor.

3.4.4 Karakterisering van dsRNA

Die reovirusgenoom kan volgens die grootte van die verskillende segmente in drie klasse verdeel word, naamlik L-, M- en S-klas (Bellamy et al., 1967). Hierdie drie klasse kan verder elektroforeties in tien diskrete fraksies geskei word (Shatkin et al., 1968). Met die oog op karakterisering is die geïsoleerde dsRNA volgens die metode van Schuerch en Joklik (1973) deur skeiding op poliakrielamiedgelle geanaliseer. Die samestelling van die pypgelle in Loening E-buffer (Loening, 1969) word in tabel 3.3 getoon.

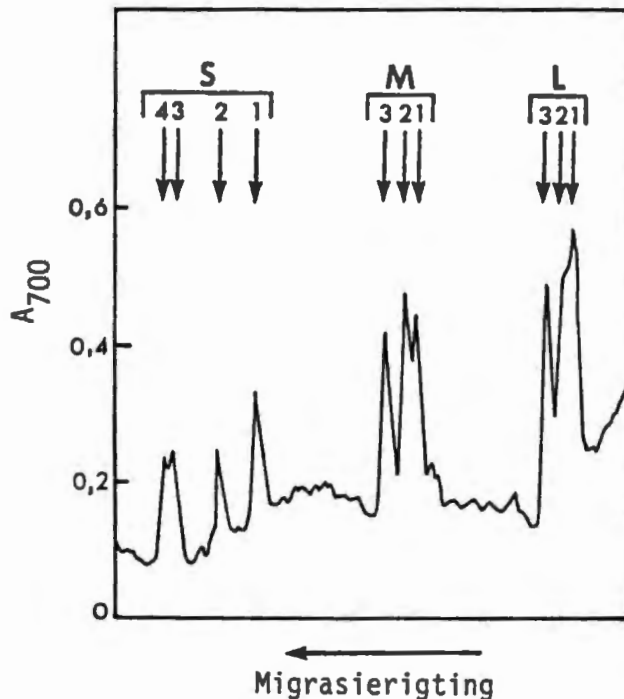
TABEL 3.3 Samestelling van gelle vir skeiding van reovirus-dsRNA

Komponente	Finale Konsentrasie
akriëlamied	7,5%
bisakriëlamied	0,2%
SDS	0,1%
TEMED	0,1%
ureum	6 M
ammoniumpersulfaat	0,04%

Loening E-buffer met 0,1% SDS is tussen die reservoïrs gesirkuleer, terwyl elektroforese vir 20 ure teen 50 volt by 25°C uitgevoer is.

Na elektroforese is die gelle vir 15 minute in 1 M asynsuur gelaat en daarna oornag in water by 25°C geïnkubeer om die SDS te verwyder. Die dsRNA is met 0,01% metileenblou in 0,02 M natriumasetaat (pH 7,8) gekleur (Schuerch et al., 1975). Densitometerprofiele van die gefraksioneerde dsRNA is met behulp van 'n Beckman Acta cIII-gekoppelde gel-aftaster verkry (figuur 3.4).

Die profiel in figuur 3.4 toon duidelik die tien dsRNA-spesies, naamlik drie L-, drie M- en vier S-spesies. Hierdie skeidingspatroon kom ooreen met die resultate van Schuerch en Joklik (1973) waar bande 1 en 2 van die L-klas en bande 3 en 4 van die S-klas ook naby aan mekaar migreer. Die resolusie kan wel verbeter word deur in 'n hoër persentasie poliakriëlamiedgel en vir langer periodes te elektroforeer (McCrae en Joklik, 1978). Vir die doeleindes van karakterisering van die gesuiwerde dsRNA was die resultaat in figuur 3.4 egter bevredigend.



FIGUUR 3.4 Densitometerprofiel van gefraksioneerde dsRNA na skeiding op PAGE (3.4.4) en kleuring met metileenblou.

Wanneer die skeidingsprofiel van die dsRNA (figuur 3.4) met die skeiding van die reovirus-mRNA in figuur 3.2 vergelyk word, is die beter resolusie van die L-klas dsRNA teenoor die ℓ -klas mRNA veral opvallend. Die densitometerprofiel in figuur 3.4 gee wel in 'n mate 'n aanduiding van die nouer bande van die geskeide dsRNA-spesies in vergelyking met die bande van die mRNA-spesies in figuur 3.2 (kyk Schuerch en Joklik, 1973 vir 'n fotografiese weergawe van 'n dsRNA-elektroforetogram). Volgens die literatuur (Schuerch et al., 1975; McCrae en Joklik, 1978) kom die probleem van kontaminasie van individuele dsRNA-bande met naasliggende dsRNA-spesies na elektroforetiese skeiding blykbaar nie voor nie. Die mobiliteit van die dsRNA-spesies korreleer ook direk met hulle molekulêre grootte. Dit beteken dat die stadigste migrerende band die L1-spesie is met L2 en L3 daaropvolgend tot by S4 wat die heel vinnigste migreer (kyk ook tabel 2.1).

3.5 FRAKSIONERING VAN REOVIRUS-dsRNA

3.5.1 Inleiding

Skeiding deur middel van PAGE is 'n handige tegniek vir die isolering van individuele RNA-spesies vanuit 'n komplekse mengsel. Hierdie preparatiewe skeidingstegniek het 'n baie groter resolusie vir reovirus-dsRNA as vir esRNA. Selfs onder optimale kondisies is die bande wat deur die esRNA's gevorm word drie tot vyf keer breër as die bande van die dsRNA (vergelyk figure 3.2 en 3.4). Die rede daarvoor is moontlik die veel minder rigiede, maar steeds uitgesproke, sekondêre struktuur van die esRNA tydens elektroforese (Floyd et al., 1974 en Schuerch et al., 1975). Die fraksionering van dsRNA-spesies en die daaropvolgende translase van die geïsoleerde spesies vorm 'n deel van hierdie projek. Met die oog op die translase van die dsRNA (hoofstukke 4 en 5) is die kritiese fase van die fraksionering uiteraard die suiwering van die dsRNA na die elektroforetiese skeiding.

3.5.2 Elektroforetiese skeiding van dsRNA

Die metode van preparatiewe elektroforetiese skeiding is gebaseer op die prosedure van Schuerch en Joklik (1973) soos aangepas deur McCrae en Joklik (1978). Plaatgelle (5 mm dik) met 'n konsentrasie van 9% akrielamied is voorberei soos beskryf in 3.4.4. Ongeveer 1 mg reovirus-dsRNA (kyk 3.4.2) in Loening E-buffer (Loening, 1969) is op 'n preparatiewe gel geplaas en vir 96 ure teen 50 volt by 25°C geëlektroforeer. Die RNA is onder ultravioletlig na kleuring met 0,01% etidiumbromied in 0,02 M natriumasetaat (pH 7,8) gelokaliseer. Die RNA-bevattende gebiede is met 'n skalpel uitgesny en die gelsnitte (ongeveer 6 cm × 0,5 cm × 0,5 cm) wat die dsRNA-spesies bevat, is elkeen afsonderlik in 5 ml Loening E-buffer in dialisebuisse toegeknoop.

Die plaaslike laboratorium het nie op die stadium van die ondersoek oor fasiliteite vir die fotografering van etidiumbromiedgekleurde RNA-bande onder ultravioletlig beskik nie. Daarom kan geen weergawe van die preparatiewe skeiding van dsRNA getoon word nie. Die skeidingspatroon

het in 'n groot mate ooreengestem met die kwalitatiewe skeiding van dsRNA soos weergegee in figuur 3.4. Hoewel die persentasie akrielamied vir die preparatiewe skeiding hoër was (9% teenoor 7,5%) en die elektroforesetyd langer was as in 3.4.4 het die dsRNA-spesies L1 en L2, asook S3 en S4, steeds baie naby aan mekaar gemigreer. Die dsRNA-bande van die preparatiewe skeiding was ook effens breër as tydens die kwalitatiewe skeiding (figuur 3.4). Die relatiewe groot hoeveelheid dsRNA (1 mg) wat op die preparatiewe gel geskei word, is 'n moontlike oorsaak vir bogenoemde effekte.

3.5.3 Eluering van dsRNA

Die herwinning van biologies aktiewe nukleïensure vanuit poliakrielamiedgelle is 'n tydrowende proses, maar is 'n baie kritiese stap met betrekking tot die daaropvolgende eksperimente. Hoewel tegnieke waar gelle fyngemaak of opgelos is vir DNA- of RNA-eluering beskryf is, lei elektroforetiese eluering tot beter herwinning. Laasgenoemde geld veral vir fragmente met hoë molekulêre gewig en is verder geskik vir poliakrielamied- en agarosegelle (Chouikh et al., 1979). Die prosedure soos beskryf deur Wienand et al. (1979) bied geleentheid vir die gelyktydige eluering van 'n aantal monsters per elueringsgel en het tot die herwinning van biologies aktiewe materiaal (hoofstuk 4) gelei. Hierdie tegniek is dan ook in hierdie ondersoek aangewend vir die herwinning van dsRNA-spesies uit poliakrielamiedgelle.

'n Horisontale elueringsgel van 1% agarose in Loening E-buffer is op 'n Perspexplaat gegiet, sodat die elueringsgel 2 mm dikker as die preparatiewe poliakrielamiedgel (3.5.1) was. Reghoekige putte, ongeveer twee keer die wydte van die RNA-bevattende preparatiewe gelgebiede, is uit die middel van die elueringsgel gesny sodat die uitgesnyde preparatiewe gelstukke in die dialisebuis daarin kan pas. Vir die doel van hierdie ondersoek is sewe putte vir gelyktydige eluering van RNA voorberei. Dieselfde elueringsgel kan, soos beskryf deur Wienand et al., 1979, suksesvol vir meerdere agtereenvolgende eluerings benut word. Nadat die gelbevattende dialisebuis in die putte geplaas is, is die putte en die reservoirs met Loening E-buffer gevul. Elektroforese is vir 10 ure

by 8°C uitgevoer. Aan die einde van die elektroforesetydperk is die polariteit van die kragbron vir 2 minute omgekeer om die RNA wat aan die wand van die dialisebuis mag kleef, vry te stel. Die geëlueerde dsRNA is dus nou in die buffer binne-in die toegeknoopte dialisebuis opgelos.

3.5.4 Suiwering van gefraksioneerde dsRNA

Die buffer in elke dialisebuis is met 'n Pasteurpipet uitgesuig en die dialisebuis met 2 ml water uitgespoel. Die afsonderlike oplossings is met gelyke volumes iso-amielalkohol geëkstraheer om die etidiumbromied te verwyder, waarna fenolekstraksie met die waterfase uitgevoer is (McCrae en Joklik, 1978). Na 'n etanolpresipitering, soos voorheen beskryf (3.4.2), was daar egter nog 'n etanolonoplosbare kontaminant wat met die RNA ko-sedimenteer. Die dsRNA is van die kontaminante op 'n Sephadex G50-kolom geskei, soos beskryf vir die suiwering van reovirus-mRNA (3.3.3). Na etanolpresipitering van die dsRNA wat in die uitsluitingsvolume elueer, is die dsRNA in 8 µg hoeveelhede gevriesdroog. Die gevriesdroogde dsRNA-spesies is by -20°C bewaar vir latere translasië-ondersoeke (kyk hoofstukke 4 en 5).

Die gemiddelde opbrengs van die individuele dsRNA-spesies na die suiwering van die gefraksioneerde dsRNA was 40 µg dsRNA per spesie vir elke 1 mg dsRNA wat aanvanklik op die preparatiewe gel geplaas is. Daar is verskillende metodes waarmee die suiwerheid en integriteit van die geïsoleerde dsRNA-spesies getoets kan word, waaronder elektroforetiese analise (vergelyk Schuerch et al., 1975). In die lig van die beskikbare hoeveelheid materiaal is volstaan met die translasië van die gesuiwerde dsRNA-spesies as 'n finale toets (kyk 4.6).

3.6 SAMEVATTING

Die doel van hierdie gedeelte van die ondersoek was die bereiding en suiwering van voldoende hoeveelhede reovirus-mRNA en -dsRNA met die oog op translasiestudies, wat in die volgende twee hoofstukke aan die orde kom. Die gemiddelde opbrengste van reovirus, reovirus-mRNA en dsRNA kan met waardes uit die literatuur vergelyk word.

Joklik (1974) maak melding van reovirusopbrengste, na kweking in suspensiekulture van muis-L-fibroblaste, van tot 3 mg reovirus per 10^8 selle (vergelykbaar met een Rouxfles), terwyl die opbrengste vir hierdie ondersoek (3.2.2) tussen 0,7 en 1,5 mg per Rouxfles gewissel het. Die verskil kan te wyte wees aan suboptimale kwekingskondisies of verlies tydens die suiweringsprosedure. Aangesien Joklik (1974) 'n inkubasietemperatuur van 33°C (waar die sitopatiesse effek van reovirus minder is) tydens kweking van die virus gehandhaaf het, teenoor 37°C in hierdie ondersoek, mag die verskil in opbrengs wel op die terrein van die kweking lê. Die opbrengs van reovirus wat in hierdie ondersoek verkry is, was egter heeltemal voldoende vir die doel van hierdie ondersoek.

Both et al. (1975) wie se metode as riglyn vir die bereiding van reovirus-mRNA gevolg is, het ongeveer 1 mg mRNA uit vergelykbare transkripsiemengsels verkry. 'n Gemiddelde opbrengs van 0,6 tot 0,8 mg reovirus-mRNA is vir hierdie ondersoek (3.3.3) verkry. Dit vergelyk goed met bogenoemde waarde uit die literatuur. Wat egter van groter belang vir hierdie ondersoek is, is die kwaliteit van die reovirus-mRNA wat na die suiwing (3.3.3) verkry is. Die resultate wat tydens die karakterisering van die transkripsieprodukte (3.3.4) verkry is, gee wel 'n aanduiding dat die integriteit van die gesuiwerde reovirus-mRNA bevredigend is. Die intaktheid van die reovirusboodskappers sal egter beter na die translasië-ondersoeke in hoofstukke 4 en 5 geëvalueer kan word.

Volgens Gomatos en Tamm (1963) bevat reovirions ongeveer 14,6% dsRNA. Dit beteken dat 10 mg gesuiwerde reovirus teoreties 'n maksimum opbrengs van 1,46 mg dsRNA kan lewer. Die 1,3 mg dsRNA per 10 mg gesuiwerde reovirus wat in hierdie ondersoek (3.4.2) geïsoleer is, verteenwoordig dus 'n herwinning van ongeveer 90%. Die isolering van reovirus-dsRNA uit geïnfekteerde selle het in hierdie ondersoeke 'n gemiddelde opbrengs van 0,1 mg dsRNA per Rouxfles gelewer. Volgens die suiwing van reovirus in 3.2.2 lewer een Rouxfles ongeveer 1 mg reovirus. Die isolering van dsRNA uit geïnfekteerde selle verteenwoordig dus by benadering 'n opbrengs van 60%. Hoewel laasgenoemde

isoleringsprosedure miskien meer ekonomies mag wees, wil dit blyk dat daar 'n kleiner verlies aan materiaal tydens die isolering van dsRNA uit gesuiwerde reovirus voorkom. Herwinning van DNA-fragmente met behulp van elektroforetiese eluering het volgens Chouikh et al. (1979) en Wienand et al. (1979) opbrengste van ongeveer 80% gelewer. In hierdie ondersoek het die herwinning van gefraksioneerde dsRNA-spesies 'n benaderde opbrengs van 40% (1 mg dsRNA lewer 40 µg per spesie) gelewer. Die herwinning van die DNA-fragmente was egter uit 1% agarosegelle waar die verwydering van 'n etanolonoplosbare kontaminant (soos by die dsRNA in 3.5.4) nie nodig was nie.

In hierdie hoofstuk is beskryf hoedat die eerste doelwit van hierdie studie bereik is, naamlik om voldoende materiaal te berei om met die translasië-ondersoek te kan voortgaan. Hierdie translasiestudies word in hoofstukke 4 en 5 beskryf.

HOOFSTUK 4

TRANSLASIE VAN REOVIRUS-RNA IN 'N SELVRYE KORINGKIEMSISTEEM

4.1 INLEIDING

Reovirus verteenwoordig 'n unieke sisteem met 'n genoom wat uit tien onderskeie dsRNA-segmente bestaan (Shatkin et al., 1968) en wat volledig in vivo (Hay en Joklik, 1971) en in vitro (Skehel en Joklik, 1969) in tien mRNA-spesies getranskribeer word. Both et al. (1975) het aangetoon dat die koderingspotensiaal van die reovirusgenoom ten volle benut word deur tien polipeptiede, wat in geïnfekteerde sellisate teenwoordig is, in 'n selvrye koringkiemekstrak te sintetiseer. Hierdie tien translasiëprodukte is derhalwe as die sogenaamde primêre geenprodukte gekarakteriseer. McCrae en Joklik (1978) het later die volledige koderingstoekenings vir reovirus bepaal (kyk tabel 2.1) deur die translasië van individuele gedenatureerde dsRNA-spesies in 'n selvrye koringkiemsisteem uit te voer (kyk ook die bespreking van die translasië van reovirus-mRNA in vitro in 2.5.3).

Verskeie selvrye sisteme is reeds vir die in vitro-translasië van reovirus-RNA benut (kyk 2.5.3). Aangesien die translasië van beide reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA reeds suksesvol in die in vitro-koringkiemsisteem aangetoon is (Both et al., 1975; McCrae en Joklik, 1978), is laasgenoemde sisteem gekies met die oog op translasiëstudies in 'n selvrye sisteem wat ook as voorbereiding vir ondersoeke in die oösietsisteem (hoofstuk 5) gedien het. Die koringkiemsisteem is reeds in die plaaslike laboratorium vir ander translasië-ondersoeke benut (De Wet, 1981) en was dus maklik bekombaar. Dit is ook reeds aangetoon dat dsRNA (tot eindkonsentrasies van $10 \mu\text{g ml}^{-1}$) geen invloed op proteïensintese in die koringkiemsisteem uitoefen nie (Grill et al., 1976), terwyl dieselfde konsentrasies wel tot inhibisie van proteïensintese in 'n retikulosietlisaatsisteem lei (Baglioni et al., 1978).

In hierdie hoofstuk is sekere aspekte van die translase van reovirus-mRNA en gedenateerde dsRNA in die koringkiemsisteem verder ondersoek en onderling met mekaar vergelyk, enersyds as aanvulling tot bestaande kennis hieroor en andersyds ter voorbereiding vir die sintese van reovirusproteïene vir verdere detailanalises. Die selvrye koringkiemsisteem is ook benut om die suiwerheid en funksionele integriteit van die dsRNA na die fraksionering en suiwering daarvan (3.5) te ondersoek.

4.2 STANDAARDISERING VAN 'N IN VITRO-KORINGKIEMSISTEEM

4.2.1 Bereiding van 'n koringkiemekstrak

Die bereiding van 'n postmitochondriale koringkiemekstrak is uitgevoer soos beskryf deur De Wet (1981). Hierdie prosedure is gebaseer op die metode van Roberts en Paterson (1973). Bereidings volgens hierdie metode is met sukses vir die translase van reovirus-mRNA aangewend (Both et al., 1975).

In 'n vysel wat vooraf tot 4°C verkoel is, is ses gram koringkiem met 'n gelyke massa gesuiwerde sand fyn gemaal om die selle te breek. Toenemende hoeveelhede van die homogeniseringsmedium (20 mM Tris-HCl pH 7,6; 100 mM KCl; 1 mM magnesiumasetaat; 2 mM CaCl_2 ; 6 mM 2-merkpto-etanol) is met tussenposes tot 'n eindvolume van 28 ml bygevoeg. Hierna is 'n postmitochondriale supernatant berei deur die homogenaat vir 15 minute teen $30\,000 \times g$ te sentrifugeer. Die bostandige materiaal is versigtig onttrek sonder om die vetlagie op die oppervlak te versteur. Soos by De Wet (1981) is die preïnkubasie van die ekstrak uitgelaat. 'n Sephadex G25-kolom (38 $\times$ 2,5 cm) is gepak en met elueringsbuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,6; 100 mM kaliumasetaat; 3 mM magnesiumasetaat; 6 mM 2-merkpto-etanol) geëkwilibreer (Hunter et al., 1977). Die postmitochondriale fraksie (15-20 ml) is by 4°C teenvertikaal oor die kolom gechromatografeer. Die materiaal wat in die uitsluitingsvolume elueer, is versamel. Hierdie koringkiemekstrak is in 1 ml fraksies met 'n gemiddelde konsentrasie van $95 A_{260}$ -eenhede ml^{-1} onder vloeibare stikstof bewaar. Hierdie gelfiltrasiestap het tot die

bereiding van preparate met 'n hoër aktiwiteit gelei, as die dialiseprosedure wat Shih en Kaesberg (1973) aanbeveel (De Wet, 1981).

4.2.2 Samestelling van die koringkiemsisteem vir in vitro-translasie

Die in vitro-koringkiemtranslasiesisteem is saamgestel volgens die voorskrifte van Hunter et al. (1977) en De Wet (1981). Die inkubasiemedium het 20 μl van die koringkiemekstrak ($85 A_{260}$ -eenhede mL^{-1}) per 50 μl reaksiemengsel bevat. Die finale konsentrasies van die komponente word in tabel 4.1 saamgevat.

TABEL 4.1

'N SAMESTELLING VAN DIE KORINGKIEMSISTEEM VIR DIE TRANSLASIE VAN REOVIRUS-RNA ⁽¹⁾

No.	Komponent	Aanvanklike konsentrasie	Volume toegevoeg (μl)	Uiteindelijke konsentrasie
I	koringkiemekstrak	$85 A_{260}$ -eenhede mL^{-1}	1000	$34 A_{260}$ -eenhede mL^{-1}
II	ATP (K^+ -sout)	20 mM	(2)	1 mM
III	GTP (K^+ -sout)	2 mM		0,1 mM
IV	kreatienfosfaat	200 mM		10 mM
V	kreatienkinase	10 mg mL^{-1}	12,5	50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
VI	Tris-HCl (pH 7,6)	1 M	30	20 mM
VII	2-merkpto-etanol	-	-	2,4 mM.
VIII	kaliumasetaat ⁽³⁾	2 M	150	120 mM
IX	magnesiumasetaat	0,2 M	40	3,2 mM
X	kaliumasetaat ⁽⁴⁾	2 M	137,5	110 mM
XI	magnesiumasetaat	0,2 M	32,5	2,6 mM
XII	[^3H]-leusien ⁽⁵⁾	1 mCi mL^{-1}	25	10 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$
XIII	[^{35}S]-metionien ⁽⁵⁾	10 mCi mL^{-1}	25	100 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$
Finale volume ⁽⁶⁾				2,5 mL

1. Die samestelling is weergegee vir die optimale kondisies vir die translasie van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA.
2. ATP, GTP en kreatienfosfaat is gelyktydig in die vorm van 'n "energiemengsel" toegevoeg.
3. Vir die translasie van reovirus-mRNA is kaliumasetaat en magnesiumasetaat soos by VIII en IX bygevoeg.
4. Vir die translasie van gedenatureerde reovirus-dsRNA is kaliumasetaat en magnesiumasetaat soos by X en XI bygevoeg.
5. Of [^3H]-leusien of [^{35}S]-metionien is in die reaksiemengsel ingesluit. Die toevoeging van [^3H]-leusien is by die translasiemengsels wat aan produkanalise onderwerp is (4.4) verhoog en sal by elke eksperiment gespesifiseer word.
6. Die finale volume is na die toevoeging van die boodskapperpreparaat tot 2,5 mL met water aangevul.

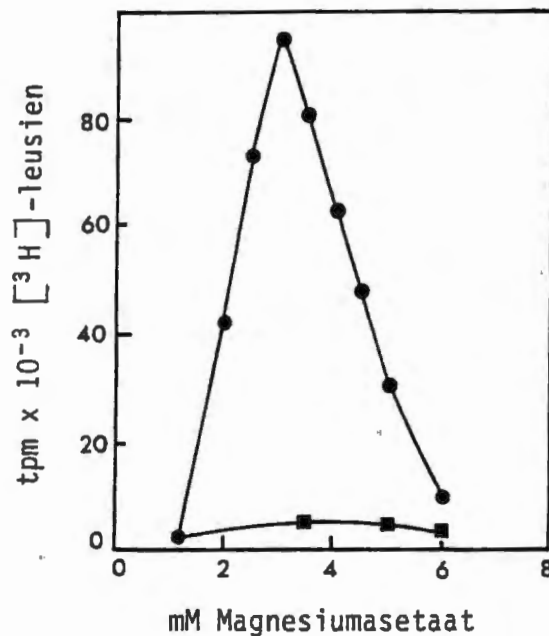
Die konsentrasies van komponente I tot VII is in hierdie ondersoek deurgaans konstant gehou, terwyl die optimale konsentrasies van die K^+ , Mg^{2+} en RNA vir die reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA afsonderlik bepaal is (kyk 4.3). In die eksperimente waarin die optimale kondisies bepaal is, is [3H]-leusien in die reaksiemengsels ingesluit. Waar produkanalises van die translase gedoen is, is of [^{35}S]-metionien of [3H]-leusien gebruik. Die presiese kondisies sal by die verskillende ondersoeke gespesifiseer word.

Die reaksiemengsels is vir 60 minute by $29^{\circ}C$ geïnkubeer, tensy anders vermeld.

4.2.3 Aktiwiteitsbepaling met konynglobien-mRNA

In die plaaslike laboratorium is die koringkiemtranslasiesisteen reeds in samehang met globien-mRNA as eksterne mRNA gebruik (De Wet, 1981). Daarom is die aktiwiteit van nuutbereide koringkiemekstrakte aanvanklik deur die translase van globien-mRNA as 'n funksie van die magnesiumasetaatkonsentrasie gemonitor. Globien-mRNA wat volgens die metode van Krystosek et al. (1975) berei is, is deur prof. W.J. de Wet beskikbaar gestel.

Na die inkubasieperiode is elke monster, saamgestel as $50\ \mu l$ reaksiemengsels, met 1 ml water verdun. Na vermenging met 0,5 ml 1,0 M NaOH is die mengsels vir 10 minute by $37^{\circ}C$ geïnkubeer. Die nie-hidroliseerbare materiaal is met 0,5 ml 50% TCA gepresipiteer en vir 20 minute by $4^{\circ}C$ gelaat. Die gepresipiteerde materiaal is op Millipore-membrane (HA 0,45 μm) afgefiltreer en 4 keer met 5 ml 5% TCA gewas. Die radioaktiwiteit op die gedroogde membrane is bepaal soos beskryf in 3.3.2. Die inkorporasie van radioaktiewe aminosure in TCA-onoplosbare materiaal wat as tpm gemeet is is as maatstaf vir translase-aktiwiteit gebruik en word in figuur 4.1 getoon.



FIGUUR 4.1 Aktiwiteitsbepaling van die selvrye koringkiemsisteem. Translasie van globien-mRNA as 'n funksie van die magnesiumasetaatkonsentrasie by finale konsentrasies van 70 mM KCl, 10 μ Ci [3 H]-leusien mL^{-1} en 9 μ g mRNA mL^{-1} . 'n Reaksiemengsel wat in die afwesigheid van eksogene mRNA geïnkubeer is, dien as kontrole (■).

Die resultaat in figuur 4.1 toon 'n lae endogene boodskapperaktiwiteit met 'n twintigvoudige verhoging (9600 tpm teenoor 490 tpm) in aktiwiteit na toevoeging van globien-mRNA. Hierdie waarde is vergelykbaar met ander gepubliseerde waardes (De Wet, 1981; Roberts en Paterson, 1973). Die inkorporasie van [3 H]-leusien in proteïenmateriaal kan dus hoofsaaklik aan die translasie van eksogene mRNA in die koringkiemsisteem toegeskryf word.

Die magnesiumasetaat-optimum van 3 mM in figuur 4.1 kom ooreen met die bevinding van De Wet (1981) en illustreer die teenwoordigheid van aktiewe inisiasiefaktore in die koringkiemekstrak.

4.3 'N VERGELYKING VAN SEKERE OPTIMALE KONDISIES VIR DIE TRANSLASIE VAN REOVIRUS-mRNA EN GEDENATUREERDE dsRNA IN DIE KORINGKIEMSISTEEM

4.3.1 Inleiding

Van die belangrikste faktore wat die translasië van alle boodskapper-RNA in in vitro-sisteme beïnvloed en deur die tipe boodskapper bepaal word, is die K^+ - en Mg^{2+} -konsentrasies (Roberts en Paterson, 1973). In die literatuur (Both et al., 1975; Levin en Samuel, 1977, 1980; McCrae en Joklik, 1978) is gevind dat die optimale Mg^{2+} - en K^+ -konsentrasies vir die translasië van reovirus-mRNA in selvrye koringkiemsisteme onderling van mekaar verskil.

By die bepaling van die K^+ -optima in die literatuur is of KCl of kaliumasetaat in die in vitro-koringkiemsisteem ingesluit. Both et al. (1975) het die translasië van reovirus-mRNA by 90 mM KCl uitgevoer, terwyl McCrae en Joklik (1978) 'n laer KCl-optimum van 35 tot 45 mM vir die translasië van reovirus-mRNA bepaal het. Levin en Samuel (1977) het aanvanklik reovirus-mRNA by 75 mM kaliumasetaat getransleer, maar dit later na 125 mM kaliumasetaat verhoog (Levin en Samuel, 1980). Weber et al. (1977a) het die invloed van KCl en kaliumasetaat op proteïensintese in eukariotiese selvrye sisteme ondersoek. Weber en medewerkers het vasgestel dat die optimale K^+ -konsentrasie vir translasië in onder andere 'n in vitro-koringkiemsisteem by 70 tot 80 mM KCl of 110 tot 150 mM kaliumasetaat bereik word. Dit het geblyk dat die verskillende K^+ -optima aan die inhibisie van proteïensintese deur Cl^- by konsentrasies hoër as dié teenwoordig in die sitoplasma van eukariotiese selle (70 tot 80 mM) toegeskryf kan word. In die lig van bogenoemde is besluit om in hierdie ondersoek die asetaatsoute van kalium en magnesium in die translasiemengsels in te sluit vir die translasië van beide reovirus-mRNA en gedenateerde dsRNA. Hoewel Mg^{2+} meestal in die vorm van magnesiumasetaat by in vitro-translasië sisteme gevoeg word, bestaan ook hier opvallende variasie. McCrae en Joklik (1978) het die optimale magnesiumasetaatkonsentrasie vir die translasië van reovirus-mRNA in die koringkiemsisteem as 3,5 tot 4,5 mM bepaal, terwyl translasië van

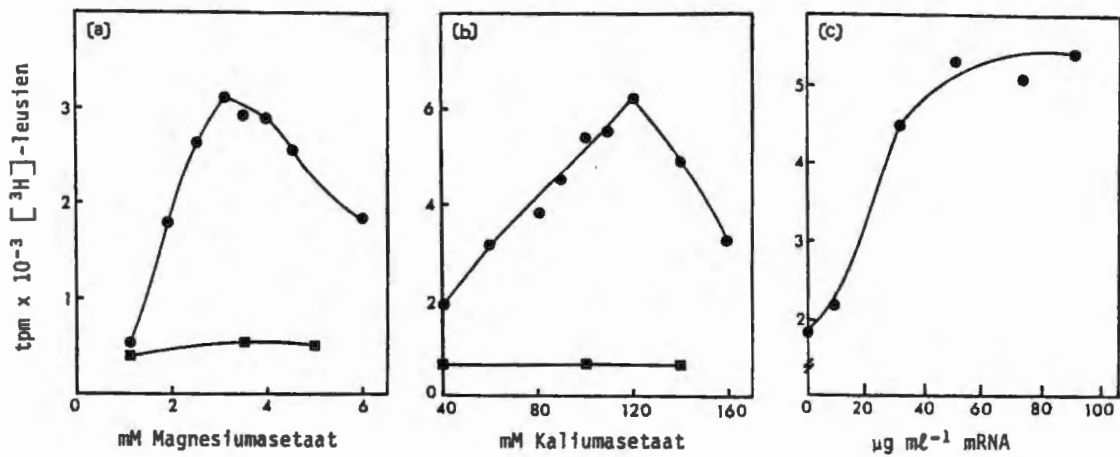
reovirus-mRNA deur Both et al. (1975) by 7,5 mM magnesiumasetaat en Levin en Samuel (1977 en 1980) by 5 mM magnesiumasetaat ondersoek is. Die verskille in die bereidingsmetodes van die koringkiemekstrakte van Roberts en Paterson (1973) en Shih en Kaesberg (1973), wat deur bogenoemde groepe navorsers toegepas is (kyk 4.2.1), mag moontlik tot hierdie verskille in optimale kondisies bydra.

Hierdie gegewens beklemtoon die belangrikheid van die standaardisering van die K^+ - en Mg^{2+} -konsentrasies vir optimale translase vir elke nuwe ondersoek onder individuele omstandighede. Verder is ook die tyds- en RNA-afhanklikheid vir die translase van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA (4.3.2 en 4.3.3) in die selvrye koringkiemsisteem bepaal.

4.3.2 Bepaling van die optimale kondisies vir die translase van reovirus-mRNA

Vir hierdie translase-eksperimente is die transkripsieprodukte van 3.3.3 as boodskapper-RNA gebruik. Die translasiemengsels is saamgestel soos beskryf in 4.2.2. Om die afhanklikheid van magnesiumasetaat, kaliumasetaat of mRNA te bepaal, is die faktor onder beskouing telkens weggelaat uit die aanvanklike reaksiemengsels. Gevolglik is die byvoeging van water sodanig aangepas dat die reaksiemengsel in 30 μl hoeveelhede (op ys) verdeel kon word. Daarby is 20 μl van die verskillende konsentrasiereekse direk voor inkubasie bygevoeg. Om die translase-aktiwiteit te kon volg, is [^3H]-leusien tot 'n eindkonsentrasie van 10 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ bygevoeg. Die translasiemengsels is na inkubasie geanaliseer soos beskryf in 4.2.3.

Figure 4.2(a) en (b) toon die magnesiumasetaat- en kaliumasetaatkonsentrasieoptima, terwyl die reovirus-mRNA-versadigingskromme in figuur 4.2(c) getoon word.



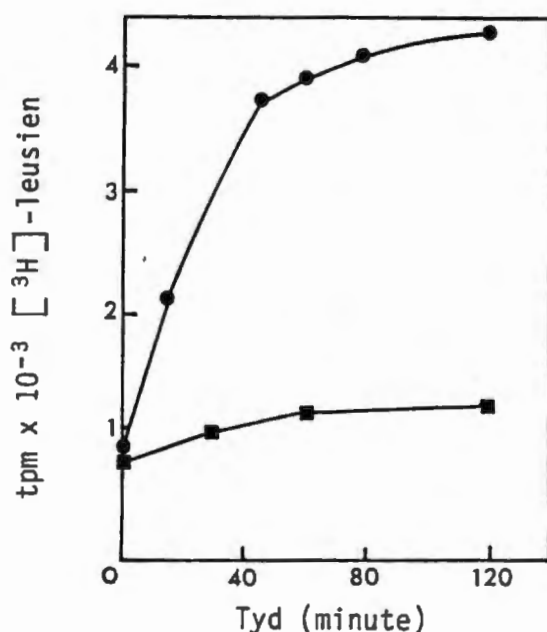
FIGUUR 4.2 Die effek van wisselende Mg^{2+} -, K^{+} - en mRNA-konsentrasies op die translase van reovirus-mRNA in die koringkiemtranslasiesisteem.

- (a) Invloed van magnesiumasetaat op translase by 'n kaliumasetaatkonsentrasie van 100 mM en 1,5 µg mRNA in 50 µl reaksiemengsel.
- (b) Invloed van kaliumasetaat op translase by 'n magnesiumasetaatkonsentrasie van 3,5 mM en 1,5 µg mRNA in 50 µl reaksiemengsel.
- (c) Invloed van reovirus-mRNA op translase by 'n finale magnesiumasetaatkonsentrasie van 3,5 mM en kaliumasetaatkonsentrasie van 120 mM.

Kontrolereaksiemengsels is in die afwesigheid van eksogene mRNA geïnkubeer (■).

Die resultate van figuur 4.2 toon dat die optimale kondisies vir die translase van reovirus-mRNA in hierdie koringkiemtranslasiesisteem 3,2 mM magnesiumasetaat en 120 mM kaliumasetaat is. Die reovirus-mRNA-afhanklikheidskromme begin by 30 µg RNA ml⁻¹ reaksiemengsel afplat en bereik 'n versadigingspunt by ongeveer 50 µg mRNA ml⁻¹. Volgens figuur 4.2(c) is 'n hoër translase-aktiwiteit (1750

tpm) in die afwesigheid van eksogene mRNA waargeneem as by figure 4.2(a) en (b) (700 tpm), waarvoor waarskynlik slegs tegniese oorsake verantwoordelik is. Reovirus-mRNA het die inkorporasie van [^3H]-leusien negevoudig gestimuleer, wat minder was as na die toevoeging van globien-mRNA (4.2.3). Die tydsafhanklikheid van die translasiereaksie is vervolgens nagegaan deur 'n volledig saamgestelde translasiemengsel in 50 μl hoeveelhede te verdeel en vir verskillende tye te inkubeer (Figuur 4.3).



FIGUUR 4.3 Kinetiek van die translasië van reovirus-mRNA in die koringkiemtranslasiesisteen. Die 50 μl reaksiemengsels het 1,5 μg reovirus-mRNA bevat, terwyl die finale magnesiumasetaatkonsentrasie 3,2 mM en die kaliumasetaatkonsentrasie 120 mM was. Kontrolereaksiemengsels met dieselfde samestelling, maar sonder eksogene mRNA is ook geïnkubeer (■). Die reaksiemengsels het 10 μCi [^3H]-leusien ml^{-1} bevat.

Die reaksiesnelheid was vir die eerste 45 minute konstant en neem daarna geleidelik af totdat daar na 120 minute feitlik geen verdere inkorporasie

van radioaktiewe aminosure in TCA-onoplosbare materiaal plaasgevind het nie.

4.3.3 Bepaling van die optimale kondisies vir die translase van gedenatureerde reovirus-dsRNA

4.3.3.1 Denaturering van dsRNA

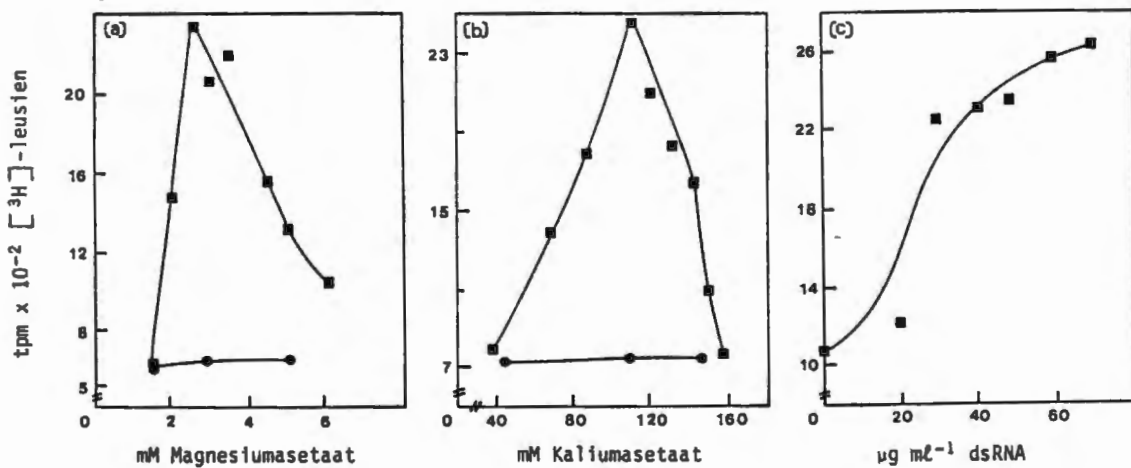
Vir die bepaling van die optimale kondisies vir die translase van gedenatureerde dsRNA in die koringkiemtranslasiesisteem is die ongefraksioneerde dsRNA wat in 3.4 na suiwing gevriesdroog is, gebruik. Die denatureringsprosedure is volgens die metode van McCrae en Joklik (1978) uitgevoer. Gevriesdroogde dsRNA is vooraf in H_2O opgelos tot 'n eindkonsentrasie van ongeveer 20 mg ml^{-1} , waarna DMSO in $2 \mu\text{l}$ hoeveelhede tot 'n eindkonsentrasie van 90% DMSO bygevoeg is. Aangesien DMSO, selfs by lae konsentrasies, translase inhibeer (McCrae en Joklik, 1978), moet die dsRNA-konsentrasie ten minste $2,5 \text{ mg RNA ml}^{-1}$ wees om 'n versadigingsvlak in die translasiemengsel te nader, sonder om 'n oormatige hoeveelheid DMSO toe te voeg. Daar is dus deurgaans in hierdie ondersoek gepoog om die DMSO-eindkonsentrasie in die translasesisteem net soos McCrae en Joklik (1978) 2% of laer te hou. Aangesien die dsRNA swak oplosbaar is in hoë konsentrasies DMSO (Scherrer et al., 1979) word die konsentrasie van die dsRNA wat in die denatureringsmengsel opgelos kan word, beperk. Hierdie faktore plaas daarom ook 'n beperking op die maksimum hoeveelheid gedenatureerde dsRNA wat tot die koringkiemtranslasiesisteem toegevoeg kan word. Onmiddellik voor translase is die dsRNA vir 15 minute by 50°C verhit om die dubbelstringe tot transleerbare esRNA te denatureer. Aangesien die plusstringe van reovirusgene identies aan die reovirus-mRNA's is (Li et al., 1980), word aangeneem dat slegs die plusstring na denaturering as boodskapper-RNA benut word.

4.3.3.2 Bepaling van die optimale kondisies

Die translasiemengsels is op dieselfde manier saamgestel as vir die reovirus-mRNA (kyk 4.3.2). Vir die bepaling van die magnesiumasetaat-

en kaliumasetaat-afhanklikhede is van die gedenatureerde dsRNA in 90% DMSO direk by die koringkiemtranslasiemengsels gevoeg tot eindkonsentrasies van $50 \mu\text{g dsRNA mL}^{-1}$ en 1,8% DMSO. Vir die bepaling van die dsRNA-afhanklikheid in die koringkiemsisteem is die dsRNA direk na denaturering in 90% DMSO met water verdun tot 'n finale konsentrasie van $1,5 \text{ mg dsRNA mL}^{-1}$ in 4% DMSO. Sodoende kon die dsRNA-variasiereeks meer akkuraat saamgestel word, deurdat groter deelvolumes van die verdunde gedenatureerde dsRNA by die koringkiemmengsels gevoeg kan word. Die translasiemengsels is tot $50 \mu\text{L}$ met 4% DMSO (sonder RNA) aangevul, sodat die hele dsRNA-reeks 'n finale DMSO-konsentrasie van 2% bevat het. Die magnesiumasetaat- en kaliumasetaat-afhanklikhede word in figure 4.4(a) en (b) getoon, terwyl die RNA-versadigingskromme vir die translasie van gedenatureerde dsRNA in die koringkiemtranslasiesisteem in figuur 4.4(c) getoon word.

Figuur 4.4 toon dat die optimale kondisies vir die translasie van gedenatureerde dsRNA van reovirus in die koringkiemtranslasiesisteem 2,6 mM magnesiumasetaat en 110 mM kaliumasetaat is. By 'n dsRNA-konsentrasie van $40 \mu\text{g RNA mL}^{-1}$ reaksiemengsel begin die kromme effens afplat, maar by die hoogste waarde van $70 \mu\text{g dsRNA mL}^{-1}$ is nog nie 'n versadigingspunt bereik nie. As aangeneem word dat slegs die plusstring van die gedenatureerde dsRNA getransleer word, is bogenoemde ekwivalent aan esRNA-konsentrasies van 20 en $35 \mu\text{g esRNA (of mRNA) mL}^{-1}$ reaksiemengsel. In figuur 4.2(c) word 'n versadigingspunt eers by $70 \mu\text{g mRNA mL}^{-1}$ bereik. As gevolg van beperkings soos in 4.3.3.1 bespreek, was dit nie moontlik om 'n versadigingspunt met die gedenatureerde dsRNA in hierdie ondersoek te bereik nie. McCrae en Joklik (1978) het wel 'n versadigingspunt by $80 \mu\text{g dsRNA mL}^{-1}$ ($40 \mu\text{g esRNA mL}^{-1}$) bereik. Dit is opvallend dat die translasie-aktiwiteit in figuur 4.4(c) in die afwesigheid van gedenatureerde dsRNA weer effens hoër (1100 tpm) was as by die kontroles (700 tpm) in figuur 4.4(a) en (b) (kyk ook figuur 4.2c).



FIGUUR 4.4 Die effek van wisselende Mg^{2+} -, K^{+} - en mRNA-konsentrasies op die translase van gedenatureerde dsRNA in die koringkiemtranslasiesisteem.

- (a) Invloed van magnesiumasetaat op translase by 'n kaliumasetaatkonsentrasie van 110 mM.
- (b) Invloed van kaliumasetaat op translase by 'n magnesiumasetaatkonsentrasie van 2,5 mM.
- (c) Invloed van gedenatureerde reovirus-dsRNA op translase by 'n finale magnesiumasetaatkonsentrasie van 2,5 mM en 'n kaliumasetaatkonsentrasie van 110 mM.

Kontrolereaksiemengsels is weer in die afwesigheid van eksogene RNA geïnkubeer (●). [³H]-leusien is tot 'n eindkonsentrasie van 10 µCi ml⁻¹ bygevoeg en die translase-aktiwiteit soos in 4.2.3 bepaal.

Enkele parameters vir die optimale translase van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA soos in hierdie ondersoek bepaal, word in tabel 4.2 saamgevat en met die waardes van McCrae en Joklik (1978) vergelyk.

TABEL 4.2 'n Vergelyking van parameters vir die optimale translasië van reovirus-RNA⁽¹⁾

Komponente	Reovirus-mRNA		Gedenatureerde dsRNA	
	Eie	McCrae en Joklik ⁽²⁾	Eie	McCrae en Joklik ⁽²⁾
K ⁺ ⁽³⁾	120 mM	40 mM	110 mM	55 mM
Mg ²⁺	3,2 mM	3,5-4,5 mM	2,6 mM	2 mM
esRNA ⁽⁴⁾	50 µg ml ⁻¹	50 µg ml ⁻¹	30 µg ml ⁻¹	30 µg ml ⁻¹

1. Reovirus-RNA sluit reovirus-mRNA en gedeneureerde dsRNA in.
2. Waardes wat deur McCrae en Joklik (1978) gepubliseer is.
3. Let daarop dat die K⁺-waardes van McCrae en Joklik (1978) KCl en nie kaliumasetaat nie verteenwoordig.
4. Die esRNA-konsentrasies by die dsRNA verteenwoordig slegs die plusstring-RNA, sodat die totale dsRNA-konsentrasie 60 µg dsRNA ml⁻¹ sou wees.

Die optimale K⁺- en Mg²⁺-konsentrasies vir die translasië van reovirus-mRNA en gedeneureerde dsRNA het in hierdie ondersoek net soos by McCrae en Joklik (1978) onderling van mekaar verskil. Soos verwag (Weber et al., 1977a) het beide die mRNA en gedeneureerde dsRNA hoër kaliumasetaat-optima getoon as wat McCrae en Joklik (1978) met KCl verkry het. Die optimale kaliumasetaatkonsentrasie (120 mM) vir die translasië van reovirus-mRNA, soos bepaal in hierdie ondersoek, vergelyk goed met die 125 mM kaliumasetaat wat deur Levin en Samuel (1980) vir die translasië van reovirus-mRNA voorgestel is. Dit is verder opvallend dat die optimale K⁺-konsentrasie, anders as by McCrae en Joklik (1978), laer by die translasië van gedeneureerde dsRNA as by die reovirus-mRNA was. Die optimale magnesiumasetaatkonsentrasies wat

in hierdie ondersoek verkry is, is vergelykbaar met die waardes van McCrae en Joklik (1978). Die rede vir die verskille in die optimale kondisies van die translase van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA is nie bekend nie.

Die toevoeging van reovirus-mRNA tot die koringkiemsisteem (figuur 4.2) het tot 'n negevoudige stimulerings van radioaktiewe aminosuurinkorporasie gelei, terwyl stimulerings na die toevoeging van gedenatureerde dsRNA slegs viervoudig was. Beide hierdie waardes is laer as die verhoging in aktiwiteit na toevoeging van globien-mRNA (4.2.3). Die redes vir hierdie verskille en die invloed daarvan op die sintese van volledige reovirusproteïene is nie bekend nie. Oor laasgenoemde sal eers na verdere analyses (4.4) uitspraak gelewer kan word.

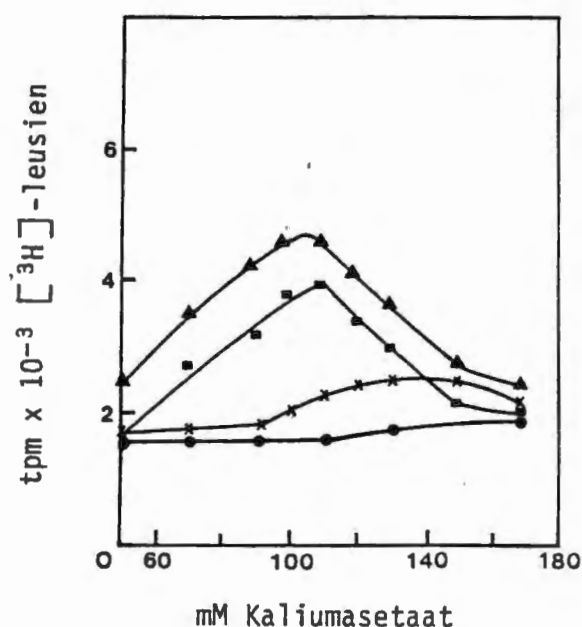
4.3.4 'n Vergelyking van die translase-aktiwiteit van dsRNA in die koringkiemsisteem na denaturering van reovirus-dsRNA in 80% of 90% DMSO

By die denaturering van dsRNA in DMSO met die oog op translase is daar verskillende faktore wat in ag geneem moet word. Daar is reeds melding gemaak (4.3.3.1) van die feit dat DMSO translase inhibeer en die beperking wat die oplosbaarheid van dsRNA in 'n hoë konsentrasie DMSO op die bereiking van 'n RNA-versadigingsvlak plaas tydens die translase van gedenatureerde dsRNA in die koringkiemsisteem (kyk ook figuur 4.4c). Daar is verder vasgestel dat reovirus-dsRNA ook in 80% DMSO gedenatureer kan word (H. Huismans, persoonlike mededeling). Met die oog op die keuse van optimale kondisies vir translase is besluit om die invloed van denaturering van dsRNA in 80% of 90% DMSO na te gaan. Dit is uitgevoer deur die translase-aktiwiteit van die gedenatureerde dsRNA in die vorm van twee kaliumasetaatafhanklikheidsreekse met mekaar te vergelyk.

Die denatureringsprosedure, soos beskryf in 4.3.3.1, is ook hier gevolg. Twee 50 µg hoeveelhede gevriesdroogde dsRNA is opgelos in 4 µl en 2 µl water onderskeidelik. Beide is opgemaak tot 20 µl met DMSO om 'n DMSO-eindkonsentrasie van 80% en 90% te gee. Die samestelling van die

koringkiemtranslasiemengsel was dieselfde as in 4.3.2. Die kaliumasetaatafhanklikheidsreeks is saamgestel soos in 4.3.3.2, waarby gedenatureerde dsRNA vanaf die een of die ander denatureringsmengsel tot 'n finale konsentrasie van $50 \mu\text{g dsRNA ml}^{-1}$ reaksiemengsel toegevoeg is. Die DMSO-eindkonsentrasies in die translasiemengsels was 1,6% en 1,9% onderskeidelik. As kontroles is dsRNA wat in water opgelos is, sowel as 80% DMSO sonder RNA gebruik.

Die koringkiemtranslasiemengsels is in teenwoordigheid van 2,3 mM magnesiumasetaat en $10 \mu\text{Ci } [^3\text{H}]\text{-leusien ml}^{-1}$ geïnkubeer. Die radioaktiwiteit in TCA-onoplosbare materiaal is soos in 4.2.3 bepaal. Die invloed van hierdie verskillende denatureringskondisies op die translasië-aktiwiteit in die koringkiemsisteem word in figuur 4.5 getoon.



FIGUUR 4.5 Kaliumasetaatafhanklikheidskrommes vir die translasië van reovirus-dsRNA na denaturering in 80% DMSO (▲) en 90% DMSO (■). Die kontroles toon die aktiwiteit in teenwoordigheid van dsRNA in water (x) en 80% DMSO sonder dsRNA (●) wat toegevoeg is.

In figuur 4.5 toon die 80% en 90% DMSO-gedenatureerde dsRNA optimale translasië-aktiwiteit by 105 en 110 mM kaliumasetaat respektiewelik, wat

met die optimum in figuur 4.4(b) vergelykbaar is. Die rede vir die effens laer optimale K^+ -konsentrasie by die translase van 80% DMSO-gedenatureerde dsRNA is nie bekend nie. Dit is duidelik dat die dsRNA wat in 80% DMSO gedenatureer is deurgaans die hoogste translase-aktiwiteit vertoon. By die optimale K^+ -konsentrasies was die translase-aktiwiteit van die 80% DMSO-gedenatureerde dsRNA 20% hoër as die aktiwiteit van die 90% DMSO-gedenatureerde dsRNA. Hierdie verskil in aktiwiteit kan moontlik aan die DMSO-eindkonsentrasies (1,6% en 1,8%) toegeskryf word. Volgens McCrae en Joklik (1978) gaan 'n toename in die DMSO-konsentrasie gepaard met groter inhibisie van translase in die koringkiemsisteem. Die oplosbaarheid van die dsRNA in die 80% en 90% DMSO mag ook tot hierdie verskil in translase-aktiwiteit bydra (kyk 4.3.3:1). Die kontroles toon, soos in figuur 4.4(b), lae translase-aktiwiteit, hoewel daar by die translase in die teenwoordigheid van dsRNA in water 'n effense styging in translase-aktiwiteit vanaf 100 tot 140 mM kaliumasetaat voorkom. Die rede vir hierdie styging in aktiwiteit is nie bekend nie. In die lig van bogenoemde waarnemings is besluit om alle verdere denaturerings van dsRNA met die oog op translase in 80% DMSO uit te voer.

4.4 'N VERGELYKENDE ANALISE VAN DIE TRANSLASIEPRODUKTE VAN REOVIRUS-mRNA EN GEDENATUREERDE dsRNA NA TRANSLASIE IN DIE KORINGKIEMSISTEEM

4.4.1 Inleiding

In die voorafgaande gedeelte (4.3) is die translase-aktiwiteit van die koringkiemsisteem in teenwoordigheid van toegevoegde reovirus-RNA in tpm uitgedruk. Hierdie parameter is as maatstaf vir die inkorporasie van [3 H]-leusien in TCA-onoplosbare materiaal gebruik. Uit hierdie resultate kan uiteraard niks oor die aard van die translaseprodukte afgelei word nie, behalwe dat dit TCA-presipiteerbare radioaktiewe materiaal is wat in teenwoordigheid van reovirus-mRNA gesintetiseer word. Tot dusver is dit nie duidelik of enige outentieke reovirusproteïene in hierdie koringkiemtranslasiesisteem gesintetiseer word nie. Poliakrielamiedgel-

elektroforese (PAGE) word algemeen aangewend om reovirusproteïene of -translasieprodukte met die oog op identifisering te skei (Smith et al., 1969; Joklik, 1974). Die spoed en eenvoud van hierdie metode, sowel as die feit dat baie klein hoeveelhede materiaal (veral wanneer hulle radioaktief gemerk is) benodig word, het van PAGE die mees algemeen gebruikte metode vir die analisering van verskillende polipeptiede gemaak. Aangesien SDS-polipeptiedkomplekse essensieel identiese ladingsdigthede besit en daarom in poliakrielamiedgelle volgens polipeptiedgrootte migreer, kan die reovirusproteïene met verskillende molekulêre massas dus met behulp van SDS-PAGE geanaliseer word (Shapiro et al., 1967).

4.4.2 Translasie met die oog op produkanalise

Die translasiemengsels is volgens die prosedure in 4.2.2 saamgestel by die optimale kondisies vir die translasie van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA soos onderskeidelik bepaal in 4.3.2 en 4.3.3. In die geval van mRNA is translasie dus by 3,2 mM magnesiumasetaat en 120 mM kaliumasetaat uitgevoer, terwyl die gedenatureerde dsRNA by 2,6 mM magnesiumasetaat en 110 mM kaliumasetaat getransleer is. Indien van hierdie konsentrasies afgewyk is, sal dit by die betrokke resultate saam met die ander kondisies gespesifiseer word. Die afwykings kom veral voor waar die mRNA en gedenatureerde dsRNA in een eksperiment onder dieselfde kondisies getransleer is, met die oog op 'n direkte vergelyking (kyk 4.4.4.2). Die translasiemengsels van 250 μl wat gewoonlik saamgestel is, was voldoende vir die bepaling van die translasie-aktiwiteit (soos in 4.2.3 beskryf) sowel as vir 'n aantal elektroforetiese analyses. Die reaksiemengsels is volledig op ys saamgestel, waarby die reovirus-mRNA of gedenatureerde dsRNA direk voor inkubasie by 29°C bygevoeg is. Vir die analise van die translasieprodukte is 10 tot 15 μl van die translasiemengsel na die inkubasie by monsterbuffer gevoeg om 'n eindkonsentrasie van 8 M ureum, 1,5% SDS en 4% 2-merkaptio-etanol te gee. Hierdie mengsel is dan vir 3 minute gekook om die proteïene vinnig te denatureer. Dertig μg gesuiwerde reovirus (3.2.1) of [^{35}S]-gemerkte reovirus (3.2.3) is soos die ander monsters in monsterbuffer behandel en as standaard saam geëlektroforeer. Aangesien

die radioaktiefgemerkte reovirus nie aan die begin van die ondersoek beskikbaar was nie, is die strukturele virusproteïene ná dissosiasie van die gesuiwerde reovirus aanvanklik as standaard tydens die analise van die translasiëprodukte benut. Later is [³⁵S]-gemerkte virionproteïene vir dieselfde doel aangewend. Daar sal by elke resultaat gespesifiseer word watter standaard gebruik is. Identifisering van die translasiëprodukte is dan op grond van ko-migrering met die standaard virionproteïene gedoen.

4.4.3 PAGE en fluorografie

Die monsters met die translasiëprodukte is op poliakrielamiedplaatgelle met 'n dikte van 1 mm geanaliseer. Die SDS-fosfaat-buffersisteem van Stone et al. (1974) met modifikasies van Huismans (1979) is gebruik. Elke gel is telkens voorberei soos beskryf deur Van der Walt (1978). Die samestelling van die polimeriseringsmengsel word in tabel 4.3 weergegee.

TABEL 4.3 Samestelling van poliakrielamiedgelle vir skeiding van reovirusproteïene

Komponente	Finale konsentrasie
akrielamied	7,5%
bisakrielamied	0,2%
natriumfosfaat (pH 7,4)	100 mM
ureum	5,8 M
SDS	0,1%
EDTA	20 mM
TEMED	0,1%
ammoniumpersulfaat	0,08%

Elektroforese is vir 8 tot 10 ure by 65 volt uitgevoer met reservoïrbuffers wat 100 mM natriumfosfaat (pH 7,4), 20 mM EDTA en 0,04% SDS bevat het. Waar gesuiwerde reovirus (3.2.1) as standaard gebruik is vir die

vergelyking met die translasieprodukte, is die gelplate in 'n Coomassie Brilliant Blue G250-oplossing gekleur en daarna in 5% asynsuur ontkleur soos beskryf deur Van der Walt (1978). Die gelplate is vir fluorografie voorberei (tensy anders vermeld) volgens die metode van Bonner en Laskey (1974) en dan op Whatman 3 MM filtreerpapier onder vakuum by 50°C gedroog. Die gedroogde gelplate is op X-straaalfilm (Kodak RP Royal X-Omat) geplaas en by -70°C gelaat, waarna die film ontwikkel is.

4.4.4 Translasieprodukte van ongefraksioneerde reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA

4.4.4.1 Inleiding

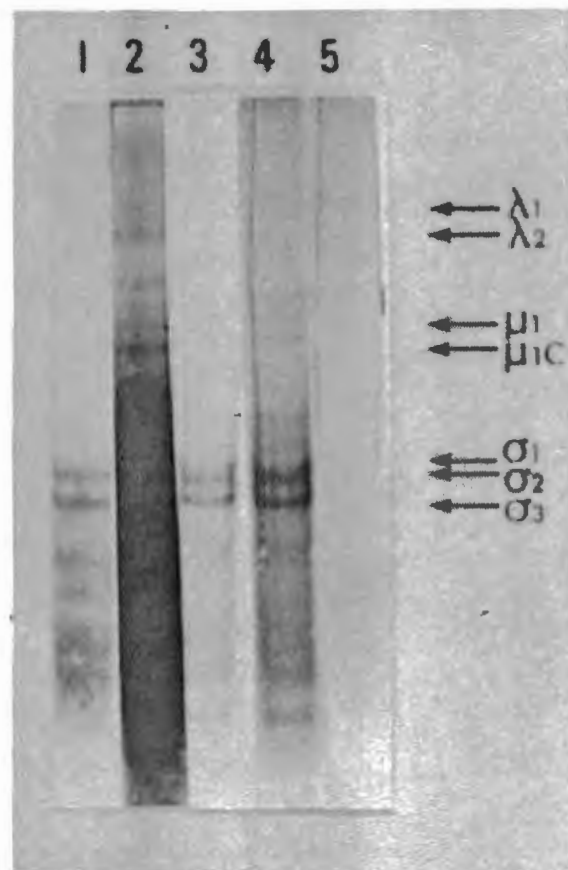
Vir hierdie ondersoek is die in vitro-transkripsieprodukte wat in 3.3.3 gesuiwer is vir die translasie van reovirus-mRNA gebruik, terwyl die gevriesdroogde dsRNA (vanaf 3.4) vir die translasie van gedenatureerde reovirus-dsRNA benut is.

4.4.4.2 Produkanalise na translasie van mRNA en gedenatureerde dsRNA by hul onderskeie optimale kondisies

In hierdie eksperimente is die translasiemengsels afsonderlik by die optimale translasiekondisies van die mRNA of dsRNA onderskeidelik saamgestel. Hierdie reaksiemengsels het 50 µg mRNA of 60 µg gedenatureerde dsRNA (30 µg plusstring-RNA) mL^{-1} en 100 µCi [^{35}S]-metionien mL^{-1} bevat. 'n Reaksiemengsel sonder enige eksogene RNA is as kontrole saam geïnkubeer. Die translasieprodukte is geanaliseer soos beskryf in 4.4.3 en die resultate word in figuur 4.6 getoon.

Die resultate van die korter blootstellings in figuur 4.6 (bane 1 en 3) van die translasie van beide die mRNA en gedenatureerde dsRNA vertoon duidelik translasieprodukte wat met die σ -proteïene van reovirus komigreer. By baan 1 (mRNA) kan σ_3 en σ_2 geïdentifiseer word, terwyl die teenwoordigheid van σ_3 , σ_2 en σ_1 by bane 3 en 4 (dsRNA) duidelik is. By die dsRNA-produkte is daar 'n breë band wat teenoor die

σ_2 -standaard ko-migreer. Hierdie band mag moontlik σ_{NS} , 'n nie-strukturele proteïen, bevat wat nie in hierdie elektroforesesisteem van σ_2 geskei word nie.



FIGUUR 4.6 Fluorogram van koringkiemtranslasieprodukte van ongefraksioneerde reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA na elektroforetiese skeiding. (Kyk teks vir volledige prosedure.)

Bane 1 en 2: Polipeptiede wat na toevoeging van ongefraksioneerde reovirus-mRNA gesintetiseer is.

Bane 3 en 4: Polipeptiede wat na toevoeging van ongefraksioneerde DMSO-gedenatureerde reovirus-dsRNA gesintetiseer is.

Baan 5: Polipeptiede wat in die afwesigheid van toegevoegde RNA gesintetiseer is.

Die blootstellingstyd van die X-straalfilm was 5 dae in die geval van bane 1 en 3 en 30 dae in die geval van bane 2, 4 en 5. Die pyle toon die posisies van standaard strukturele reovirusproteïene wat ongemerk is aan.

Na die langer blootstellings (bane 2 en 4) kan polipeptiedbande in die omgewing van die standaard μ -proteïene waargeneem word, terwyl geen polipeptiede wat met λ -proteïene vergelykbaar is onder hierdie kondisies waargeneem kon word nie. 'n Vergelyking van die standaard μ -proteïene met die translasiëprodukte in bane 2 en 4 toon dat $\mu 1$ die enigste produk is wat op grond van ko-migrering met die standaard geïdentifiseer kan word. Aangesien slegs $\mu 1C$, 'n splytingsproduk van $\mu 1$ wat nie in die koringkiemsisteem gevorm word nie (Both et al., 1975) verder by die standaard strukturele μ -proteïene voorkom, kan die ander bande in bane 2 en 4 in die gebied van die μ -proteïene nie benaam word nie. Hierdie bande wat dof in baan 4 en duideliker in baan 2 voorkom, sluit een band bo $\mu 1$ en twee daaronder in. Volgens McCrae en Joklik (1978) kan behalwe $\mu 1$ nog twee primêre geenprodukte van die μ -klas, μNS en $\mu 2$, in die koringkiemsisteem gesintetiseer word. Dit is belangrik om daarop te let dat daar in die afwesigheid van toegevoegde RNA (baan 5) geen produkte sigbaar is nie. Dit blyk dus dat al die translasiëprodukte (ook die wat nie met die standarde ko-migreer nie) reoviruspesifieke produkte is. Die translasiëprodukte van intermediêre grootte wat nie met enige van die klasse reovirusproteïene ko-migreer nie kom in 'n groter mate by die translasië van mRNA voor (vergelyk bane 2 en 4). Die oorsprong van hierdie kleiner produkte mag na verskillende oorsake herlei word. Hierdie proteïenmateriaal mag weens proteolitiese afbraak van voltooide reovirusproteïene ontstaan of onvolledig gesintetiseerde polipeptiede wees. Onvoltooide translasiëprodukte mag teenwoordig wees omdat die betrokke boodskappers nie volledig getransleer word nie. Dit mag plaasvind as gevolg van beperkings in die translasiëstelsel of nukleolitiese afbraak van die mRNA. Die resultate van baan 2 in figuur 4.6 waar die kleiner produkte 'n aaneenlopende smeer vorm, is in ooreenstemming met 'n nie-spesifieke effek. By bane 1 en 4 vorm die kleiner produkte duideliker bande, wat dui op produkte van spesifieke grootte. Uit hierdie resultate kan egter geen definitiewe afleidings oor die oorsprong van die produkte van intermediêre grootte gemaak word nie. Verdere eksperimente in hierdie verband sal in 4.5 bespreek word.

Dit moet hier beklemtoon word dat die translasiëprodukte wat op grond van ko-migrering met die standarde geïdentifiseer is nie met sekerheid

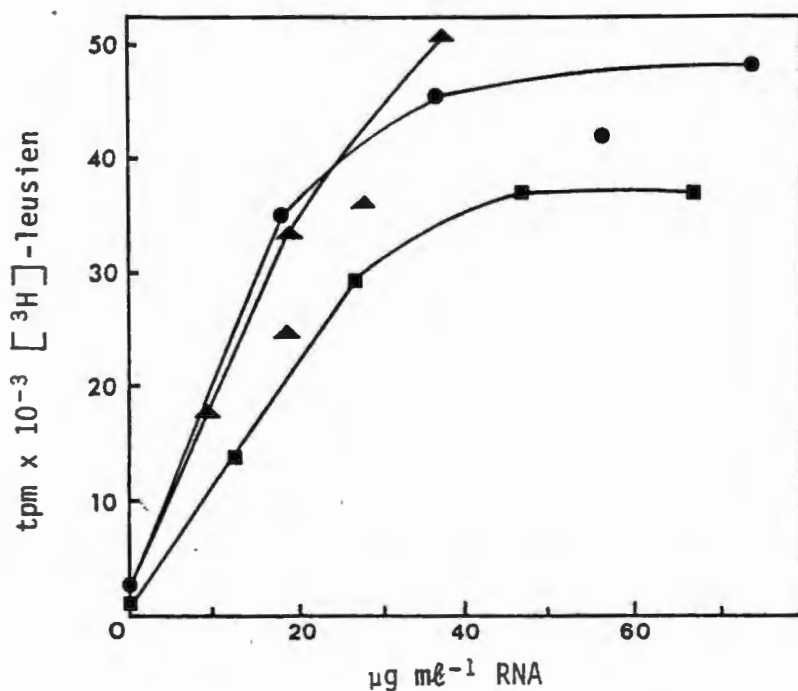
as outentieke reovirusproteïene beskou kan word nie. Dit is dus noodsaaklik om die betroubaarheid van die translase verder na te gaan. In hoofstuk 5 is hierdie evaluering met behulp van peptiedkartering gedoen (kyk 5.6) om aan te toon dat hierdie produkte wel reovirusspesifiek is.

4.4.4.3 'n Vergelyking van die aktiwiteit en translasielprodukte van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA

In teenstelling met 4.4.4.2 is in hierdie geval een gemeenskaplike reaksiemengsel met die koringkiemekstrak saamgestel wat dan in kleiner deelvolumes verdeel is, waarby òf reovirus-mRNA òf gedenatureerde dsRNA gevoeg is. Hierdie benadering, om die kondisies sover moontlik konstant te hou, is gevolg met die oog op 'n vergelyking van die translase-aktiwiteit (gemeet in tpm) en translasielprodukte van die reovirus-mRNA en die plusstringe van gedenatureerde dsRNA.

Ongefraksioneerde reovirus-mRNA en dsRNA is weer as boodskappers gebruik. Die RNA-afhanklikheidsreeks is saamgestel soos beskryf in 4.3.2 en 4.3.3. Die invloed van DMSO op die translase van mRNA is ook nagegaan deur reovirus-mRNA wat aan die denatureringsprosedure in 80% DMSO (soos vir die dsRNA in 4.3.3.1) onderwerp is by een van die translasiemengsels te voeg. In die geval van die kontrolereaksiemengsels is water, 80% DMSO of dsRNA opgelos in water toegevoeg. Die finale mengsels het 2,5 mM magnesiumasetaat, 110 mM kaliumasetaat en 30 μCi [^3H]-leusien mL^{-1} bevat. In die translasiemengsels waarby RNA in DMSO toegevoeg is, was die finale DMSO-konsentrasie 1,8%. Hierdie soutkonsentrasies was volgens 4.3.3.2 optimaal vir die translase van gedenatureerde dsRNA.

Vanuit die gemeenskaplike reaksiemengsel is RNA-afhanklikheidsreeks soos in 4.3.2 en 4.3.3 saamgestel. Die translase-aktiwiteit is as die inkorporasie van radioaktiewe aminosure in TCA-onoplosbare materiaal bepaal soos in 4.2.3 beskryf. Hierdie resultate word grafies in figuur 4.7 voorgestel.



FIGUUR 4.7 'n Vergelyking van die translasië-aktiwiteit van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA met toenemende RNA-konsentrasies.

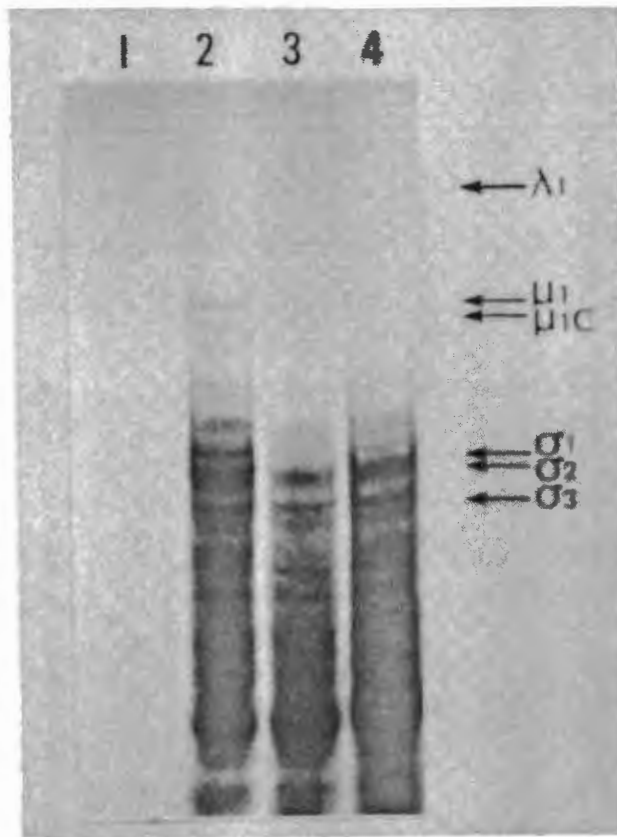
Translasie is in die teenwoordigheid van mRNA in water (■), mRNA in DMSO (●) of gedenatureerde dsRNA in DMSO (▲) uitgevoer met laasgenoemde uitgedruk in terme van die konsentrasie van plusstring-RNA.

Uit die RNA-versadigingskrommes in figuur 4.7 is dit duidelik dat die translasië-aktiwiteit, gemeet as tpm, aanvanklik by almal lineêr toeneem tot 20 µg RNA ml⁻¹. Hierna plat die twee mRNA-krommes af om 'n versadigingsvlak by ongeveer 45 µg RNA ml⁻¹ te bereik. Die gedenatureerde dsRNA toon 'n geringe afplatting by 20 µg RNA ml⁻¹, maar bereik nie 'n versadigingsvlak nie. Indien die aktiwiteite van die verskillende eksperimente in figuur 4.7 wat almal in vergelykbare konsentrasies uitgedruk is (kyk byskrifte by figuur) onderling vergelyk word, is die translasië-aktiwiteit in die geval van die mRNA in water die laagste. Die mRNA in 80% DMSO en gedenatureerde dsRNA se

translasie-aktiwiteite is aanvanklik dieselfde, maar vanaf $25 \mu\text{g RNA mL}^{-1}$ styg die aktiwiteit van die gedenatureerde dsRNA bo die ander uit. Die resultate van die RNA-afhanklikheidskromme vir die translasie van gedenatureerde dsRNA in figuur 4.4(c) stem ooreen met die resultate in figuur 4.7, terwyl die mRNA-versadigingskromme in figuur 4.2(c) 'n subtiele verskil toon en eers by $30 \mu\text{g RNA mL}^{-1}$ begin afplat en by ongeveer $50 \mu\text{g RNA mL}^{-1}$ 'n versadigingspunt bereik. In figuur 4.8 word die translasieprodukte van hierdie translasie-eksperimente na elektroforetiese analise (soos in 4.4.3) getoon.

Wanneer die resultate in figuur 4.8 beskou word, is dit duidelik dat geen bande op die fluorogram in baan 1 sigbaar is nie. Hierdie baan verteenwoordig die translasieprodukte van al die kontroles (kyk byskrifte van figuur 4.8). Hieruit kan afgelei word dat al die bande, wat in die ander bane (2, 3 en 4) sigbaar is, van die translasie van die toegevoegde boodskapper-RNA afkomstig is. Ongedenatureerde dsRNA, wat slegs in water opgelos is, (figuur 4.8, baan 1) lewer dus ook geen translasieprodukte nie. Die voorkoms van groot hoeveelhede proteïenmateriaal, wat kleiner as die σ -proteïene is, is baie opvallend by bane 2, 3 en 4 (figuur 4.8). In hierdie gevalle is translasie in die selvrye koringkiemsisteem in teenwoordigheid van eksogene mRNA uitgevoer. Die moontlike oorsprong van hierdie produkte van intermediêre grootte wat dikwels by die translasie van eksogene mRNA in selvrye koringkiemsisteme voorkom, is reeds in 4.4.4.2 bespreek.

Die rede vir die groter hoeveelheid kleiner produkte wat in vergelyking met figuur 4.6 hier teenwoordig is, is nie bekend nie. Dit mag verband hou met die feit dat twee verskillende koringkiembereidings in hierdie twee eksperimente gebruik is. Die groot ooreenkomste tussen die bandpatrone van die kleiner produkte in figuur 4.8 by bane 2, 3 en 4 (mRNA en gedenatureerde dsRNA) impliseer 'n gemeenskaplike oorsprong. Dit is duidelik dat 'n groot deel van die gemete tpm in hierdie translasie-eksperimente (figure 4.7 en 4.8) met die kleiner polipeptiede geassosieer is. Hierdie groot hoeveelheid kleiner produkte het dan ook aanleiding gegee tot die ondersoeke in 4.5.



FIGUUR 4.8 'n Vergelyking van die translasieprodukte van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA na translasie by dieselfde kaliumasetaat- en magnesiumasetaat-konsentrasies. Die fluorogram toon die translasieprodukte wat gevorm is na toevoeging van die volgende:

Baan 1: Kontrole met H_2O (80% DMSO of dsRNA in water lewer 'n soortgelyke resultaat).

Baan 2: *Reovirus-dsRNA gedenatureer in 80% DMSO.

Baan 3: Reovirus-mRNA in 80% DMSO (behandel soos baan 2).

Baan 4: Reovirus-mRNA in water.

Die finale RNA-konsentrasies was $50 \mu g \text{ ml}^{-1}$, wat dus by baan 2 neerkom op $25 \mu g \text{ plusstring-RNA ml}^{-1}$. Ongemerkte reovirionproteïene is weer as standaard gebruik. Die blootstellingstyd vir fluorografie was 30 dae.

* Translasieprodukte van gedenatureerde dsRNA wat eers met water verdun is (soos vir die dsRNA-afhanklikheidskromme in figuur 4.7) voor toevoeging tot die translasiemengsel het met die resultate in baan 2 ooreengekom.

In baan 2 (dsRNA in DMSO) kom bande voor wat met $\mu 1$, $\sigma 1$, $\sigma 2$ (breë band) en $\sigma 3$ ko-migreer. In baan 3 (mRNA in DMSO) en baan 4 (mRNA in H_2O) is 'n dowwe band teenoor $\sigma 1$ en bande by $\sigma 2$ (breë band) en $\sigma 3$ sigbaar. Die intensiteit van bogenoemde bande van die mRNA-translasiereaksie in teenwoordigheid van DMSO (baan 3) is laer as by die translasie van mRNA in water (baan 4), wat weer laer is as by die translasie van gedenatureerde dsRNA (baan 2). Hierdie waarnemings dui eerstens daarop dat DMSO as sodanig nie 'n positiewe invloed op die sintese van volledige reoviruspesifieke proteïene het nie al is die gemete tpm in figuur 4.7 hoër waar die reovirus-mRNA na behandeling in 80% DMSO getransleer is. Verder word gedenatureerde dsRNA op 'n massabasis (kyk byskrifte van figuur 4.8) oënskynlik meer effektief as die mRNA van reovirus getransleer. Hoë translasie-aktiwiteit, gemeet as tpm, dui dus nie noodwendig op die sintese van volledige translasieprodukte nie. Hierdie gegewens mag daarop dui dat die inisiasieproses wel effektief plaasvind, maar dat verlenging van die nassente polipeptiede in hierdie koringkiemsisteem beperk word. Dit is wel duidelik dat 'n groot deel van die gemete radioaktiwiteit (tpm) in hierdie translasie-eksperimente (figure 4.7 en 4.8) in die kleiner polipeptiede teenwoordig is.

Ten spyte van die groter hoeveelheid onvolledige polipeptiede in figuur 4.8 en die feit dat hierdie translasie in teenwoordigheid van [3H]-leusien uitgevoer is, is essensieel dieselfde translasieprodukte wat met die reovirusstandaarde ko-migreer as by figuur 4.6 geïdentifiseer. In figuur 4.8 is dit duideliker dat die gedenatureerde dsRNA meer effektief as reovirus-mRNA getransleer word. Dit is egter belangrik om daarop te let dat die eksperimente waarvan die resultate in figure 4.7 en 4.8 getoon word by die optimale kondisies vir die translasie van gedenatureerde dsRNA uitgevoer is. Hoewel die doel van hierdie hoofstuk nie daarop gerig was om die translasie van al die primêre geenprodukte van reovirus in die koringkiemsisteem aan te toon nie, is enkele ander benaderings in die volgende afdeling (4.5) gevolg om die moontlike redes vir die teenwoordigheid van die groot hoeveelheid onvolledige translasieprodukte, soos in figure 4.6 en 4.8 geïllustreer, te ondersoek.

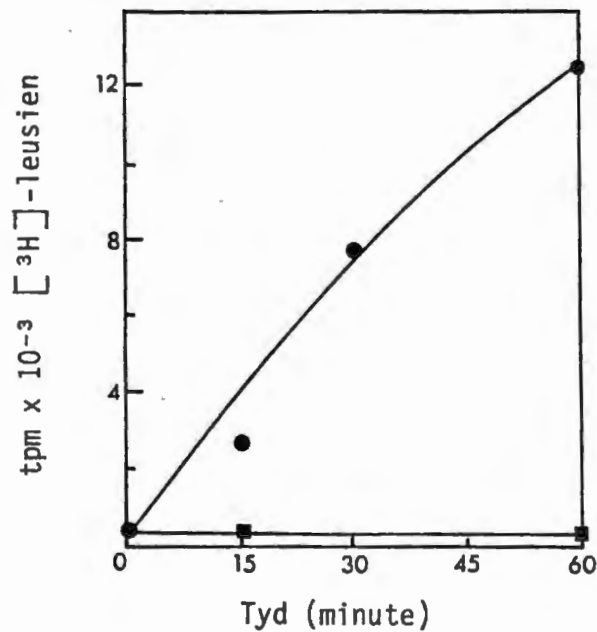
4.5 ENKELE ANDER BENADERINGS OM TRANSLASIE IN DIE SELVRYE KORINGKIEMSISTEEM TE ONDERSOEK

4.5.1 Inleiding

Die groot hoeveelheid onvolledige polipeptiede en die lae voorkoms van die groter reoviruspesifieke proteïene, soos bespreek in 4.4, het tot die ondersoek in 4.5 gelei. Die doel van die eksperimente wat hier bespreek word, was hoofsaaklik om meer duidelikheid te kry oor die oorsprong en vormingstyd van die translasiëprodukte van intermediêre grootte, soos waargeneem na die translasië van reovirus-boodskappers in die koringkiemsisteem (figure 4.6 en 4.8).

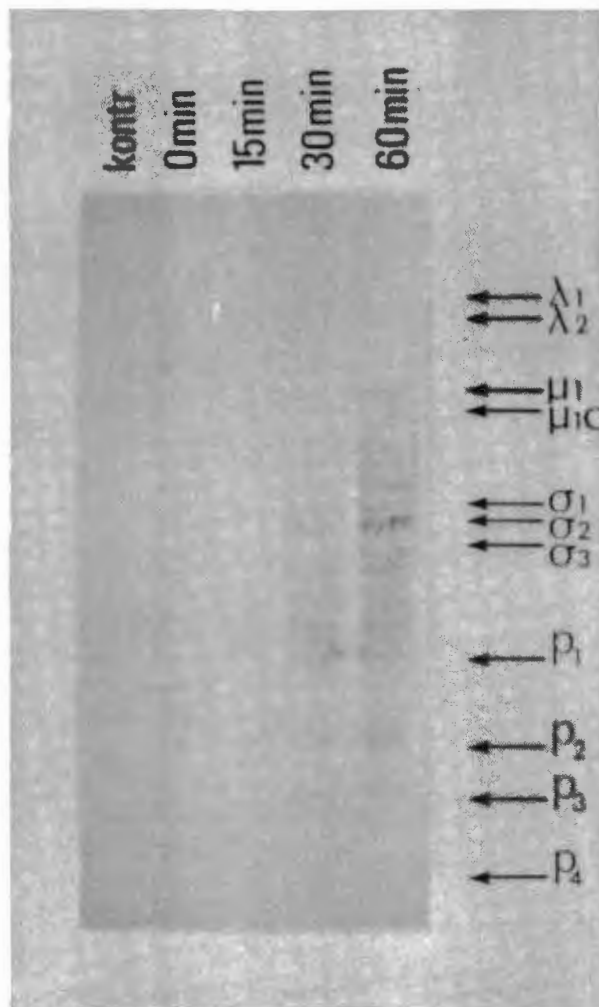
4.5.2 Elektroforetiese analise na 'n tydsafhanklike translasië van reovirus-mRNA

Die oorsprong van hierdie intermediêre produkte is moontlik 'n gevolg van proteolitiese afbraak na translasië. Hierdie moontlikheid is soos volg ondersoek: 'n Translasiemengsel is by die optimale kondisies vir die translasië van reovirus-mRNA (kyk 4.3.2) saamgestel. [³H]-leusien en ongefraksioneerde reovirus-mRNA is tot eindkonsentrasies van 30 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ en 50 $\mu\text{g RNA ml}^{-1}$ bygevoeg. Deelvolumes van 50 μl is vir verskillende tye (0 tot 60 minute) geïnkubeer waarna 15 μl van elke monster vir die bepaling van radioaktiwiteit (soos in 4.2.3) gebruik is (figuur 4.9). Op spesifieke tye soos aangetoon in figuur 4.9 is 15 μl van elke monster onttrek en met behulp van PAGE (soos beskryf in 4.4.3) geanaliseer (kyk figuur 4.10).



FIGUUR 4.9 Tydsafhanklike translase in 'n koringkiemsisteem na toevoeging van reovirus-mRNA (•). Die kontrole (■) is in die afwesigheid van toegevoegde RNA geïnkubeer.

Die kinetiek van translase soos in figuur 4.9 geïllustreer, toon 'n lineêre toename in die inkorporering van radioaktiwiteit in TCA-onoplosbare materiaal. Daar vind wel 'n effense afplatting van die kromme na 45 minute plaas. 'n Vorige eksperiment (figuur 4.3) het reeds getoon dat 'n vinnige afplatting na 60 minute verwag kan word.



FIGUUR 4.10 Analise van translasiëprodukte met toenemende inkubasietyd. Na die aangeduide tydsintervalle is elektroforese soos voorheen (4.4.3) uitgevoer. Die eerste baan toon 'n kontrole wat vir 60 minute sonder eksogene RNA geïnkubeer is. P1, P2, P3 en P4 toon klein polipeptiede wat nie met standaardreovirusproteïene ko-migreer nie.

Die resultate in figuur 4.10 toon geen translasiëprodukte by die kontrole (baan 1) en voor inkubasie (baan 2) nie. Na 'n inkubasieperiode van 15 minute is effense verdonkering teenoor P1 en tussen P1 en σ_3 sigbaar. Na 30 minute is daar 'n toename van groter polipeptiede en is verdonkering tot onder die μ -proteïene sigbaar. Daar is ook 'n toename in verdonkering teenoor die kleiner produkte P2 en P3. Na 60 minute is

produkte wat met μ -proteïene vergelykbaar is sigbaar, terwyl al die ander bande tot by P4 ook 'n toename in verdonkering toon. Waar die inkubasie tot 120 minute geduur het (resultate nie getoon), het daar geen sigbare verandering in die produkte wat na 60 minute gevorm was, plaasgevind nie. Die resolusie van die bande in figuur 4.10 is nie so goed soos by die vorige produkanalises (figure 4.6 en 4.8) nie, waarskynlik weens tegniese probleme. Die gesintetiseerde produkte by tyd 60 minute (figuur 4.10) is egter vergelykbaar met vorige resultate met polipeptiede wat met die $\mu 1$ -, $\sigma 1$ -, $\sigma 2$ - en $\sigma 3$ -standaardproteïene van reovirus komigreer.

Uit die kinetiese benadering van figuur 4.10 is dit duidelik dat daar 'n gelyktydige toename in groter sowel as kleiner produkte is. Dit blyk dus dat die afwesigheid van λ -proteïene en die teenwoordigheid van intermediêre produkte nie as gevolg van proteolitiese afbraak manifesteer nie, maar dat die kleiner produkte eerder onvolledig gesintetiseerde reovirusproteïene mag wees. Dit is egter nog nie duidelik of die onvoltooide produkte van gedegradeerde reovirus-mRNA of van defektiewe terminering van translase afkomstig is nie.

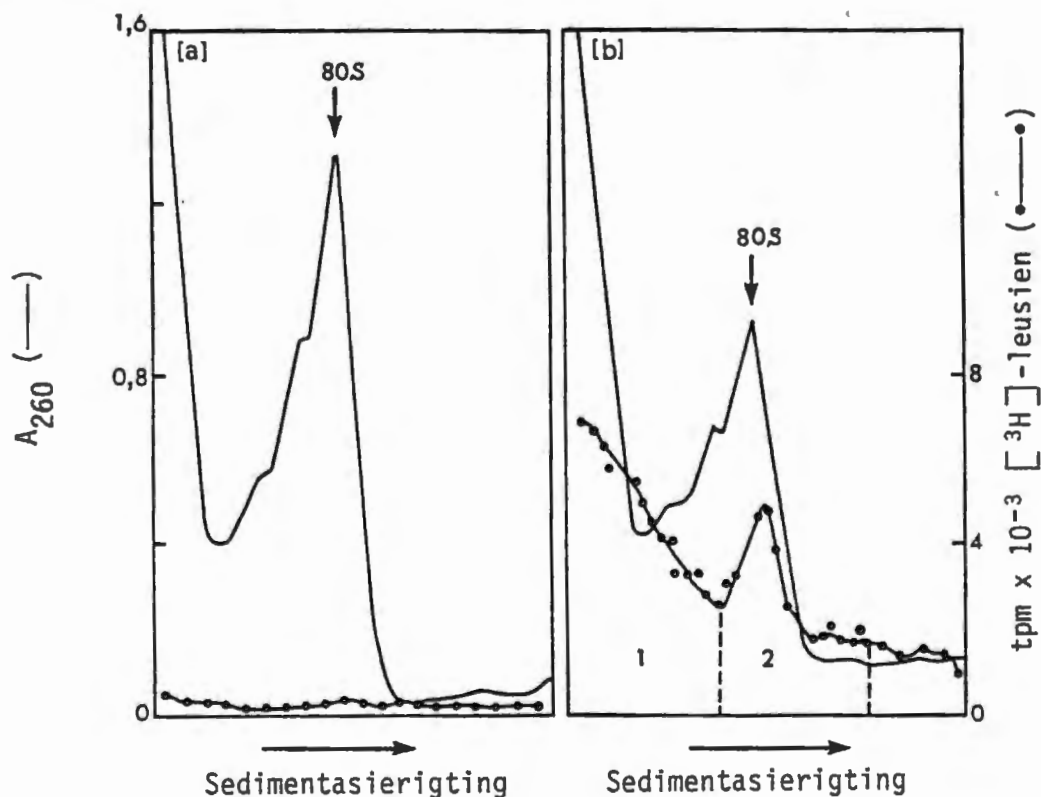
4.5.3 Gradiëntanalise van die translasiemengsels na translase van reovirus-mRNA in die selvrye koringkiemsisteem

Hierdie benadering is gevolg om die posisie en verhouding van vrygestelde polipeptiede tot ribosomaalgebonde polipeptiede aan die einde van die translase van reovirus-mRNA in die selvrye koringkiemsisteem vas te stel. Hieruit kan sekere afleidings oor die effektiwiteit van die translasieproses in die koringkiemsisteem gemaak word. Dit mag moontlik lig werp op die oorsprong van die groot hoeveelheid intermediêre produkte soos waargeneem in figure 4.6 en 4.8.

Translasiemengsels is soos voorheen by optimale kondisies vir reovirus-mRNA-translase saamgestel (kyk 4.3.2). Die mengsels het ook $50 \mu\text{g}$ reovirus-mRNA ml^{-1} en $30 \mu\text{Ci}$ $[^3\text{H}]$ -leusien ml^{-1} bevat. Die reaksiemengsels is vir 0 en 90 minute geïnkubeer, waarna gradiëntanalise volgens die metode van De Wet (1981) uitgevoer is. Na inkubasie is die

reaksiemengsels op ys afgekoel en direk op 10%-30% lineêre sukrosegrediënte wat saamgestel is in 100 mM kaliumasetaat, 20 mM Tris-HCl (pH 7,6) en 3 mM magnesiumasetaat geanaliseer. Die sentrifugeringskondisies was 38 000 opm by 4°C vir 90 minute in 'n SW41-rotor. Die gradiënte is in tiendruppelhoeveelhede gefraksioneer en die radioaktiwiteit in elke fraksie na TCA-presipitering bepaal (soos in 4.2.3).

Die resultate van die radioaktiwiteitsbepaling as maatstaf vir die inkorporasie van [^3H]-leusien in nie-hidroliseerbare, TCA-onoplosbare materiaal, word in figuur 4.11 voorgestel. Tydens die fraksionering is die gradiënte met behulp van 'n ACTA III-spektrofotometer by 260 nm gemonitor. Die sedimentasieprofiel (A_{260}) word ook in 'figuur 4.11 weergegee.



FIGUUR 4.11 Gradiëntanalise van translasiemengsels na 'n inkubasietyd van 0 minute (a) en 90 minute (b) in teenwoordigheid van reovirus-mRNA ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$)

Die A_{260} -profile in figuur 4.11 toon dat die ribosomale materiaal in die koringkiemekstrak oorwegend in die vorm van 80S-ribosome (monosome) voorkom, terwyl vrye ribosomale subeenhede wel teenwoordig is. Na 'n inkubasieperiode van 90 minute in die teenwoordigheid van reovirus-mRNA (figuur 4.11b) is vrye ribosomale subeenhede steeds teenwoordig, wat daarop dui dat die subeenhede nie die beperkende faktor in die translasiesisteem is nie. Die verhouding van vrygestelde polipeptiede tot ribosomaalgebonde polipeptiede is bepaal deur 'n fotokopie van die inkorporasieprofiel te maak en die gedeeltes wat die vrygestelde (gedeelte 1) en die ribosomaalgebonde (gedeelte 2) translasiëprodukte verteenwoordig is uitgesny en geweeg. 'n Verhouding van 10 : 7 (vrygestelde : gebonde) is so verkry. Hoewel 'n groot gedeelte van die radioaktiewe proteïenmateriaal nog na 90 minute ribosomaalgebonde bly, is 'n betekenisvolle hoeveelheid van die produkte tog vrygestel. Hierdie waarneming dui dus nie op 'n abnormaal lae effektiwiteit van die koringkiemsisteem nie en bied nie 'n verklaring vir die onvoltooide produkte nie. Die grootste hoeveelheid van die ribosomaalgebonde radioaktiewe materiaal ko-sedimenteer met die monoribosome, terwyl daar 'n klein hoeveelheid radioaktiewe materiaal steeds polisomaalgebonde is. Davies en Samuel (1975) stel voor dat 'n redelike hoeveelheid van die nassente polipeptiede gevorm word weens defektiewe terminering as gevolg van ribosoomblokkering naby die 3'-einde van die mRNA. Hiervolgens behoort die onvolledige produkte in die ribosomaalgebonde fraksie voor te kom. 'n Volgende eksperiment is in 4.5.4 uitgevoer om vas te stel of die onvoltooide polipeptiede (soos in figure 4.6 en 4.8) ribosomaalgebonde- of vrygestelde produkte is.

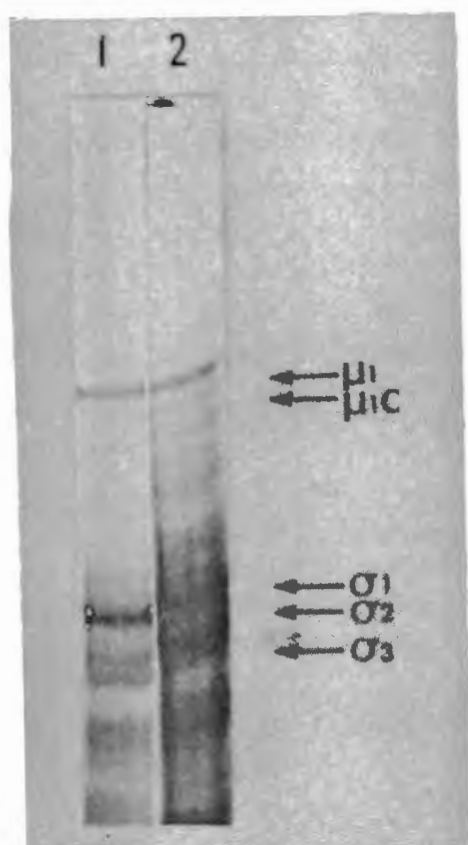
4.5.4 Elektroforetiese analise van die translasiëprodukte na bereiding van 'n postribosomale supernatant

Op dié stadium van hierdie ondersoek is dit duidelik dat die rol van proteolitiese afbraak by die vorming van die produkte van intermediêre grootte in die koringkiemtranslasiesisteem (figure 4.6, 4.8 en 4.10) relatief klein is. Dit blyk dus dat hierdie teenwoordigheid van kleiner produkte eerder aan onvolledige translasië van reovirusboodskappers toegeskryf kan word (kyk bespreking in 4.4.4.2). Tydens die

gradiëntanalise van translase van reovirus-mRNA in die koringkiemsisteem (4.5.2) is vasgestel dat die hoeveelheid vrygestelde translasiëprodukte groter is as die ribosomaalgebonde produkte. Dit is egter onbekend of die onvoltooide produkte deel vorm van die ribosomaalgebonde of vrygestelde radioaktiewe proteïenmateriaal in figuur 4.11(b).

Translasie van reovirus-mRNA in die koringkiemsisteem is uitgevoer soos in 4.4.2 in teenwoordigheid van 500 μCi [^{35}S]-metionien mL^{-1} by die optimale kondisies vir die translase van reovirus-mRNA. Na inkubasie is die helfte van die translasiemengsel onttrek en vir 10 minute teen $148\,000 \times g$ in 'n Beckman Airfuge gesentrifugeer om die ribosome en ribosomaalgebonde komponente te sedimenteer. Vyftien μL van die postribosomale supernatant en ongesentrifugeerde (totale) translasiemengsel is afsonderlik saam met monsterbuffer gekook (4.4.2) waarna die monsters met behulp van PAGE geanaliseer is soos beskryf in 4.4.3. In figuur 4.12 word 'n fotografiese weergawe van die resultate ná fluorografie getoon.

Die translasiëprodukte van die totale reaksiemengsel in figuur 4.12 (baan 2) vertoon bande wat met $\mu 1$, $\sigma 1$, $\sigma 2$ en $\sigma 3$ ko-migreer. By die translasiëprodukte wat in die postribosomale supernatant teenwoordig is (baan 1), is al bogenoemde produkte ook sigbaar hoewel die intensiteit van die band teenoor $\sigma 1$ heelwat laer is as by baan 2. Die translasiëprodukte in figuur 4.12 (baan 2) stem in 'n groot mate ooreen met die resultate van vorige eksperimente (figure 4.6, 4.8 en 4.10). Wanneer die produkte van intermediêre grootte van die twee bane in figuur 4.12 onderling met mekaar vergelyk word, is dit duidelik dat die hoeveelheid intermediêre produkte in die postribosomale supernatant (baan 1) wel opsigtelik verminder is deur die sentrifugering. Hierdie produkte wat deur sentrifugering gesedimenteer is en dus ribosomaalgebonde materiaal is, verteenwoordig polipeptiede wat moontlik weens nukleolitiese degradering van die mRNA of as gevolg van defektiewe terminering ontstaan het. Sodanige onvoltooide polipeptiede sal ribosomaalgebonde wees.



FIGUUR 4.12 Fluorogram van translasiëprodukte na die translasië van reovirus-mRNA in die koringkiemsisteem.

Baan 1: Translasiëprodukte in postribosomale supernatant (vrygestelde polipeptiede).

Baan 2: Translasiëprodukte in totale translasiemengsel. Ongemerkte reovirionproteïene is soos voorheen (4.4.2) as standaard saam geëlektroforeer.

Volgens die model van Davies en Samuel (1975) is produkte wat weens ribosoomblokkering ontstaan polipeptiede van spesifieke groottes wat met relatief konstante veelvoude van 1500 tot 1800 dalton van mekaar verskil. Die bande tussen μ_1 en die σ -proteïene wat na sentrifugering verdwyn mag weens laasgenoemde rede ontstaan het. Dit is egter opvallend in baan 1 dat by die polipeptiede kleiner as die σ -proteïene wel nog produkte van spesifieke grootte voorkom ná verwydering van 'n hoeveelheid ribosomaalgebonde materiaal deur sentrifugering. Hierdie kleiner vrygestelde polipeptiede (baan 1) ontstaan dus heel waarskynlik weens

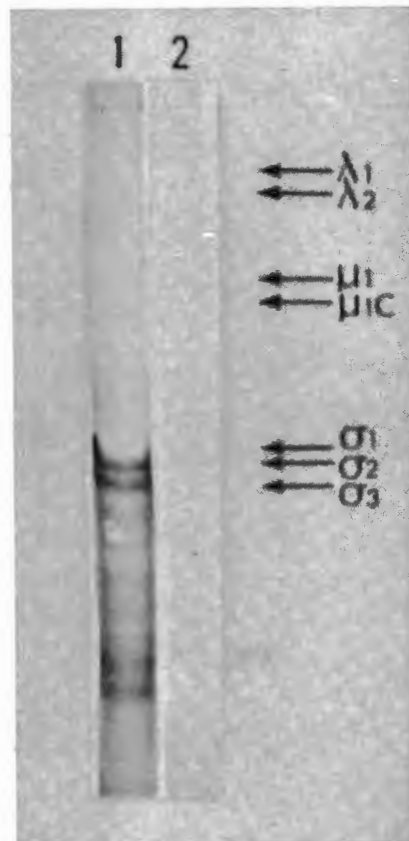
premature terminering (Both et al., 1975; Mathews en Osborn, 1974). Die resultate dui tog op 'n mate van spesifisiteit in bogenoemde gebeure.

4.5.5 Elektroforetiese analise van die translasieprodukte van die kleiner dsRNA-spesies

Daar bestaan 'n algemene neiging vir die meer effektiewe translasie van kleiner mRNA's in selvrye koringkiemsisteme (Davies en Samuel, 1975; McCrae en Joklik, 1978), soos wat dit ook in hierdie ondersoek (4.4 en 4.5) na vore gekom het. Uit die vorige resultate is dit tot dusver nie duidelik of die translasieprodukte van intermediêre grootte slegs vanaf onvolledige translasie van die groter (m- en l-klas) reovirus-boodskappers afkomstig is nie. In hierdie ondersoek is vervolgens enkele dsRNA-spesies van die S-klas, na denaturering, in die koringkiemsisteem getransleer. Die translasieprodukte is weer met behulp van PAGE geanaliseer om vas te stel hoe die afwesigheid van die groter boodskappers die voorkoms van die onvoltooide polipeptiede beïnvloed.

Tydens die fraksionering van die dsRNA in 3.5 het die S3- en S4-spesies baie naby aan mekaar gemigreer (kyk figuur 3.4). Hierdie twee dsRNA-spesies wat gesamentlik geïsoleer is, is in hierdie eksperiment na denaturering as boodskappers benut.

Die translasiemengsel is saamgestel by die optimale kondisies vir die translasie van gedenatureerde reovirus-dsRNA (4.3.3). Die reaksiemengsels het verder 45 μg gedenatureerde S3- en S4-dsRNA $\text{m}\ell^{-1}$ en 200 μCi [^{35}S]-metionien $\text{m}\ell^{-1}$ bevat. Die kontrole het geen toegevoegde RNA bevat nie. Die translasieprodukte is met behulp van PAGE geanaliseer soos beskryf in 4.4.3. Die fluorogram word in figuur 4.13 getoon.



FIGUUR 4.13 Fluorogram van die translasieprodukte van gedenatureerde S3- en S4-dsRNA na PAGE.

Baan 1 bevat die translasieprodukte van gedenatureerde S3- en S4-dsRNA.

Baan 2 verteenwoordig die produkte van die kontrole met geen toegevoegde RNA nie.

Ongemerkte reovirionproteïene is as standaard saam geëlektroforeer.

Produkanalise na die translasie van gedenatureerde S3- en S4-dsRNA in die koringkiemsisteem (figuur 4.8, baan 1) vertoon twee duidelike bande teenoor die σ -proteïene van die standaard. Die een band ko-migreer met σ_3 , terwyl die ander band net onder σ_2 migreer en waarskynlik σ_{NS} , die produk waarvoor S3 kodeer, is (McCrae en Joklik, 1978). Onder die σ -proteïene in baan 1 is die teenwoordigheid van onvoltooide reovirus-poliipeptiede weer opvallend. Soos verwag, kom daar geen μ -proteïene of intermediêre produkte groter as die σ -proteïene soos by die translasie

van ongefraksioneerde gedenatureerde dsRNA (figure 4.6 en 4.8) voor nie. Die hoeveelheid onvoltooide produkte in figuur 4.13 is wel minder as in figuur 4.8. Die resultate van hierdie eksperiment (figuur 4.13) bevestig dus die afleiding in 4.5.1 dat die onvolledige produkte nie van proteolitiese afbraak afkomstig is nie. Dit is ook duidelik dat onvolledig gesintetiseerde σ -proteïene wel 'n bydrae tot die onvoltooide polipeptiede lewer en dat laasgenoemde dus nie slegs van die λ - en m-klas reovirusboodskappers afkomstig is nie. Die resultate van figuur 4.13 toon ook dat die dsRNA-spesies na die fraksioneringsprosedure van 3.5 nog intakt is en betroubaar getrou in die koringkiemsisteem getransleer word.

Om die oorsprong van die onvoltooide translasieprodukte presies te definieer, is verdere eksperimente nodig. Vir die doeleindes van hierdie projek is met die benaderings in 4.5 volstaan.

4.6 SAMEVATTING

Nadat die optimale kondisies vir die translasie van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA in die selvrye koringkiemsisteem bepaal is (4.3), kon die translasie van σ -polipeptiede van reovirus duidelik na die toevoeging van mRNA of gedenatureerde dsRNA aangetoon word (4.4). Die μ -polipeptiede is in 'n mindere mate gevorm, terwyl die sintese van λ -polipeptiede glad nie onder hierdie kondisies aantoonbaar was nie. Hierdie bevindings was in ooreenstemming met die resultate van McCrae en Joklik (1978) wat die sintese van λ -proteïene eers na 'n kaliumsoutsprong kon aantoon. Dit is bekend dat die in vitro-koringkiemsisteem beter tot die getroue translasie van kleiner boodskappers in staat is, maar dat translasie van die groter boodskappers gestimuleer kan word deur verhoging van die kaliumkonsentrasie (Both et al., 1975; McCrae en Joklik, 1978) of optimalisering van die translasiesisteem met poli-amiene (Hunter, et al., 1977). Hierdeur word die hoeveelheid onvoltooide translasieprodukte gewoonlik ook verminder.

Aangesien dit nie die hoofdoel van hierdie ondersoek was om die sintese van al die reoviruspolipeptiede in die in vitro-koringkiemsisteem aan te toon nie, is die resultate van hierdie hoofstuk as voldoende vir die doel

van standaardisering aanvaar. In die lig hiervan is vir die bestek van hierdie ondersoek dus veral op die translasiëprodukte van die s-klas boodskappers gekonsentreer. Die betroubaarheid van die koringkiemtranslasie is daarom ook gekontroleer deur een van die σ -produkte deur middel van peptiedkartering (kyk 5.6) verder te karakteriseer. Uit die vergelyking van die aktiwiteit en translasiëprodukte in 4.4.4.3 blyk dit dat gedenatureerde dsRNA wel meer effektief as reovirus-mRNA, soos voorgestel deur McCrae en Joklik (1978), in die koringkiemsisteem getransleer word. In die laaste plek is die gefraksioneerde dsRNA suksesvol getransleer (4.5.5) waarmee die funksionele integriteit daarvan na die isolering en suiwering bevestig is. Hierdie ondersoek kon dus vervolgens na die oösietsisteem van *Xenopus laevis* uitgebrei word.

HOOFSTUK 5

TRANSLASIE VAN REOVIRUS-mRNA EN GEDENATUREERDE dsRNA IN DIE OÖSIETE VAN XENOPUS LAEVIS

5.1 INLEIDING

Die einddoel van hierdie ondersoek, soos gemotiveer in hoofstuk 2, was om die translasië van reovirus-RNA in die oösiëte van *Xenopus laevis* verder te ondersoek. In hierdie hoofstuk word hierdie gedeelte van die ondersoek vervolgens beskryf. Beide in vitro-getranskribeerde mRNA en gedensureerde dsRNA van reovirus is weer as bron van boodskapper-RNA benut ten einde die bruikbaarheid daarvan vir translasiestudies in die oösiëtsistiem te evalueer.

'n Verskeidenheid verskillende boodskapper-mRNA's is reeds met sukses in die oösiëtsistiem getransleer (kyk Lane, 1983 vir 'n oorsig). In die meeste gevalle verteenwoordig die aantoning van die spesifieke translasiëprodukte 'n kritiese stap. Weens die relatief hoë translasië-aktiwiteit en verskeidenheid endogene translasiëprodukte van die oösiëte (Van der Walt, 1978; McCrae en Woodland, 1981) is die selektiewe isolering van die reovirus-translasiëprodukte noodsaaklik vir produkanalise. Vir hierdie doel is die aanwending van die spesifisiteit van die interaksie tussen antigeen en antiliggam baie nuttig (Graziadei et al., 1973). Die reovirus-spesifieke polipeptiede is daarom ook na translasië in die oösiëte met behulp van reovirus-spesifieke antiserum geïsoleer, voordat hierdie translasiëprodukte verder met behulp van PAGE geanaliseer is.

Die spesifisiteit van bogenoemde immuno-isolering van die translasiëprodukte verhoog die betroubaarheid van identifisering van die gesintetiseerde polipeptiede op grond van elektroforetiese mobiliteit. Hierdie identifisering is egter nog nie absoluut nie. Daarom is die betroubaarheid van translasië en produkanalise ook deur middel van peptiedkartering geëvalueer (5.6).

5.2 MIKRO-INSPUITING VAN OÖSIETE VAN XENOPUS LAEVIS

Die oösiete van *Xenopus laevis* is in hierdie laboratorium reeds as translasiesisteem benut. Vir die standaardisering van die oösietsisteem het die werk van Gurdon et al. (1971), Moar et al. (1971) en Lane et al. (1971) as riglyn gedien. Die mikro-inspuittegniek, soos in hierdie laboratorium gebruik, is reeds volledig deur Van der Walt (1978) beskryf.

Oösiete is uit volwasse *Xenopus laevis*-wyfies gedissekteer en in voedingsmedium op ys gehou. Hierdie voedingsmedium is 'n gemodifiseerde medium van Barth soos deur Gurdon (1968) gebruik (kyk tabel 5.1).

TABEL 5.1 Barth se gemodifiseerde medium

Komponent	Eindkonsentrasie
NaCl	88 mM
KCl	1 mM
Ca(NO ₃) ₂	0,33 mM
CaCl ₂	0,41 mM
MgSO ₄	0,82 mM
NaHCO ₃	2,4 mM
Tris-HCl (pH 7,6)	2,0 mM
Penisillien en streptomisien	1 mg %

Nadat die oösiete van mekaar losgemaak is, is hulle na 'n oösiethouer oorgedra vir inspuiting. 'n Kapillêre glasbuis (deursnee ~ 0,7 mm) is met behulp van 'n mikropipettrekker as mikrosput met 'n puntdeursnee van ongeveer 20 µm voorberei. Twintig µl inspuitmedium is telkens met behulp van 'n 50 mℓ spuit in die kapillêre buis opgesuig. In elke oösiet is 50 nanoliter reovirus-mRNA (800 µg mℓ⁻¹) of gedenatureerde dsRNA (600-1200 µg plusstring mℓ⁻¹) gesput. 'n Groep van veertig oösiete is telkens ná inspuiting in 150 µl inkubasiemedium vir 24 of 48 uur by

20°C geïnkubeer. Die inkubasiemedium het die gemodifiseerde voedingsmedium van Barth bevat waarby [³H]-leusien of [³⁵S]-metionien gevoeg is. Die presiese kondisies word by elke eksperiment aangedui. Na inkubasie is elke groep oösiete in die volgende medium gewas en gehomogeniseer: 10 mM natriumfosfaatbuffer (pH 7,2) met 0,9% NaCl, 0,5% Triton X-100, 0,5% natriumdeoksicholaat en 0,1% SDS (Asselbergs et al., 1978). Die homogenaat is teen 60 000 × g vir 60 minute by 4°C gesentrifugeer en die supernatant (~ 8 ml) is vir nie langer nie as 12 uur by 4°C bewaar.

5.3 VOORBEREIDING VIR PRODUKANALISE

5.3.1 Bereiding van antiserum teen reovirus

Een mg gesuiwerde intakte reovirus (Lee et al., 1981a), wat opgelos is in 1,5 ml 2 mM Tris-HCl (pH 7,4) is deeglik met 'n gelyke volume Freund's-adjuvant gemeng. Hierdie mengsel is onderhuids in die skouer van 'n volwasse Nieu-Seelandse wit konyn ingespuut. Na 7 dae is die prosedure herhaal, terwyl reovirus sonder adjuvant weer na 14 dae ingespuut is.

'n Week na die laaste toediening is ongeveer 20 ml bloed uit 'n perifere venus in die oor van die konyn onder vakuum onttrek. Nadat die bloed gestol het, is die antiserum in 200 µl-dele gevries en by -20°C bewaar.

5.3.2 Suiwering van reovirusspesifieke translasiëprodukte

5.3.2.1 Inleiding

Anders as by die selvrye koringkiemsisteem het die oösietsisteem 'n betekenisvolle hoeveelheid endogene mRNA wat tydens die translasië-eksperimente tot die sintese van endogene polipeptiede lei. Om sinvolle produkanalise na die translasië van reovirusboodskappers in die oösiete te kan uitvoer, is dit daarom nodig om die reovirusspesifieke translasiëprodukte eers te suiwer voordat dit verder elektroforeties geanaliseer word. Die benadering van immunopresipitering wat deur Van

der Walt (1978) toegepas is, is vir hierdie doel geoptimaliseer. Een van die tegniese probleme met immunopresipitering is die moontlikheid van ko-presipitering van nie-spesifieke translasieprodukte wat die spesifisiteit van die resultate enigsins kan beïnvloed. Om hierdie probleem te oorkom, is twee alternatiewe metodes om die translasieprodukte te isoleer toegepas en met mekaar vergelyk.

5.3.2.2 Indirekte immunopresipitering

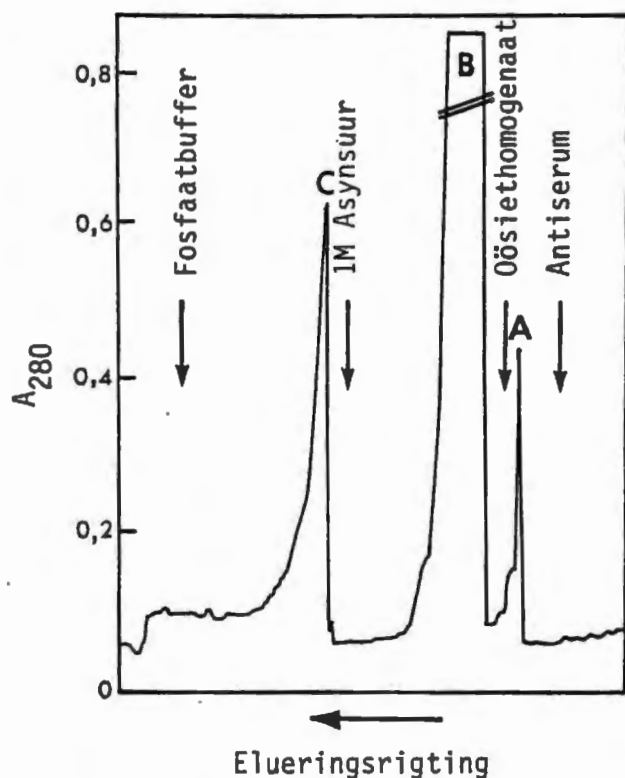
Indirekte immunopresipitering (Rapoport et al., 1978) is uitgevoer deur 20 μ l konynantiserum teen reovirus (5.3.1) by elke 8 ml gesentrifugeerde oösiethomogenaat (kyk 5.2) te voeg en vir 1 uur by 37°C te inkubeer. Na die byvoeging van 'n oormaat (~ 35 μ l) bok-antiserum teen konyn-IgG (Miles Laboratories Inc.) is die inkubasie voortgesit vir nog 'n uur by 37°C en vir 1 uur by 25°C. Soms is die mengsel oornag by 8°C bewaar, maar aangesien laasgenoemde soms tot nie-spesifieke presipitering aanleiding gegee het, word dit nie aanbeveel nie. Die bok-antiligggame vorm groter komplekse met die konyn-IgG's wat ook dié insluit wat met reovirusantigeen gebind het. Die swaarder immuunkomplekse is dan teen 12 000 $\times$ g vir 20 minute gesedimenteer. Die sedimente is weer in Asselberg se homogeniseringsmedium gesuspendeer en die sentrifugering herhaal om nie-spesifieke presipitering te verminder. Die sediment is in monsterbuffer (soos in 4.4.2) gekook met die oog op PAGE.

5.3.2.3 Proteïen A-affiniteitschromatografie

Hierdie metode is toegepas om die risiko van kontaminerende ko-presipitering (Nickol et al., 1976) saam met die immuunkomplekse te verlaag. Deur gebruik te maak van 'n proteïen A-Sepharosekolom kan alle IgG's in die antiserum eerstens aan die matriks gebind word. Na binding van die antigene aan die geïmmobiliseerde IgG's kan met relatief groot volumes wasbuffer geëlueer word om nie-spesifieke binding te beperk. Hierna kan die immuunkomplekse met behulp van 1 M asynsuur geëlueer word met die oog op verdere analise. Hierdie tegniek berus op die selektiewe binding van proteïen A van *Staphylococcus aureus* (SpA) aan die Fc-gebied van immunoglobuliene, gewoonlik IgG (Langone, 1982).

Die metode van Chenais et al. (1977), met enkele wysigings, is vir die affiniteitschromatografie op SpA-Sepharose CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals) gebruik. 'n Kolom met 'n totale volume van 0,5 ml is met 'n wasbuffer (0,89% NaCl, 0,1 M natriumfosfaatbuffer, pH 7,2) geëkwilibreer voordat 20 µl van die reovirusspesifieke konynantiserum (5.3.1) stadig met die buffer deur die kolom geëlueer is om die IgG's te laat bind. Die teenwoordigheid van proteïene is deur meting van die optiese digtheid by 280 nm gemonitor. Die resultaat word in figuur 5.1 getoon. Die serumproteïene wat nie gebind het nie, is met wasbuffer uit die kolom geëlueer (figuur 5.1, piek A), totdat die A_{280} konstant laag gebly het. Die gesentrifugeerde oösiethomogenaat (8 ml vanaf 5.2) is stadig deur die kolom geëlueer, sodat antigeen-antiliggaambinding kon plaasvind. Hierna is wasbuffer weer deur die kolom geëlueer om van die materiaal wat nie gebind het nie (figuur 5.1, piek B) ontslae te raak. Die immuunkompleks is met 1 M asynsuur geëlueer en as die laaste A_{280} -fraksie versamel (Figuur 5.1, piek C). Na ekwilibrering met wasbuffer kan die prosedure vir 'n volgende eksperiment herhaal word.

Die versamelde 1 M asynsuur-eluaat is drie maal teen 200 volumes 0,89% NaCl by 8°C gedialiseer. Die proteïene is met 4 volumes asetoon by -20°C vir 3 ure gepresipiteer. Na sentrifugering vir 10 minute teen 10 000 opm in 'n SW27-rotor is die presipitaat in monsterbuffer (4.4.2) vir elektroforese gesuspendeer en gekook.



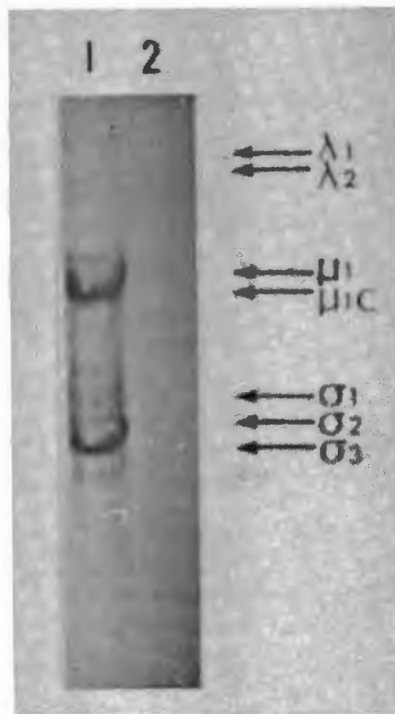
FIGUUR 5.1 'n Tipiese elueringsprofiel van die proteïen A-affiniteitschromatografie. Die prosedure word in 5.3.2.3 beskryf.

5.4 PRODUKANALISE NA TRANSLASIE VAN REOVIRUS-mRNA IN DIE OÖSIETSISTEEM

5.4.1 Produkanalise na indirekte immunopresipitering

Oösiete is met reovirus-mRNA ingespuut en geïnkubeer soos beskryf in 5.2. Die inspuutmedium het bestaan uit ongefraksioneerde reovirus-mRNA (kyk 3.3.2) opgelos in water tot 'n eindkonsentrasie van $800 \mu\text{g mRNA mL}^{-1}$. Wanneer 50 nL hiervan per oösiet ingespuut is, het dit tot 'n finale konsentrasie van ongeveer $80 \mu\text{g mRNA mL}^{-1}$ in die oösiete gelei, wat vergelykbaar is met waardes in die literatuur wat gewissel het vanaf 10 tot $160 \mu\text{g mRNA mL}^{-1}$ (Asselbergs et al., 1978; Mous et al., 1977). Elke groep oösiete is vir 24 uur in voedingsmedium (kyk 5.2) in die teenwoordigheid van $250 \mu\text{Ci } [^3\text{H}]\text{-leusien mL}^{-1}$ geïnkubeer. Na homogenisering van die oösiete is indirekte immunopresipitering uitgevoer

soos beskryf in 5.3.2.2. Die translasiëprodukte is daarna met behulp van PAGE (SDS-fosfaatbuffersisteem) soos beskryf in 4.4.3 geanaliseer. Figuur 5.2 toon die resultate na fluorografie.



FIGUUR 5.2 Fluorogram van translasiëprodukte, wat in *Xenopus laevis*-oösiëte gesintetiseer is na inspuiting van ongefraksioneerde reovirus-mRNA en gesuiwer is met indirekte immunopresipitering.

Baan 1: Polipeptiede wat na inspuiting van reovirus-mRNA gesintetiseer is.

Baan 2: Polipeptiede wat na inspuiting van water sonder enige mRNA gesintetiseer is.

Die pyle toon die posisies van strukturele reovirus-proteïene, wat as standaard saam geëlektroforeer is. Die blootstellingstyd op die X-straalfilm was 14 dae.

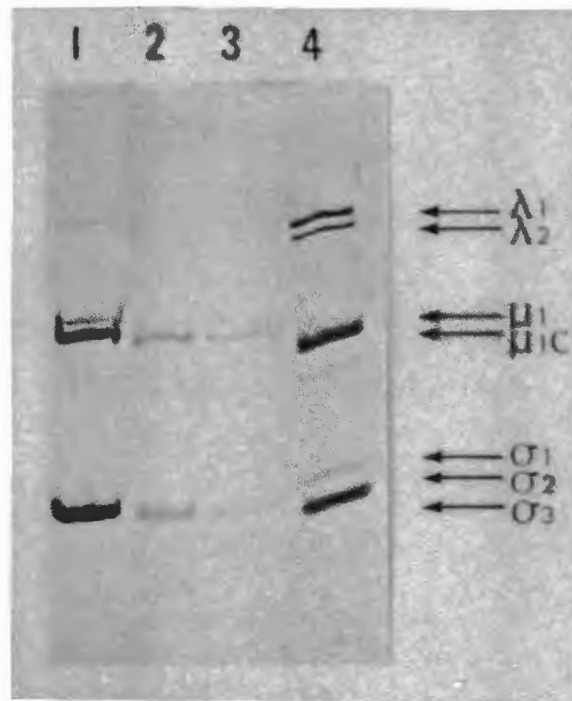
Die fluorogram in figuur 5.2 toon 'n aantal translasiëprodukte wat in die oösiëte gesintetiseer is na inspuiting van reovirus-mRNA (baan 1), terwyl geen produkte by die kontrole in baan 2 voorkom nie, waar oösiëte met water sonder enige mRNA ingespuut is. Polipeptiedbande wat met $\sigma 3$ -, $\sigma 2$ -, $\sigma 1$ - en $\mu 1C$ -proteïenstandaarde ko-migreer, kom in baan 1 voor. Hiervan is die bande teenoor $\sigma 3$ en $\mu 1C$ die duidelikste. Daar is verder

in baan 1 verdonkering van die X-straalfilm in gebiede bokant die standaard μ -proteïene, sowel as bo $\sigma 1$ en onder $\sigma 3$. Hierdie verdonkering dui heel waarskynlik op produkte wat in teenwoordigheid van reovirus-mRNA gesintetiseer word, aangesien geen produkte by die kontrole (baan 2) voorkom nie. Dit is belangrik om daarop te let dat hier, anders as in hoofstuk 4, eers van selektiewe immunopresipitering gebruik gemaak is voordat die translasieprodukte met behulp van PAGE geanaliseer is. In die lig van bogenoemde kan die translasieprodukte uit die oösierte in vergelyking met die produkte na translasie in die koringkiemsisteem (hoofstuk 4) met 'n groter mate van sekerheid as reovirusspesifieke proteïene, waarmee dit ko-migreer, geïdentifiseer word.

In afdeling 5.6 is die betroubaarheid van bogenoemde identifikasie, sowel as die betroubaarheid van translasie in beide die oösierte en die koringkiemsisteem verder met behulp van peptiedkartering geverifieer, wat as finale maatstaf van die betroubaarheid van translasie gebruik is (McCrae en Joklik, 1978).

5.4.2 Produkanalise na proteïen A-affiniteitschromatografie

In hierdie ondersoek is weer ongefraksioneerde reovirus-mRNA in die oösierte ingespuut, maar teen 'n hoër konsentrasie van $1 \text{ mg mRNA mL}^{-1}$ (vergelyk 5.4.1). Die oösierte is vir 48 uur by 20°C in inkubasiemedium, wat $150 \text{ } \mu\text{Ci } [^{35}\text{S}]\text{-metionien mL}^{-1}$ bevat, geïnkubeer. Die reovirusspesifieke translasieprodukte is met behulp van affiniteitschromatografie op 'n proteïen A-Sepharose-kolom, soos beskryf in 5.3.2.3, gesuiwer. Hierna is die gesuiwerde produkte elektroforeties geanaliseer, soos voorheen beskryf (4.4.3). In hierdie geval is outoradiografie uitgevoer en die resultate word in figuur 5.3 getoon.



FIGUUR 5.3 Outoradiogram van reovirus-mRNA translasiëprodukte. Ongefraksioneerde reovirus-mRNA (1 mg ml^{-1}) is in die oösiëte ingespuut en inkubasie in die teenwoordigheid van $150 \text{ } \mu\text{Ci } [^{35}\text{S}]\text{-metionien ml}^{-1}$ uitgevoer. Na suiwing met behulp van proteïen A-affiniteitschromatografie is die translasiëprodukte elektroforeties geanaliseer. Die prosedure word volledig in die teks beskryf.

Baan 1-3: Polipeptiede wat in die oösiëtsistiem gesintetiseer is na inspuiting van reovirus-mRNA. Vanaf baan 1 tot 3 is onderskeidelik 50, 30 en 20 oösiëte per groep ingespuut.

Baan 4: Gesuiwerde reovirus met $[^{35}\text{S}]\text{-metionien}$ in die proteïene (3.2.3) wat as standaard benut is.

In die outoradiogram (figuur 5.3) is daar 'n toename in die intensiteit van die polipeptiedbande vanaf baan 3 tot 1. Die bande in hierdie bane wat die duidelikste vertoon, ko-migreer met die $\sigma 3$ - en $\mu 1\text{C}$ -proteïenstandaarde in baan 4. Verder is daar in baan 1 drie ander bande van laer intensiteit sigbaar. Die translasiëproduk met die grootste molekulêre massa migreer saam met die λ -standaarde. Uit die resultate in figuur 5.3 is dit egter nie duidelik met watter standaard ($\lambda 1$ of $\lambda 2$) hierdie

produk ko-migreer nie. Die tweede band in baan 1 wat saam met die μ -klas polipeptiede migreer, is moontlik $\mu 1$ maar kan nie finaal uit die resultate in figuur 5.3 geïdentifiseer word nie, omdat $\mu 1$ nie by die standaard in baan 4 sigbaar is nie. Die derde produk in baan 1 wat ook nie met sekerheid benaam kan word nie val in die σ -klas en die band vertoon baie dof. Die mobiliteit van hierdie polipeptied is vergelykbaar met dié van $\sigma 1$ wat soos $\mu 1$ in baie lae konsentrasies in die reoviruskapsel voorkom en dus ook nie by die standaard in baan 4 sigbaar is nie. Die band wat by die standaard in baan 4 onder $\mu 1C$ sigbaar is, is slegs teenwoordig as gesuiwerde reovirus vir relatief lang periodes by 4°C gestoor word en is dus waarskynlik 'n afbraakproduk. Soos gemotiveer by 5.4.1 kan die produkte wat na die translase van reovirus-mRNA in die oösiets immunochemies geïsoleer is met redelike sekerheid as reoviruspesifieke polipeptiede geïdentifiseer word veral as die baie lae agtergrond van endogene oösietsprodukte in figuur 5.3 in ag geneem word. Vir finale evaluering bly die peptiedkartering wat in 5.6 beskryf word egter steeds nodig.

5.5 TRANSLASIE VAN GEDENATUREERDE dsRNA IN DIE OÖSIETSISTEEM

5.5.1 Inleiding

Die oösietsistiem van *Xenopus laevis* is sover bekend nog nooit voorheen in kombinasie met gedenateerde dsRNA vir translasiestudies aangewend nie. Aangesien die translase van reovirus-mRNA wel in hierdie sisteem aangetoon is (5.4), kon nou met die ondersoek van bogenoemde benadering voortgegaan word.

In die literatuur (McCrae en Joklik, 1978), soos ook bevestig in hoofstuk 4 (4.4.4.3), is aangetoon dat DMSO 'n negatiewe invloed op die translase van eksogene mRNA in die koringkiemsistiem het. In die lig hiervan is translase van gedenateerde dsRNA in die koringkiemsistiem deurgaans by finale DMSO-konsentrasies laer as 2% uitgevoer.

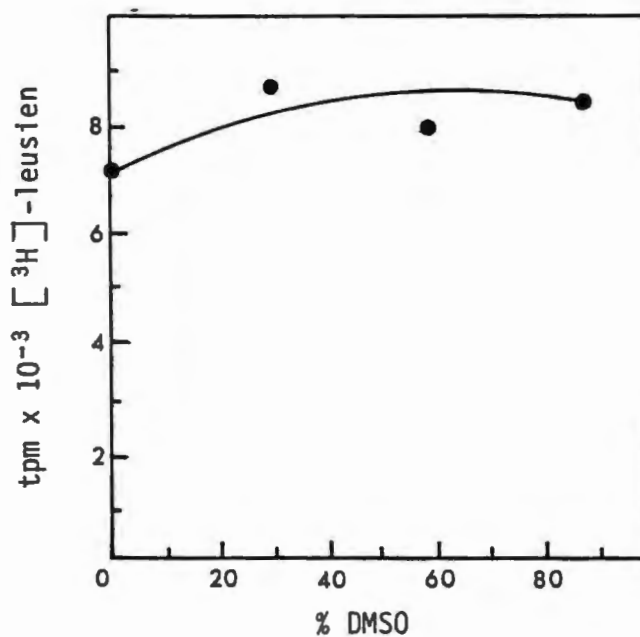
Voordat die translase van DMSO-gedenatureerde dsRNA in die oösietsisteem aangepak is, is die invloed van ingespuite DMSO op die translase-aktiwiteit van die oösiete en op die translase van eksogene mRNA in die oösiete ondersoek.

5.5.2 Die invloed van ingespuite DMSO op die translase-aktiwiteit van die oösietsisteem

Hoewel McCrae en Joklik (1978) aangetoon het dat DMSO tot 'n eindkonsentrasie van 5% geen effek op die endogene aktiwiteit van die koringkiemtranslasiesisteem het nie is die invloed van DMSO op translase in die oösiete onbekend. Vier groepe oösiete (10 oösiete elk) is met toenemende konsentrasies DMSO ingespuut, naamlik 0, 30, 60 en 90% DMSO. Elke groep oösiete is afsonderlik in 100 μl inkubasiemedium met 50 μCi [^3H]-leusien mL^{-1} vir 24 uur geïnkubeer. Die oösiete is in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) gehomogeniseer en die swaar membraanstrukture deur middel van sentrifugering teen 5000 opm vir 15 minute gesedimenteer. As maatstaf van die translase-aktiwiteit is radioaktiwiteit in die TCA-onoplosbare materiaal van die supernatant bepaal soos beskryf in 3.3.1. Hierdie resultate word in figuur 5.4 voorgestel.

Die tendens van hierdie resultate (figuur 5.4) toon dat die styging van die DMSO-konsentrasie in die inspuutmedium nie 'n betekenisvolle invloed op die translase van endogene mRNA in die oösiete uitoefen nie. Hierdie afleiding is gebaseer op die totale hoeveelheid radioaktiewe aminosure wat vir proteïensintese benut is. As die gemiddelde volume van 'n oösiet (deursnee ~ 1 mm) as 500 nL geneem word, is die maksimum konsentrasie wat in die oösiete bereik word 9%. Hierdie konsentrasie neem egter af tydens die inkubasie, aangesien die DMSO uit die oösiete in die medium kan diffundeer.

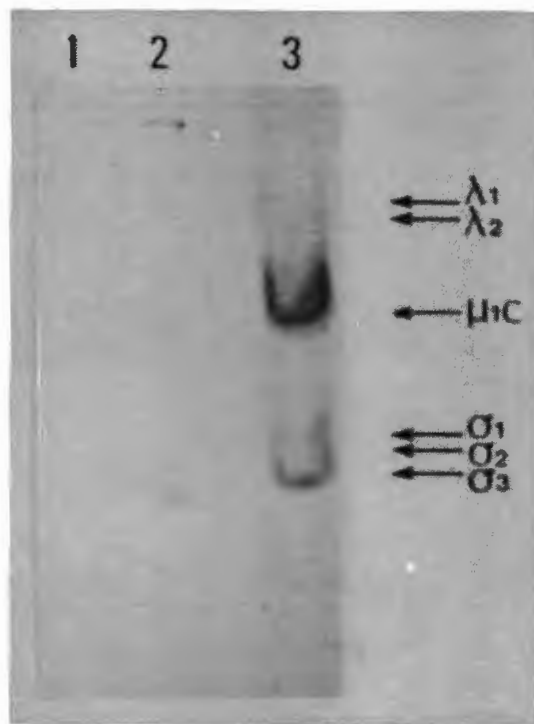
Die afleiding kan dus gemaak word dat die invloed van selfs 90% DMSO in die inspuutmedium op die globale endogene aktiwiteit van die oösiete gering is oor 'n inkubasieperiode van 24 uur. Dit is egter nie bekend wat die invloed van soortgelyke DMSO-konsentrasies op die translase van eksogene mRNA wat saam met die DMSO ingespuut word, is nie.



FIGUUR 5.4 Die invloed van toenemende DMSO-konsentrasie op die endogene translasië-aktiwiteit van oösiëte van *Xenopus laevis*. Die persentasie DMSO verteenwoordig die konsentrasie in die inspuitsmedium. (Kyk teks vir prosedure.)

5.5.3 Die invloed van ingespuite DMSO op die translasië van eksogene mRNA in die oösiëtsisteem

Ongefraksioneerde reovirus-mRNA is in 80% DMSO opgelos tot 'n eindkonsentrasie van $1 \text{ mg mRNA mL}^{-1}$ en in die oösiëte ingespuit soos beskryf in 5.2. Die oösiëte is vir 48 uur in inkubasiemedium met $250 \text{ } \mu\text{Ci } [^3\text{H}]\text{-leusien mL}^{-1}$ geïnkubeer. As kontroles is reovirus-mRNA (1 mg mL^{-1}) in water en water sonder RNA in twee addisionele groepe oösiëte ingespuit. Na inkubasie is die translasiëprodukte met behulp van proteïen A-affiniteitschromatografie (5.3.2.2) gesuiwer. Elektroforese en fluorografie is soos voorheen (4.4.3) uitgevoer. Hierdie resultate word in figuur 5.5 vergelyk.



FIGUUR 5.5 Die invloed van ingespuite DMSO op die translase van eksogene mRNA in *Xenopus laevis*-oösiete.

Baan 1: Polipeptiede wat na inspuiting van water sonder RNA gesintetiseer is.

Baan 2: Polipeptiede wat na inspuiting van reovirus-mRNA in 80% DMSO gesintetiseer is.

Baan 3: Polipeptiede wat na inspuiting van reovirus-mRNA in water gesintetiseer is.

Die pyle toon die posisies van strukturele reovirusproteïene. Fluorografie is vir 14 dae uitgevoer.

Die fluorogram in figuur 5.5 toon dat geen translaseprodukte in baan 1 waar slegs water in die oösiete ingespuut is, voorkom nie. In baan 2 waar reovirus-mRNA wat in 80% DMSO opgelos is, ingespuut is, kom dowwe bande teenoor $\mu 1C$ en $\sigma 3$ voor. In die geval van reovirus-mRNA in water (baan 3) is duideliker bande wat met $\mu 1C$ en $\sigma 3$ ko-migreer, sigbaar, terwyl 'n ligter band teenoor die $\sigma 1$ -standaard voorkom. Anders as by figuur 5.3 is hier geen λ -translaseproduk sigbaar nie, moontlik omdat translase by figuur 5.5 in teenwoordigheid van $[^3H]$ -leusien uitgevoer is teenoor die $[^{35}S]$ -metionien by figuur 5.3. As die resultate van baan

2 en 3 (figuur 5.5) met mekaar vergelyk word, wil dit dus voorkom asof die translase van eksogene mRNA wel benadeel word wanneer die mRNA in 80% DMSO opgelos is tydens die inspuiting van die oösiete. Die presiese redes vir hierdie inhiberende effek is op hierdie stadium nie duidelik nie.

5.5.4 Verskillende benaderings vir die translase van gedenatureerde reovirus-dsRNA in die oösietsisteem

5.5.4.1 Inleiding

In hoofstuk 4 is aangetoon dat, ten spyte van die inhiberende invloed van DMSO, dsRNA van reovirus wat in 80% DMSO gedenatureer is wel in die koringkiemsisteem tot translasielprodukte getransleer word wat met die produkte van reovirus-mRNA vergelykbaar is. Dit is tydens die ondersoek van translase van gedenatureerde dsRNA in die oösiete ook belangrik om daarop te let dat die dsRNA in die vorm van enkelstring-RNA teenwoordig móét wees. Die effek van DMSO op translase kan ook nie buite rekening gelaat word nie (kyk ook bespreking by 4.3.3.1).

In die lig van vorige resultate (hoofstuk 4, sowel as 5.5.2 en 5.5.3) is 'n aantal verskillende benaderings gevolg om die translase van gedenatureerde dsRNA in die oösiete te ondersoek. Aangesien die wyse waarop die gedenatureerde dsRNA tot die koringkiem- en oösietsisteem toegevoeg word, sowel as die eie aard van die twee sisteme grootliks van mekaar verskil, is dit nie moontlik om al die bevindinge met die reovirus-dsRNA in die koringkiemsisteem direk na die oösietsisteem te ekstrapoleer nie. Die translasiestudies in die selvrye koringkiemsisteem dien egter as goeie basis vir die beplanning van die eksperimente om die translase van gedenatureerde dsRNA in die oösiete te ondersoek.

5.5.4.2 Translase van ongefraksioneerde dsRNA na denaturering

In hierdie gedeelte van die ondersoek is ongefraksioneerde dsRNA (kyk 3.4) in 80% of 90% DMSO gedenatureer soos beskryf in 4.3.3.1. Aangesien verag kan word dat enige renaturering van reovirus RNA (Harland en

Weintraub, 1985), sowel as hoë DMSO-konsentrasies (5.5.3) die translase in die oösietsisteem nadelig kan beïnvloed, is hierdie gegewens in ag geneem by die keuse van die kondisies tydens denaturering en inspuiting van die reovirus-dsRNA. Die denatureringsprosedure met dieselfde finale konsentrasies dsRNA en DMSO wat met die koringkiemtranslasie suksesvol toegepas is (4.3.3.1), is in die eerste plek sonder aanpassings gevolg, waarna die gedenatureerde RNA in die oösiete gespuit is. Tweedens is die konsentrasie van die dsRNA in die denatureringsmengsel vooraf met die helfte verlaag om die moontlikheid van renaturering tydens en na inspuiting in die oösiete te verlaag. In die derde plek is die denatureringsmengsel direk voor inspuiting met water verdun, waarmee die konsentrasies van beide die DMSO en die reovirus-RNA in die inspuitmedium verlaag is. Laasgenoemde is uitgevoer om die invloed van die DMSO op translase in die oösiete te verminder. In die volgende paragrawe word die uitvoering van elk van bogenoemde benaderings beskryf.

In die eerste ondersoek is dsRNA in 80% DMSO gedenatureer. Een groep oösiete is met 2,5 mg gedenatureerde dsRNA ml^{-1} in 80% DMSO ingespuit en 'n ander met 1,25 mg ml^{-1} . Elke oösiet is weer met 50 nℓ mengsel ingespuit soos in 5.2. 'n Volgende groep oösiete is met gedenatureerde dsRNA ingespuit wat na denaturering in 80% DMSO met 'n gelyke volume water tot 1,25 mg dsRNA ml^{-1} en 40% DMSO verdun is. Die eindkonsentrasie van die DMSO in die oösiete was onderskeidelik 8% en 4% vir bogenoemde gevalle.

In 'n ander geval is dsRNA wat in 90% DMSO gedenatureer is in oösiete gespuit. Met hierdie hoër konsentrasie DMSO is gepoog om die kondisies vir denaturering te verbeter en die moontlikheid vir renaturering tydens inspuiting te verlaag. Twee groepe is weer met eindkonsentrasies van onderskeidelik 2,5 mg of 1,25 mg RNA ml^{-1} ingespuit. Die finale konsentrasie van DMSO na inspuiting in die groep oösiete was dus 9%.

Met 'n volgende benadering is die dsRNA na denaturering in 90% DMSO met behulp van etanolpresipitering van die DMSO geskei, voordat dit in die oösiete ingespuit is. Die dsRNA is in 90% DMSO gedenatureer, waarna

1,5 M NaCl onmiddellik tot 'n eindkonsentrasie van 0,15 M bygevoeg is en die RNA met die toevoeging van 5 volumes etanol by -20°C gepresipiteer is (Zarbl et al., 1980b). Na 3 ure by -20°C is die RNA deur sentrifugering gesedimenteer en in water opgelos tot 'n finale konsentrasie van $1,25 \text{ mg ml}^{-1}$. 'n Groep oösiete is vervolgens met hierdie RNA (opgelos in water) ingespuut. Sodoende is geen DMSO saam met die gedenatureerde RNA ingespuut nie. Volgens McCrae (1985) is laasgenoemde benadering reeds suksesvol in selvrye translasiesisteme gevolg, waar die gedenatureerde RNA na etanolpresipitering direk in die translasiemengsel gesuspendeer is.

Die groepe oösiete is telkens saam met 'n kontrolegroep waar inspuutmedium sonder RNA ingespuut is in die teenwoordigheid van $250 \mu\text{Ci } [^3\text{H}]\text{-leusien}$ in Barth se gemodifiseerde medium (tabel 5.1) geïnkubeer. Na 'n inkubasietydperk van 24 uur is proteïen A-affiniteitschromatografie uitgevoer soos voorheen beskryf (5.3.2.3). Hierna is die sediment van die immuunkomplekse wat die reoviruspesifieke translasieprodukte bevat elektroforeties geanaliseer soos in die vorige ondersoeke (4.4.3).

Die resultate van elke eksperiment is telkens goed beoordeel, waarna 'n volgende benaderingswyse beplan en uitgevoer is. Tog kon met nie een van hierdie benaderingswyses die translasie van gedenatureerde dsRNA in die oösietsisteem aangetoon word nie. Hierdie gevolgtrekking is gemaak, omdat by al die analyses daar geen verskil was tussen die resultate van die kontroles waar geen RNA ingespuut is en enige van die groepe oösiete waar gedenatureerde dsRNA ingespuut is nie. Om hierdie rede word die resultate ook nie getoon nie.

5.5.4.3 Translasie van gedenatureerde subspesies dsRNA van reovirus

In hierdie eksperiment is die translasie van twee spesies dsRNA (S3 en S4), wat gesamentlik na die fraksionering in 3.5 geïsoleer is, ná denaturering in 80% DMSO in die oösietsisteem ondersoek. In 4.5.4 is die translasie van die ooreenstemmende dsRNA-spesies reeds in die koringkiemsisteem aangetoon (figuur 4.13). Hierdie boodskappers is van

die reovirus-mRNA wat die effektiëste in vitro en in vivo getransleer word (Levin en Samuel, 1980) (kyk ook tabel 2.3). In die oösiëte kan die translasiëprodukt van s4-mRNA, naamlik $\sigma 3$, ook baie duidelik aangetoon word (kyk 5.4) na translasië in die teenwoordigheid van totale reovirus-mRNA. Deur die inspuiting van gedenatureerde S3- en S4-dsRNA in die oösiëte word die moontlikheid om reovirusspesifieke translasiëprodukte op te spoor dus verhoog, deurdat kompetisie met die ander RNA-spesies van reovirus tydens translasië uitgeskakel word.

Een groep van veertig oösiëte is met S3 en S4 wat in 80% DMSO teen 'n eindkonsentrasie van 2 mg RNA ml^{-1} gedenatureer is, ingespuut. 'n Tweede groep is met dieselfde S3 en S4, maar ná verdunning daarvan tot 1 mg RNA ml^{-1} in 40% DMSO direk ná denaturering, ingespuut. Kontrole-groepe is met 80% en 40% DMSO sonder RNA ingespuut en saam met eersgenoemde twee groepe in die teenwoordigheid van $150 \text{ } \mu\text{Ci } [^{35}\text{S}]\text{-metionien}$ geïnkubeer. Na inkubasie is die produkte met behulp van proteïen A-affiniteitschromatografie (5.3.2.3) en PAGE (4.4.3) geanaliseer.

Na fluorografie is daar ook by hierdie eksperimente geen translasiëprodukte waargeneem nie. Hoewel die translasië van gedenatureerde dsRNA in die koringkiemsisteem (hoofstuk 4) aangetoon kon word, is daar onder al bogenoemde kondisies in die oösiëtsisteem geen reovirusspesifieke translasiëprodukte ná die inspuiting van gedenatureerde dsRNA inspuiting van gedenatureerde dsRNA waargeneem nie.

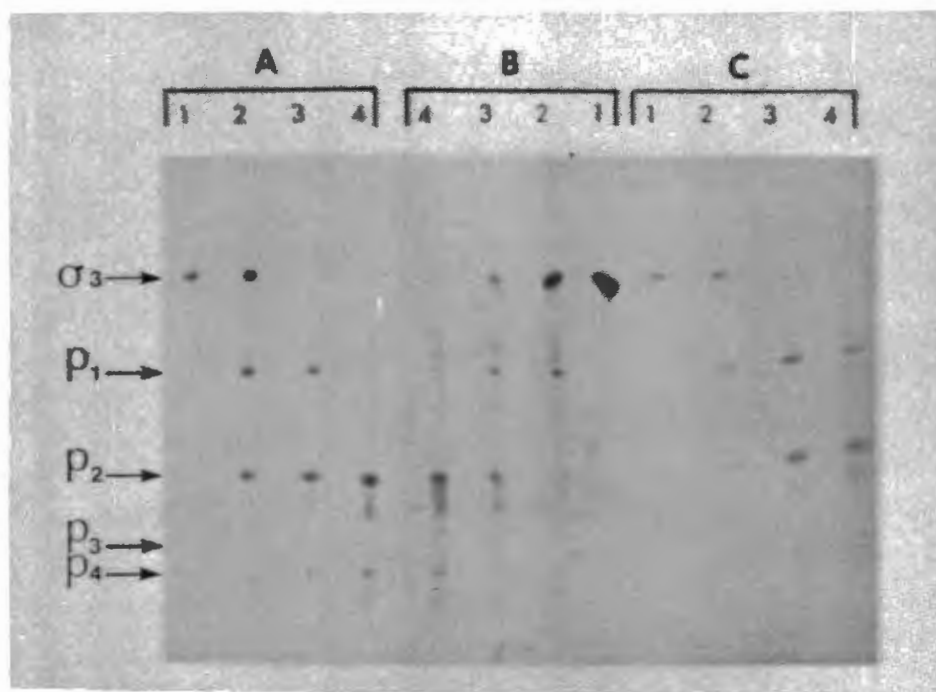
5.6 EVALUERING VAN DIE BETROUBAARHEID VAN TRANSLASIE IN DIE SELVRYE KORINGKIEMSISTEEM EN DIE OÖSIËTSISTEEM VAN XENOPUS LAEVIS.

Hierdie evaluering is gedoen deur translasiëprodukte van beide bogenoemde sisteme aan peptiedkartering te onderwerp en met die peptiedprofiel van 'n standaardreovirusproteïen te vergelyk. Die translasiëprodukt wat met $\sigma 3$ ko-migreer, is die reovirusprodukt wat in beide die koringkiemsisteem en oösiëte effektië gesintetiseer is en na

skeiding met PAGE met redelike sekerheid geïdentifiseer kan word. Verder kom $\sigma 3$ in relatief groot hoeveelhede in die reoviruskapsel voor, sodat die gesuiwerde reovirus met [^{35}S]-metionien in die proteïene (3.2.3) as bron vir standaard- $\sigma 3$ benut kan word. Die waarskynlike $\sigma 3$ -produk was dus by uitstek geskik vir peptiedkartering met die oog op evaluering van die translasiestelsel.

Peptiedkaartanalise is uitgevoer deur van *Staphylococcus aureus* V8-protease (Boehringer Mannheim) en die elektroforesetegniek van Cleveland et al. (1977) soos gemodifiseer deur Burge en Huang (1979) gebruik te maak. V8-protease splyt peptiedbande selektief aan die karboksielterminale kant van glutamiensuur of aspartiensuur (Houmard en Drapeau, 1972). McCrae en Joklik (1978) het reeds die bruikbaarheid van peptiedkartering met V8-protease vir die bevestiging van koderingstoekennings aangetoon (kyk ook 2.2.3).

In hierdie ondersoek is [^{35}S]-gemarkte translasiëprodukte wat met $\sigma 3$ -proteïen ko-migreer, ná elektroforese (4.4.3) met behulp van outoradiografie gelokaliseer en uit die gedroogde gelle gesny. Die uitgesnyde gelstukkies (0,5 cm $\times$ 0,3 cm) is in droë monsterputte van 'n 15% Laemmli-plaatgel (Laemmli, 1970) geplaas. Die gelfragmente is met 20% gliserol in pakgelbuffer (0,1% SDS, 0,001 M EDTA, 0,003% broomfenolblou, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8) bedek. Tien μl 10% gliserol in pakgelbuffer met toenemende hoeveelhede V8-protease (soos in figuur 5.6 aangedui) is bo-op die 20% gliserolbuffer geplaas. Die kragbron is onmiddellik met die instelling op 150 volt aangeskakel. Nadat die broomfenolbloufront 3,5 cm in die 4 cm pakgel inbeweeg het, is die krag vir 30 minute afgeskakel waartydens gedeeltelike ensimatiese hidrolise van die proteïene in teenwoordigheid van V8-protease plaasvind. Na hierdie periode is die kragbron op 200 volt ingestel en elektroforese uitgevoer totdat die broomfenolbloufront die einde van die skeigel bereik het. Die peptiedfragmente is met behulp van fluorografie gelokaliseer. Die vergelyking van peptiedkaarte van outentieke $\sigma 3$ -proteïene en ooreenstemmende translasiëprodukte wat in die koringkiem- en oösietsistiem gesintetiseer is, word in figuur 5.6 getoon.



FIGUUR 5.6 Fluorogram van die peptied na behandeling van (A) σ_3 -standaardproteïen, (B) die koringkiemtranslasieproduk en (C) die oösiettranslasieproduk met V8-protease.

Die hoeveelheid V8-protease in die putte was:

1. 0 ng
2. 25 ng
3. 500 ng
4. 2500 ng.

Die elektroforetiese skeidingsprofile van die peptiedfragmente (figuur 5.6) van die koringkiem- en oösiettranslasieprodukte toon groot ooreenkomste met die profiel van die ooreenstemmende reovirusproteïen (σ_3). Weens die spesifisiteit van die protease word slegs 'n beperkte aantal peptiede vanaf die σ_3 -proteïen gevorm, waardeur die vergelyking van die translasieprodukte met die standaard vergemaklik word. Die outentieke σ_3 -proteïen (figuur 5.6A) word vinnig in twee hooffragmente P1 en P2 gesplyt (bane A2 en A3). Verdere vertering van die groter fragment (P1) lei tot die vorming van nog peptiede, naamlik P3, P4 en P5 (baan A4). Die peptiedprofiel van die koringkiemtranslasieproduk

(figuur 5.6B) toon wel ooreenkomste met die profiel van die $\alpha 3$ -standaard, maar ten minste vier bykomende hidroliseprodukte is in die profiel aangetoon (bane B3 en B4). Daarteenoor is die peptiedprofiel van die translasielproduk wat in die oösietsisteem gesintetiseer is (figuur 5.6C) bykans identies aan die profiel van die outentieke proteïene. Hierdie waarneming bevestig die betroubaarheid van translasiel van reovirus-mRNA in die oösietsisteem. Die geringe verskille wat in die profiel van die koringkiemproduk na vore kom, kan moontlik aan verskille in translasiel of post-translasionele gebeure in die selvrye koringkiemsisteem toegeskryf word.

5.7 SAMEVATTING

In hierdie hoofstuk is die translasiel van reovirus-mRNA en gedenatureerde dsRNA in die oösietsisteem ondersoek. Om die reoviruspesifieke translasielprodukte in die oösiete te kon identifiseer, moes 'n effektiewe en betroubare metode vir produkanalise aangewend word.

Na die translasiel van reovirus-mRNA in die oösiete is aangetoon dat 'n aantal reoviruspesifieke translasielprodukte in die oösiete gesintetiseer is. Hierdie produkte het polipeptiede in die λ -, μ - en σ -klas ingesluit. Produkanalise met behulp van proteïene A-affiniteitschromatografie voor PAGE is deurgaans meer effektief as indirekte immunopresipitering toegepas. Met laasgenoemde is dikwels probleme met nie-spesifieke kopresipitering ondervind (resultate nie getoon). Die resolusie van die polipeptiedbande ná elektroforetiese skeiding was meestal beter na isolering van die immuunkomplekse met behulp van affiniteitschromatografie (vergelyk figure 5.2 en 5.3). Dit is moontlik toe te skryf aan die groter hoeveelheid antiligggame wat na indirekte immunopresipitering in die finale elektroforesemonster teenwoordig is. Hierdie immunoglobulienkettings mag aanleiding gee tot oorbelading van 'n baan met proteïene, wat versteuring van die polipeptiedbande (veral die μ -klas) tydens PAGE kan veroorsaak. Weens die beginsel van indirekte immunopresipitering kan hierdie probleem egter moeilik uitgeskakel word.

In die ondersoek na die translase van gedensureerde dsRNA van reovirus kon egter geen reoviruspesifieke translaseprodukte aangetoon word nie. Resultate dui daarop dat 'n hoë konsentrasie DMSO (90%) in die oösiete nie 'n groot invloed op die totale translase-aktiwiteit (gemeet as tpm) van die oösiete uitoefen nie, maar dat die translase van reovirus-mRNA wat saam met die 90% DMSO ingespuut word wel nadelig beïnvloed word. Ten spyte daarvan dat die konsentrasie van die DMSO na denaturering verlaag is, kon steeds geen reoviruspesifieke translase met gedensureerde dsRNA in die oösiete aangetoon word nie. Aangesien translase van gedensureerde dsRNA in die koringkiemsisteem (hoofstuk 4) die funksionele aktiwiteit van die RNA bevestig het, wil dit voorkom asof die oösietsisteem tesame met die mikro-inspuiting inherente probleme met die toepassing van hierdie benadering vertoon. Die moontlike oorsake vir hierdie bevindings sal in hoofstuk 6 bespreek word.

Die resultate van die peptiedkartering (5.6) toon dat die koringkiemsisteem en oösietsisteem, soos aangewend in hierdie ondersoek, wel tot die betroubare sintese van 'n σ -polipeptied van reovirus in staat is. Uit 'n vergelyking van die peptiedprofiele van die koringkiem- en oösietranslaseproduk blyk dit dat die betroubaarheid van translase groter is in die oösietsisteem. Die peptiedkartering bevestig ook in 'n sekere mate die betroubaarheid van produkanalise wat in hoofstuk 4 en 5 uitgevoer is. Daar kan egter nog nie met sekerheid aanvaar word dat die ander translaseprodukte wat met die outentieke reovirusproteïene ko-migreer, wel die ooreenstemmende viruspolipeptiede is nie. Hiervoor sal peptiedkartering met al die betrokke translaseprodukte uitgevoer moet word. Vir die doel van hierdie ondersoek is met die kartering van die $\sigma 3$ -produkte as maatstaf van die betroubaarheid van translase in die koringkiem- en oösietsisteem volstaan.

HOOFSTUK 6

ALGEMENE BESPREKING

6.1 INLEIDING

Die doelstelling van hierdie ondersoek was die verdere ontwikkeling van die oösietsisteem vir die translase van reovirus-mRNA om sodoende 'n bydrae te lewer tot die uiteindelijke daarstelling van 'n manipuleerbare heelselsisteem waarin vrae ten opsigte van die molekulêre biologie van reovirus onder bykans in vivo-toestande bestudeer kan word. Uit die bespreking van die literatuur in hoofstuk 2 was dit duidelik dat geen finale afleidings oor die betroubaarheid van die translase van reovirus-mRNA in die oösiete van *Xenopus laevis* gemaak kan word nie. Die bevindings van hierdie ondersoek sal vervolgens aan die hand van drie aspekte, wat in afdeling 2.7 as leemtes in hierdie terrein geïdentifiseer is, bespreek word. Hierdie ondersoek sal dan ook samevattend in die lig van die geformuleerde doelstelling geëvalueer word.

6.2 DIE VERHOUDING VAN DIE REOVIRUSTRANSLASIEPRODUKTE

Dit is wel bekend dat die tien reovirus-mRNA's teen verskillende frekwensies in vivo getransleer word (kyk tabel 2.3). Levin en Samuel (1980) het ook aangetoon dat die relatiewe translase-effektiwiteit van die s-klas mRNA's van reovirus in 'n selvrye koringkiemsisteem vergelykbaar is met die effektiwiteit soos in vivo bepaal. Gegewens in die literatuur dui daarop dat die verskil in translase-effektiwiteit van die individuele mRNA's hoofsaaklik verband hou met intrinsieke eienskappe van die mRNA-spesies (Levin en Samuel, 1980; Atwater et al., 1987). Die meganisme waarvolgens sekere reovirus-mRNA's meer effektief as ander getransleer word, is egter nog nie opgeklaar nie (vergelyk 2.2.2 en 2.5.3).

Om vas te stel of die translase van reovirus-mRNA in die oösiete verteenwoordigend van die translase in vivo is, is dit nodig om te bepaal of die verhouding van die translasielprodukte wat in die oösiete

gesintetiseer is, vergelykbaar is met die translasië-effektiwiteit in vivo. In hoofstukke 4 en 5 van hierdie ondersoek is die elektroforetiese analise van die translasiëprodukte van beide reovirus-mRNA en gedensureerde dsRNA wat onderskeidelik in die koringkiem- en oösiëstelsel gesintetiseer is, weergegee. Aangesien die translasië van reovirus-mRNA in hierdie studie hoofsaaklik kwalitatief ondersoek is, is die translasiëprodukte nie gekwantifiseer nie. Die resultate kan nogtans benut word om 'n aanduiding van die relatiewe verhouding van die translasiëprodukte te verkry. Hierdie gegewens word in samehang met die relatiewe translasië-effektiwiteit in vivo (soos aangedui in tabel 2.3) in tabel 6.1 weergegee. In ander ondersoeke waar die kwantifisering van die translasiëprodukte noukeurig uitgevoer is, is outoradiogramme met 'n densitometer afgetas en die pieke van die individuele polipeptiede geïntegreer (Levin en Samuel, 1980; Atwater et al., 1987). Waar die nukleotiedvolgordes van die mRNA's bekend is, is die relatiewe hoeveelhede van die ooreenstemmende polipeptiede gekorrigeer. Dit is gedoen deur die verskil in die metionieninhoud van die betrokke polipeptiede in ag te neem, waar die polipeptiede met [³⁵S]-metionien radioaktief gemerk is (Atwater et al., 1987). In hierdie ondersoek is die translasiëprodukte relatief gekwantifiseer op grond van die sigbaarheid van die polipeptiedbande op fluorogramme (of outoradiogramme), soos verkry in hoofstukke 4 en 5 (figure 4.6, 4.8, 4.12, 5.2 en 5.3).

TABEL 6.1

'N VERGELYKING VAN DIE RELATIEWE TRANSLASIE-EFFEKTIWITEIT VAN REOVIRUS-mRNA in vivo (kyk TABEL 2.3) MET DIE RESULTATE VAN DIE TRANSLASIE-ONDERSOEKE IN DIE KORINGKIE- EN OÖSIETSISTEEM

Genoomsegment	Translasie- effektiwiteit <u>in vivo</u>	Proteïen	Koringkiem		Oösiete	
			dsRNA	mRNA	dsRNA	mRNA
L1	< 2	λ 3	-	-	-	-
L2	28	λ 2	-	-	-	+(?)
L3	24	λ 1	-	-	-	-
M1	< 3	μ 2	-	-	-	-
M2	67	μ 1	+	+	-	++
		μ 1C	-	-	-	+++
M3	32	μ NS	NI	NI	-	-
S1	8	σ 1	+(?)	+(?)	-	+
S2	47	σ 2	+	+	-	+
S3	41	σ NS	+	+	-	-
S4	100	σ 3	+++	+++	-	++++

Relatiewe hoeveelhede van translasieprodukte:

- nie sigbaar
+ sigbaar
++ goed sigbaar
+++ baie goed sigbaar

(?) identifikasie onseker
NI nie identifiseerbaar

Uit die gegewens in tabel 6.1 blyk dit dat die tendens wat by beide die koringkiem- en oösietsisteem verkry is, vergelykbaar is met die effektiwiteit van die translase van die reovirus-mRNA in vivo. By die koringkiemsisteem word hierdie tendens waargeneem vir beide die reovirus-mRNA en die gedenatureerde dsRNA, terwyl by die oösietsisteem geen aanduiding van virusspesifieke translasiëprodukte na die inspuiting van gedenatureerde dsRNA verkry is nie.

Die selvrye koringkiemsisteem besit 'n algemene neiging om kleiner mRNA's beter te transleer (kyk 4.5). Aangesien die kondisies vir translase in die koringkiemsisteem tydens hierdie ondersoek nie vir die translase van die groter mRNA's (ℓ - en m-klas) geoptimaliseer is nie, is dit sinvol om vir die vergelyking van die verhouding van die translasiëprodukte hoofsaaklik op die σ -klas te fokus. In tabel 6.1 word die toename in die frekwensie van translase duidelik geïllustreer in die relatiewe hoeveelhede van die σ -polipeptiede wat in die koringkiemsisteem gesintetiseer is. Vir die translasiëprodukte $\sigma 2$ en σNS word die bepaling van die relatiewe hoeveelhede bemoeilik, omdat die twee produkte tydens die elektroforetiese analise nie volledig van mekaar geskei is nie (kyk afdeling 4.4). Ten spyte van hierdie faktore is die verhouding van die translasiëprodukte wat in die koringkiemsisteem gesintetiseer is (tabel 6.1), vergelykbaar met die resultate van Levin en Samuel (1980). Hierdie groep kon weer aantoon dat die translase-effektiwiteit van die s-klas mRNA's in 'n selvrye koringkiemsisteem met die relatiewe hoeveelheid van die ooreenstemmende in vivo-translasiëprodukte korreleer.

Uit die resultate in afdeling 4.4 is voorgestel dat die gedenatureerde dsRNA as geheel meer effektief as die in vitro-transkripsieprodukte (mRNA) in die koringkiemsisteem getransleer word (vergelyk ook McCrae en Joklik, 1978). Uit tabel 6.1 blyk dit dat die verskil in translasië-effektiwiteit van die individuele reovirus-boodskappers (byvoorbeeld s1 en s4) steeds behoue bly by die plusstring-RNA afkomstig vanaf die gedenatureerde dsRNA. Die eienskappe wat verantwoordelik is vir die differensiële translase van die individuele reovirus-mRNA's word dus nie opgehef deur DMSO-denaturering vóór die in vitro-translase nie. In tabel 6.1 is dit verder duidelik dat $\mu 1$ die enigste identifiseerbare

translasieproduk van die m-klas mRNA is wat in relatiewe groot hoeveelhede in die koringkiemsisteem gesintetiseer is. Hierdie polipeptied word deur m2-mRNA gekodeer wat ook teen 'n relatief hoë frekwensie in vivo getransleer word. Proteïen $\mu 1C$, 'n splytingsproduk van $\mu 1$, is nie in die koringkiemsisteem gevorm nie (vergelyk ook Both et al., 1975). Hierdie modifikasie is sover nog nie in enige selvrye sisteem aangetoon nie (kyk 2.5.3). Die ander translasieprodukte in tabel 6.1 wat as nie-identifiseerbaar aangedui is, ko-migreer nie met een van die strukturele proteïene van reovirus wat as standaard in hierdie ondersoek gebruik is nie.

Die aard en onderlinge verhouding van die translasieprodukte wat in die oösierte gesintetiseer is na die inspuiting van reovirus-mRNA (soos aangetoon in tabel 6.1), is vergelykbaar met die verhouding van die produkte wat in vivo gevorm word. Hieruit blyk dit dat die verskil in translasie-effektiwiteit van die individuele reovirus-mRNA's ook in *Xenopus*-oösierte geld. Die toename in die frekwensie van translasie vanaf s1 na s4, wat in ooreenstemming met die in vivo-gegewens is, word duidelik in tabel 6.1 geïllustreer. Ook by die m-klas mRNA word m2 met 'n ooreenstemmende hoë effektiwiteit in die oösierte getransleer. Hoofsaaklik $\mu 1C$, die splytingsproduk van $\mu 1$, word in die oösierte gevorm met 'n klein hoeveelheid $\mu 1$ steeds teenwoordig. Die betekenis van hierdie post-translasionele modifikasie wat wel in die oösietsisteem plaasvind, in teenstelling met alle selvrye sisteme (kyk 2.5.3), sal in 6.4 bespreek word. Verder is aangetoon dat een van die λ -klas mRNA's in die oösietsisteem getransleer word en wel met 'n relatief laer effektiwiteit as byvoorbeeld m2 en s4. Die onderskeie mRNA-spesies vertoon dieselfde stabiliteit in die oösierte (McCrae en Woodland, 1981). Uit die gegewens van hierdie ondersoek kan dus wel afgelei word dat die hoeveelhede van ten minste sekere translasieprodukte wat in die oösietsisteem gevorm is (tabel 6.1), vergelykbaar is met die hoeveelhede wat in vivo geproduseer word. In hierdie ondersoek is nie bepaal of antiligggame teen alle strukturele proteïene van reovirus in die gebruikte antiserum teenwoordig is nie. Daar moet derhalwe in ag geneem word dat al die reovirusproteïene wat in die oösierte getransleer is, moontlik nie opgespoor is nie. Net so sou die afwesigheid van nie-strukturele

reovirusproteïene moontlik aan die betrokke isoleringsprosedure toegeskryf kan word. Die waarnemings in hierdie ondersoek dui op die behoud van die differensiële translasië-effektiwiteit van die individuele reovirus-mRNA's in die oösietsisteem. Hierdie gegewe is in ooreenstemming met die bestaande voorstelling dat die verskil in translasië-effektiwiteit 'n intrinsieke eienskap van die reovirus-mRNA's is (Munemitsu en Samuel, 1988).

Die resultate wat met die oösiete ná die inspuiting van gedenatureerde dsRNA verkry is, dui daarop dat hierdie kombinasie onder die kondisies, soos aangewend vir hierdie ondersoek, nie geskik is vir translasiestudies nie. Hoewel daar nie verder op die oorsake van hierdie bevinding ingegaan is nie, kan verskillende moontlike oorsake vir die effek verantwoordelik wees. Eerstens is aangetoon (5.5.3) dat die DMSO wat saam met eksogene mRNA ingespuut word wel 'n inhiberende invloed op die translasië van die eksogene mRNA het. Die DMSO mag self 'n invloed op die oösiet hê wat nadelig is vir die translasië van eksogene mRNA. Dit is reeds bekend dat DMSO in weefselkulture as moduleerder van groei en ontwikkeling van differensiërende hepatosiete kan optree (Baribault en Marceau, 1986). Tweedens bestaan die moontlikheid dat die esRNA (plus- en minusstringe) weer kan renatureer tydens of ná die inspuiting van die RNA. Die gerenatureerde RNA sal nie alleen nie getransleer kan word nie (vergelyk Harland en Weintraub, 1985), maar mag ook tot dsRNA-geassosieerde inhibisie van die translasië van virale mRNA in die oösietsisteem lei, soos reeds vir ander eukariotiese sisteme aangetoon is (Benedetti et al., 1985; Miyamoto et al., 1983). Om die presiese oorsake vir die bevindings met die gedenatureerde dsRNA in die oösietsisteem te bepaal, is verdere eksperimentele ondersoeke egter nodig.

6.3 PRODUKANALISE

Produkanalise vorm 'n kritiese stap in die evaluering van die korrektheid van die translasië van reovirus-mRNA in die oösietsisteem. Die leemtes in die produkanalises van McCrae en Woodland (1981) en Van Der Walt (1978), wat saamhang met die hoë endogene translasië-aktiwiteit van die oösiete, is reeds in afdeling 2.7 uitgewys. Die aantoning van die eksogene

translasieprodukte wat in die oösietsisteem gesintetiseer is, deur middel van PAGE, is grootliks afhanklik van die effektiewe isolering van die reoviruspesifieke proteïene. In hierdie ondersoek is die endogene oösietranslasieprodukte effektief deur immuno-isolering voor elektroforese geëlimineer, waardeur die interpretasie van die resultate vergemaklik is (vergelyk 5.3 en 5.4). Die deteksiemethode kan egter verder verbeter word deur van 'n volledige stel antiligggame teen al die reovirusproteïene gebruik te maak (kyk ook bespreking by 6.2).

Die aanvanklike identifikasie van die reoviruspesifieke translasieprodukte wat in beide die koringkiem- en oösietsisteem gevorm is, is op grond van die elektroforetiese mobiliteit van die polipeptiede in 'n SDS-poliakrielamiedgel gedoen. Die translasieprodukte wat in die oösietsisteem gevorm is, is elektroforeties geanaliseer na selektiewe immuno-isolering van viruspesifieke polipeptiede. Ko-migrering van die translasieprodukte met outentieke reovirusproteïene dui op vergelykbare fisies-chemiese eienskappe, terwyl die translasieprodukte ook dieselfde immunologiese eienskappe as reovirusproteïene vertoon het, op grond van die suksesvolle immuno-isolering.

McCrae en Joklik (1978) het aangetoon dat ko-migrering van polipeptiede nie voldoende bewys is dat hulle identies is nie. 'n Finaler evaluering kan gedoen word deur die peptiedkaarte van die betrokke proteïene onder bespreking, ná gedeeltelike proteolise te vergelyk. In afdeling 5.6 is een van die σ -klas produkte ($\sigma 3$) wat in die oösietsisteem gesintetiseer is met behulp van peptiedkartering verder gekarakteriseer. Die peptiedprofiel van hierdie polipeptied is met die peptiedprofiel van die ooreenstemmende σ -polipeptied wat in die koringkiemsisteem gevorm is en die profiel van natuurlike $\sigma 3$ vergelyk. Die $\sigma 3$ -translasieproduk wat in die oösietsisteem gevorm is, het 'n groter strukturele ooreenkoms met die outentieke virale proteïen vertoon, waardeur die korrektheid van die translasie van ten minste sekere reovirus-mRNA's in die oösiete van *Xenopus laevis* bevestig is.

6.4 POST-TRANSLASIONELE MODIFIKASIE

Die grootste persentasie van die primêre geenproduk $\mu 1$ word in vivo post-translasioneel gesplyt om $\mu 1C$, een van die hoofkomponente van die buitekapsel van reovirus, te vorm (Zweerink en Joklik, 1970). Volgens die samevatting van die resultate in tabel 6.1 blyk dit dat in die oösietsisteem, in teenstelling met die selvrye koringkiemsisteem, hoofsaaklik $\mu 1C$ gevorm word met 'n klein hoeveelheid $\mu 1$ wat steeds teenwoordig is. Hierdie waarneming dui daarop dat die essensiële post-translasionele modifikasie van $\mu 1$ deur spesifieke proteolitiese splyting wel in die oösietsisteem plaasvind. Hierdie modifikasie vind nie in selvrye translasiesisteme plaas nie en is sower slegs in selkulture wat met reovirus geïnfekteer is, waargeneem. Dit is dus die eerste keer dat splyting van $\mu 1$ na $\mu 1C$ in 'n heteroloë translasiesisteem aangetoon is. Dit blyk dat 'n intakte sel noodsaaklik is vir hierdie post-translasionele modifikasie van die $\mu 1$ -proteïen.

Die verskillende ensimatiese modifikasies van verskeie polipeptiede, insluitende virale voorgangerpolipeptiede, waartoe ingespuite oösiete van *Xenopus laevis* in staat is, is reeds omvangryk beskryf (Lane, 1983). Die vorming van disulfiedbindings en selfs die saamstelling van multimeriese proteïene in die oösiete is ook gerapporteer. Die waarneming wat in hierdie ondersoek met die omvorming van $\mu 1$ na $\mu 1C$ gemaak is, sluit aan by die voorstelling dat die spesifisiteit van die modifikasie van hierdie heteroloë translasieprodukte deur intrinsieke eienskappe van die substraat bepaal word (Lane, 1983). Wanneer 'n serienprotease-inhibeerder (aprotinien) saam met reovirus-mRNA in die oösiete ingespuut is, is die splyting van $\mu 1$ tot $\mu 1C$ selektief geïnhibeer (M.P.K. van der Walt, ongepubliseerde data). Hierdeur is die identiteit van die waarskynlike $\mu 1C$ -translasieproduk as splytingsproduk van $\mu 1$ bevestig. Die volledige nukleotiedvolgorde van die M2-genoomsegment van reovirus tipe 3 is onlangs deur Jayasuriya et al. (1988) opgeklaar, waaruit die splytingspunt vir die omvorming van $\mu 1$ tot $\mu 1C$ geïdentifiseer is. Die splyting vind plaas tussen 'n asparagien-prolienpaar, wat 'n ongewone setel is vir die meeste gekarakteriseerde proteases. Toekomstige studies

behoort verdere lig te werp op die meganisme van hierdie proteolitiese splyting.

Die korrekte post-translasionele modifikasie van $\mu 1$ tot $\mu 1C$ in die oösietsisteem mag verder daarop dui dat die assosiasie van $\mu 1C$ en $\sigma 3$, as deel van die morfogeneseweg van reovirus, in die ingespuite oösiete plaasvind. Die prosessering van die primêre translasieproduk $\mu 1$ tot $\mu 1C$ is deur Lee et al. (1981a) met die vorming van 'n kompleks met $\sigma 3$ gekoppel (kyk ook 2.3.3). 'n Voorwaarde vir die korrekte splyting van $\mu 1$ en assosiasie met $\sigma 3$ is die getroue translasie van die reovirus-mRNA's wat wel in die oösietsisteem moontlik blyk te wees.

6.5 EVALUERING

Uit die gegewens wat in die voorafgaande drie afdelings (6.2, 6.3 en 6.4) bespreek is, kan vervolgens 'n samevattende evaluering van die betroubaarheid van die translasie van reovirus-mRNA in die oösiete van *Xenopus laevis* gedoen word.

Die resultate wat in hierdie ondersoek verkry is, dui op die volgende:

1. Die onderlinge verhouding van die reovirustranslasieprodukte wat in die oösiete gesintetiseer is, is vergelykbaar met die translasie-effektiwiteit van reovirus-mRNA in vivo.
2. Die reovirusspesifieke translasieprodukte het immunologiese en elektroforetiese eienskappe vertoon, wat met die eienskappe van die natuurlike reovirusproteïene vergelykbaar is. Hierdie resultate gee dus 'n aanduiding van die ooreenstemmende struktuur en konformasie van die betrokke proteïene.
3. Ooreenkomste in die peptiedprofiele van die $\sigma 3$ -translasieproduk en outentieke $\sigma 3$ bevestig die korrektheid van translasie van reovirus-mRNA in die oösietsisteem.
4. Die sintese van komponente van al drie klasse reovirusproteïene en die post-translasionele modifikasie van $\mu 1$ om $\mu 1C$ te vorm, dui ook daarop dat reovirus-mRNA in 'n groot mate betroubaar en

verteenwoordigend van die in vivo-gebeure, in die oösietsisteem getransleer word.

Hierdie waarnemings dui daarop dat die oösiete van *Xenopus laevis* 'n geskikte heelselsisteem mag wees om aspekte van die molekulêre biologie van reovirus te ondersoek. Standring et al. (1986) het onlangs ook die bruikbaarheid van die oösietsisteem vir die bestudering van die samestelling van eenvoudige virale strukture voorgestel, na aanleiding van 'n ondersoek met komponente van hepatitis B virus. Die benutting van cDNA's van die individuele reovirusgene wat in geskikte uitdrukkingsvektore gekloneer is (vergelyk Atwater et al., 1987), in kombinasie met die oösietsisteem, mag die bruikbaarheid van hierdie sisteem vir die opklaring van vrae ten opsigte van byvoorbeeld reovirusmorfogenese verder vergroot.

Daar is reeds in afdeling 2.2.2 verwys na die aanwending van die rekombinante-DNA-tegnologie vir die bepaling van die nukleotiedvolgordes van reovirusgene. Onlangs is die opklaring van die nukleotiedvolgordes en die afgeleide primêre struktuur van die betrokke proteïene van die L2- en M2-genoomsegment gerapporteer (Seliger et al., 1987; Jayasuriya et al., 1988). Die beskikbaarheid van die gekloneerde reovirusgene tesame met die nukleotiedvolgordes van die gene, bied verskillende moontlikhede vir die bestudering van vrae in die reovirologie. Deur gebruik te maak van delesiemutante van die S1-geen kon Nagata et al. (1987) die funksionele domeine van die selhegtingsproteïen van reovirus ($\sigma 1$) ondersoek. Die data van hierdie groep stel eerstens voor dat die gasheerselbindingsdomein van $\sigma 1$ verskil van die heemagglutineringsdomein. Die vyf neutraliserende monoklonale anti- $\sigma 1$ -antiligggame wat ook getoets is, het epitope in die middelgebied of die C-terminale helfte van $\sigma 1$ herken. Munemitsu en Samuel (1988) het die effek van nukleotiedsubstitusies rondom die 5'-proksimale AUG-inisiasiekodon van die S1- en S4-mRNA op die effektiwiteit van translase bepaal. Hierdeur is vasgestel dat ander nukleotiede as dié op posisies -3, -2, -1 en +4 relatief tot die AUG-kodon (waar A +1 is) 'n dominerende rol speel in die bepaling van die translase-effektiwiteit van hierdie twee reovirus-mRNA's in vivo. Die selektiewe invoering van

verdere deleesies, invoegings of substitusies in die gekloneerde genoomsegmente van reovirus behoort bydraes te lewer in die opklaring van bestaande leemtes in die kennis van molekulêre reovirologie.

Die waarnemings in hierdie ondersoek dui daarop dat die oösietsisteem wel geskik is vir die betroubare translase van reovirus-mRNA. Die moontlikhede van die oösietsisteem in kombinasie met die rekombinante-DNA-tegnologie en die gekloneerde reovirusgene sal deur verdere navorsing ondersoek en ontgin moet word.

Gedeeltes van die resultate van hierdie studie is in die volgende artikel opgeneem vir publikasie:

OPPERMAN, D.P.J., VAN DER WALT, M.P.K. EN REINECKE, C.J. 1988. "Fidelity in the translation of reovirus mRNA in oocytes of *Xenopus laevis*."

Suid-Afrikaanse tydskrif vir wetenskap, 84:293-297.

(Kyk bylaag A.)

Resultate van hierdie ondersoek is ook by 'n internasionale kongres en verskeie nasionale kongresse aangebied:

1. OPPERMAN, D.P.J., VAN DER WALT, M.P.K. EN REINECKE, C.J.
"Translation of ssRNA and denatured dsRNA from reovirus."
Twaalfde Internasionale Kongres vir Biochemie: Perth, Wes-Australië (1982).
2. OPPERMAN, D.P.J., VAN DER WALT, M.P.K. EN REINECKE, C.J.
"Translation of reovirus mRNA."
Agste Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemiese Vereniging: Port Elizabeth (Julie 1984).
3. VAN DER WALT, M.P.K., OPPERMAN, D.P.J. EN REINECKE, C.J.
"The effect of double-stranded RNA on the endogenous translation activity of the oocyte of *Xenopus laevis*."
Eerste Gesamentlike Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemiese Vereniging, die Suid-Afrikaanse Genetiese Vereniging en die Suid-Afrikaanse Vereniging vir Mikrobiologie: Johannesburg (Junie 1986).

4. OPPERMAN, D.P.J., VAN DER WALT, M.P.K. EN REINECKE, C.J.
"Fidelity in the translation of reovirus mRNA in oocytes of *Xenopus laevis*."
Negende Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemiese Vereniging:
Wildernis (Maart 1988).

BIBLIOGRAFIE

- ACS, G., KLETT, H., SCHONBERG, M., CHRISTMAN, J., LEVIN, D.H. & SILVERSTEIN, S.C. 1971. Mechanism of reovirus double-stranded ribonucleic acid synthesis in vivo and in vitro. *Journal of virology*, 8:684-689.
- ANTCZAK, J.B., CHMELO, R., PICKUP, D.J. & JOKLIK, W.K. 1982. Sequences at both termini of the ten genes of reovirus serotype 3 (strain Dearing). *Virology*, 121:307-319.
- ASSELBERGS, F.A.M., VAN VEN ROOIJ, W.J. & BLOEMENDAL, H. 1978. Synthesis of lens crystallins in *Xenopus* oocytes as determined by quantitative immunoprecipitation. *European journal of biochemistry*, 87:517-524.
- ASTELL, C., SILVERTEIN, S.C., LEVIN, D.H. & ACS, G. 1972. Regulation of the reovirus RNA transcriptase by a viral capsomere protein. *Virology*, 48:648-654.
- ATWATER, J.A., MUNEMITSU, S.M. & SAMUEL, C.E. 1987. Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides: efficiency of expression of cDNAs of the reovirus S1 and S4 genes in transfected animal cells differs at the level of translation. *Virology*, 159:350-357.
- BAGLIONI, C., LENZ, J.R., MARONEY, P.A. & WEBER, L.A. 1978. Effect of double-stranded RNA associated with viral messenger RNA on in vitro protein synthesis. *Biochemistry*, 17:3257-3262.
- BANERJEE, A.K. & SHATKIN, A.J. 1970. Transcription in vitro by reovirus-associated ribonucleic acid-dependent polymerase. *Journal of Virology*, 6:1-11.
- BARIBAULT, H. & MARCEAU, N. 1986. Dexamethasone and dimethylsulfoxide as distinct regulators of growth and differentiation of

cultured suckling rat hepatocytes. *Journal of cellular physiology*, 129:77-84.

BASSEL-DUBY, R., JAYASURIYA, A., CHATTERJEE, D., SONENBERG, N., MAIZEL, J.V. Jr. & FIELDS, B.N. 1985. Sequence of reovirus haemagglutinin predicts a coiled-coil structure. *Nature (London)*, 315:421-423.

BASSEL-DUBY, R., NIBERT, M.L., HOMCY, C.J., FIELDS, B.N. & SAWUTZ, D.G. 1987. Evidence that the sigma 1 protein of reovirus serotype 3 is a multimer. *Journal of virology*, 61:1834-1841.

BELLAMY, A.R. & JOKLIK, W.K. 1967. Studies on reovirus RNA. II. Characterization of reovirus messenger RNA and of the genome RNA segments from which it is transcribed. *Journal of molecular biology*, 29:19-26.

BELLAMY, A.R., SHAPIRO, L., AUGUST, J.T. & JOKLIK, W.K. 1967. Studies on reovirus RNA. I. Characterization of reovirus genome RNA. *Journal of molecular biology*, 29:1-17.

BONNER, W.M. & LASKEY, R.A. 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *European journal of biochemistry*, 46:83-88.

BORSA, J. & GRAHAM, A.F. 1968. Reovirus: RNA polymerase activity in purified virions. *Biochemical and biophysical research communications*, 33:896-901.

BORSA, J., GROVER, J. & CHAPMAN, J.D. 1970. Presence of nucleoside triphosphate phosphohydrolase activity in purified virions of reovirus. *Journal of virology*, 6:295-300.

BORSA, J., SARGENT, M.D., LIEVAART, P.A. & COPPS, T.P. 1981. Reovirus: evidence for a second step in the intracellular uncoating and transcriptase activation process. *Virology*, 111:191-200.

- BOTH, G.W., LAVI, S. & SHATKIN, A.J. 1975. Synthesis of all the gene products of the reovirus genome in vivo and in vitro. *Cell*, 4:173-180.
- BURGE, B.W. & HUANG, A.S. 1979. Conserved polypeptides in the proteins of vesicular stomatitis virus. *Virology*, 95:445-453.
- BURSTIN, S.J., SPRIGGS, D.R. & FIELDS, B.N. 1982. Evidence for functional domains on the reovirus type 3 hemagglutinin. *Virology*, 117:146-155.
- CARTER, C.A., LIN, B.Y. & METLAY, M. 1980. Polyadenylation of reovirus proteins: analysis of the RNA bound to structural proteins. *Journal of biological chemistry*, 255:6479-6485.
- CASHDOLLAR, L.W., CHMELO, R., ESPARZA, J., HUDSON, G.R. & JOKLIK, W.K. 1984. Molecular cloning of the complete genome of reovirus serotype 3. *Virology*, 133:191-196.
- CASHDOLLAR, L.W., CHMELO, R.A., WIENER, J.R. & JOKLIK, W.K. 1985. Sequences of the S1 genes of the three serotypes of reovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 82:24-28.
- CASHDOLLAR, L.W., ESPARZA, J., HUDSON, G.R., CHMELO, R., LEE, P.W.K. & JOKLIK, W.K. 1982. Cloning the double-stranded RNA genes of reovirus: sequence of the cloned S2 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 79:7644-7648.
- CENATIEMPO, Y., TWARDOWSKI, T., SHOEMAN, R., ERNST, H., BROTH, N., WEISSBACH, H. & SHATKIN, A.J. 1984. Two initiation sites detected in the small s1 species of reovirus mRNA by dipeptide synthesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 81:1084-1088.
- CHENAIS, F., VIRELLA, G., PATRICK, C.C. & FUDENBERG, H.H. 1977. Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using

staphylococcal protein-A-sepharose as substrate. *Journal of immunological methods*, 18:183-192.

CHOUIKH, Y., VOLOVITCH, M. & YOT, P. 1979. A simple and fast electrophoretic method for elution of nucleic acids from gels. *Molecular biology reports*, 5:237-239.

CLEVELAND, D.W., FISCHER, S.G., KIRSCHNER, M.W. & LAEMMLI, U.K. 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecylsulphate and analysis by gel electrophoresis. *Journal of biological chemistry*, 252:1102-1106.

CLEVELAND, D.R., ZARBL, H. & MILLWARD, S. 1986. Reovirus guanylyltransferase is L2 gene product lambda 2. *Journal of virology*, 60:307-311.

CROSS, R.K. & FIELDS, B.N. 1972. Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: studies on the synthesis of viral RNA. *Virology*, 50:799-809.

CROSS, R.K. & FIELDS, B.N. 1976. Reovirus-specific polypeptides: analysis using discontinuous gel electrophoresis. *Journal of virology*, 19:162-173.

DAVIES, J.W. & SAMUEL, C.E. 1975. Translation of virus mRNA: comparison of reovirus and brome mosaic virus single-stranded RNAs in a wheat germ cell-free system. *Biochemical and biophysical research communications*, 65:788-796.

DE BENEDETTI, A., WILLIAMS, G.J. & BAGLIONI, C. 1985. Inhibition of binding to initiation complexes of nascent reovirus mRNA by double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Journal of virology*, 54:408-413.

DE WET, W.J. 1981. Die funksionele karakteristieke van konynretikulosiet mRNP-komplekse. Potchefstroom. 414p. (Proefskrif (D.Sc.) - PU vir CHO.)

DRAYNA, D. & FIELDS, B.N. 1982a. Activation and characterization of the reovirus transcriptase : genetic analysis. *Journal of virology*, 41:110-118.

DRAYNA, D. & FIELDS, B.N. 1982b. Genetic studies on the mechanisms of chemical and physical inactivation of reovirus. *Journal of general virology*, 63:149-159.

ERNST, H. & SHATKIN, A.J. 1985. Reovirus hemagglutinin mRNA codes for two polypeptides in overlapping reading frames. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 82:48-52.

EWING, D.D., SARGENT, M.D. & BORSA, J. 1985. Switch-on of transcriptase function in reovirus: analysis of polypeptide changes using 2-D gels. *Virology*, 144:448-456.

FIELDS, B.N. & GREENE, M.I. 1982. Genetic and molecular mechanisms of viral pathogenesis: implications for prevention and treatment. *Nature (London)*, 300:19-23.

FINBERG, R., WEINER, H.L., FIELDS, B.N., BENACERRAF, B. & BURAKOFF, S.J. 1979. Generation of cytolytic T lymphocytes after reovirus infection: role of the S1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 76:442-446.

FLOYD, R.W., STONE, M.P. & JOKLIK, W.K. 1974. Separation of single-stranded ribonucleic acids by acrylamide-agarose-urea gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 59:599-609.

FONTANA, A. & WEINER, H.L. 1980. Interaction of reovirus with cell surface receptors. II. Generation of suppressor T cells by the hemagglutinin of reovirus type 3. *Journal of immunology*, 125:2660-2665.

FURUICHI, Y., MORGAN, M., MUTHUKRISHNAN, S. & SHATKIN, A.J. 1975. Reovirus messenger RNA contains a methylated, blocked 5'-terminal

structure: $m^7G(5')ppp(5')G_m pCp-$. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 72:362-366.

FURUICHI, Y. & SHATKIN, A.J. 1977. 5'-Termini of reovirus mRNA: ability of viral cores to form caps posttranscriptionally. *Virology*, 77:566-578.

GAILLARD, R.K. Jr. & JOKLIK, W.K. 1985. The relative translation efficiencies of reovirus messenger RNAs. *Virology*, 147:336-348.

GILLIES, S., BULLIVANT, S. & BELLAMY, A.R. 1971. Viral RNA polymerases: electron microscopy of reovirus reaction cores. *Science*, 174:694-696.

GOMATOS, P.J. 1967. RNA synthesis in reovirus-infected L929 mouse fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 58:1798-1805.

GOMATOS, P.J., STAMATOS, N.M. & SARKAR, N.H. 1980. Small reovirus-specific particle with polycytidylate-dependent RNA polymerase activity. *Journal of virology*, 36:556-565.

GOMATOS, P.J. & TAMM, I. 1963. The secondary structure of reovirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 49:707-712.

GRAZIADEI, W.D. III, ROY, D., KONIGSBERG, W. & LENGYEL, P. 1973. Translation of reovirus messenger ribonucleic acids synthesized in vitro into reovirus proteins in a mouse L cell extract. *Archives of biochemistry and biophysics*, 158:266-275.

GRILL, L.K., SUN, J.D. & KANDEL, J. 1976. Effect of double stranded RNA on protein synthesis in an in vitro wheat germ embryo system. *Biochemical and biophysical research communications*, 73:149-156.

GURDON, J.B. 1968. Changes in somatic cell nuclei inserted into growing and maturing amphibian oocytes. *Journal of embryology and experimental morphology*, 20:401-414.

GURDON, J.B., LANE, C.D., WOODLAND, H.R. & MARBAIX, G. 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature (London)*, 233:177-182.

GURDON, J.B. & WICKENS, M.P. 1983. The use of *Xenopus* oocytes for the expression of cloned genes. *Methods in enzymology*, 101:370-386.

HARLAND, R. & WEINTRAUB, H. 1985. Translation of mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA. *Journal of cell biology*, 101:1094-1099.

HARVEY, J.D., BELLAMY, A.R., EARNSHAW, W.C. & SCHUTT, C. 1981. Biophysical studies of reovirus type 3. IV. Low-angle X-ray diffraction studies. *Virology*, 112:240-249.

HAY, A.J. & JOKLIK, W.K. 1971. Demonstration that the same strand of reovirus genome RNA is transcribed in vitro and in vivo. *Virology*, 44:450-453.

HAYES, E.C., LEE, P.W.K., MILLER, S.E. & JOKLIK, W.K. 1981. The interaction of a series of hybridoma IgGs with reovirus particles. Demonstration that the core protein $\lambda 2$ is exposed on the particle surface. *Virology*, 108:147-155.

HOUMARD, J. & DRAPEAU, G.R. 1972. Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 69:3506-3509.

HUISMANS, H. 1979. Protein synthesis in bluetongue virus-infected cells. *Virology*, 92:385-396.

HUISMANS, H. & JOKLIK, W.K. 1976. Reovirus-coded polypeptides in infected cells: isolation of two native monomeric polypeptides with high affinity for single-stranded and double-stranded RNA, respectively. *Virology*, 70:411-424.

HUNG, P.P. 1976. Assembly of spherical plant and bacterial viruses. *Comprehensive virology*, 6:65-102.

HUNTER, A.R., FARRELL, P.J., JACKSON, R.J. & HUNT, T. 1977. The role of polyamines in cell-free protein synthesis in the wheat-germ system. *European journal of biochemistry*, 75:149-157.

ITO, Y. & JOKLIK, W.K. 1972. Temperature-sensitive mutants of reovirus. I. Patterns of gene expression by mutants of groups C, D and E. *Virology*, 50:189-201.

JACOBS, B.L. & SAMUEL, C.E. 1985. Biosynthesis of reovirus- specified polypeptides: the reovirus s1 mRNA encodes two primary translation products. *Virology*, 143:63-74.

JAYASURIYA, A.K., NIBERT, M.L. & FIELDS, B.N. 1988. Complete nucleotide sequence of the M2 segment of reovirus type 3 Dearing and analysis of its protein product $\mu 1$. *Virology*, 163:591-602.

JOKLIK, W.K. 1972. Studies on the effect of chymotrypsin on reovirions. *Virology*, 49:700-715.

JOKLIK, W.K. 1974. Reproduction of Reoviridae. *Comprehensive virology*, 2:231-334.

JOKLIK, W.K. 1981. Structure and function of the reovirus genome. *Microbiological reviews*, 45:483-501.

JOKLIK, W.K. 1983. The reovirus particle. (In Joklik, W.K., red. *The Reoviridae*. New York: Plenum Press. p.9-78.)

JOKLIK, W.K. 1985. Recent progress in reovirus research. *Annual review of genetics*, 19:537-575.

KAPULER, A.M. 1970. An extraordinary temperature dependence of the reovirus transcriptase. *Biochemistry*, 9:4453-4457.

KAPULER, A.M., MENDELSON, N., KLETT, H. & ACS, G. 1970. Four base-specific 5'-triphosphatases in the subviral core of reovirus. *Nature (London)*, 225:1209-1211.

KAVENOFF, R., TALCOVE, D. & MUDD, J.A. 1975. Genome-sized RNA from reovirus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 72:4317-4321.

KOZAK, M. 1977. Nucleotide sequences of 5'-terminal ribosome-protected initiation regions from two reovirus messages. *Nature (London)*, 269:390-394.

KOZAK, M. 1980. Influence of mRNA secondary structure on binding and migration of 40S ribosomal subunits. *Cell*, 19:79-90.

KOZAK, M. 1981. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic acids research*, 9:5233-5252.

KOZAK, M. 1982a. Analysis of ribosome binding sites from the s1 message of reovirus. Initiation at the first and second AUG codons. *Journal of molecular biology*, 156:807-820.

KOZAK, M. 1982b. Sequences of ribosome binding sites from the large size class of reovirus mRNA. *Journal of virology*, 42:467-473.

KOZAK, M. & SHATKIN, A.J. 1977a. Sequences and properties of two ribosome binding sites from the small size class of reovirus messenger RNA. *Journal of biological chemistry*, 252:6895-6908.

KOZAK, M. & SHATKIN, A.J. 1977b. Sequences of two 5'-terminal ribosome-protected fragments from reovirus messenger RNAs. *Journal of molecular biology*, 112:75-96.

KOZAK, M. & SHATKIN, A.J. 1978. Identification of features in 5'-terminal fragments from reovirus mRNA which are important for ribosome binding. *Cell*, 13:201-212.

KRYSTAL, G., PERRAULT, J. & GRAHAM, A.F. 1976. Evidence for a glycoprotein in reovirus. *Virology*, 72:308-321.

KRYSTAL, G., WINN, P., MILLWARD, S. & SAKUMA, S. 1975. Evidence for phosphoproteins in reovirus. *Virology*, 64:505-512.

KRYSTOSEK, A., CAWTHON, M.L. & KAVAT, D. 1975. Improved methods for purification and assay of eukaryotic messenger ribonucleic acids and ribosomes: quantitative analysis of their interaction in a fractionated reticulocyte cell-free system. *Journal of biological chemistry*, 250:6077-6084.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

LANE, C.D. 1983. The fate of genes, messengers and proteins introduced into *Xenopus* oocytes. *Current topics in developmental biology*, 18:89-116.

LANE, C.D., MARBAIX, G. & GURDON, J.B. 1971. Rabbit haemoglobin synthesis in frog cells: the translation of reticulocyte 9s RNA in frog oocytes. *Journal of molecular biology*, 61:73-91.

LANGONE, J.J. 1982. Applications of immobilized protein A in immunochemical techniques. *Journal of immunological methods*, 55:277-296.

LAU, R.Y., VAN ALSTYNE, D., BERCKMANS, R. & GRAHAM, A.F. 1975. Synthesis of reovirus-specific polypeptides in cells pretreated with cycloheximide. *Journal of virology*, 16:470-478.

LAWSON, T.G., RAY, B.K., DODDS, J.T., GRIFO, J.A., ABRAMSON, R.D., MERRICK, W.C., BETSCH, D.F., WEITH, H.L. & THACH, R.E. 1986. Influence of 5'proximal secondary structure on the translational efficiency of eukaryotic mRNAs and on their interaction with initiation factors. *Journal of biological chemistry*, 261:13979-13989.

LEE, K.A.W., GUERTIN, D. & SONENBERG, N. 1983. mRNA secondary structure as a determinant in cap recognition and initiation complex formation. *Journal of biological chemistry*, 258:707-710.

LEE, P.W.K., HAYES, E.C. & JOKLIK, W.K. 1981a. Characterization of anti-reovirus immunoglobulins secreted by cloned hybridoma cell lines. *Virology*, 108:134-146.

LEE, P.W.K., HAYES, E.C. & JOKLIK, W.K. 1981b. Protein σ -1 is the reovirus cell attachment protein. *Virology*, 108:156-163.

LEMIEUX, R., LEMAY, G. & MILLWARD, S. 1987. The viral protein sigma 3 participates in translation of late viral mRNA in reovirus-infected L cells. *Journal of virology*, 61:2472-2479.

LEVIN, D.H., Mendelsohn, N., SCHONBERG, M., KLETT, H., SILVERSTEIN, S., KAPULER, A.M. & ACS, G. 1970. Properties of RNA transcriptase in reovirus subviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 66:890-897.

LEVIN, K.H. & SAMUEL, C.E. 1977. Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides: effect of methylation on the efficiency of reovirus genome expression in vitro. *Virology*, 77:245-259.

LEVIN, K.H. & SAMUEL, C.E. 1980. Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides. Purification and characterization of the small-sized class mRNAs of reovirus type 3: coding assignments and translational efficiencies. *Virology*, 106:1-13.

LI, J.K.-K., SCHEIBLE, P.P., KEENE, J.D. & JOKLIK, W.K. 1980. The plus strands of reovirus gene S2 are identical with its in vitro transcripts. *Virology*, 105:282-286.

LOENING, U.E. 1969. The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis: the effects of changes in conformation. *Biochemical journal*, 113:131-138.

LOH, P.C. & SHATKIN, A.J. 1968. Structural proteins of reovirus. *Journal of virology*, 2:1353-1359.

McCRAE, M.A. 1985. Double-stranded RNA viruses. (In Mahy, B.W.J., red. *Virology: a practical approach*. Oxford: IRL Press. p.151-168.)

McCRAE, M.A. & JOKLIK, W.K. 1978. The nature of the polypeptide encoded by each of the double-stranded RNA segments of reovirus type 3. *Virology*, 89:578-593.

McCRAE, M.A. & WOODLAND, H.R. 1981. Stability of non-polyadenylated viral mRNAs injected into frog oocytes. *European journal of biochemistry*, 116:467-470.

McDOWELL, M.J., JOKLIK, W.K., VILLA-KOMAROFF, L. & LODISH, H.F. 1972. Translation of reovirus messenger RNAs synthesized in vitro into reovirus polypeptides by several mammalian cell-free extracts. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 69:2649-2653.

McLACHLAN, A.D. & STEWART, M. 1975. Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure. *Journal of molecular biology*, 98:293-304.

MASRI, S.A., NAGATA, L., MAH, D.C.W. & LEE, P.W.K. 1986. Functional expression in *Escherichia coli* of cloned reovirus S1 gene encoding the viral cell attachment protein $\sigma 1$. *Virology*, 149:83-90.

- MATHEWS, M.B. & OSBORN, M. 1974. The rate of polypeptide chain elongation in a cell-free system from Krebs II ascites cells. *Biochimica et biophysica acta*, 340:147-152.
- MILLWARD, S. & GRAHAM, A.F. 1970. Structural studies on reovirus: discontinuities in the genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 65:422-426.
- MIYAMOTO, N.G., JACOBS, B.L. & SAMUEL, C.E. 1983. Mechanism of interferon action: effect of double-stranded RNA and the 5'-O-monophosphate form of 2', 5'-oligoadenylate on the inhibition of reovirus mRNA translation in vitro. *Journal of biological chemistry*, 258:15232-15237.
- MOAR, V.A., GURDON, J.B., LANE, C.D. & MARBAIX, G. 1971. Translational capacity of living frog eggs and oocytes, as judged by messenger RNA injection. *Journal of molecular biology*, 61:93-103.
- MOLDAVE, K. 1985. Eukaryotic protein synthesis. *Annual review of biochemistry*, 54:1109-1149.
- MORGAN, E.M. & KINGSBURY, D.W. 1980. Pyridoxal phosphate as a probe of reovirus transcriptase. *Biochemistry*, 19:484-489.
- MORGAN, E.M. & ZWEERINK, H.J. 1974. Reovirus morphogenesis. Core-like particles in cells infected at 39° with wild-type reovirus and temperature-sensitive mutants in groups B and G. *Virology*, 59:556-565.
- MORGAN, E.M. & ZWEERINK, H.J. 1975. Characterization of transcriptase and replicase particles isolated from reovirus-infected cells. *Virology*, 68:455-466.
- MOUS, J., PEETERS, B. & ROMBAUTS, W. 1977. Synthesis of rat prostatic binding protein in *Xenopus* oocytes and wheat germ. *Biochemical and biophysical research communications*, 79:1111-1116.

MUNEMITSU, S.M. & SAMUEL, C.E. 1988. Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides: effect of point mutation of the sequences flanking the 5'-proximal AUG initiator codons of the reovirus S1 and S4 genes on the efficiency of mRNA translation. *Virology*, 163:643-646.

MUSTOE, T.A., RAMIG, R.F., SHARPE, A.H. & FIELDS, B.N. 1978. A genetic map of reovirus. III. Assignment of the double-stranded RNA positive mutant groups A, B and G to genome segments. *Virology*, 85:545-556.

NAGATA, L., MASRI, S.A., MAH, D.C.W. & LEE, P.W.K. 1984. Molecular cloning and sequencing of the reovirus (serotype 3) S1 gene which encodes the viral cell attachment protein $\sigma 1$. *Nucleic acids research*, 12:8699-8710.

NAGATA, L., MASRI, S.A., PON, R.T. & LEE, P.W.K. 1987. Analysis of functional domains on reovirus cell attachment protein $\sigma 1$ using cloned S1 gene deletion mutants. *Virology*, 160:162-168.

NICHOLS, J.L., HAY, A.J. & JOKLIK, W.K. 1972. 5'-Terminal nucleotide sequence of reovirus mRNA synthesized in vitro. *Nature: new biology* (London), 235:105-107.

NICKOL, J.M., LEE, K.-L., HOLLINGER, T.G. & KENNEY, F.T. 1976. Translation of messenger RNA specific for tyrosine aminotransferase in oocytes of *Xenopus laevis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 72:687-693.

NONOYAMA, M., MILLWARD, S. & GRAHAM, A.F. 1974. Control of transcription of the reovirus genome. *Nucleic acids research*, 1:373-385.

ODA, K.I. & JOKLIK, W.K. 1967. Hybridization and sedimentation studies on "early" and "late" vaccinia messenger RNA. *Journal of molecular biology*, 27:395-420.

PAIN, V.M. 1986. Initiation of protein synthesis in mammalian cells. *Biochemical journal*, 235:625-637.

PAUL, R.W. & LEE, P.W.K. 1987. Glycophorin is the reovirus receptor on human erythrocytes. *Virology*, 159:94-101.

POWELL, K.F.H., HARVEY, J.D. & BELLAMY, A.R. 1984. Reovirus RNA transcriptase: evidence for a conformational change during activation of the core particle. *Virology*, 137:1-8.

RALPH, S.J., HARVEY, J.D. & BELLAMY, A.R. 1980. Subunit structure of the reovirus spike. *Journal of virology*, 36:894-896.

RAPOPORT, T.A., THIELE, B.J., PREHN, S., MARBAIX, G., CLEUTER, Y., HUBERT, E. & HUEZ, G. 1978. Synthesis of carp proinsulin in *Xenopus* oocytes. *European journal of biochemistry*, 87:229-233.

RICHARDS, K.E. & WILLIAMS, R.C. 1976. Assembly of tobacco mosaic virus in vitro. *Comprehensive virology*, 6:1- 37.

ROBERTS, B.E. & PATERSON, B.M. 1973. Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 70:2330-2334.

RONER, M.R. & COX, D.C. 1985. Cellular integrity is required for inhibition of initiation of cellular DNA synthesis by reovirus type 3. *Journal of virology*, 53:350-359.

ROSEN, L. 1960. Serologic grouping of reoviruses by hemagglutination-inhibition. *American journal of hygiene*, 71:242-249.

SCHERRER, K., IMAIZUMI-SCHERRER, M.T., REYNAND, C.A. & THERMATH, A. 1979. On pre-messenger RNA and transcriptions: a review. *Molecular biology reports*, 5:5-28.

SCHUERCH, A.R. & JOKLIK, W.K. 1973. Temperature-sensitive mutants of reovirus. IV. Evidence that anomalous electrophoretic migration behavior of certain double-stranded RNA hybrid species is mutant group-specific. *Virology*, 56:218-229.

SCHUERCH, A.R., MITCHELL, W.R. & JOKLIK, W.K. 1975. Isolation of intact individual species of single- and double-stranded RNA after fractionation by polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 65:331-345.

SELIGER, L.S., ZHENG, K. & SHATKIN, A.J. 1987. Complete nucleotide sequence of reovirus L2 gene and deduced amino acid sequence of viral mRNA guanylyltransferase. *Journal of biological chemistry*, 262:16289-16293.

SHAPIRO, A.L., VINUELA, E. & MAIZEL, J.V. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and biophysical research communications*, 28:815-820.

SHARPE, A.H., CHEN, L.B. & FIELDS, B.N. 1982. The interaction of mammalian reoviruses with the cytoskeleton of monkey kidney CV1 cells. *Virology*, 120:399-411.

SHARPE, A.H. & FIELDS, B.N. 1981. Reovirus inhibition of cellular DNA synthesis: role of the S1 gene. *Journal of virology*, 38:389-392.

SHARPE, A.H. & FIELDS, B.N. 1982. Reovirus inhibition of cellular RNA and protein synthesis: role of the S4 gene. *Virology*, 122:381-391.

SHARPE, A.H. & FIELDS, B.N. 1983. Pathogenesis of reovirus infection. (In Joklik, W.K., red. *The Reoviridae*. New York: Plenum Press. p.229-285.)

SHATKIN, A.J. 1965. Inactivity of purified reovirus RNA as a template for *E. coli* polymerase in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 54:1721-1726.

SHATKIN, A.J. 1974. Methylated messenger RNA synthesis in vitro by purified reovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 71:3204-3207.

SHATKIN, A.J. & KOZAK, M. 1983. Biochemical aspects of reovirus transcription and translation. (In Joklik, W.K., red. *The Reoviridae*. New York: Plenum Press. p.79-106.)

SHATKIN, A.J. & RADA, B. 1967. Reovirus-directed ribonucleic acid synthesis in infected L cells. *Journal of virology*, 1:24-35.

SHATKIN, A.J. & SIPE, J.D. 1968. RNA polymerase activity in purified reoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 61:1462-1469.

SHATKIN, A.J., SIPE, J.D. & LOH, P.C. 1968. Separation of ten reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of virology*, 2:986-991.

SHIH, D.S. & KAESBERG, P. 1973. Translation of brome mosaic viral ribonucleic acid in a cell-free system derived from wheat embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 70:1799-1803.

SILVERSTEIN, S.C., ASTELL, C., CHRISTMAN, J., KLETT, H. & ACS, G. 1974. Synthesis of reovirus oligo adenylic acid in vivo and in vitro. *Journal of virology*, 13:740-752.

SILVERSTEIN, S.C., ASTELL, C., LEVIN, D.H., SCHONBERG, M. & ACS, G. 1972. The mechanism of reovirus uncoating and gene activation in vivo. *Virology*, 47:797-806.

SKEHEL, J.J. & JOKLIK, W.K. 1969. Studies on the in vitro transcription of reovirus RNA catalyzed by reovirus cores. *Virology*, 39:822-831.

SKUP, D. & MILWARD, S. 1980. mRNA capping enzymes are masked in reovirus progeny subviral particles. *Journal of virology*, 34:490-496.

- SKUP, D., ZARBL, H. & MILLWARD, S. 1981. Regulation of translation in L-cells infected with reovirus. *Journal of molecular biology*, 151:35-55.
- SMITH, R.E., ZWEERINK, H.J. & JOKLIK, W.K. 1969. Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3. *Virology*, 39:791-810.
- SPANDIDOS, D.A., KRYSTAL, G. & GRAHAM, A.F. 1976. Regulated transcription of the genomes of defective virions and temperature-sensitive mutants of reovirus. *Journal of virology*, 18:7-19.
- SPENDLOVE, R.S., McCLAIN, M.E. & LENNETTE, E.H. 1970. Enhancement of reovirus infectivity by extracellular removal or alteration of the viral capsid by proteolytic enzymes. *Journal of general virology*, 8:83-93.
- STAMATOS, N.M. & GOMATOS, P.J. 1982. Binding to selected regions of reovirus mRNAs by a nonstructural reovirus protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 70:3457-3461.
- STANDRING, D.N., OU, J. & RUTTER, W.J. 1986. Assembly of viral particles in *Xenopus* oocytes: presurface-antigens regulate secretion of the hepatitis B viral surface envelope particle. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 83:9338-9342.
- STOLTZFUS, C.M., MORGAN, M., BANERJEE, A.K. & SHATKIN, A.J. 1974. Poly (A) polymerase activity in reovirus. *Journal of virology*, 13:1338-1345.
- STONE, K.R., SMITH, R.E. & JOKLIK, W.K. 1974. Changes in membrane polypeptides that occur when chick embryo fibroblasts and NRK cells are transformed with avian sarcoma viruses. *Virology*, 58:86-100.
- VAN DER WALT, M.P.K. 1978. *Xenopus laevis* oösite as translasiesistiem vir reovirus-mRNA. Potchefstroom. 146p. (Verhandeling (M.Sc.) - PU vir CHO.)

VAN DIJK, A.A. 1985. The in vitro transcription and translation of bluetongue virus mRNA. Potchefstroom. 155p. (Proefskrif (D.Sc.) - PU vir CHO.)

VERWOERD, D.W. & HUISMANS, H. 1969. On the relationship between bluetongue, African horsesickness and reovirus: hybridization studies. Onderstepoort journal of veterinary research, 36:175-180.

VERWOERD, D.W., OELLERMANN, R.A., BROEKMAN, J. & WEISS, K.E. 1967. The serological relationship of South African bovine enterovirus strains (Ecbo SA-I and II) and the growth characteristics in cell culture of the prototype strain (Ecbo SA-I). Onderstepoort journal of veterinary research, 34:41-52.

WATANABE, Y. & GRAHAM, A.F. 1967. Structural units of reovirus ribonucleic acid and their possible functional significance. Journal of virology, 1:665-677.

WATANABE, Y., PREVEC, L. & GRAHAM, A.F. 1967. Specificity in transcription of the reovirus genome. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 58:1040-1047.

WEBER, L.A., HICKEY, E.D., MARONEY, P.A. & BAGLIONI, C. 1977a. Inhibition of protein synthesis by Cl^- . Journal of biological chemistry, 252:4007-4010.

WEBER, L.A., HICKEY, E.D., NUSS, D.L. & BAGLIONI, C. 1977b. 5'-Terminal 7-methylguanosine and mRNA function: influence of potassium concentration on translation in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 74:3254-3258.

WEINER, H.L., DRAYNA, D., AVERILL, D.R. Jr. & FIELDS, B.N. 1977. Molecular basis of reovirus virulence: role of the S1 gene. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 74:5744-5747.

WEINER, H.L. & FIELDS, B.N. 1977. Neutralization of reovirus: the gene responsible for the neutralization antigen. *Journal of experimental medicine*, 146:1305-1310.

WEINER, H.L., RAMIG, R.F., MUSTOE, T.A. & FIELDS, B.N. 1978. Identification of the gene coding for the hemagglutinin of reovirus. *Virology*, 86:581-584.

WHITE, C.K. & ZWEERINK, H.J. 1976. Studies on the structure of reovirus cores: selective removal of polypeptide $\lambda 2$. *Virology*, 70:171-180.

WIENAND, U., SCHWARZ, Z. & FEIX, G. 1979. Electrophoretic elution of nucleic acids from gels adapted for subsequent biological tests. *Febs letters*, 98:319-323.

YAMAKAWA, M., FURUICHI, Y., NAKASHIMA, K., LaFIANDRA, A.J. & SHATKIN, A.J. 1981. Excess synthesis of viral mRNA 5'-terminal oligonucleotides by reovirus transcriptase. *Journal of biological chemistry*, 256:6507-6514.

YAMAKAWA, M., FURUICHI, Y. & SHATKIN, A.J. 1982. Reovirus transcriptase and capping enzymes are active in intact virions. *Virology*, 118:157-168.

ZARBL, H., HASTINGS, K.E.M. & MILLWARD, S. 1980a. Reovirus core particles synthesize capped oligonucleotides as a result of abortive transcription. *Archives of biochemistry and biophysics*, 202:348-360.

ZARBL, H. & MILLWARD, S. 1983. The reovirus multiplication cycle. (In Joklik, W.K., red. *The Reoviridae*. New York: Plenum Press. p.107-196.)

ZARBL, H., SKUP, D. & MILLWARD, S. 1980b. Reovirus progeny subviral particles synthesize uncapped mRNA. *Journal of virology*, 34:497-505.

ZWEERINK, H.J. 1974. Multiple forms of SS + DS RNA polymerase activity in reovirus-infected cells. *Nature (London)*, 247:313-315.

ZWEERINK, H.J., ITO, Y. & MATSUHISA, T. 1972. Synthesis of reovirus double-stranded RNA within virion-like particles. *Virology*, 50:349-358.

ZWEERINK, H.J. & JOKLIK, W.K. 1970. Studies on the intracellular synthesis of reovirus-specified proteins. *Virology*, 41:501-518.

ZWEERINK, H.J., MORGAN, E.M. & SKYLER, J.S. 1976. Reovirus morphogenesis: characterization of subviral particles in infected cells. *Virology*, 73:442-453.

BYLAAG A

Fidelity in the translation of reovirus mRNA in oocytes of *Xenopus laevis*

D.P.J. Opperman, M.P.K. van der Walt and C.J. Reinecke

Department of Biochemistry, Potchefstroom University for C.H.E., Potchefstroom 2520, South Africa.

The translation products formed from reovirus mRNA micro-injected into oocytes of Xenopus laevis were compared with authentic reovirus proteins by polyacrylamide gel electrophoresis, immunoprecipitation, isolation of immune complexes by affinity chromatography and peptide mapping using proteolytic digestion with Staphylococcus aureus V8 protease. Products from the s-, m- and l-class mRNAs were detectable in quantities comparable to those synthesized in vivo, confirming that the differences in the translational efficiencies in the oocyte system resemble those found in vivo. Protein μ 1C was formed in the oocytes by post-translational cleavage of its precursor, protein μ 1. The V8 protease peptide profile of the translation product with the same electrophoretic mobility as protein, α 3, is identical to that of the authentic reovirus protein. All these observations indicate a high degree of fidelity in the translation of reovirus mRNA in the oocyte system. The fidelity in translation, ratios of the various translation products, as well as post-translational modification suggest that the oocyte system might provide a means for studying the mechanism of reovirus morphogenesis.

Die translasiëprodukte gevorm in oösiëte van Xenopus laevis na mikro-inspuiting met reovirus-mRNA is vergelyk met die natuurlike reovirusproteïene. Hiervoor is elektroforese in poliakrielamied, immunopresipitasie, die vorming van immuunkomplekse tydens affiniteitschromatografie, en peptiedkartering ná proteolitiese afbreking met 'n protease van Staphylococcus aureus nagegaan. Die aard van en die hoeveelheid translasiëprodukte van sowel die s-, m- en l-klas mRNA was vergelykbaar met die produkte wat in vivo waargeneem word, wat aantoon dat die verskil in translasië-effektieweities van die verskillende mRNA-tipes ook by die oösiëte geld. Proteïen μ 1C is in die oösiëte gevorm na post-translasionele splitsing van sy voorloper, proteïen μ 1. Na proteolitiese afbreking van die translasiëproduk met dieselfde elektroforetiese mobiliteit as proteïen α 3 word 'n peptiedpatroon verkry wat identies is aan die patroon van die ooreenstemmende natuurlike virusproteïen. Uit hierdie waarnemings volg dat die oösiëstelsiem by uitnemendheid vir die betroubare translasië van reovirus-mRNA geskik is. Die betroubaarheid van translasië, die onderlinge verhoudinge van translasiëprodukte en die post-translasionele modifikasie dui daarop dat die oösië 'n geskikte stelsiem kan wees om die meganisme van reovirusmorfogenese na te gaan.

The oocyte (egg precursor) of *Xenopus laevis*, the South African clawed frog (family, Pipidae; subfamily, Xenopinae), is a giant single cell over 1 mm in diameter, some 10 000 times larger than a single frog liver cell. Numerous studies have shown that the oocytes are well suited for cell biological and molecular biological investigations. Micro-injection of mRNA into oocytes proved to be a generally useful experimental means for studying the translation of different kinds of mRNA.^{1,2} This procedure has the unique advantage that the translation of the genetic message, post-translational modification of the protein product(s), as well as control of the translational process can be studied directly under *in vivo* conditions. The possible functional significance of the 3'-poly(A) segment of mRNAs and its controlling influence on mRNA stability has been studied for a number of mRNAs in the frog oocyte system. Marbaix and co-workers³ have shown that the absence of the 3'-poly(A) segment in globin mRNA accelerates its degradation in *Xenopus* oocytes. Native 3'-poly(A)-containing mRNA species were almost completely preserved 56 h after injection, whereas about 85% of the 3'-poly(A)-free mRNA molecules were degraded during the same period of time. Histone mRNAs, which normally lack the 3'-poly(A) segments *in vivo*, have the very short half-life of 3–4 h when injected into oocytes.⁴ These observations lead to the hypothesis that polyadenylation is a prerequisite for mRNA stability. However, against this hypothesis is the observation that oocytes contain large reserves of 3'-poly(A)-free mRNA, which must be very stable to be able to accumulate.⁵ Moreover, reovirus mRNAs, which is another class of mRNA normally lacking 3'-poly(A) segments *in vivo*, show a half-life of about 18 h in oocytes,⁶ placing their stability as intermediate between stable and unstable mRNAs. It was subsequently suggested⁷ that some reovirus mRNAs were translated much more efficiently than others, indeed that the products of some reovirus mRNAs were not detectable in the oocytes. This suggestion is based on a comparative electrophoretic investigation of polypeptides formed in uninjected oocytes and those formed in oocytes micro-injected with reovirus mRNA.⁷ It is still unknown, however, to what extent the translation products, formed in oocytes injected with reovirus mRNAs, show structural features similar to those of the authentic reovirus proteins.⁸ This aspect is crucial, since for reliable conclusions on mRNA stability and control of translation, fidelity in translation is a necessary prerequisite. In this communication we present results on the translation products formed after micro-injection of the ten reovirus mRNAs into oocytes. Immunological, physico-chemical and structural aspects of some of the translation products were studied to determine fidelity in the transla-

tion of at least some of the reovirus mRNAs. The results presented here indicate that at least some of the reovirus proteins synthesized in the oocytes have structural and conformational features that resemble those of the native authentic structural proteins of reovirus. These observations suggest that the translation of reovirus mRNA in the oocyte can be a model system of choice for studying the widely different translational efficiencies observed for these molecules, despite their common high stability.

Methods

Preparation of reovirus mRNA

The Dearing strain of reovirus type 3 was isolated from cultures of mouse L fibroblasts as described by Smith and co-workers,⁸ and the reovirus mRNA was synthesized *in vitro*, using purified virus.⁹ The viral transcriptase was activated by treating the purified virus with chymotrypsin in a reaction mixture containing 70 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 7.5 mM magnesium acetate, 5 μ g creatine kinase ml^{-1} , 8 mM creatine phosphate, 0.5 mg bentonite ml^{-1} , 2 mM ATP, 2 mM CTP, 2 mM UTP, 200 μ g chymotrypsin ml^{-1} and 400 μ g purified reovirus ml^{-1} . The incubation mixture was supplemented with 0.1 mM S-adenosyl methionine.¹⁰ After incubation at 45°C the viral cores were sedimented by centrifugation at 30 000 $\times$ g. The supernatant fraction was extracted with an equal volume of water-saturated phenol and the aqueous layer passed through Sephadex G-50 (fine). The mRNA was recovered from the void volume by ethanol precipitation, separated from double-stranded RNA by precipitation with lithium chloride and stored at -20°C at a concentration of 800 μ g RNA per ml distilled water. The *in vitro* synthesized mRNA was characterized by electrophoresis in acrylamide-agarose gels containing urea.¹¹

Preparation of reovirus labelled with [³⁵S]methionine

Confluent monolayers of L cells were infected with reovirus at a multiplicity of about 5 plaque-forming units per cell and incubated with modified Eagle's medium supplemented with 5% bovine serum¹² at 31°C. After 16 h the cells were washed with methionine-free medium. Methionine-free Eagle's medium, supplemented with 6 μ Ci [³⁵S]methionine, was subsequently added to the cells. The cells were incubated for 20 h after which normal medium was added and incubation continued for a further 12 h. The reovirus was purified from these cells as previously described.⁸

Translation of reovirus mRNA in the cell-free system of wheat germ

Reovirus mRNA was translated in a wheat germ system prepared essentially as described by Roberts and Paterson.¹³ The reaction mixture contained 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM ATP, 0.2 mM GTP, 10 mM creatine phosphate, 16 μ g creatine kinase ml^{-1} , 2.4 mM 2-mercaptoethanol, 120 mM potassium acetate, 3.2 mM magnesium acetate, 100 μ Ci [³⁵S]methionine and 50 μ l of the wheat germ extract. The final volume of the reaction mixture was 250 μ l. Translation of reovirus mRNA was achieved by incubation at 29°C for 60 min. The ³⁵S-labelled translation products were analysed by means of SDS-polyacrylamide gels containing phosphate buffer, followed by autoradiography.¹⁴

Translation of reovirus mRNA in oocytes

Oocytes of *Xenopus laevis* were each injected with 50 nl of reovirus mRNA (800 μ g ml^{-1}). Batches of 40 oocytes were incubated at 20°C for 24 h in 150 μ l modified Barth's medium¹⁵ supplemented with 100 μ Ci [³⁵S]methionine per ml. After incubation, the oocytes were homogenized in a medium as described by Asselbergs and co-workers,¹⁶ the homogenates were centrifuged at 60 000 $\times$ g for 60 min at 4°C and the supernatant stored at 4°C for no longer than 24 h before analysis.

Isolation of reovirus translation products by protein A-affinity chromatography

Reovirus proteins synthesized in the oocytes were isolated as immune complexes by affinity chromatography on staphylococcal protein A-Sepharose.¹⁷ Antiserum against reovirus proteins was prepared as follows: one mg purified reovirus in 1.5 ml 2 mM Tris-HCl (pH 7.4) was mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant and injected subcutaneously into a rabbit. This treatment was repeated after 7 days. Two weeks later the rabbit was injected with the reovirus preparation without any adjuvant. A week later the animal was bled and antiserum prepared. For affinity chromatography protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals) was used as stationary phase. The gel was poured into a column with a total volume of 0.5 ml, and washed extensively with phosphate-buffered saline (0.89% NaCl in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.2). A sample of 20 μ l antiserum against reovirus was applied on the column to allow the IgG antibodies to interact with protein A. Other serum proteins were eluted with phosphate-buffered saline until the optical density at 280 nm was less than 0.1. Oocyte supernatant was subsequently applied on the column and the unbound proteins again eluted with phosphate-buffered saline until the optical density at 280 nm was approximately 0.05. The antigen-antibody complex was then eluted with 1 M acetic acid. This eluted fraction was dialysed immediately against phosphate-buffered saline and the proteins later concentrated by precipitation in four volumes of acetone at -20°C. The precipitate was isolated by centrifugation and analysed by polyacrylamide gel electrophoresis, using ³⁵S-labelled reovirus proteins as standards.

An alternative isolation procedure was also used to confirm results obtained on the nature of the reovirus translation products synthesized in the oocytes. This alternative procedure involved the indirect immunoprecipitation of the viral products with the antiserum against reovirus and goat antiserum against rabbit IgG, essentially as described by Rapoport and co-workers.¹⁸

Peptide mapping

Peptide mapping of authentic ³⁵S-labelled σ 3 reovirus protein and translation products, synthesized in oocytes and the wheat germ system, that showed the same electrophoretic mobility as the σ 3 protein, was performed essentially according to the modified method of Cleveland and co-workers.^{19,20} The ³⁵S-labelled material was located on the dried gel by means of autoradiography and excised. After removal of the filter paper backing, four rectangular protein-containing fragments (0.5 cm $\times$ 0.3 cm) were inserted in the sample wells of a 15% Laemmli slab gel.²¹ As far as possible, fragments containing similar amounts of radioactivity, as judged by the intensity of the bands on the autoradiograms, were used for comparative purposes. The gel fragments were overlaid with 20% glycerol in stacking gel buffer (0.1% SDS; 0.001 M EDTA; 0.003% bromophenolblue; 0.125 M Tris-HCl at pH 6.8). A 10 μ l volume of 10% glycerol in stacking gel buffer, containing either 0, 25, 500 or 2500 ng *Staphylococcus aureus* V8 protease, was layered over the 20% glycerol buffer. An electrical current was applied immediately and the voltage adjusted to 150 V. When the tracking dye had moved 0.3 cm into the stacking gel, the current was turned off for 30 min to allow digestion. After the digestion period the current was reapplied and the voltage adjusted to 200 V. Electrophoresis was continued until the bromophenolblue marker had moved to the bottom of the resolving gel. The peptides were visualised according to standard autoradiographical methods.

Results and discussion

The transcriptase contained in reovirus particles was used to synthesize viral mRNA as described under Methods. The complete *in vitro* transcripts of the viral genome were separated by

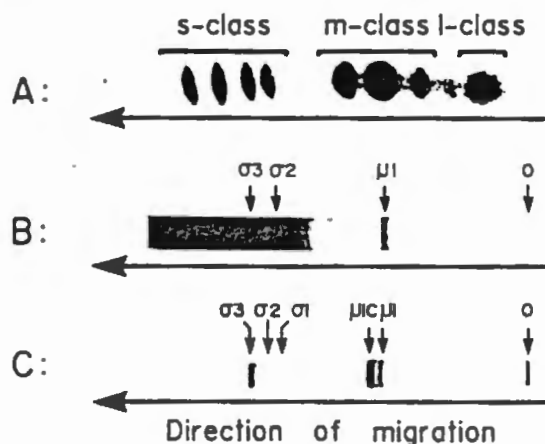


Fig. 1. Electrophoretic separation of reovirus transcription and translation products. *a*, Analysis of *in vitro* synthesized reovirus mRNA on acrylamide-agarose and detection by treatment with methylene blue. Analysis of reovirus translation products on SDS-PAGE, as synthesized in (*b*) the wheat germ system and (*c*) oocytes of *Xenopus laevis*. The latter translation products were isolated by indirect immunoprecipitation prior to gel electrophoresis. Detection of the translation products was performed by autoradiography. α : origin of electrophoresis.

acrylamide-agarose gel electrophoresis as shown in Fig. 1*a* into the large (l: $1.2-1.4 \times 10^6$ daltons), medium (m: $0.6-0.8 \times 10^6$ daltons) and small (s: $0.3-0.4 \times 10^6$ daltons) size classes of viral mRNA, which code for the λ , μ and σ classes of proteins, respectively.⁸

In order to study the fidelity of the translation of reovirus mRNA in the oocyte system, we had to compare this synthesis with results obtained in the well-described wheat germ system. When the total mixture of mRNA species was added to cell-free extracts of wheat germ and treated as described under Methods, incorporation of amino acids into polypeptide products proceeded at a linear rate for a period of 60 min. Maximum stimulation of the wheat germ extracts, programmed with the *in vitro* synthesized reovirus mRNA, occurred at potassium and magnesium acetate concentrations of 120 mM and 3.2 mM, respectively. Virtually no endogenous polypeptides were formed in wheat germ extracts not supplemented with reovirus mRNA. Polyacrylamide gel analysis of polypeptides synthesized in the presence of reovirus mRNA in the wheat germ system is shown in Fig. 1*b*. The dominant *in vitro* synthesized polypeptides that co-migrated with the authentic reovirus proteins were two σ polypeptides ($\sigma 2$ and $\sigma 3$) and one μ polypeptide ($\mu 1$). Over-exposure of the gel indicated that some other reovirus polypeptides were apparently present also at extremely low levels. Under the conditions used for the *in vitro* translation of the reovirus mRNAs, the synthesis of λ proteins was clearly inefficient. This is known to be a general phenomenon for the translation of l class reovirus mRNAs and can be overcome partially by using different ionic conditions in a wheat germ system programmed with only the l class mRNAs.⁹ Apart from the polypeptides that co-migrated with the authentic reovirus proteins, an array of polypeptides smaller than the size expected from the coding potential of each class of mRNA was also synthesized. This material probably arises from premature termination or internal in-phase initiation events, as it is known that the wheat germ cell-free extract contains very little proteolytic activity.

The results presented by McCrae and Woodland⁷ on the stability of reovirus mRNAs injected into frog oocytes clearly showed that endogenous oocyte proteins, synthesized after micro-injection of the oocytes with reovirus mRNAs, dominated over the reovirus translation products, as shown in their polyacrylamide gel analysis of the polypeptides. The way in which these

products obscure the reovirus translation products precludes any final conclusions on the translation of reovirus mRNA in oocytes. Immunoprecipitation of the reovirus translation products prior to electrophoresis effectively eliminated the oocyte translation products, as is shown in Fig. 1*c*, greatly facilitating interpretations of the results. For example, the following deductions regarding the nature of the translation products can be made:

1) Over-exposure of the gel indicated that some translation products other than those of s class and m class mRNAs could also be detected in minute quantities, probably from the l class mRNAs. It is therefore clear that the number of reovirus polypeptides synthesized paralleled those made *in vitro* in the wheat germ system, which in turn mimic the amounts produced *in vivo*²² to a certain extent. The observation that some species of the s class and m class reovirus mRNAs were efficiently translated, despite the active endogenous oocyte protein synthesis, substantiates the suggestion⁹ that the differences observed in translational efficiencies between components of the reovirus mRNAs are due to some intrinsic properties of the mRNAs.

2) A remarkable observation was that polypeptides equivalent to both $\mu 1$ and $\mu 1C$ were formed in the oocyte. Protein $\mu 1C$ (72 000 daltons) is the principal reovirus outer capsid shell component, and is derived from protein $\mu 1$ (80 000 daltons) by cleavage.²³ It is therefore clear that post-translational modification of a reovirus protein by specific proteolytic cleavage of the precursor protein ($\mu 1$) could also occur in the oocyte, as was found for a number of other viral proteins synthesized in *Xenopus* oocytes.³ This observation emphasizes the structural similarity that must exist between the translation product synthesized in the oocyte and the authentic viral protein, $\mu 1$, confirming the fidelity of translation in the oocyte.

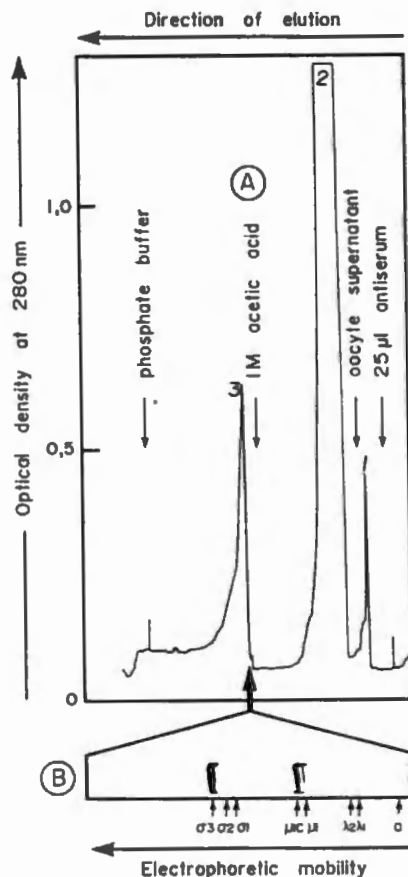


Fig. 2. Analysis of the translation products synthesized in the oocytes after micro-injection of total reovirus mRNA. *a*, Chromatographic separation of proteins from oocyte homogenates on protein A-Sepharose, followed by (*b*) SDS-PAGE of reovirus-specific proteins. α : origin of electrophoresis.

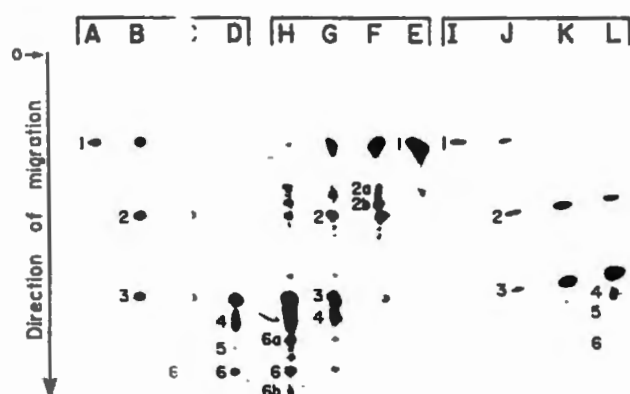


Fig. 3. Electrophoretic analysis of the partial V8 protease digests of authentic protein $\sigma 3$ (lanes A, B, C and D) and putative protein $\sigma 3$ translation products formed in the wheat germ system (lanes E, F, G and H) and the oocyte system (lanes I, J, K and L). The amounts of protein used were (A, E and I) 0 ng; (B, F and J) 25 ng; (C, G and K) 500 ng; (D, H and L) 2500 ng. σ : origin of

3) It was interesting to note that translation products of intermediate size were not present in the results shown in Fig. 1c. This might indicate that premature termination or internal in-phase initiation did not occur in the oocyte, although polypeptides of intermediate size might be absent simply because they were not immunoprecipitable.

Successful immunoprecipitation of the reovirus translation products implies also that these polypeptides have secondary and tertiary conformations that resemble those of authentic viral proteins. This is supported by the successful isolation of reovirus-specific translation products by affinity chromatography as shown in Fig. 2.

The elution profile of proteins separated on the protein A-Sepharose CL-4B column is shown in Fig. 2a. Three principal protein-containing peaks were detected: peak 1 consisted of unbound proteins from the rabbit antiserum prepared against reovirus; peak 2 contained the bulk of the oocyte supernatant proteins; and peak 3 contained the IgG antibodies and the labelled reovirus-specific translation products, synthesized in the oocytes. Analysis of this material by gel electrophoresis (Fig. 2b) showed that a number of proteins were synthesized that co-migrated with the authentic reovirus protein standards. Two components of the σ class proteins were detectable. The major component was the $\sigma 3$ protein but a faint band co-migrating with the $\sigma 1$ protein was also observed. No material that resembles $\sigma 2$ was detected. The major μ class protein formed in the oocytes was $\mu 1C$, derived from $\mu 1$ by post-translational cleavage, with a small amount of $\mu 1$ still present. Only a limited amount of material co-migrating with $\lambda 2$ was detected, with no indication of any other λ proteins. This result confirms that at least a number of the translation products of reovirus mRNA, synthesized in the oocyte, had immunological characteristics similar to the authentic reovirus proteins, thus confirming the value of the oocyte system for fidelity in the translation of the genetic message. It should be pointed out, however, that a reovirus mRNA may not have been detected, as we did not determine whether antibodies against all structural reovirus proteins were present in the antiserum. Translation of mRNA segments coding for non-structural reovirus proteins would similarly remain undetected. A technical advantage of affinity chromatography is the elimination of practically all ^{35}S -labelled endogenous oocyte proteins on a preparative scale.

In experiments on the assignment of the genome segments of reovirus type 3 to the proteins for which they code, it was shown

that co-migration of viral proteins is not sufficient evidence that they are identical.²³ More conclusive evidence can be obtained by comparing specific peptide maps prepared for the proteins under discussion. The fidelity in the translation of reovirus mRNA in wheat germ and oocyte systems was verified by comparing the peptide maps of the translation products with that of the authentic reovirus protein $\sigma 3$. This protein was used for mapping because of the relatively large quantities of this protein synthesized in both systems. An extracellular protease of *Staphylococcus aureus*, strain V8, was used as cleaving agent.²⁵ Owing to enzyme specificity, only a limited number of peptides are formed from $\sigma 3$, facilitating the comparison of the peptides by gel electrophoresis. This result is shown in Fig. 3. The authentic protein $\sigma 3$ is rapidly cleaved into two major products, polypeptides 2 and 3 (lanes A and B, Fig. 3). Further digestion of polypeptide 2 leads to the formation of peptides 4, 5 and 6 (lanes C and D, Fig. 3). The fragmentation pattern of the putative protein $\sigma 3$ translation products formed in the wheat germ system (lanes E, F, G and H, Fig. 3) closely resembles that of the protein $\sigma 3$ standard, but at least four other minor degradation products, designated 2a, 2b, 6a and 6b (lanes F and H, Fig. 3), were also detected in this profile. By contrast, the peptide map obtained with the polypeptides formed in the oocyte system (lanes I, J, K and L) is virtually identical to that of the authentic viral protein, which emphasizes the fidelity of translation in the oocyte of *Xenopus laevis*.

It has been shown that all classes of reovirus mRNAs are relatively stable after micro-injection into oocytes,^{6,7} despite the fact that they normally lack 3'-poly(A) segments *in vivo*. Although the individual mRNA species have similar stabilities in the oocytes, our results have conclusively established that the number of proteins synthesized under these conditions paralleled the number produced *in vivo*. Moreover, these proteins showed immunological and electrophoretic properties comparable to those of authentic reovirus proteins, indicating similarities in conformation and physico-chemical properties, respectively. The simultaneous synthesis of components of all three classes of reovirus proteins, post-translational modification of protein $\mu 1$ to form protein $\mu 1C$, and the similarities in the peptide maps of the putative protein $\sigma 3$ and authentic protein $\sigma 3$ indicate that a high degree of fidelity in the translation of reovirus mRNAs is achieved in the oocyte system. These observations suggest the possibility of studying the mechanism of reovirus morphogenesis in the oocyte system, as was recently suggested for hepatitis B virus.²⁶

The facilities of the Division for Biochemistry at the Onderstepoort Veterinary Research Institute for the cultivation of reovirus were kindly made available to us by Dr H. Huisman. His interest in this project and fruitful discussion are also gratefully acknowledged. C.J. Reinecke received financial support from the South African Medical Research Council.

Received 22 September 1987; accepted 31 March 1988.

1. Gurdon J.B., Lane C.D., Woodland H.R. and Marbaix G. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233, 177-182.
2. Lane C.D. (1983). The fate of genes, messengers, and proteins introduced into *Xenopus* oocytes. *Current Topics in Developmental Biology* 18, 89-116. Academic Press, New York.
3. Marbaix G. *et al.* (1975). Absence of polyadenylate segment in globin messenger RNA accelerates its degradation in *Xenopus* oocytes. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3065-3067.
4. Huez G. *et al.* (1978). Functional stability of HeLa cell histone messenger RNAs injected into *Xenopus* oocytes by 3'-OH polyadenylation. *Nature* 271, 572-573.
5. Ruderman J.V., Woodland H.R. and Sturgess E.A. (1979). Modulations of histone messenger RNA during the early development of *Xenopus laevis*. *Devel. Biol.* 71, 71-82.
6. Furuichi Y., La Fiandra A. and Shatkin A.J. (1977). 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* 266, 235-239.
7. McCrae M.A. and Woodland H.R. (1981). Stability of non-adenylated viral

- mRNAs injected into frog oocytes. *Eur. J. Biochem.* 116, 467–470.
16. Asselbergs F.A.M., Van den Rooij W.J. and Bloemendal H. (1978). Synthesis of lens crystallins in *Xenopus* oocytes as determined by quantitative immunoprecipitation. *Eur. J. Biochem.* 87, 517–524.
 8. Smith R.E., Zweerink H.J. and Joklik W.K. (1969). Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3. *Virology* 39, 791–810.
 9. Both G.W., Lavi S. and Shatkin A.J. (1975). Synthesis of all the gene products of the reovirus genome *in vivo* and *in vitro*. *Cell* 4, 173–180.
 10. Furuichi Y., Muthukrishnan S., Tomasz J. and Shatkin A.J. (1976). Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked and methylated sequence, m⁷GpppG^mpC. *J. biol. Chem.* 251, 5043–5053.
 11. Floyd R.W., Stone M.P. and Joklik W.K. (1974). Separation of single-stranded ribonucleic acids by acrylamide-agarose-urea gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* 59, 599–609.
 12. Verwoerd D.W., Oellermann R.A., Broekman J. and Weiss K.E. (1967). The serological relationship of South African bovine enterovirus strains (Ecbo SA-I and II) and the growth characteristics in cell culture of the prototype strain (Ecbo SA-I). *Onderstepoort J. vet. Res.* 34, 41–52.
 13. Roberts B.E. and Paterson B.M. (1973). Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 2330–2334.
 14. Huisman H. and Joklik W.K. (1976). Reovirus-coded polypeptides in infected cells: Isolation of two native monomeric polypeptides with affinity for single-stranded and double-stranded RNA, respectively. *Virology* 70, 411–424.
 15. Gurdon J.B. (1968). Changes in somatic cell nuclei inserted into growing and maturing amphibian oocytes. *J. Embryol. exp. Morph.* 20, 401–414.
 17. Chenais F., Virella G., Patrick C.C. and Fudenberg H.H. (1977). Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A-Sepharose as substrate. *J. immun. Meth.* 18, 183–192.
 18. Rapoport T.A. et al. (1978). Synthesis of carp proinsulin in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem.* 87, 229–233.
 19. Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W. and Laemmli U.K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecylsulphate and analysis by gel electrophoresis. *J. biol. Chem.* 252, 1102–1106.
 20. Burge B.W. and Huang A.S. (1979). Conserved polypeptides in the proteins of vesicular stomatitis virus. *Virology* 95, 445–453.
 21. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
 22. Both G.W., Furuichi Y., Muthukrishnan S. and Shatkin A.J. (1975). Ribosome binding to reovirus mRNA in protein synthesis requires 5'-terminal-7-methylguanosine. *Cell* 6, 185–195.
 23. Zweerink H.J. and Joklik W.K. (1970). Studies on the intracellular synthesis of reovirus-specific proteins. *Virology* 41, 501–522.
 24. McCrae M.A. and Joklik W.K. (1978). The nature of the polypeptide encoded by each of the 10 double-stranded RNA segments of reovirus type 3. *Virology* 89, 578–593.
 25. Houmard J. and Drapeau G.R. (1972). Staphylococcal protease: A proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3506–3509.
 26. Standing D.N., Ou J.H. and Rutter W.J. (1986). Assembly of viral particles in *Xenopus* oocytes: Pro-surface-antigens regulate secretion of hepatitis B viral surface envelope particle. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9338–9342.