



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## Virussen: springlevende moleculen

Bol, J.F.

### Citation

Bol, J. F. (2005). Virussen: springlevende moleculen. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/5244>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License:

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/5244>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

# **Virussen: springlevende moleculen**

Afscheidscollege uitgesproken door

**Prof.dr. J.F. Bol**

op 3 juni 2005

“It is always wise to look ahead,  
but difficult to look further than you can see.”

*Winston Churchill*

*Mijnheer de Rector Magnificus,  
Zeer gewaardeerde toehoorders,*

*DNA als genetisch materiaal*

Uit experimenten van Oswald Avery en medewerkers werd in 1944 duidelijk dat de erfelijke eigenschappen van organismen gelegen zijn in het DNA, een keten van vier bouwstenen, aangeduid als de basen A, T, G en C. De structuur van genen en de wijze waarop ze aan het nageslacht werden doorgegeven bleef echter een raadsel. Begin jaren 50 kwam Erwin Chargaff met de vondst dat in DNA de hoeveelheden van de basen A en T gelijk waren, evenals de hoeveelheden G en C, maar de betekenis daarvan voor de structuur van DNA werd niet doorzien. Toen Linus Pauling begin 1953 een model publiceerde waarin drie DNA-ketens samen een triple-helix-structuur vormden, haalden Jim Watson en Frances Crick in Cambridge, Engeland, opgelucht adem. Pauling, die baanbrekend werk op het gebied van eiwitstructuur had verricht, zat er met zijn DNA-structuur nu duidelijk naast. Watson was toen 25 jaar en sinds anderhalf jaar als postdoc in Cambridge bezig om samen met Crick modellen voor de DNA-structuur te bouwen. Een maand later, in maart 1953, vielen in hun handen de stukjes van de puzzel in elkaar en werd een “letter” aan het tijdschrift “Nature” op papier gezet. Door “kruis of munt” te gooien werd de volgorde van de auteurs bepaald (Watson & Crick), Watson’s zus Betty typte het manuscript en Odile, de echtgenote van Crick, vervaardigde de figuur waarin het DNA werd voorgesteld als een helix van twee DNA-ketens waarin de base A in de ene keten paarde met de base T in de andere keten, evenals de basen G en C. Hun publicatie<sup>1</sup> in Nature, in april 1953, werd geflankeerd door publicaties van Maurice Wilkins en Rosalind Franklin van het King’s College te Londen. Dat laatste was nodig om te verantwoorden dat Watson en Crick bij de opstelling van hun model gebruik hadden gemaakt van gegevens die Rosalind Franklin met Röntgen-diffractie had verkregen, en waar zij via/via en zonder haar medeweten inzage in hadden gekregen. In diverse boeken geschreven door Jim Watson<sup>2,3,4</sup>, twee biografieën van Rosalind Franklin<sup>5,6</sup>, en een autobiografie van Maurice Wilkins<sup>7</sup> worden verschillende visies gegeven op de rol van Franklin in de ontdekking van de DNA-structuur, en op de moeizame relatie die Wilkins en Watson met de “dark lady” hadden. Als Crick, Watson en Wilkins in 1962 voor de ontdekking van de DNA-structuur de Nobel-prijs ontvangen is Rosalind Franklin al vier jaar aan kanker overleden. De bepaling dat de Nobel-prijs voor één vinding aan maximaal drie personen kan worden toegekend levert dan geen probleem op. Maar hoe het ook zij, met de vondst dat in DNA de basen A en T en de basen G en C elkaar kunnen binden en de inpassing van deze binding in een dubbele helix-structuur hebben Watson en Crick een nieuw tijdperk in de moleculaire biologie ingeluid.

Nadat de structuur van DNA, deoxyribonucleïnezuur, is opgehelderd rijst de vraag wat dan wel de functie is van dat andere type nucleïnezuur dat in cellen aanwezig is, het ribonucleïnezuur, afgekort RNA. De RNA-keten bevat dezelfde vier bouwstenen als DNA maar de rijkdraad is zwakker en RNA dat men uit cellen isoleert is deels afgebroken. Maar bekend is dat een aantal plantenvirussen RNA bevat, verpakt in een mantel van eiwitmoleculen, en in 1956 tonen Gierer en Schramm en anderen aan dat de RNA-component van tabaksmozaïekvirus het infectieuze bestanddeel is. Plantenvirussen zijn makkelijk in grote hoeveelheden te zuiveren en veel genommeerde onderzoekers gaan hun onderzoek op plantenvirussen richten. Watson gaat in Pasadena samen met Alex Rich aan het werk om de structuur van het RNA van tabaksmozaïekvirus met Röntgendiffractie op te helderen, maar de diffractiepatronen die zij krijgen lijken niet op die van DNA en zijn niet te interpreteren. Rosalind Franklin vertrekt van King's naar Birbeck College om daar, samen met Aaron Klug, met Röntgendiffractie de structuur van de deeltjes van tabaksmozaïekvirus op te helderen. Zij krijgt het gezuiverde virus van Bill Pirie van het Rothamsted Experimental Station tot zij in Nature publiceert dat het virus een uniforme lengte heeft en bestaat uit een helix van identieke eiwitsubeenheden waarin de RNA-keten eveneens in helixvorm besloten ligt. Volgens Rosalind's biografie Brenda Maddox<sup>6</sup> is Pirie zo ontstemt over deze, overigens correcte, conclusies dat hij weigert haar verder van viruspreparaten te voorzien en haar subsidie-aanvragen bij de Royal Society als lid van de jury systematisch torpedeert. Volgens mijn collega Stan Pierpoint, die een biografie van Pirie geschreven heeft<sup>8</sup>, mist deze zienswijze echter elke grond. Waaruit maar al te zeer blijkt dat wetenschap mensenwerk is. Zo verhaalt François Jacob<sup>4</sup> over een symposium waar Watson tijdens de voordracht van een collega demonstratief de krant gaat zitten lezen om zijn desinteresse in het onderwerp kenbaar te maken. Als Watson dan de volgende dag zijn verhaal moet houden, halen alle deelnemers aan het symposium simultaan een krant tevoorschijn en beginnen die te lezen.

Maar wat was nu de functie van dat RNA in de cel. In de tien jaar na de ontdekking van de DNA-structuur wordt duidelijk dat een gen bestaat uit een stuk van de DNA-keten van gemiddeld 1000 basen, A, T, C, en G, en dat de volgorde van deze basen de volgorde bepaalt van de aminozuren in een eiwit dat onder regie van het DNA gesynthetiseerd wordt. Een DNA-keten waarin honderden tot duizenden genen gelegen zijn is een chromosoom. Om van één zo'n gen het corresponderende eiwit te maken wordt van het betreffende stuk DNA een RNA-kopie gemaakt, het boodschapper-RNA, dat de eiwit-synthetiserende machinerie in de cel instrueert tot het maken van het betreffende eiwit. Dit principe van "DNA geeft RNA geeft eiwit" wordt bekend als het centrale dogma van de moleculaire biologie. Het vertalen van RNA in eiwit in een cel is een ingewikkeld mechanisme waarvan de grote lijnen in de jaren vijftig van de 20-ste eeuw zijn opgehelderd, voor een belangrijk deel door virale RNAs als boodschapper-RNAs te gebruiken. In feite kunnen we dat RNA-molecuul van

tabaksmoziëkvirus beschouwen als een infectieus boodschapper-RNA dat, als het een plantencel binnenkomt, zich laat vertalen in een viertal virale eiwitten waarvan er twee het virale RNA gaan vermenigvuldigen, één het nieuw-gesynthetiseerde RNA bemantelt tot nieuwe virusdeeltjes, en het vierde eiwit er voor zorgt dat het virus zich door de hele plant kan verspreiden. In de jaren negentig wordt het technisch mogelijk om de volgorde van de vier bouwstenen in het DNA van bacteriën, planten en dieren op te helderen. In 1996 wordt de structuur van het genoom van de bakkersgist ontrafeld en daar blijken circa 6000 genen in gelegen te zijn. In 1997 volgt de structuur van het genoom van de darmbacterie *E. coli* met zo'n 4400 genen, in 1998 het genoom van de worm met ruim 19.000 genen, en in het jaar 2000 het genoom van de fruitvlieg, met een kleine 14.000 genen, de plant de zandraket met ruim 25.000 genen, en, als klap op de vuurpijl, het genoom van de mens met het onverwacht lage aantal van een kleine 30.000 genen. Het wordt duidelijk dat in de loop van de evolutie organismen niet complexer zijn geworden door steeds meer genen te vergaren, maar door voortdurend slimmer gebruik te maken van een beperkte set genen.

Van de meeste virussen die als modelsysteem bestudeerd worden is al sinds het begin van de jaren tachtig de volledige genoomstructuur bekend. Bij bacteriën, planten en dieren bestaat het genetisch materiaal altijd uit DNA, maar bij virussen kan het zowel uit DNA als uit RNA bestaan. Bekende diervirussen als polio, mazelen, de bof en influenza hebben een RNA-genoom en ook bij 90% van de plantenvirussen bestaat het genoom uit RNA. Van de meeste virussen is het genoom relatief simpel en bevat het zo'n vier tot tien genen, coderend voor evenzoveel eiwitten. De structuur van het genoom en dus de structuur van de eiwitten van deze virussen is al meer dan twintig jaar bekend en je zou verwachten dat na twintig jaar onderzoek de functies van zo'n handjevol eiwitten per virus wel uitentreuren bekend zou zijn. En toch weten we nog maar vaag hoe virale eiwitten werken en met welke componenten in de cel ze interacties aangaan. Dagelijks levert het virusonderzoek nog steeds verrassende resultaten op en enkele recente gebeurtenissen in het bestaan van deze springlevende moleculen wil ik U vandaag niet onthouden.

### *Aanval en verdediging in de interactie tussen virus en gastheer*

Een aspect van de virusinfectie dat mij altijd uitermate geboeid heeft is de wijze waarop de gastheer zich tegen een binnendringend virus weet te verdedigen en de strategieën die een virus heeft ontwikkeld om die afweer te omzeilen. Als mens kunnen we niet zonder ons immuun-systeem en door middel van wereldwijde vaccinatieprogramma's is het pokkenvirus inmiddels uitgeroeid en is poliovirus naar verwachting binnenkort hetzelfde lot beschoren. Maar ons immuunsysteem is niet waterdicht. Elke winter worden we weer bezocht door een griep-epidemie doordat het influenzavirus heel flexibel zijn manteleiwitten weet te veranderen zodat de immuniteit die we het ene jaar opbouwen het volgend jaar niet meer werkt. Maar het toppunt van raffinement in het omzeilen van het immuun-systeem vinden we bij de sexueel over-

draagbare herpesvirussen. Op de vraag “Wat is het verschil tussen herpes en de liefde?” is het antwoord “Herpes is voor altijd.” Herpesvirussen zijn kampioen in het toepassen van “immune evasion” zoals het in het Engels wordt genoemd, doordat ze ongeveer de helft van de circa 100 genen in hun DNA-genoom gebruiken om het immuun-systeem onderuit te halen<sup>9,10</sup>. Met behulp van namaak contrôle-eiwitten ontregelen ze het complement-systeem en het interferon-systeem. Door de productie van namaak-chemokines of chemokine-receptoren verstoren ze de ontwikkeling en activering van het immuun-systeem. Door ondermeer homologen van het eiwit Bcl-2 te produceren, blokkeren ze de geprogrammeerde celdood die door de virusinfectie geactiveerd werd. En door de presentatie van brokstukken van viraal eiwit op het oppervlak van de geïnfecteerde cel door MHC klasse-I moleculen te blokkeren, zorgt het virus er voor dat de cel niet herkend wordt door cytolytische T-cellen. Om te voorkomen dat de afwezigheid van MHC klasse-I moleculen er toe leidt dat de cel alsnog door “*natural killer*” cellen wordt opgeruimd stuurt het virus een namaak MHC-molecuul naar het cel-oppervlak.

Planten hebben geen immuun-systeem dat met dat van de mens te vergelijken is. In mijn oratie, 13 jaar geleden, beschreef ik een strategie om planten resistent te maken tegen virusinfectie door een DNA-kopie van het deel van het virale RNA dat codeert voor het manteleiwit, in het genoom van de plant te plaatsen. Gemodificeerde planten die het virale manteleiwit in al hun cellen produceerden, bleken een resistentie tegen infectie met het corresponderende virus te vertonen. Ik moet U bekennen dat deze strategie om planten tegen virus-infectie te vaccineren een zachte dood gestorven is. De resistentie was niet bijzonder sterk en voor een aantal typen van virussen geheel afwezig. Door viraal manteleiwit in planten tot expressie te brengen hadden wij in Leiden planten resistent gemaakt tegen mechanische infectie met een drietal virussen, waaronder het tabaksratelvirus, en in 1991 bracht ik de zomermaanden door in het Scottish Crop Research Institute om in samenwerking met dr. Derek Brown te zien of deze planten ook resistent waren tegen infectie met tabaksratelvirus op de natuurlijke wijze, namelijk via overdracht van het virus door aaltjes in de grond. Het antwoord was een teleurstellend “NEE” maar mijn gezinsleden en ik hebben er wel ons hart aan Schotland verloren.

In diezelfde periode bestudeerde Bill Dougherty en medewerkers in Corvallis, Oregon, de mogelijkheid om planten resistent te maken tegen het *tobacco etch virus* door het virale manteleiwit-gen in planten tot expressie te brengen. Zo’n DNA-kopie van het virale gen wordt in de plant eerst overgeschreven in een RNA-kopie en dat RNA wordt dan vertaald in eiwit. Als controle zette hij ook een DNA-kopie in het genoom van de plant, die zodanig gemuteerd was dat de plant wel viraal RNA maar geen viraal eiwit kon maken. Tot zijn grote verrassing bleek zo’n 30% van de planten die alleen viraal RNA konden maken, volledig immuun te zijn voor infectie terwijl dit percentage bij de planten die zowel viraal RNA als eiwit maakten veel lager lag. Kennelijk speelde viraal eiwit bij deze resistentie geen rol, en Bill sprak van “RNA-mediated resistance”. Nog vreemder werd het toen bleek dat planten die veel viraal

RNA accumuleerden niet resistent waren en in de resistente planten nauwelijks viraal RNA aan te tonen was. Ik herinner me een symposium in oktober 1992 in College Park, nabij Washington DC, waar de chairman Mike Wilson aankondigde dat Bill Dougherty een revolutionaire theorie ter verklaring van “RNA-mediated resistance” zou ontvouwen. Voorafgaand aan zijn lezing vroeg ik hem in de wandelgang een tip van de sluijer op te lichten, en toen hij me vertelde dat hij dacht dat zijn resistente planten een mechanisme activeerden om selectief het virale RNA af te breken, verklaarde ik hem voor gek. Hoe kon de plant nu het virale RNA onderscheiden tussen die duizenden verschillende RNAs die in een plantencel voorkomen? Maar Bill was niet gek, althans toen nog niet. In een publicatie in 1993<sup>11,12</sup> liet hij zien dat zijn resistente planten wel degelijk RNA overschreven van de ingebrachte virale DNA-kopie, maar dat ze dit RNA even snel weer afbraken. En niet alleen dit RNA maar ook het RNA van een infecterend virus als dit overeenkwam met de virale DNA-kopie in het plantengenoom. Bovendien legde Bill de link met twee publicaties die in 1990 verschenen waren over een verschijnsel in planten dat “co-suppressie” werd genoemd. Eén van die publicaties was van de groep van professor Jos Mol in Amsterdam, die probeerde de kleur van bloemen te veranderen door de expressie van bepaalde plantengenen te verhogen. Een mogelijkheid om de expressie van laten we zeggen “gen X” te verhogen is een tweede kopie van dat gen in het genoom van de plant te zetten. Maar de onderzoekers die dat deden, zagen tot hun verrassing dat in veel gevallen de expressie van het ingebrachte gen X uitdoofde, en dat bovendien de expressie van het oorspronkelijk aanwezige gen X werd uitgeschakeld, vandaar de term “co-suppressie”. Als je nu een stukje van gen X in het genoom van een plantenvirus zette en je smeerde dit virus op een gastheerplant die co-suppressie van gen X vertoonde, dan bleek deze plant resistent tegen het gemodificeerde virus te zijn geworden. Door het mechanisme van co-suppressie werd niet alleen het boodschapper-RNA van gen X afgebroken maar ook viraal RNA waar een stukje van dit boodschapper-RNA was ingebracht. Een niet-gemodificeerde plant (die dus geen co-suppressie vertoonde) kon je prima infecteren met het virus waarin je een stukje van gen X had gezet, maar in dat geval schakelde het virus de expressie van gen X in de plant uit. Onderzoekers op het gebied van co-suppressie en RNA-geïnduceerde virus-resistentie in planten kregen in de gaten dat ze aan hetzelfde fenomeen werkten. En niet alleen zij, maar ook onderzoekers van “RNA-interferentie” bij nematoden, fruitvliegen en zoogdier-cellen, en onderzoekers van “*quelling*” bij schimmels en algen bleken allemaal aan het zelfde fenomeen te werken. In 1995 droeg Bill Dougherty in een overzichtsartikel een aantal basis-elementen aan, die betrokken zijn bij RNA-interferentie of RNAi zoals het nu algemeen wordt genoemd. Daarna stapte hij in de autohandel van zijn schoonvader en heeft hij de geweldige vlucht die dit onderzoek in de afgelopen 10 jaar heeft genomen alleen op afstand kunnen volgen. Maar gelukkig is zijn rol bij het onderzoek naar RNA-interferentie in planten met verve overgenomen door David Baulcombe uit Norwich, Engeland, die onlangs de Beijerinck Virologie Prijs voor zijn werk aan RNAi ontving.

Zoals het er nu uitziet zijn er drie routes waarlangs RNA in een cel het zwijgen kan worden opgelegd, die zich alle drie bedienen van korte RNA fragmenten van 21 tot 26 bouwstenen lang<sup>14</sup>.

In de eerste route wordt dubbelstrengs RNA door een enzym “Dicer” geknipt tot korte fragmenten die “*small interfering RNAs*” of siRNAs worden genoemd, en die vervolgens in enkelstrengs vorm geïncorporeerd worden in eiwit-complexen met de naam RISC (van “RNA-induced silencing complex”), tegenwoordig ook “Slicer” genoemd. Met behulp van deze RNA-fragmentjes kan Slicer via base-pairing selectief binden aan specifieke RNAs in de cel, waarna deze RNAs door een eiwit in het Slicer-complex worden doorgeknipt. RNA-virussen en ook wel DNA-virussen produceren dubbelstrengs RNA als bijproduct van de infectie, dat door Dicer tot de brokstukken wordt geknipt die Slicer in staat stellen specifiek het virale RNA te knippen.

In de tweede route knipt Dicer RNA-fragmenten van 21 tot 24 bouwstenen lang, zogenaamde micro-RNAs (“miRNAs”) uit cellulaire RNA-moleculen die een lokale dubbelstrengs-structuur bezitten. En met deze micro-RNAs kan het organisme de activiteit van zijn eigen genen uitschakelen, in dierlijke cellen vooral door de vertaling van RNA in eiwit te remmen, in plantencellen vooral door boodschapper-RNAs door te knippen.

In de derde route worden door Dicer gemaakte “*small interfering RNAs*” als gids gebruikt om bepaalde enzymen naar specifieke plaatsen van het DNA van de cel te geleiden alwaar ze het DNA van methylgroepen voorzien, waardoor de chromatine-structuur verandert en de expressie van een gen wordt afgesloten. Met name wordt deze route gebruikt om de in ons DNA sluimerende kopieën van retrovirussen onder de duim te houden.

In planten vinden we alle drie de routes: route 1 om in geïnfecteerde planten virusinfecties te bestrijden, en routes 2 en 3 om in gezonde planten gen-expressie te regelen. In andere organismen kunnen één of meer van deze routes ontbreken. In de jaren twintig van de vorige eeuw werden er al voorbeelden beschreven van de infectie van planten met het tabaksringspotvirus. Na een virulente start, waarbij verschillende bladeren vernietigd werden, doofde de infectie geleidelijk uit. De virus-vrije delen van de plant waren dan resistent tegen hernieuwde infectie met tabaksringspotvirus maar volledig gevoelig voor infectie met andere virussen. Nu weten we dat in de primaire infectiehaard de plant de productie van *small interfering RNAs* activeert en dat deze zich waarschijnlijk als een mobiel signaal voor het infectiefront door de plant verspreiden om de gezonde delen van de plant op de komst van het virus voor te bereiden. Bij deze amplificatie en systemische verspreiding van het RNAi-signaal speelt een enzym van de plant een rol dat virologen dertig jaar lang voor een mysterie had geplaatst. Dit enzym, dat RNA kopieert in nieuw RNA, werd in het begin van de jaren zeventig in gezonde planten aangetroffen, maar had geen plaats in het centrale dogma van “DNA geeft RNA geeft eiwit”. Met de vondst dat dit enzym als RNA-afhankelijk

RNA-polymerase een rol speelde in het RNAi-mechanisme, was ook deze puzzel opgelost. Mijn rol hierbij was bescheiden. Ik was coördinator van een door de EU gesubsidieerd netwerk van onderzoekers waar ook David Baulcombe in Norwich deel van uitmaakte. Ten laste van de subsidie was in zijn groep Talmas Dalmay als postdoc aangesteld en Talmas wist de genen voor dit RNA-afhankelijk RNA-polymerase in de zandraket, *Arabidopsis thaliana*, te karakteriseren. Zijn publicatie in Cell<sup>15</sup> vormde de kroon op de resultaten van ons netwerk.

### *RNAi en tulpomanie*

Misschien vraagt U zich af: “Als planten nu zulke effectieve verdedigings-mechanismen tegen virussen hebben, waarom maken we ons dan nog druk om virusinfecties in onze gewassen?”. Net zoals diervirussen strategieën hebben bedacht om het immuunsysteem van de gastheer te omzeilen, zo hebben veel plantenvirussen eiwitten ontwikkeld waarmee ze het RNA-interferentie-mechanisme van de gastheer kunnen onderdrukken. Deze virale eiwitten worden suppressors van *gene silencing* genoemd. Van sommige van deze suppressors is aangetoond dat ze de *small interfering RNAs* wegvangen die na infectie gemaakt worden door het enzym Dicer, van anderen is de werking nog niet duidelijk. Veel infecties in onze cultuurgewassen zijn menginfecties die veroorzaakt worden door een combinatie van verschillende virussen waarvan er tenminste één een suppressor van *gene silencing* produceert, waar de andere virussen in het mengsel dan een dankbaar gebruik van maken. Deze virale suppressors van *gene silencing* blijken in veel gevallen ook verantwoordelijk voor de symptomen die een virusinfectie van planten veroorzaakt. Niet alleen vangen de suppressors de *small interfering RNAs* weg die Dicer knipt uit viraal dubbelstrengs-RNA, maar ook de micro-RNAs die Dicer knipt uit cellulaire RNAs en die de expressie regelen van genen van de plant. Door het wegvangen van deze micro-RNAs ontregelt het virus de ontwikkeling en het metabolisme van de plant waardoor misvorming en vergeling van het blad optreedt. Waarschijnlijk kennen we nu ook de aanleiding tot de windhandel in tulpen in Nederland in het begin van de 17e eeuw. De tulpen die Carolus Clusius bij zijn benoeming in 1593 tot hoogleraar in Leiden, uit Wenen had meegebracht, en die uit zijn privé-tuin in Leiden werden gestolen, raakten op de Nederlandse geestgronden al snel geïnfecteerd met het *tulip breaking virus*. Dit virus behoort tot de groep van potyvirussen die een krachtige suppressor van *gene silencing* produceren om de afweer van de plant tegen virusinfectie te onderdrukken. Maar doordat de suppressor ook micro-RNAs van de plant weg vangt vertoonden de geïnfecteerde tulpen spectaculair gevlamde en geveerde bloemen waardoor ze extra begeerlijk werden. Op het hoogtepunt van de tulpomanie in 1636 werd voor de legendarische Semper Augustus 10.000 florijnen per bol betaald, een bedrag gelijk aan de prijs van het duurste huis aan de Amsterdamse grachten, tot in 1637 de handel als een zeepbel uiteen spatte en velen geruïneerd raakten. De windhandel in aandelen World-on-line was hierbij vergeleken slechts kinderspel.

Thans mogen Nederlandse bloembollen alleen geëxporteerd worden als ze virusvrij zijn. In het kader van een jarenlange samenwerking met het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse hebben wij met succes het RNAi-mechanisme toegepast om lelies resistent te maken tegen verschillende lelievirussen. Het doel was om het gebruik te verminderen van bestrijdingsmiddelen die werden toegepast om virusoverdracht door bladluizen tegen te gaan. Gezien de aversie tegen genetische modificatie van gewassen die de gemiddelde Europeaan zich heeft laten aanpraten, zal de teelt van deze virusresistente lelies nog wel even op zich laten wachten. Het succes waarmee de vernietiging van de papaya-cultuur door het papayamozaïekvirus op Hawaï is voorkomen, illustreert echter de kracht van de strategie om met de RNAi-techniek virusresistente gewassen te verkrijgen<sup>16</sup>.

### *Resistentie-genen*

Een tweede gebied, naast RNA-interferentie, waarop zich in de afgelopen tien jaar spectaculaire ontwikkelingen in het onderzoek naar de plant-pathogeen-interactie hebben voorgedaan betreft de karakterisering van resistentie-genen van de plant. Het eiwit dat zo'n resistentie-gen codeert stelt een plant in staat om een binnendringend pathogeen zoals virus, bacterie of schimmel te herkennen, en deze herkenning leidt er toe dat in de plant een breed scala aan afweermechanismen in stelling wordt gebracht. Eén zo'n resistentie-gen, dat de tabaksplant in staat stelt het tabaksmozaïekvirus te herkennen, is het *N*-gen, dat lange tijd als de heilige graal in de plantenvirologie heeft gegolden tot het in 1994 door de groep van Barbara Baker werd geïsoleerd<sup>17</sup>. In het begin van de jaren zeventig zag Kees van Loon in Wageningen, thans hoogleraar in Utrecht, dat tabaksplanten die het *N*-gen bezaten, na infectie met tabaksmozaïekvirus een specifieke set eiwitten gingen maken, terwijl deze eiwitten niet gemaakt werden na infectie van tabaksplanten zonder het *N*-gen. Rond 1980 zijn we een samenwerking met Kees van Loon begonnen, in eerste instantie gericht op het karakteriseren van de genen voor deze virus-geïnduceerde eiwitten, later gericht op de signaaltransductie-route die de expressie van deze genen na virus-infectie activeert. Een samenwerking waarbij op een gegeven moment ook het bedrijf MOGEN en de groep van professor Rob Verpoorte uit Leiden betrokken werden, en die ons met name inzicht heeft gegeven in de rol van de plantenhormonen salicylzuur en ethyleen in de afweer van de plant tegen pathogenen<sup>18,19</sup>.

### *Competitie tussen boodschapper RNA van virus en gastheer*

Ik heb de afgelopen dertig jaar veel plezier beleefd aan de vele samenwerkingsverbanden met collega's in binnen- en buitenland. Het sluitstuk betrof een samenwerking met professor Dan Gallie in Riverside, Californië, in de afgelopen twee jaar, waarin we ons bezig hielden met de vraag hoe de RNAs van een plantenvirus na hun entree in een plantencel er in slagen om de eiwitsynthetiserende machinerie over te

nemen van die circa 300.000 boodschapper-RNA-moleculen van de plant, die gemiddeld per cel aanwezig zijn. Zo'n boodschapper-RNA bestaat, evenals DNA, uit een ketting van vier verschillende basen. De twee uiteinden van die ketting zijn verschillend. Laten we die uiteinden voor het gemak de "kop" en de "staart" noemen. De eiwit-synthetiserende machinerie leest de volgorde van die vier basen van kop naar staart en gebruikt die informatie om aminozuren in een specifieke volgorde te koppelen tot een eiwitketen. Die boodschapper-RNAs van de cel hebben aan de kop en de staart specifieke structuren zitten. Aan de kop zit als een hoedje een omgekeerde G-base, de "cap"-structuur, en aan de staart zit een serie van circa 200 kopieën van de base A van het RNA, de zogenaamde poly(A)-staart. De kop-structuur bindt een drietal eiwitten, initiatiefactoren, die voor de start van de eiwit-synthese nodig zijn, en de poly(A)-staart bindt het *poly(A)-binding protein*. De afgelopen tien jaar is gebleken dat de efficiëntie van de vertaling van cellulair boodschapper-RNA in eiwit sterk verhoogd wordt wanneer de RNA-keten als een slang met z'n kop in z'n staart bijt zodat een cirkel-vormige structuur ontstaat. Die interactie tussen kop en staart van het RNA komt tot stand doordat het *poly(A)-binding protein* dat aan de poly(A)-staart zit bindt aan één van die drie eiwitten die aan de "cap"-structuur aan de kop van het RNA gebonden zitten, te weten de initiatiefactor "4G".

Cellulair boodschapper-RNA wordt tijdens de synthese in de celkern voorzien van de "cap"-structuur en poly(A)-staart. Veel virussen met RNA als genetisch materiaal komen nooit in deze kern, en hebben ingenieuze strategieën bedacht om de virale boodschapper-RNAs te laten competeren met die van de cel. Sommige virussen zetten zelf een "cap" en poly(A)-staart aan hun RNAs zodat ze, net als de RNAs van de cel, zo'n cirkelvormige structuur kunnen aannemen. Maar andere virussen maken RNAs die geen "cap" of poly(A)-staart bezitten, en dan is het een raadsel hoe ze er in slagen om toch hun RNAs efficiënt in eiwit te laten vertalen. De RNAs van het in Leiden bestudeerde alfalfamozaïekvirus hebben aan de kop-zijde een "cap"-structuur, die het virus zelf aanbrengt, maar aan het andere uiteinde geen poly(A)-staart. Sinds de jaren zeventig was bekend dat de RNAs van het virus alleen een plant kunnen infecteren wanneer er enkele moleculen manteleiwit aan het staart-uiteinde gebonden zitten. In samenwerking met Dan Gallie toonden wij aan dat deze binding van manteleiwit aan het uiteinde van het RNA de vertaling van het virale RNA in eiwit in de plant met een factor 40 verhoogt, en dat het virale manteleiwit, net als het *poly(A)-binding protein* van de cel, kan binden aan het aan de kop van het RNA gebonden eiwit 4G (eukaryotische Initiatie-Factor 4G, afgekort eIF4G)<sup>20,21,22,23</sup>. Het virale manteleiwit boost de functie van het *poly(A)-binding protein* na, en maakt het mogelijk dat de virale boodschapper-RNAs evenals de cellulaire RNAs een cirkelvormige structuur kunnen aannemen.

## *Slotwoord*

De resultaten van het onderzoek aan plantenvirussen in mijn groep zijn verkregen door de enthousiaste en toegewijde inzet van vele medewerkers. Ik prijs het lot dat me in 1983 op een congres in East Lansing, Michigan, Huub Linthorst deed ontmoeten. Zijn daaropvolgende aanstelling in onze groep werd het begin van een lange en vruchtbare samenwerking. De bloei van ons onderzoek is ook in belangrijke mate te danken aan de ondersteuning gedurende meer dan 30 jaar door Frans Brederode en Lyda Neeleman, die het biochemisch handwerk tot in de perfectie beheersten. In hoge mate heb ik ook genoten van de bijdragen van de tientallen promovendi en postdocs die een aantal jaren van hun leven aan het plantenvirusonderzoek gewijd hebben. Ik ben ze bijzonder dankbaar voor hun inzet en hoop dat ook zij met een warm hart op hun Leidse tijd terugkijken. De samenwerking met deze categorie van jonge, enthousiaste tijdelijke medewerkers maakt dat ik me geen mooiere loopbaan had kunnen wensen. Ik ben de Leidse Universiteit dankbaar voor de vrijheid waarin ik mijn onderzoek gestalte heb kunnen geven en voor de uitstekende faciliteiten die zij voor dit onderzoek beschikbaar heeft gesteld. Het gaat mij uiteraard aan het hart dat bij mijn afscheid een einde komt aan meer dan 45 jaar onderzoek aan plantenvirussen in Leiden, maar wellicht dat René Olsthoorn, die voor zijn onderzoek in onze groep de Beijerinck Virologie-Premie kreeg toegekend en die nu middels een Vidi-beurs aan de faculteit verbonden is, de fakkel brandend weet te houden. Tenslotte had ik hier niet gestaan zonder de steun van het thuisfront, bestaande uit mijn echtgenote en drie dochters. Aan hen is het voor een groot deel te danken dat ik hier als een gelukkig man kan besluiten met de woorden “Ik heb gezegd”.

## Literatuur

1. Watson JD & Crick FHC. A structure for deoxyribonucleic acid. *Nature* 171 (1953) 737-738.
2. Watson JD. The double helix. Norton Critical Edition. ed. Gunther S. Stent, WW Norton and Company, New York & London, 1980.
3. Watson JD. Genes, girls and gamow. Oxford University Press, Oxford & New York, 2001.
4. Watson JD. A passion for DNA; genes, genomes and society. Oxford University Press. Oxford & New York, 2000.
5. Sayre A. Roslind Franklin and DNA. Norton, New York, 1975.
6. Maddox B. Roslind Franklin, the dark lady of DNA. Harper Collins Publishers, London, 2002.
7. Wilkins M. The third man of the double helix. Oxford University Press, Oxford & New York, 2003.
8. Pierpoint WS. Norman Wingate Pirie FRS, 1 July 1907-29 March 1997. *Biog. Mems Fell. R. Soc. London* 45 (1999) 397-415.
9. Alcami A & Koszinowski UH. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunology Today*, 21 (2000) 447-455.
10. Murphy PM. Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nature Immunology* 2 (2001) 116-122.
11. Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM & Dougherty WG. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5 (1993) 1749-1759.
12. Lindbo JA & Dougherty WG. Plant pathology and RNAi: a brief history. *Annual Review of Phytopathology* 43 (2005) in press.
13. van der Krol AR, Mur LA, Beld M & Mol JN. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to cosuppression of gene expression. *Plant Cell* 2 (1990) 291-299.

14. Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature* 431 (2004) 356-363.
15. Dalmay T, Hamilton AJ, Rudd S, Angell S & Baulcombe DC. An RNA-dependent RNA-polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101 (2000) 543-553.
16. Fermin G, Tennant P, Gonsalves C, Lee D & Gonsalves D. Comparative development and impact of transgenic papayas in Hawaii, Jamaica, and Venezuela. *Methods Mol. Biol.* 286 (2005) 399-430.
17. Witham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C & Baker B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and interleukin-1 receptor. *Cell* 78 (1994) 1101-1115.
18. Verberne MC, Verpoorte R, Bol JF, Mercado-Blanco J & Linthorst HJM. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology* 18 (2000) 779-783.
19. Knoester M, van Loon LC, van den Heuvel J, Hennig J, Bol JF & Linthorst HJM. Ethylene insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 1933-1937.
20. Neeleman L, Olsthoorn RCL, Linthorst HJM & Bol JF. Translation of a nonpolyadenylated viral RNA is enhanced by binding of viral coat protein or polyadenylation of the RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 14286-14291.
21. Neeleman L, Linthorst HJM & Bol JF. Efficient translation of alfamovirus RNAs requires the binding of coat protein dimers to the 3' termini of the viral RNAs. *J. Gen. Virol.* 85 (2004) 231-240.
22. Krab IM, Caldwell C, Gallie DR & Bol JF. Coat protein enhances translational efficiency of *Alfalfa mosaic virus* RNAs and interacts with the eIF4G component of initiation factor eIF4E. *J. Gen. Virol.* 86 (2005) 1841-1849.
23. Bol JF. Replication of alfamo- and ilarviruses: Role of the coat protein. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43 (2005) in press.



