

**GENETICA VAN PSEUDOMONAS PUTIDA
ONTWIKKELING VAN TECHNIEKEN VOOR GEN-KARTERING
IN DE STAM PMBL-L**

STELLINGEN

I

De bewering van Holloway, dat van *P. putida* geen lysogene stammen bekend zijn, terwijl uitgebreid belangrijk onderzoek, verricht met een faag geïsoleerd uit een lysogene stam, wordt aangehaald, is op zijn minst slordig te noemen.

B. W. Holloway (1969). *Bacteriol. Rev.* 33, 419.

II

Het door Adelberg e.a. gevonden verschil in mutagenese van *E. coli* voor valine-resistentie en auxotrofie moet toegeschreven worden aan het verschil in toegepaste selectie-methoden.

E. A. Adelberg, M. Mandel en G. Ch. Ch. Chen (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 788.

III

Om de *E. coli*-afkomst van de R-factoren van twee afzonderlijk geïsoleerde *P. aeruginosa* stammen aan te tonen hadden Sykes en Richmond de mogelijkheid van overdracht van *E. coli* naar *P. aeruginosa* moeten bestuderen.

R. B. Sykes en M. H. Richmond (1970). *Nature* 226, 952.

IV

Ten onrechte wordt door Sanderson gesteld dat de afwezigheid van overeenkomst in chromosoomkaarten van enerzijds de *Enterobacteriaceae* en anderzijds niet verwante bacteriesoorten (zoals *Bacillus* en *Pseudomonas*) samengaat met de onmogelijkheid van overdracht van genetisch materiaal.

K. E. Sanderson. In: *Advance in Genetics*, 1971.

V

Als een specificatie van cellen in een weefselkweek, die gebruikt wordt om in vitro de toxische eigenschappen van chemische verbindingen te testen, ontbreekt, kan men niet die specifieke waarde aan de resultaten hechten die gesuggereerd wordt door het noemen van het orgaan waaruit het weefsel voor de kweek genomen is.

Th. F. Paine en J. Nagington (1971). *Nature, New Biol.* 233, 108.

VI

De relatie die is waargenomen tussen het voorkomen van anomalieën, carcinomen en andere afwijkingen bij marine organismen en de vervuiling van hun milieu, kan beschouwd worden als het resultaat van een in vivo studie betreffende de mutagene en carcinogene eigenschappen van geloosde afvalstoffen. Het verdient aanbeveling om de mogelijke oorzaken en gevolgen te inventariseren en te bevestigen met experimenten, opdat gefundeerd opgetreden kan worden tegen een achteloze lozing van dergelijke stoffen.

P. H. Young (1964). Calif. Fish and Game 57,33

VII

De grote verzamelwoede van enkele biologen is voor zeldzame planten een garantie dat zij zeldzaam zullen blijven.

VIII

Het is even absurd de arbeidsbevrediging te betrekken in het inkomen als reëel inkomensbestanddeel als het voordeel uit doe-het-zelf werkzaamheden.

J. Wemelsfelder. L & S Magazine, april 1974.
(Maandblad voor lijn- en staffunctionarissen).
J. Tinbergen. L & S Magazine, juni 1974.

IX

Bij vergaande loonnivellering is leerplicht de enige methode om te voorzien in de behoefte voor geschoold en hoger personeel.

X

Bij het eerste kind verheugt men zich in de vooruitgang, bij het tweede in de hulpeloosheid van de kleine.

**GENETICA VAN PSEUDOMONAS PUTIDA
ONTWIKKELING VAN TECHNIEKEN VOOR GEN-KARTERING
IN DE STAM PMBL-L**

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN
DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN AAN
DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG
VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. A.E. COHEN,
HOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN,
VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN
TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 23 OKTOBER 1974
TE KLOKKE 14.15 UUR

DOOR

JOHANNA MARTINA AMELINK-KOUTSTAAL

GEBOREN TE 's-GRAVENHAGE, 1941

Krips Repro B.V., Meppel

PROMOTOR: PROF. DR. IR. A. RÖRSCH

Het onderzoek werd verricht onder leiding van
Dr. Ir. P. van de Putte

AAN WOUT EN KARIN

INHOUD

		pag.
	AFKORTINGEN EN SYMBOLEN	9
HOOFDSTUK I	INLEIDING	11
HOOFDSTUK II	MATERIAAL EN METHODEN	15
	II.1 Bacteriestammen	15
	II.2 Het kweken van de bacteriën	15
	II.3 Het isoleren van mutanten	16
	II.4 Media en chemicaliën	18
HOOFDSTUK III	ISOLATIE EN KARAKTERISERING VAN EEN TRANSDUCERENDE FAAG VOOR PMBL-L1	20
	III.1 Inleiding	20
	III.2 Isolatie fagen	21
	III.3 Karakterisering van PP8	21
	III.3.1 Phenotypische eigenschappen van PP8	22
	III.3.2 Morfologie van PP8	26
	III.3.3 Isolatie en eigenschappen van het faag-DNA	27
HOOFDSTUK IV	TRANSDUCTIE	29
	IV.1 Inleiding	29
	IV.2 Transductie zonder speciale voorzorgs- maatregelen	29
	IV.2.1 Inleiding	29
	IV.2.2 Resultaten	30
	IV.2.2.1 Transductieprocedure	30
	IV.2.2.2 Transductie-experimenten	33
	IV.3 Methoden ter verbetering van de trans- ductie-frequentie	35
	IV.3.1 Inactiveren van de fagen door bestralen met U.V.	35
	IV.3.2 Voorkomen van herinfectie door toevoe- gen van antiserum	35
	IV.3.3 Transductie met een gastheermutant van PP8	37
	IV.3.4 Toepassen van de temperatuurgevoelig- heid van de PP8-fagen	45
	IV.4 Genkartering door cotransductie	47
	IV.5 Discussie en samenvatting	49

HOOFDSTUK V	CONJUGATIE	54
V.1	Inleiding	54
V.2	Materiaal en methoden	57
V.3	Identificatie van de sex van de L-stammen	57
V.3.1	Inleiding	57
V.3.2	Resultaten	59
V.4	Overdracht van F-factoren van Escherichia coli naar Pseudomonas putida	61
V.4.1	Inleiding	61
V.4.2	Resultaten	62
V.4.2.1	Overdracht van F-lac, F-gal en F-lac (Muets)	62
V.4.2.2	Acridine-oranje gevoeligheid van P. putida F-lac	63
V.4.2.3	Overdracht van F-lac van KMBL-283 naar gecureteerde P. putida F-lac stammen	63
V.5	P. putida F-lac als donor	65
V.5.1	Inleiding	65
V.5.2	Resultaten	65
V.5.2.1	Kruisingen met P. putida als acceptor	65
V.5.2.2	Kruisingen met E. coli als acceptor	66
V.5.2.3	Controle op de aanwezigheid van F-pili	66
V.5.2.3.1	Plauevorming	67
V.5.2.3.2	Adsorptie	67
V.5.2.3.3	Faagvermenigvuldiging	67
V.6	Samenvatting en discussie	69
HOOFDSTUK VI	MUTATIEKARTERING IN SYNCHRONE CULTURES	73
VI.1	Inleiding	73
VI.2	Materiaal en methoden	74
VI.3	Synchronisatie door FPA	76
VI.3.1	Inleiding	76
VI.3.2	Werkwijze	76
VI.3.3	Resultaten	78
VI.3.3.1	Gevoeligheid voor FPA	78
VI.3.3.2	Synchronisatie met FPA	79
VI.4	Synchronisatie door NAL	80
VI.4.1	Inleiding	80
VI.4.2	Werkwijze	81
VI.4.3	Resultaten	81
VI.4.3.1	Gevoeligheid voor NAL; invloed van EDTA	81
VI.4.3.2	Synchronisatie	84
VI.5	Optimale condities voor de NG-behandeling	87
VI.5.1	Inleiding	87
VI.5.2	Resultaten	89
VI.5.2.1	Overleving van P. putida bij pH 5 - 6	89
VI.5.2.2	Optimale concentratie en incubatietijd	89
VI.5.2.3	DNA-synthese in NaAc-buffer	89
VI.5.2.4	Procedure NG-behandeling	89

VI.6	Mutatiekartering	91
VI.6.1	Inleiding	91
VI.6.2	Werkwijze	91
VI.6.3	Resultaten	91
VI.6.4	Complicaties bij de NAL-synchronisatie	97
VI.6.4.1	Versnelde reïnitiatie van de DNA-replicatie	97
VI.6.4.2	Lethale nawerking van NAL	99
VI.6.4.3	Mutageniteit van NAL	100
VI.7	Discussie en samenvatting	101
HOOFDSTUK VII	SAMENVATTING	104
	SUMMARY	107
	LITERATUUR	110
	APPENDIX	115

AFKORTINGEN EN SYMBOLEN

a. ALGEMEEN

DNA	desoxyribonucleïnezuur
EDTA	ethyleen-diamino-tetra-azijnzuur
FPA	para-fluorphenylalanine
K	inactiverings constante van serum
Mg	buffer voor minimaal medium
m.o.i.	multiplicity of infection (Eng.)
NAL	nalidixinezuur
NB	nutrient broth
NG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
OD	optische dichtheid
PCA	perchloorzuur
PEG	poly-ethyleenglycol
p.f.u.	plaque forming units (Eng.)
RNA	ribonucleïnezuur
S	sedimentatie co-efficient
t _D	verdubbelingstijd
TMN	Tris-MgSO ₄ -NaCl buffer
Tris	tri-(hydroxymethyl)aminomethaan
UV	ultravioletlicht (254 nm)

b. GENETISCHE KENMERKEN

<i>atr</i>	afbraak van atropine
<i>cys</i>	biosynthese van cysteine
<i>gal</i>	afbraak van galactose
<i>his</i>	biosynthese van histidine
<i>ilv</i>	biosynthese van isoleucine en valine
<i>lac</i>	afbraak van lactose
<i>leu</i>	biosynthese van leucine
<i>met</i>	biosynthese van methionine
<i>pro</i>	biosynthese van proline
<i>ser</i>	biosynthese van serine
<i>str</i>	resistentie voor streptomycine
<i>tro</i>	afbraak van tropazuur
<i>tpn</i>	afbraak van tropine
<i>trp</i>	biosynthese van tryptofaan

HOOFDSTUK I

INLEIDING

Het bacteriegeslacht *Pseudomonas* is biochemisch en genetisch van belang vanwege de vele verschillende substraten die het als koolstof- en/of stikstofbron kan benutten.

Verschillende *Pseudomonas*-soorten werden geïsoleerd die in staat zijn om bijzondere en complexe verbindingen als koolstofbron te gebruiken zoals amylamine, phenylaminoazijnzuur (den Dooren de Jong 1926), phenol en benzoëzuur (Evans, 1947), kamfer (Bradshaw e.a., 1959), naftaleen (Davies en Evans, 1964) en amandelzuur (Hegeman, 1966). Een genetische analyse van bepaalde stofwisselingsketens heeft veel bijgedragen tot het begrijpen van de regelmechanismen daarvan. Dergelijk onderzoek is bij micro-organismen waarbij genetische informatie uitgewisseld kan worden o.a. via een sexueel proces, zoals bij de *Enterobacteriaceae*, gisten- en schimmels zeer succesvol geweest. Het is van groot belang voor *Pseudomonas* die door zijn biochemische diversiteit een aparte plaats inneemt, goede genetische technieken te ontwikkelen.

Voor *Pseudomonas aeruginosa* zijn reeds als twee goed bruikbare technieken de conjugatie en transductie beschreven door Holloway e.a. (1955, 1959, 1969). Echter voor elke soort die om een bepaalde metabolische activiteit geïsoleerd wordt zal opnieuw een genetisch systeem opgezet moeten worden.

Het onderwerp van dit proefschrift *Pseudomonas putida*, PMBL-L1, werd geïsoleerd op het Medisch Biologisch Laboratorium te Rijswijk om zijn vermogen het alkaloïde atropine af te breken en dit als enige koolstofbron te gebruiken. (Rörsch e.a., 1971). Door Stevens (1969) werd biochemisch vastgesteld hoe de afbraak van atropine verloopt.

Het atropine-esterase dat dé eerste stap in de afbraakketen verzorgt is om zijn structurele eigenschappen van belang in het onderzoek naar de interactie tussen organofosfaten en het actieve centrum van serine-esterasen. Het atropine-esterase wordt hierbij gebruikt als modelsysteem voor deze enzymen (Berends, 1973). Structurele veranderingen in de enzymen kunnen zeer sterk de affiniteit tot de substraten veranderen. Het is wenselijk bij een dergelijk onderzoek gemuteerde enzymen uit mutanten voor het *atr*-locus op hun werking te vergelijken. Om de mutanten genetisch te kunnen karakteriseren en om de genetische organisatie van de genen die bij de afbraak van atropine betrokken zijn te bestuderen was het nodig genetische technieken te ontwikkelen voor deze *P. putida* stam.

In dit proefschrift wordt beschreven hoe de ontwikkeling van drie verschillende genkarteringstechnieken ter hand genomen werd.

De bacterie-genetica is gebaseerd op het bestuderen van fenotypische veranderingen na uitwisseling van genen tussen verschillende stammen, waarbij mutanten die door middel van mutagene agentia gemakkelijk te krijgen zijn van de uit de natuur geïsoleerde stammen, zogenaamde wilde typen. Voor het overbrengen van DNA van de ene cel naar de andere worden drie technieken gebruikt: transductie, hierbij speelt een faag de rol van transporteur; conjugatie, door een onderlinge verbinding tussen twee cellen kan uit de donorcel DNA overgaan naar de acceptorcel; transformatie, opname van vrij DNA door een cel.

De hoeveelheid DNA die met deze technieken overgebracht wordt is verschillend.

Met conjugatie bestaat de mogelijkheid het hele chromosoom over te brengen. Met transductie is men afhankelijk van het volume van de faag en bij transformatie van de schade die men aanbrengt bij de bereiding van het DNA dat meestal in brokstukken van $\pm 10^6$ daltons breekt.

Door de aard van het mechanisme is conjugatie de meest bruikbare methode om snel een overzicht te verkrijgen van de plaatsen van alle mogelijke genen op het chromosoom. Transductie en transformatie worden over het algemeen gebruikt om in een beperkt gebied een gedetailleerd overzicht te geven van genen van een zelfde locus en van bij elkaar gelegen loci in relatie tot elkaar. Zo kan inzicht verkregen worden of functioneel gekoppelde genen ook genetisch gekoppeld

zijn. De frequentie van het gelijktijdig overbrengen van meerdere genen is dan een maat voor hun onderlinge afstand. Door zorgvuldig gekozen selectiemethoden en gebruik van verschillende mutanten kunnen we uit de verkregen recombinanten de aard van de mutaties en de ligging op het chromosoom vast stellen.

Een andere mogelijkheid om het chromosoom in kaart te brengen waarbij geen overdracht van DNA nodig is, is de mutatiekartering in synchrone cultures. Deze methode, beschreven en toegepast o.a. voor *Escherichia coli* (Cerda-Olmedo e.a., 1968; Ward e.a., 1969, 1970), biedt een uitweg voor het geval bovengenoemde technieken op korte termijn niet te verwezenlijken zijn.

Bij de aanvang van dit onderzoek was over genetische technieken voor *Pseudomonas putida* weinig bekend. Als enige bruikbare techniek was voor niet verwante *P. putida*-stammen de transductie beschreven (Chakrabarty e.a., 1968; Holloway en van de Putte, 1968). Een transducerende faag kan o.a. uit rioolwater geïsoleerd worden. Alleen in een zeer beperkt gebied zijn genen gelokaliseerd (Gunsalus e.a., 1968). Transformatie als genkarteringstechniek werd door Khan en Sen (1967) op verscheidene andere *Pseudomonas* soorten toegepast op zeer beperkte schaal.

Om de genetica van de *P. putida* PMBL-L stammen te ontwikkelen leek het wenselijk zowel een algemene karteringstechniek als een voor fijnlokalisatie mogelijk te maken. Omdat hierbij de belangstelling sterk gericht was op de organisatie van de genen in het *atr*-locus werd het onderzoek eerst gericht op een techniek voor fijnlokalisatie. Transformatie heeft als voordeel dat de frequentie waarmee genen overgebracht worden onder optimale omstandigheden een weinig hoger ligt dan voor transductie. Uit resultaten van experimenten die aan ons onderzoek vooraf gingen was gebleken dat transformatie voor de L-stammen niet eenvoudig te verwezenlijken was. Daarom zijn wij gestart met de transductie.

In hoofdstuk III en IV worden de faagisolatie en transductie beschreven.

Daarnaast om een begin van een chromosoomkaart te kunnen maken werd zowel de mogelijkheid van conjugatie als van mutatiekartering voor de L-stammen bestudeerd. Hoofdstuk V gaat over de experimenten die gedaan zijn om de sex van L-stammen te bepalen. Deze bleken van

nature F^- te zijn waardoor conjugatie met een eigen sexfactor niet mogelijk was. Dit was aanleiding om een F-factor van *Escherichia coli* naar PMBL-L1 over te dragen om op deze wijze te proberen toch conjugatie mogelijk te maken.

In hoofdstuk VI wordt de mutatiekartering behandeld waarbij twee technieken om de groei van de stammen te kunnen synchroniseren.

Omdat in de verschillende hoofdstukken op zichzelf staande onderwerpen aan de orde komen worden de discussies hierover en over de betreffende resultaten aan het eind van elk hoofdstuk gegeven. In hoofdstuk VII wordt een samenvatting gegeven van het gehele proefschrift.

HOOFDSTUK II

MATERIAAL EN METHODEN

II.1 BACTERIESTAMMEN

Het wilde type waarvan alle mutanten afgeleid zijn is PMBL-L1. Deze bacteriestam werd geïsoleerd door Rörsch e.a. (1971) met de specifieke eigenschap dat hij in staat is te groeien op atropine als enige koolstofbron. PMBL-L1 werd door Wensinck (1971) gedetermineerd als een *Pseudomonas putida* biotype A volgens de methode van Stanier e.a. (1966).

Alle mutanten van dit wilde type afgeleid worden collectief aangegeven met L-stammen.

II.2 HET KWEKEN VAN DE BACTERIËN

De bacteriën werden gekweekt in rijk en minimaal medium resp. NB en M9, bij 28°C. (Het temperatuuroptimum voor de groei van L1 ligt bij 28 - 29°C.)

De groei werd gevolgd door het meten van de optische dichtheid (OD_{700}) die als maat voor de celdichtheid van de cultuur gebruikt werd. Hierbij werd gebruik gemaakt van een Vitatron colorimeter (type UC200) met een 703 nm filter.

P. putida is een obligaat aerob organisme. De groei is sterk afhankelijk van de aeratie van de cultuur. Daarmee hangt nauw samen de verhouding van het volume van de kweek en het volume van de kolf. Door ons werd een verhouding van 1 : 10 aangehouden. Voor de aeratie werden de kolven geschud met ± 100 slagen per minuut in een op 28°C gehouden waterbad. Onder deze omstandigheden was de generatietijd van L1 in NB ± 45 minuten en in M9 ± 75 minuten.

De bacteriën werden verzameld door middel van centrifugatie met lage snelheid, uitgevoerd in een Homef type L-30 of een Sorvall

type M centrifuge, of door middel van filtratie over een 0.45 μ filter (Millipore of Sartorius).

Het aantal kolonievormende cellen per ml cultuur werd bepaald door geijkte hoeveelheden (0.1 ml) van daartoe geschikte verdunningen uit te platen op NB-platen.

II.3 HET ISOLEREN VAN MUTANTEN

De voor dit onderzoek gebruikte mutanten werden geïsoleerd van het wilde type met het mutagene agens N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NG).

De NG-behandeling werd uitgevoerd met een exponentieel groeiende cultuur. De cellen werden overgebracht naar synthetisch medium waarin NG opgelost was tot een eindconcentratie van 0.1 - 0.2 mg/ml. De incubatie met NG duurde 15 - 45 minuten, waarbij de overleving varieerde van 10 - 0.1%. Voor auxotrofe kenmerken werden de cellen meteen na uitwassen van de NG uitgeplaat op NB tot een dichtheid van ongeveer 100 kolonies per plaat.

De mutanten werden geselecteerd met behulp van de replica-methode van Lederberg en Lederberg (1952).

Voor mutanten, die geblokkeerd zijn in de atropine-afbraak werden de met NG behandelde cellen verdeeld over een aantal subcultures in M9-medium en na \pm 15 uren kweken op platen gebracht. Mutanten geïsoleerd uit de verschillende subcultures konden als onafhankelijk geïnduceerde mutanten beschouwd worden.

De gevoeligheid voor NG wordt sterk bepaald door het medium en is in medium waarin groei van de cellen plaatsvindt, groot. Dit berust er waarschijnlijk op dat de voorkeursplaats waar NG inwerkt de replicatievork is (Cerde Olmedo e.a., 1968). Onder groeibevorderende omstandigheden, dus bij actieve DNA-replicatie zal het gebied waar NG op inwerkt groot zijn. Onder deze omstandigheden konden grote deleties in het *atr*-gebied geïsoleerd worden. Bij een korter durende incubatietijd konden ook puntmutaties geïnduceerd worden.

De mutanten die geblokkeerd zijn in een specifieke stap in de afbraak voor atropine worden aangeduid met: *atr* voor inactivering van het atropine esterase, *troA* voor inactivering van het tropazuur-dehydrogenase, *troB* voor het 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde-decarboxylase en *troC* voor het fenylacetaldehyde-dehydrogenase.

TABEL 1

Eigenschappen en herkomst van de meest gebruikte bacteriestammen

collectie nr. 1)	kenmerken	ouderstam	isolatiemethode
FMBL-L1	w.t.		spontaan op atropine
FMBL-L3	<i>his1</i>	L1	NG
FMBL-L11	<i>ser1</i>	L1	NG
FMBL-L19	<i>met3</i>	L1	NG
FMBL-L24	<i>arg1</i>	L1	NG
FMBL-L53	<i>ilv5</i>	L1	NG
FMBL-L54	<i>cys4</i>	L1	NG
FMBL-L55	<i>his4</i>	L1	NG
FMBL-L58	<i>cys4 leu5</i>	L54	NG
FMBL-L63	<i>cys4 pro3</i>	L54	NG
FMBL-L64	<i>his4 ilv7</i>	L55	NG
FMBL-L66	<i>his4 pro4</i>	L55	NG
FMBL-L67	<i>ilv5 his6</i>	L53	NG
FMBL-L73	<i>his4 ilv7 str</i>	L64	NG
FMBL-L90	<i>cys4 pro3 str</i>	L63	NG
FMBL-L108	<i>trp2</i>	L1	NG
FMBL-L301	<i>met3 atr17</i>	L19	NG
FMBL-L403	<i>atr32 troA31 troB30 troC13</i>	L1	NG
FMBL-L408	<i>atr37 troB35</i>	L1	NG
<u>isolatie</u>			
<u>nr.</u>			
AG 1	w.t. <i>PP10^R</i>	L1	faagresistentie
AG 5	<i>trp5</i>	AG 1	NG
AG 15	<i>trp6 met16</i>	AG 1	NG
AG 15.1	<i>trp6 met16 ilv9</i>	AG 15	NG
AG 15.2	<i>trp6 met16 leu17</i>	AG 15	NG
AG 15.3	<i>trp6 his7</i>	AG 15	NG
AG 15.57	<i>trp6 ser4</i>	AG 15	NG
AG 15.63	<i>trp6 leu22</i>	AG 15	NG

1) voor referenties Rörsch e.a. (1967)

Deze genen worden collectief aangegeven met *atr*-genen.

Om de genotypische kenmerken van de auxotrofe mutanten aan te geven werd de drielettercode van Demerec e.a. (1966) aangehouden.

De belangrijkste mutanten waarmee in dit onderzoek gewerkt is staan vermeld in tabel 1.

II.4 MEDIA EN CHEMICALIËN

Samenstelling van de media was als volgt:

NB : per liter water 8 gram nutrient broth (Difco), 5 gram gistextract (Difco) en 5 gram NaCl; pH 7.0 - 7.1.

M9 : 40 ml oplossing A, 10 ml oplossing B aangevuld tot 1 l met water; pH 7.0. Toegevoegd werden apart, direkt voor het gebruik, de koolstofbronnen, glucose en lactose tot 1%; atropine, tropine en tropazuur tot 0.5%; zonodig aminozuren tot 50 µg/ml en sporenelementen 1 : 100 uit de stockoplossing.

Samenstelling A : per liter :

75 gram KH_2PO_4 en 188 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

B : per liter : 20 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 gram NaCl en 100 gram NH_4Cl .

Sporenelementen : 100 x geconcentreerd per liter : 0.8 gram MgSO_4 , 1.0 gram CaCl_2 , 0.08 gram NH_4 -molybdaat, 1.0 gram ZnSO_4 , 0.4 gram H_3BO_3 , 0.1 gram CuSO_4 , 0.1 gram CoSO_4 , 0.4 gram FeSO_4 , 20.0 gram MnSO_4 , 50.0 gram KCl, 50.0 gram NH_4Cl en 0.05 gram Na-Verseen; bufferen tot pH 7.2 met 1.0 M Tris.

Andere rijke media die incidenteel gebruikt werden (hoofdstuk V) waren LC : per liter 10 gram trypton (Difco), 5 gram gistextract (Difco) en 10 gram NaCl; pH 7.1.

trypton : per liter 10 gram trypton (Difco), 5 gram gistextract (Difco) en 1 gram MgSO_4 ; pH 7.0.

Voor het maken van agarplaten werd 1.8% agar (Difco) toegevoegd. Als buffers werden gebruikt:

TMN : 0.01 M Tris, 0.15 M NaCl en 0.01 M MgSO_4 ; pH 7.4.

HMP : 0.01 M K-fosfaat; pH 7.0.

Het water was voor gebruik gedemineraliseerd of gedestilleerd. Sterilisatie werd gedaan door autoclaveren bij 110°C gedurende 20 minuten of door seitz-filtratie (koolstofbronnen).

De chemicaliën waren alle van pro analyse kwaliteit betrokken van Merck A.G. Duitsland en British Drug Houses Ltd. Engeland.

Bijzondere chemicaliën : NG : Aldrich Chemical Co., Wisconsin (U.S.A.); NAL : Calbiochem, B Grade (U.S.A.); FPA : Sigma (St.Louis. U.S.A.); EDTA : Siegfried A.G. (Zwitserland); Tris : Koch-Light Labs (Engeland); streptomycine : Mycofarm (Delft); mitomycine C : Kyowa Hakko Kogyo (Tokio); (+) atropine-sulfaat : Brocades-Steeman & Pharmacia (Amsterdam); tropazuur : Mac Farlan Smith Ltd. (Schotland); tropine : Fluka A.G. Buch S.G. (Zwitserland); albumine : gedroogd runder-serum, Poviet (Amsterdam).

HOOFDSTUK III

ISOLATIE EN KARAKTERISERING VAN EEN TRANSDUCERENDE BACTERIO-FAAG VOOR PMBL-L1

III.1 INLEIDING

Onder transductie verstaan we het overbrengen van genetisch materiaal met behulp van bacterio-fagen. Om transductie te kunnen uitvoeren moeten we zogenaamde transducerende fagen hebben. Fagen kunnen geïsoleerd worden uit lysogene stammen zoals onder andere lambda voor *Escherichia coli* en verschillende fagen voor *Pseudomonas aeruginosa* (Hayes, 1968; Holloway, 1969) of uit afvalwater.

Van *Pseudomonas putida* is een natuurlijk lysogene stam bekend waaruit 4 fagen geïsoleerd zijn die algemeen kunnen transduceren (Bertland, 1964). Het is niet bekend of de stam voor meerdere fagen lysogeen is of de 4 geïsoleerde fagen verschillende mutanten zijn van één faag. Uit een van deze fagen werd een "clear plaque" mutant geïsoleerd die de transducerende eigenschap behouden heeft, de zgn. pf 16 faag (Niblack, 1968; Gunsalus e.a., 1968). Transductie met pf 16 beperkt zich niet tot de kamfer afbrekende stam waarvoor hij geïsoleerd werd, maar maakt transductie mogelijk tussen verscheidene *putida* stammen en naar *P. aeruginosa* (Chakrabarty e.a., 1968, 1970).

De voor *P. putida* beschreven fagen kunnen zich niet vermenigvuldigen op de atropine afbrekende PMBL-stammen. Voor PMBL-4B1 werden de transducerende fagen PP1 en PP1C, een "clear plaque" mutant van PP1, geïsoleerd die evenmin plaques vormen op de andere PMBL-stammen (Holloway en van de Putte, 1968).

In dit hoofdstuk wordt de isolatie en karakterisering van een transducerende faag beschreven, voor de atropine afbrekende *P. putida*-stam PMBL-L1 die door het biochemisch werk dat er aan verricht is centraal staat in het atropine-esterase onderzoek

(Stevens, 1969; Rörsch e.a., 1971; Oosterbaan en Berends, 1971; Amelink-Koutstaal en van de Putte, 1971).

III.2 ISOLATIE FAGEN

Uit rioolwater werden op de volgende manier enkele fagen geïsoleerd:

Een hoeveelheid rioolwater werd 15 minuten geïncubeerd en geschud met chloroform en daarna gecentrifugeerd om bacteriën en andere verontreinigingen te verwijderen. Van het supernatant werd de chloroform afgeblazen en 5 ml gemengd met 20 ml van een exponentieel groeiende cultuur van L1 met een dichtheid van $5-10 \times 10^7$ cellen per ml in een erlenmeyer van 250 ml en ongeveer 15 uur geïncubeerd bij 28°C stilstaand.

Na incubatie werd de cultuur verzadigd met chloroform en na 15 minuten gecentrifugeerd. Het supernatant werd getitreerd op L1 als indicator stam. De verschillende plaques werden apart geïsoleerd en gesuspenderd in NB bouillon en getitreerd op L1. Dit werd een paar maal herhaald tot in elk lysaat 1 type faag aanwezig was.

Geïsoleerd werden PP2, PP3, PP4, PP5, PP6, PP7, PP8, PP10 en PP13. Al deze fagen uitgezonderd PP3 en PP8 maken heldere plaques op L1. PP3 en PP8 maken troebele plaques.

De kans op transductie is het grootst met fagen die troebele plaques vormen, de zogenaamde gematigde fagen, en het kleinst met de zogenaamde virulente fagen die heldere plaques vormen. PP4 bleek een "clear plaque" mutant van PP3 te zijn. PP3 en PP4 waren instabiele fagen die lysaten met lage titers gaven. Met electronenmicroscopie bleek dat in deze lysaten veel incomplete fagen voorkomen. Deze fagen werden derhalve niet in het onderzoek betrokken.

Van PP8 werden de transducerende en fenotypische eigenschappen nader bestudeerd.

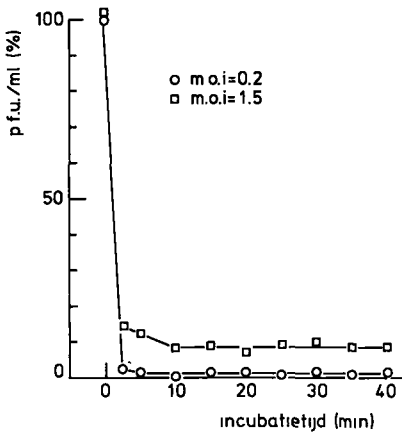
III.3 KARAKTERISERING VAN PP8

Nadat aangetoond was dat PP8 een algemeen transducerende faag is (zie hoofdstuk IV) werden de fenotypische eigenschappen en de morfologie van PP8 bestudeerd en het faag DNA na isolatie gekarakteriseerd.

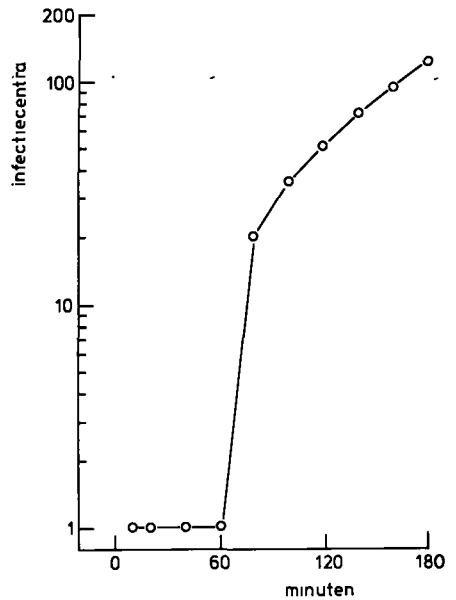
III. 3.1 FENOTYPISCHE EIGENSCHAPPEN VAN PP8

Voor het bestuderen van de eigenschappen van de faag werden de standaard technieken beschreven door Adams (1959) toegepast. Alle experimenten vonden plaats bij 28°C de kweektemperatuur van L1.

De plaques van PP8 op L1 zijn troebel en ± 1 mm in doorsnede op NB agar in een toplaag met 0.7% agar. Met een frequentie van 1×10^{-4} worden ook heldere plaques gevormd die na isolatie op



Figuur 1.



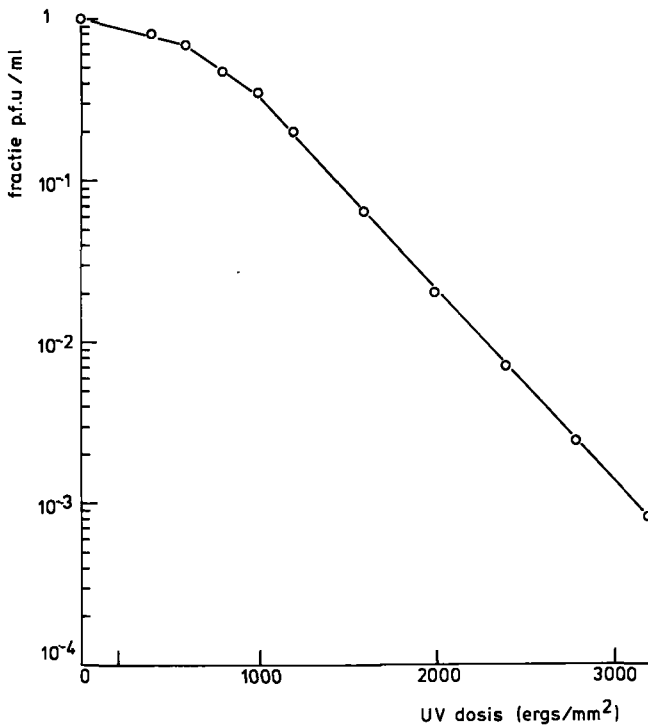
Figuur 2.

Figuur 1. Adsorptie van PP8 aan L1 bij twee verschillende m.o.i.'s gemeten als de afname van het aantal vrije p.f.u. gedurende de incubatietijd van het infectiemengsel.

Figuur 2. Groeicurve van PP8 op L1 in NB, gemeten volgens de "one-step growthcurve" techniek (Adams 1959). Infectie van de bacteriën op $t = 0$. Op $t = 6$ werden de vrije niet geadsorbeerde fagen geïnactiveerd met antiserum tegen PP8. Op $t = 9$ werden de 10^{-4} en 10^{-6} verdunningen gemaakt waaruit 0.1 ml getitreerd werd met L1 als indicator. Het eerste monster werd 10 minuten na infectie getitreerd.

hun beurt met ongeveer dezelfde frequentie ook weer troebele plaques geven. De titers van lysaten gemaakt door confluenta lysis op agar platen waren 10^{10} - 10^{11} p.f.u. per ml (plaque vormende eenheden). Vloeistofcultures geven minder hoge titers nl. $\pm 5 \times 10^9$ p.f.u./ml. De titers veranderden nauwelijks gedurende meer dan een jaar.

De fagen adsorberen voor minstens 90% binnen 10 minuten aan L1 bij een multipliciteit van infectie (m.o.i.) niet hoger dan 2. De adsorptie is optimaal bij een minimale celdichtheid van 5×10^8 bacteriën per ml in de exponentiële groeifase. In figuur 1 zijn de adsorptie karakteristieken weergegeven voor een m.o.i. = 0.2 en 1.5. Met NB of TMN als medium was er geen verschil in adsorptie.



Figuur 3. Inactivering van PP8 door U.V. Uitgezet is de afname van het aantal p.f.u. in een bestraalde faagsuspensie ten opzichte van een onbestraalde controle tegen de dosis U.V.

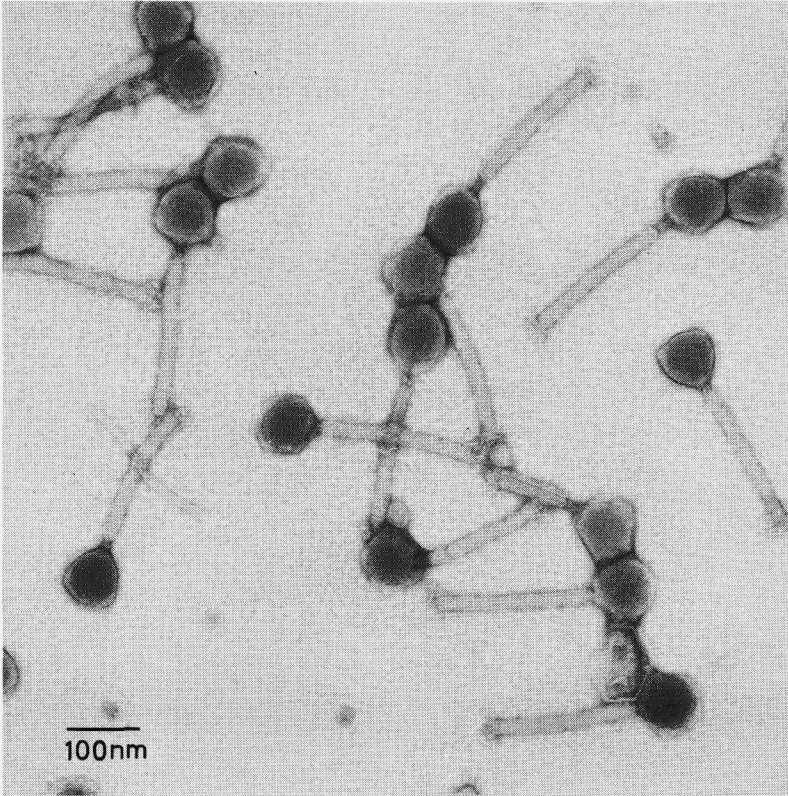


Foto 1

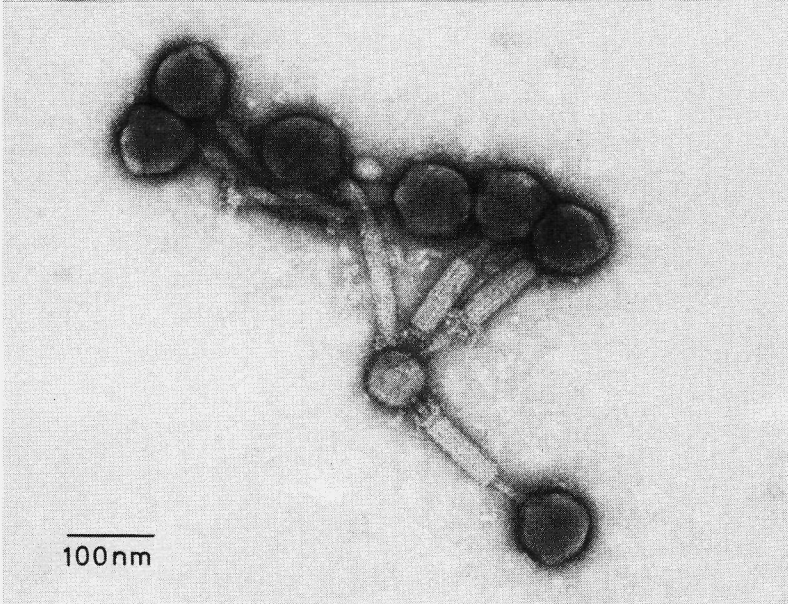


Foto 2

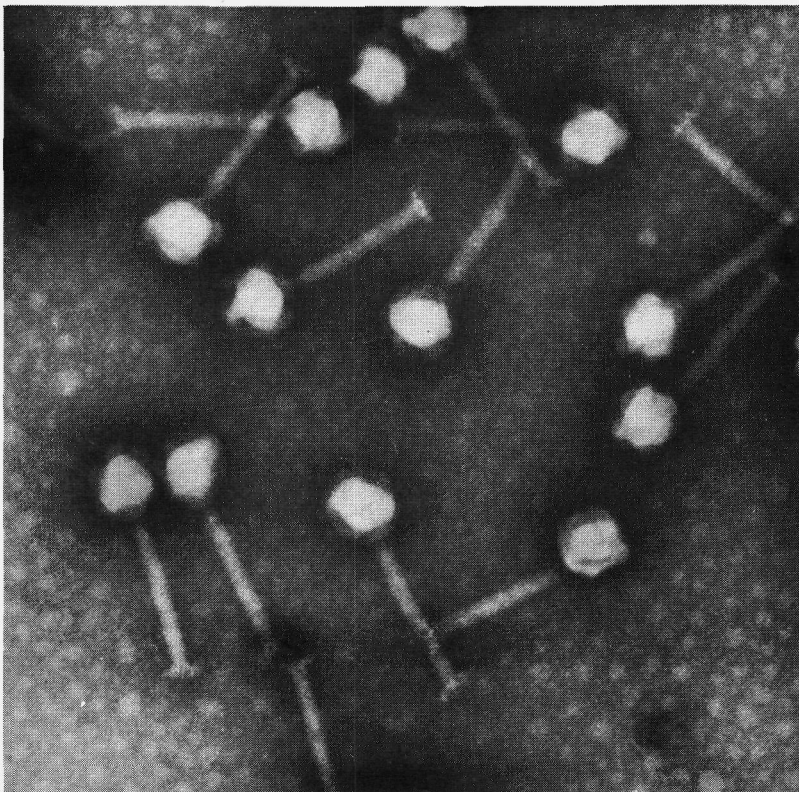


Foto 3

Foto 1. PP8 fagen uit de fractie met de dichtheid van 1.48 g/cm^3 . (negatief gekleurd met uranylacetaat).

Foto 2. PP8 fagen gebonden aan een celwandpartikel, uit de fractie met de dichtheid van 1.46 g/cm^3 (negatief gekleurd met uranylacetaat).

Foto 3. PP8 fagen; positief gekleurd met fosforwolframzuur. Voor de kleuring werden de fagen gefixeerd met glutaraldehyde.

Na adsorptie duurt het ongeveer 60 minuten voordat lysis plaatsvindt. Bij lysis komen uiteindelijk ± 100 fagen per geïnfecteerde bacterie vrij (zie figuur 2), die in eerste instantie voor een deel aan celwand-partikels gebonden worden en later weer vrijkomen. De eigenlijke burst wordt daardoor te laag gemeten (zie III.3.2.2 en IV.3.3.2.1).

De gevoeligheid van PP8 voor bestraling met U.V. is weergegeven in figuur 3. Daarin is uitgezet de afname van het aantal p.f.u. met toenemende dosis U.V. Bestraald werd een ruw lysaat verdund tot 10^8 p.f.u./ml in TMN. Gemeten werd een inactivering met een factor 10 per 1000 erg/mm² bij een dosis van meer dan 1000 ergs/mm².

PP8 vormt alleen plaques op L1 en niet op de andere atropine-afbrekende stammen. Het was niet mogelijk uit de troebele plaques voor PP8-lysogene cellen te isoleren. Waarschijnlijk is PP8 toch een virulente faag. Waarom door een virulente faag troebele plaques gevormd kunnen worden en transductie aantoonbaar is wordt besproken in hoofdstuk IV.2.3.

III.3.2 MORFOLOGIE VAN PP8

Om met de electronenmicroscop de faagdeeltjes te kunnen bestuderen werden de fagen gekweekt in vloeistofcultures en geconcentreerd uit het ruwe lysaat op de volgende twee manieren:

1. door differentiële centrifugatie. Na korte centrifugatie bij een laag toerental om celdebris te verwijderen, werd het lysaat gecentrifugeerd bij een hoog toerental overeenkomend met 30.000 x g gedurende 90 minuten om de fagen neer te slaan. Na resuspenderen gedurende ± 16 uur in TMN werd de procedure tweemaal herhaald.
2. door neerslaan met 7% polyethyleenglucol (PEG 6000, Shell) volgens Yamamoto (1970).

De PEG-pellets werden ook in TMN opgenomen.

Het verlies aan p.f.u. was door differentiële centrifugatie ongeveer 90%, met neerslaan door PEG 10%.

Na concentreren werden de fagen gezuiverd in een CsCl gradient. De faagsuspensie werd gemengd met CsCl tot een brekingsindex van ± 1.379 en gedurende 15 - 18 uur gecentrifugeerd bij

30.000 rpm in een SW50 rotor in een preparatieve ultracentrifuge Spinco, model L. Voor electronenmicroscopie werden de fracties gedialyseerd tegen ammoniumcarbonaatbuffer pH 8.5.

In de CsCl-gradient werden meestal 3 bandjes aangetroffen met een dichtheid (ρ) van resp. ± 1.46 , 1.48 en 1.52 g/cm^3 . Deze waarden werden bevestigd met een analytische ultracentrifuge Spinco model E.

De fagen die in de drie bandjes voorkomen werden bekeken met een electronenmicroscop van Philips, model E.M.200. Op de foto's 1 en 3 zijn PP8 fagen te zien die voorkomen in het bandje met $\rho = 1.48 \text{ g/cm}^3$.

De kop is een icosaeëder met een rib van $50 \text{ m}\mu$, de staart heeft een lengte van $140 \text{ m}\mu$ en is $16 \text{ m}\mu$ dik. Op de staart is duidelijk een dwarsgestreepte fijnstructuur te zien. Tussen kop en staart is een smalle verbinding te zien die $5.5 \text{ m}\mu$ lang is en $10 \text{ m}\mu$ dik. De staart komt uit in een basaalplaat met korte uitsteeksels van 5 tot $10 \text{ m}\mu$ lang. De lange hechtvezels zijn alleen zichtbaar als de fagen gekoppeld zijn aan een restant celwand. Dit is op foto 2 te zien. Het bandje van $\rho = 1.52 \text{ g/cm}^3$ bestaat uit losgeraakte koppen gevuld met DNA en weinig hele fagen, die waarschijnlijk als verontreiniging meegekomen zijn in de gradient uit de fractie $\rho = 1.48 \text{ g/cm}^3$. De fagen in het bandje met $\rho = 1.46 \text{ g/cm}^3$ zitten veel in groepjes vast aan restanten celwand (zie foto 2). De koppen zijn bijna allemaal gevuld. Na differentiële centrifugatie worden voornamelijk de bandjes met een dichtheid van 1.48 en 1.52 g/cm^3 aangetroffen. Door deze methode om de fagen te concentreren worden de koppen losgemaakt van de staarten. Door concentreren met PEG worden veel minder fagen beschadigd en gebroken in koppen en staarten. Na concentreren op deze wijze worden voornamelijk de bandjes met $\rho = \pm 1.46$ en 1.48 g/cm^3 aangetroffen.

III.3.3 ISOLATIE EN EIGENSCHAPPEN VAN HET FAAG DNA

De over CsCl gradienten gezuiverde fagen werden meestal behalve voor electronenmicroscopie, gedialyseerd tegen Tris-buffer.

Voor de isolatie van het faag DNA werd de faagsuspensie verdund tot $\pm 10^{12}$ faagdeeltjes per ml in 0.01 M fosfaatbuffer pH 7.0.

Het DNA werd geëxtraheerd met fenol volgens Mandel en Hershey (1960). Zesmaal schudden met vers gedestilleerde ether was voldoende om uit het DNA-preparaat de phenol te verwijderen.

Allereerst werd bepaald of het geïsoleerde nucleïnezuur DNA of RNA was door de orcinol-reactie specifiek voor RNA te vergelijken met de diphenylamine-reactie die specifiek is voor DNA (Schneider, 1957; Burton, 1956).

Uit de resultaten bleek duidelijk dat PP8 DNA bevat.

De structuur en het molecuulgewicht van het faag DNA werd bepaald door sedimentatie-analyse in de analytische ultracentrifuge Spinco, model E, volgens Vinograd e.a. (1963) met band en zone sedimentatie en in sucrosegradienten volgens de techniek beschreven door van der Schans e.a. (1969). De S-waarden gevonden met de analytische centrifuge en met sucrosegradienten kwamen goed overeen op een waarde van 44 voor natief DNA. In alkalische sucrosegradienten werd voor het gedenatureerde DNA een $S=127$ gevonden.

In de gradienten voor natief en gedenatureerd DNA was slechts één piek aanwezig wat duidt op slechts één sedimenteerbare vorm. Uit het verschil in S-waarden voor gedenatureerd en natief DNA blijkt dat het DNA molecuul dubbelstrengig moet zijn. Met als referentie waarden de molecuulgewichten van het DNA van T4 en T7 en de lineaire structuren van het DNA van PM_2 en ϕX , respectievelijk 120, 25, 6 en 3.4×10^6 daltons werd het molecuulgewicht van het PP8-DNA bepaald op 55×10^6 daltons.

De dichtheid van het faag DNA is 1.722 g/cm^3 . Dit werd vergeleken met de dichtheid van het bacterieel DNA van PMBL-L1. De dichtheid van dit DNA werd bepaald op 1.721 g/cm^3 . Als referentie waarde werd het DNA van T4 met een $\rho = 1.698 \text{ g/cm}^3$ meegenomen. Scheiding van transducerende fagen en infectieuze fagen is op grond van deze overeenkomst in dichtheid van het DNA niet te verwachten.

HOOFDSTUK IV

TRANSDUCTIE

IV.1 INLEIDING

Na de isolatie van PP8, die troebele plaques vormt op L1 werden de transducerende eigenschappen van deze faag nader bestudeerd.

De resultaten van de transductie-experimenten worden in dit hoofdstuk beschreven in twee paragrafen.

De eerste paragraaf behandelt de transducties zonder speciale voorzorgsmaatregelen om de transductanten te beschermen tegen herinfectie. In de tweede paragraaf wordt de invloed op de transductie frequentie behandeld, van de methoden die toegepast werden om lysis van transductanten te voorkomen. Gekeken werd ook naar de koppeling van genen door middel van cotransductie voor zover dit mogelijk was.

De transductieprocedure zoals die in alle experimenten gebruikt werd na optimalisatie wordt beschreven in IV.2.2.1.

IV.2 TRANSDUCTIE ZONDER SPECIALE VOORZORGSMATREGELEN

IV.2.1 INLEIDING

Bestudeerd werd het vermogen van PP8 om een aantal verschillende genen te transduceren.

In eerste instantie werd uitgegaan van de transductie-procedure die door Holloway en van de Putte (1968) wordt beschreven voor *Pseudomonas aeruginosa*. Deze werd gewijzigd na optimaliseren van de omstandigheden voor PP8 en de PMBL-L-stammen. De gewijzigde procedure wordt beschreven.

Vergeleken werd het transducerend vermogen van de fagen die in

de verschillende bandjes van de CsCl gradient gezuiverd werden. De transducties werden gedaan met auxotrofe en substraatmutanten van L1 waaronder dubbelmutanten die naast een gemeenschappelijke mutatie in een *trp*-gen een ander auxotroof kenmerk hebben. Deze mutanten werden ook gebruikt voor de genkartering waarbij het *trp*-gen als referentie dienst deed (zie hoofdstuk VI).

IV.2.2 RESULTATEN

IV.2.2.1 Transductieprocedure

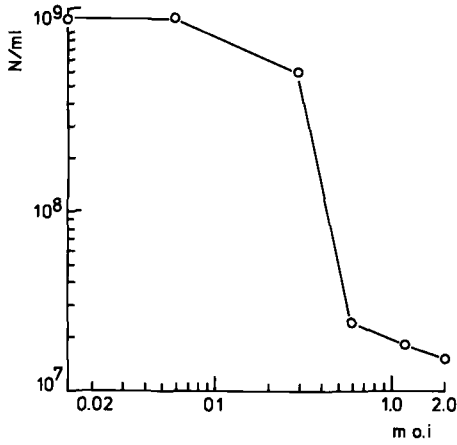
Voor de transductie werd een vers faaglysaat gebruikt verkregen van confluente lysis op NB-agar. De toplagen werden 1 : 1 verdund in TMN. Na incubatie met chloroform en centrifugeren werden de resterende bacteriën verwijderd door het lysaat te filtreren over een 0.45 μ milliporefilter. De bacteriën werden na opgroeien afgecentrifugeerd en opgenomen in TMN tot een dichtheid van 10^9 cellen

TABEL 2

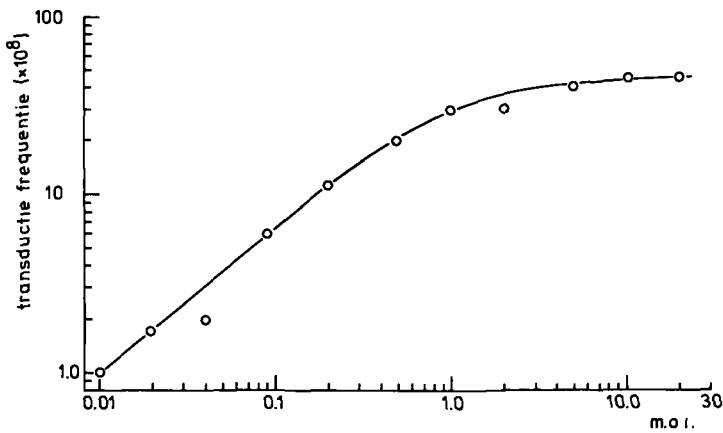
Invloed van het groeistadium van de cultuur (uitgedrukt in OD₇₀₀) op de transductiefrequentie. Voor het verkrijgen van eenzelfde celdichtheid ($\pm 1 \times 10^9$ cellen per ml.) werden de oorspronkelijke culturen een aantal malen geconcentreerd. Transductie: PP8 (L1) x AG15, selectie voor *trp*; m.o.i. = 0.3 .

OD ₇₀₀	transductiefrequentie ¹⁾ per 10^8 bacteriën
0.25	15.5
0.5	5.8
0.75	3.8
1.0	2.0
1.5	2.4

1) De transductiefrequentie is gecorrigeerd voor de terugmutatiefrequentie.



Figuur 4. Afname van het aantal vitale cellen (N/ml) in een transductiemengsel van L3 en PP8(L1) na 25 minuten incuberen, uitgezet tegen de gebruikte m.o.i.



Figuur 5. De relatie tussen de transductiefrequentie en de m.o.i. zoals bepaald werd voor het *trp*-gen van AG15 na transducties met faag PP8 en L1 als donor.

per ml. De beste resultaten werden verkregen met een cultuur in de vroege exponentiële groeifase. Dit wordt geïllustreerd in tabel 2 waarin de transductiefrequenties worden gegeven afhankelijk van de groeifase. Alle opgegeven transductiefrequenties zijn gecorrigeerd voor de terugmutatiefrequentie. Beide frequenties werden betrokken op de "viable count" uit de niet geïnfecteerde bacteriesuspensie. Voor de bepaling van de terugmutatiefrequentie werd uitgegaan van het aantal kolonies op de controleplaten met niet geïnfecteerde cellen.

Aan de bacteriesuspensie werden de fagen toegevoegd in een m.o.i. van 0.1 - 0.5. Als m.o.i. is aangehouden de verhouding van de in het infectiemengsel samengevoegde plaquevormende eenheden en vitale cellen.

In figuur 4 is weergegeven de overleving van bacteriën na 20 minuten incuberen in een transductiemengsel met verschillende m.o.i.'s. Daaruit blijkt dat bij m.o.i.'s groter dan 0.3 het merendeel van de cellen door lysis doodgaat. De overlevingskans van de transductanten worden dan gering omdat de kans dat een potentiële transductant dubbel geïnfecteerd wordt, groter wordt.

In figuur 5 is de relatie tussen de m.o.i. en de transductiefrequentie uitgezet voor het *trp*-gen van AG15. Daarin is te zien dat de transductiefrequentie boven een m.o.i. = 0.5 nauwelijks meer toeneemt.

Beneden een m.o.i. van 0.1 is voor de meeste kenmerken geen transductie waar te nemen. Daarom werd standaard aangehouden voor infectie een m.o.i. van 0.1 - 0.5.

Het transductiemengsel werd 25 minuten geïncubeerd bij 28°C. Deze tijd is ruim voldoende om minstens 90% van de fagen te laten adsorberen (zie hoofdstuk III).

Het medium van het transductiemengsel is van weinig invloed. De transducties werden uitgevoerd in TMN.

Na incubatie werden de mengsels gekoeld tot 0°C, gecentrifugeerd en de pellets opgenomen in M9 van 0°C. Op de selectieplaten van M9-medium werd 0.2 ml uitgespateld.

Bij selectie voor een auxotroofkenmerk zijn de transductanten na 1 - 2 dagen zichtbaar, voor de substraatkenmerken *atr* en *tro* na 5 dagen.

IV.2.2.2 Transductie-experimenten

In tabel 3 worden de resultaten samengevat verkregen met transducties voor diverse genen.

Naast de transductiefrequentie wordt ook de terugmutatiefrequentie gegeven. Uit deze tabel blijkt het volgende:

1. PP8 kan meerdere genen transduceren en is dus een algemeen transducerende faag.
2. De waargenomen terugmutatiefrequentie is voor de meeste genen bijna even hoog als de transductiefrequentie. Hierdoor zijn de transducties voor deze genen, onder andere *atr*, nauwelijks significant.
3. De transductiefrequentie is over het algemeen laag. Behalve voor het *trp*-gen van L108 en AG15 stammen is de frequentie duidelijk hoger dan voor de andere genen.
4. De hogere transductie voor *trp* is niet afhankelijk van de stam, maar van het kenmerk zelf. Dit wordt duidelijk gedemonstreerd door de resultaten met de dubbelmutanten. In deze *trp* dubbelmutanten bleef de frequentie voor de andere kenmerken laag terwijl die voor *trp* hoog was.

In tabel 4 worden de resultaten gegeven van de transducties met de PP8 fagen geïsoleerd in de drie CsCl bandjes. De transductiefrequentie is in dit geval betrokken op het aantal plaquevormende eenheden.

Uit de resultaten blijkt dat zich geen speciale transducerende deeltjes laten concentreren in een van de drie dichtheidsbandjes.

Hoewel voor meerdere genen transductie aantoonbaar is, is de transductiefrequentie zo laag dat voor onderzoek naar genkoppeling het aantal transductanten te laag is. Het aantal terugmutanten is in verhouding te hoog om betrouwbare cotransductiepercentages te kunnen bepalen. De verkregen kolonies van de transductanten waren zo gelyseerd dat de lage transductiefrequentie geweten werd aan volledige lysis van transductanten na herinfectie op de selectieplaten. In de volgende paragraaf worden enkele methoden beschreven om de transductiefrequentie te verbeteren door de herinfectie te voorkomen.

TABEL 3

Transductiefrequentie en terugmutatiefrequenties voor diverse genen. Transductie met PP8 en L1 als donor.

Stam	selectie gen	transd. freq. 1)	terugm. freq.
L3	<i>his</i>	5×10^{-8}	6×10^{-9}
L19	<i>met</i>	2×10^{-8}	1×10^{-9}
L58	<i>cys</i>	2×10^{-9}	4×10^{-9}
	<i>leu</i>	1×10^{-8}	5×10^{-9}
L67	<i>his</i>	2×10^{-8}	1×10^{-8}
	<i>ilv</i>	7×10^{-8}	4×10^{-9}
L108	<i>trp</i>	1.5×10^{-7}	4×10^{-8}
AG15	<i>trp</i>	2×10^{-7}	1×10^{-8}
AG15.1	<i>trp</i>	2.5×10^{-7}	1×10^{-8}
	<i>ilv</i>	2×10^{-8}	3×10^{-8}
AG15.63	<i>trp</i>	2.5×10^{-7}	1×10^{-8}
	<i>leu</i>	6×10^{-9}	5×10^{-8}
AG15.57	<i>trp</i>	2×10^{-7}	1×10^{-8}
	<i>ser</i>	1×10^{-8}	1×10^{-8}
L301	<i>met</i>	2×10^{-8}	1×10^{-9}
	<i>atr</i>	5×10^{-9}	5×10^{-8}

1) De transductiefrequentie is gecorrigeerd voor de terugmutatiefrequentie.

TABEL 4

Transductiefrequenties van *his* en *ilv* van L67 en *trp* van L108 na transductie met de verschillende faagfracties van PP8 in CsCl aangegeven met de ρ van PP8. m.o.i. = ± 0.1 ; frequentie per p.f.u. De transductiefrequentie is gecorrigeerd voor de terugmutatiefrequentie.

gen	$\rho = 1.46$	$\rho = 1.48$	$\rho = 1.52$
<i>his</i>	8×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-7}
<i>ilv</i>	6×10^{-7}	4×10^{-7}	3×10^{-7}
<i>trp</i>	8×10^{-7}	1×10^{-6}	1×10^{-6}

IV.3 METHODEN TER VERBETERING VAN DE TRANSDUCTIEFREQUENTIE

IV.3.1 INACTIVEREN VAN DE FAGEN DOOR U.V.-BESTRALING

IV.3.1.1

Het is bekend dat de transductiefrequentie verhoogd kan worden bij *Pseudomonas* (Holloway e.a., 1962; Chakrabarty e.a., 1968) zowel als in *Escherichia coli* (Arber, 1958; Luria, 1960; Wilson, 1960), *Salmonella typhimurium* (Benzinger en Hartman, 1962) en *Proteus mirabilis* (Coetzee en Sacks, 1960) door de fagen te bestralen met U.V.

Door U.V. wordt het faag DNA beschadigd waardoor de faagfuncties geïnactiveerd worden. Het adsorptieproces wordt niet beïnvloed. De kans dat de faagfuncties door U.V. uitgeschakeld worden is veel groter dan de beschadiging van het te transduceren gen. Doordat dan een groot deel van de fagen geen lysis van de gastheer kan veroorzaken zal herinfectie uitblijven, waardoor de overlevingskansen voor de transductanten groter wordt.

Beschreven is dat U.V.-bestraling de recombinatie-frequentie verhoogt (Benzinger en Hartman, 1962), zodat hierdoor de integratie van het getransduceerde DNA gestimuleerd kan worden.

Voor een aantal kenmerken werd de invloed van bestralen met U.V. bepaald.

IV.3.1.2 Resultaten

De resultaten zijn weergegeven in tabel 5. Afhankelijk van het kenmerk kon een verbetering gemeten worden van een 2 tot 8 maal zo grote transductiefrequentie. Deze blijft echter over 't algemeen nog zeer laag vooral, voor de *atr*-genen.

IV.3.2 VOORKOMEN VAN HERINFECTIE DOOR TOEVOEGEN VAN ANTISERUM

IV.3.2.1

Een andere, meer direkte manier om herinfectie te voorkomen is

TABEL 5

Transductiefrequenties voor diverse genen na transductie met onbestraalde en bestraalde fagen. De m.o.i.₂ = 0.5 gerekend met onbestraald lysaat. Dosis U.V. 3000 ergs/mm². Frequentie (per 10⁸ bacteriën) is gecorrigeerd voor de terugmutatiefrequentie.

<u>Stam</u>	<u>selectie gen</u>	<u>onbestraald</u>	<u>bestraald</u>
L3	<i>his</i>	5	39
L19	<i>met</i>	1.6	5
L66	<i>his</i>	0	28
	<i>pro</i>	0	7
L90	<i>cys</i>	1.7	3.4
L301	<i>met</i>	2	5.2
	<i>atr</i>	0.5	2.5
L408	<i>troB</i>	0.3	5

TABEL 6

Invloed van antiserum op de transductiefrequentie. Serum toegevoegd tot K = ± 10/min. Transducties met faag PP8 en L1 als donor. Frequentie (per 10⁸ bacteriën) is gecorrigeerd voor de terugmutatiefrequentie.

<u>Stam</u>	<u>selectie</u>	<u>zonder serum</u>	<u>met serum</u>
L3	<i>his</i>	5	40
L58	<i>cys</i>	0.3	25
	<i>leu</i>	1.2	25
L194	<i>troA</i>	0	6
L301	<i>met</i>	2	6
	<i>atr</i>	0.5	3
L401	<i>troB</i>	0	4
L408	<i>troB</i>	0.3	8

het binden van de vrijkomende nieuwe fagen aan faaginactiverend antiserum.

Het antiserum werd na de transductie toegevoegd aan de bacteriën voordat ze op de plaat uitgespateld werden. Bij het maken van het antiserum tegen PP8 werden behalve antistoffen tegen de fagen ook antistoffen tegen de bacterie zelf gevormd. De activiteit van de bacteriële component was zo hoog dat het antiserum voor transducties na een korte tijd na bereiden van het serum onbruikbaar werd. De bereiding van het antiserum en de daarbij komende problematiek wordt beschreven in de bijgevoegde appendix. Ook wordt daarin aangegeven hoe de aanmaak van de bacteriële component onderdrukt kan worden. De enkele goede resultaten die werden verkregen in de periode vlak na de bereiding waarin de faag-component nog zeer actief was, worden hieronder gegeven.

IV.3.2.2 Resultaten

Zie tabel 6. Hierin worden vergeleken de transductiefrequenties met en zonder toevoegen van antiserum. Door toevoegen van het serum werd een verbetering verkregen van 3 - 80 x afhankelijk van het kenmerk.

Cumulatief gebruik van bestraalde faag en antiserum gaf geen verbetering ten opzichte van het antiserum.

Met een serum met een hoge inactiveringsconstante voor de fagen en een zo laag mogelijke voor de bacteriën kan een redelijke verbetering van de transductiefrequentie bereikt worden.

IV.3.3 TRANSDUCTIE MET EEN GASTHEERMUTANT VOOR PP8

IV.3.3.1

In de vorige paragrafen hebben we gezien dat transductie met PP8 voor verschillende genen mogelijk is maar, uitgezonderd voor het *trp*-gen, bijzonder laag. Ondanks speciale voorzorgsmaatregelen die een geringe verbetering geven blijven de transductiefrequenties

te laag om reproduceerbare experimenten uit te voeren. Vooral wat betreft het *atr*-gen, waarvoor het onderzoek in principe was begonnen, geldt dit in het bijzonder.

Het feit dat de *trp*-genen van L108 en AG15 stammen met redelijke frequentie worden overgedragen doet veronderstellen dat we mogelijkwijs toch met speciale transductie door een lysogene faag te maken hebben.

Hoewel nooit voor PP8 lysogene stammen geïsoleerd konden worden, is toch nagegaan of de *trp*-transductanten lysogeen voor PP8 zijn. Dit bleek niet zo te zijn. De meeste transductanten zijn gevoelig voor PP8 en produceerden na inductie geen faag.

Er werd echter een transductant geïsoleerd die resistent geworden was tegen PP8. Op deze resistente stam werden met een frequentie van $\pm 10^{-4}$ door PP8 plaques gevormd. Deze plaques waren allemaal helder. Deze faagmutant, aangeduid als PP11, is waarschijnlijk een gastheermutant van PP8 die met een ongewoon hoge frequentie voorkomt in de PP8 populatie. Om de relatie tussen PP8 en PP11 te bepalen werden deze fagen onderzocht op kruisresistentie. Tegen PP11 resistent gemaakte stammen van L1 bleken ook resistent te zijn tegen PP8.

Tussen deze PP11 resistente stammen was er één (320-R) waarop PP8 met hoge frequentie ($\pm 10^{-4}$) wel plaques vormt, die alle troebel waren. Deze gastheermutant werd PP12 genoemd en verschilt hierin van PP8 en PP11 dat op L1 (wilde type) heldere plaques gevormd worden en op 320-R (PP11^R) troebele. De isolatie en eigenschappen van de fagen worden in tabel 7 nog eens weergegeven.

Het vormen van troebele plaques is bij gematigde fagen als regel een gevolg van groei van immune cellen in de plaque. Lysogene cellen konden nooit uit deze plaques geïsoleerd worden.

Om het mechanisme te verklaren waarmee PP12 op L1 heldere plaques vormt en op 320-R troebele, werden de eigenschappen van deze faag nader bestudeerd. Met de gevonden bijzonderheden kan verklaard worden waarom met PP8 ondanks de virulentie van deze faag toch transductie mogelijk is.

TABEL 7

Onderscheid van PP8, PP11 en PP12 naar isolatie en plaquevorm op L1 en 320-R

faag	isolatiestam	plaquevorm op	
		L1 (w.t.)	320-R(PP11 ^R)
PP8	L1, wilde type	troebel	10 ⁻⁴ , troebel
PP11	<i>trp</i> -transductant, PP8 ^R	helder	geen
PP12	320-R, PP11 ^R	helder	troebel

IV.3.3.2 Resultaten

IV.3.3.2.1

- a. De lysis van een L1 cultuur na infectie met PP12 werd vergeleken met die van 320-R.

Het blijkt dat als 320-R geïnfecteerd wordt met een lage m.o.i. zodat slechts een deel van de cultuur geïnfecteerd wordt, na de burst de overige cellen gewoon doorgroeien, alsof ze resistent geworden zijn tegen de vrijkomende fagen.

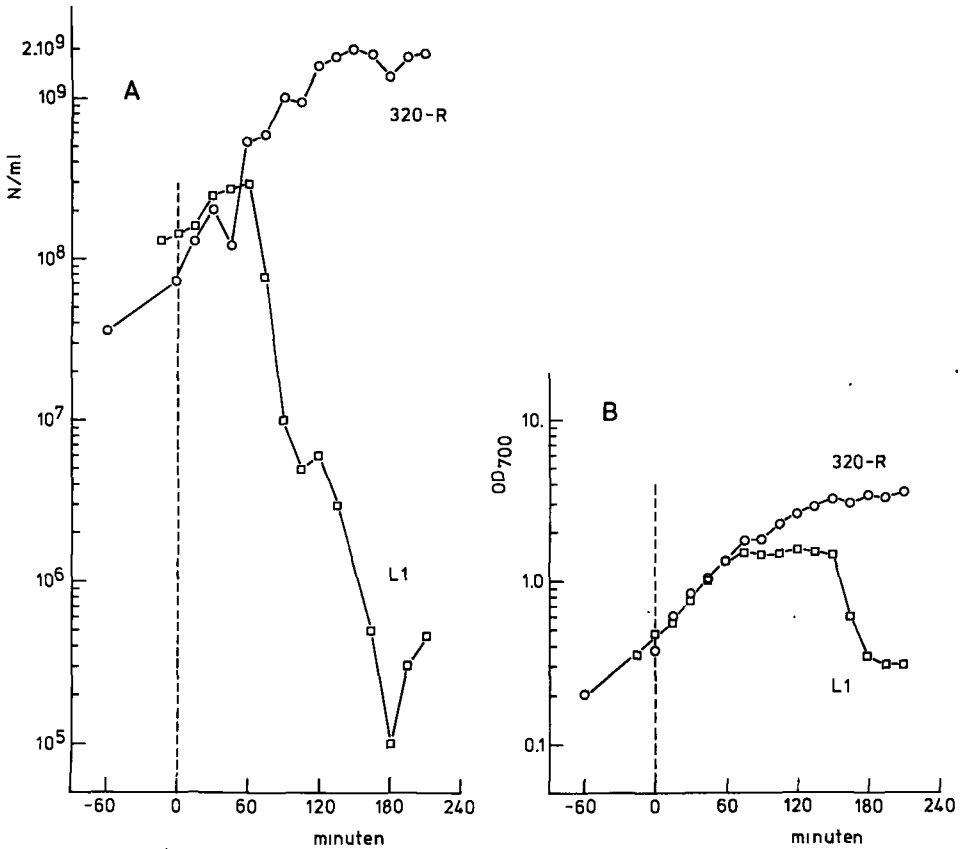
Wordt daarentegen L1 geïnfecteerd met PP12 met dezelfde lage m.o.i. dan wordt na de eerste burst de rest van de cultuur geïnfecteerd en treedt na enige tijd volledige lysis van de cultuur op (zie figuur 6).

In figuur 7 is de lysis van L1 door PP8 weergegeven.

Na een aanvankelijke lysis herstelt de groei zich waarna bij een tweede burst weer het aantal vitale cellen daalt. De situatie is intermediair ten opzichte van de vorige twee lysispatronen. Er treedt geen volledige lysis op van de cultuur door PP8.

- b. Bij een confluente lysis van PP12 op 320-R blijkt de top laag zeer visceus geworden te zijn bij resuspenderen. Deze viscositeit treedt niet op bij de groei van de bacteriën alleen. De

acceptorcellen scheiden klaarblijkelijk na infectie een stof af die deze viscositeit veroorzaakt.



Figuur 6. Lysis van een cultuur van L1 en 320-R door PP12 in NB. Infectie met faag op $t=0$ met een m.o.i. = 0.4 en 0.7 van L1 en 320-R resp.

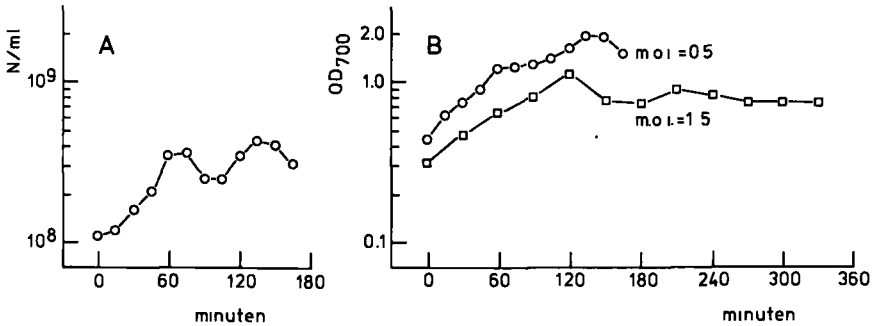
A. De verandering van het aantal kolonievormende cellen (N/ml).
 B. De verandering van de OD_{700} gedurende de incubatie met faag.

c. Met de electronenmicroscop is duidelijk te zien waarom PP12 fagen gegroeid op 320-R als donor en gezuiverd in CsCl-gradiënten zich voornamelijk laten concentreren in het bandje met $\rho = 1.46 \text{ g/cm}^3$. Zij zijn voor het merendeel gebonden aan partikels die erg veel lijken op lipopolysacchariden (Bartell, 1971; Katayama, 1971). Daarentegen wordt PP12 gegroeid op L1 als donor hoofdzakelijk geconcentreerd in een bandje met $\rho = 1.48 \text{ g/cm}^3$, niet gebonden aan partikels.

Verondersteld wordt dat de viscositeit van het faaglysaat

van PP12 op 320-R veroorzaakt wordt door een overmatig afscheiden van lipopolysacchariden.

- d. Als PP12, ongeacht de donor stam, getitreerd wordt op L1 en 320-R dan worden op L1 + 10 x meer plaques gevormd dan op 320-R. De afgescheiden substantie moet redelijk efficiënt zijn om verdere infectie te voorkomen waardoor schijnresistentie ontstaat.



Figuur 7. Lysis van een L1-cultuur in NB door PP8. Op $t = 0$ werd faag toegevoegd met een m.o.i. van 0.5 en 1.5.

A. Het aantal kolonievormende cellen (N/ml) gedurende incubatie met faag na de infectie met de m.o.i. = 0.5.

B. Het verloop van de OD₇₀₀ gedurende de incubatie met faag gemeten voor de beide m.o.i.'s.

IV.3.3.2.2

Het effect van het afscheiden van deze faagadsorberende substantie op de transductie werd bestudeerd.

In de eerste plaats werd onderzocht of transductie wordt waargenomen indien het afscheiden van deze substantie niet plaatsvindt.

Hiervoor werd getransduceerd met PP12, gegroeid op L1 als donor, en L108 als acceptorstam. De transductie is laag. Voor zover transductanten gevonden worden zijn ze erg gelyseerd, zodat ze nauwelijks te zien zijn.

Vervolgens werd de transductie gedaan met dezelfde acceptorstam, maar met PP12 gegroeid op 320-R als donor. Hierbij wordt de faag adsorberende substantie in het faaglysaat voor de transductie toegevoegd. De transductanten zijn gaaf en de opbrengst is duidelijk

hoger dan in het eerste geval (zie tabel 8).

TABEL 8

Transductie van het *trp*-gen van L108 door PP12(L1).
Vergeleken wordt de invloed van 320-R als faagdonor en het zogenaamde R-type van 108 als acceptor op de transductiefrequentie. Frequentie (per 10^8 bacteriën) is gecorrigeerd voor de terugmutatiefrequentie.

<u>acceptorstam</u>	<u>faagdonor: L1</u>	<u>faagdonor: 320-R</u>
L108	23 ¹⁾	96
108-R	19	6

¹⁾ Zeer kleine kolonies door lysis.

Beide proeven werden herhaald met als acceptor 108-R, dit is L108 die na infectie met PP12 lipopolysacchariden afscheidt evenals 320-R (dergelijke stammen zijn verder aangegeven als R-type). Als de substantie die herinfectie moet voorkomen, vrijkomt bij het lyseren van de cellen op de platen, wordt het grootste effect eigenlijk verwacht als zowel de donor als de acceptor van het zogenaamde R-type zijn.

De bescherming door de afgescheiden substantie blijkt het meest effectief te zijn als bij de transductie de faagadsorberende stof door de donor gegeven wordt (PP12(320-R) x L1 typen). Is daarentegen ook de acceptor van het R-type dan is tegen de verwachting in de transductiefrequentie juist lager in plaats van hoger.

Een passende verklaring hiervoor kan gegeven worden als we veronderstellen dat de beschermende stof vrijkomt direct bij de infectie van de cellen en niet na faagvermenigvuldiging.

In dit geval speelt het door de faag meegebrachte lysozym dat nodig is om penetratie van het faag-DNA mogelijk te maken waarschijnlijk een belangrijke rol. Wij gaan er dan vanuit dat het lysozym van PP12 op R-type acceptor-cellen overactief is zodat door een overmatige afbraak van de celwand de integriteit van de celwand verloren gaat, waarbij veel lipopolysacchariden vrijkomen die vrije

fagen inactiveren. Hierbij kunnen echter ook potentiële transductanten verloren gaan.

Daarentegen is de celwand van L1 voldoende resistent tegen PP12-lysozym dat hiervan niet meer dan nodig lyseert om 't faag-DNA door te laten en de faagvorming volledig plaats kan vinden voordat de cel lyseert.

Bij de transductie spelen dus twee factoren een rol: voortijdige lysis van de geïnfecteerde cellen en voorkomen van herinfectie door de faagadsorberende lipopolysacchariden.

Door de herinfectie op andere wijze te voorkomen, bijvoorbeeld door incubatie bij 33°C, (zie hierna IV.3.4), kan de invloed van de voortijdige lysis bepaald worden.

In tabel 9 zijn de resultaten weergegeven van transducties met PP12 voor het *trp*-gen van L108 en *atr* en *met* van L301.

TABEL 9

Invloed van de faagadsorberende stof in 320-R lysaten en de incubatietemperatuur van de platen op de transductiefrequentie van PP12 transducties met L1-typen en R-typen als acceptor-stammen. Frequentie (per 10⁸ bacteriën) is gecorrigeerd voor de terugmutatiefrequentie.

acceptorstam	selectie-gen	faagdonor L1		faagdonor 320-R	
		28°C	33°C	28°C	33°C
L108	<i>trp</i>	24 ¹⁾	26	120	85
108-R	<i>trp</i>	23	13	13	7
L301	<i>met</i>	2.0 ¹⁾	2.5	12.5	14.0
	<i>atr</i>	0	0	7.0	8.5
301-R	<i>met</i>	1.0	0.7	1.0	1.0
	<i>atr</i>	0	0	0	0

1) Zeer kleine kolonies door lysis.

De volgende situaties werden bestudeerd:

1. faagdonor L1 x L1-typen acceptor (L108 en L301). Hierbij verwachten we geen voortijdige lysis en wel herinfectie.

Door herinfectie zijn de kolonies bij 28°C zeer klein door lysis, wat niet het geval is bij 33°C.

2. *faagdonor 320-R x L1-type acceptor*: geen voortijdige lysis door lysozym, minder herinfectie door aanwezigheid van de faagadsorberende stof in het faaglysaat.

De transductiefrequentie is bij 28°C duidelijk hoger dan onder 1 en kan nog beter worden bij 33°C; de transductanten zijn niet gelyseerd.

3. *faagdonor L1 x R-typen acceptor*: voortijdige lysis door PP12-lysozym te verwachten, maar verminderde herinfectie door vrijkomend faagadsorberend materiaal.

De transductiefrequentie is afhankelijk van de meest invloedrijke factor en blijkt eerder lager dan beter te worden bij uitschakelen van herinfectie bij 33°C.

4. *faagdonor 320-R x R-typen acceptor*: de situatie is eender als onder 3. De herinfectie wordt onderdrukt door zowel het in het lyasaat al aanwezige als het op de platen vrijkomende faagadsorberend materiaal.

De transductiefrequentie blijkt zowel bij 28°C als bij 33°C lager te zijn dan in elk van de drie vorige situaties. Dus in die gevallen waarin de voortijdige lysis direct na infectie optreedt is de transductiefrequentie eerder lager dan hoger.

De beste resultaten worden dus verkregen met faag gegroeid op 320-R als donor en met als acceptor een L1-type mutant. De bescherming van het faagadsorberend materiaal in het faaglysaat is effectiever dan het voorkomen van herinfectie door de faagvermenigvuldiging te blokkeren door verhoogde incubatietemperatuur. Samen toegepast kan cumulatief nog een verbetering van de transductiefrequentie gevonden worden.

Hoewel PP12 op 320-R troebele plaques vormt is de faag hierop het meest virulent door de lysis direct na infectie. Door deze lysis worden bij transducties met R-typen als acceptoren meer potentiële transductanten uitgeschakeld dan door uitblijven van herinfectie beschermd worden.

Een analoge situatie na de infectie van PP12 van 320-R doet zich voor met het infecteren van L1 door PP8. Daarbij worden ook troebele plaques gevormd door het groeien van schijnresistente

bacteriën in de plaque. Infectie van L1 met PP8 geeft bij een lage m.o.i. geen volledige lysis van de cultuur en bij een hoge m.o.i. is het aantal fagen per ml na de lysis nauwelijks toegenomen ten opzichte van het aantal toegevoegde fagen.

De cellen lyseren ook nog voor faagproductie volledig plaats gevonden heeft. De aanwezigheid van groepjes fagen in gezuiverde faagfracties gebonden aan lipopolysaccharide-achtige structuren (verg. Bartell 1971) is een aanwijzing voor de aanwezigheid van overmatig veel van dit materiaal in het lysaat. De isolatie van defecte fagen over CsCl-gradienten (koppen, en koppen met defecte staarten) na PEG zuivering is waarschijnlijk het gevolg van te vroege lysis van cellen waardoor de faagvermenigvuldiging te vroeg wordt afgebroken. De lage transductiefrequentie is verklaarbaar door de killing van transductanten na herinfectie enerzijds en door lysis van potentiële transductanten door het overactieve faaglysozym anderzijds.

IV.3.4 TOEPASSEN VAN TEMPERATUURGEVOELIGHEID VOOR PP8 FAGEN

IV.3.4.1

Uit het voorgaande blijkt dat PP8 een virulente faag is of een "clear plaque" mutant van een gematigde faag, die zich zeer virulent gedraagt.

Transductie met een virulente faag is al eerder beschreven voor *Escherichia coli* door Drexler (1970). De transductie met de virulente *coli*-faag T1 werd mogelijk door conditioneel lethale mutanten te gebruiken, in dit geval amber-mutanten van T1, en als acceptor suppressor negatieve stammen te nemen.

Omdat van *Pseudomonas putida* geen suppressorstammen bekend zijn hebben we een andere methode toegepast.

Een andere manier om faagvermenigvuldiging te voorkomen is het gebruiken van temperatuurgevoelige mutanten. Door na de transductie de geïnfecteerde cellen over te brengen naar de beperkende temperatuur wordt de faagproductie geblokkeerd en kan de herinfectie zo voorkomen worden.

Alvorens temperatuurgevoelige mutanten te gaan maken werd het temperatuurtraject van PP8 vastgesteld. Daarbij bleek dat PP8 bij 32°C

en hoger geen plaques meer vormt terwijl de bacteriën nog wel een gesloten dek maken. PP8 is dus van nature temperatuurgevoelig. Hier- van hebben wij gebruik gemaakt door na de transductie de geïnfecteerde cellen uit te platen en te incuberen bij 33°C.

IV.3.4.2 Resultaten

Bij 33°C bleken de transductanten niet meer gelyseerd te worden. De kolonies zagen er gaaf uit dit in tegenstelling tot die bij 28°C die grotendeels gelyseerd waren.

De invloed op de transductiefrequentie is weergegeven in tabel 10. De transducties werden meestal gedaan met PP12 gegroeid op L1

TABEL 10

Invloed van de incubatietemperatuur van de platen op de transductiefrequentie van verschillende genen. Transducties uitgevoerd met PP12(L1) bij 28°C. De acceptorstammen zijn allemaal van het L1-type. Frequentie (per 10⁸ bacteriën) is gecorrigeerd voor de terugmutatiefrequentie.

acceptorstam	selectie-gen	incubatietemperatuur	
		28°C ¹⁾	33°C
L1	<i>ser</i>	0	15
L24	<i>arg</i>	0	7
L63	<i>pro</i>	0	5
L301	<i>met</i>	1.5	2.0
	<i>atr</i>	0	0.7
AG5	<i>trp</i>	9	20
AG15.1	<i>trp</i>	25	30
	<i>ilv</i>	0	3
AG15.63	<i>trp</i>	0	32
	<i>leu</i>	0	5
AG15.57	<i>trp</i>	144	80
	<i>ser</i>	0	6

1) Zeer kleine kolonies door lysis.

en uitgevoerd bij 28°C. De incubatie vond plaats zowel bij 28°C als bij 33°C. Alleen L1-typen werden als acceptor gebruikt. In de meeste gevallen is bij 33°C een duidelijke verbetering van de transductiefrequentie te zien. Het grootste effect is gelegen in het feit dat de transductanten niet grotendeels gelyseerd zijn zoals op de platen bij 28°C.

IV.4 GEN-KARTERING DOOR COTRANSDUCTIE

IV.4.1

Lokalisatie van genen met transductie berust op de mogelijkheid meerdere genen tegelijk met één transducerend deeltje over te brengen, zogenaamd te cotransduceren. De frequentie waarmee cotransductie plaatsvindt wordt als maat gebruikt voor de onderlinge afstand tussen de betrokken genen.

Met een molecuulgewicht van 55×10^6 daltons is de lengte van het faag DNA 2 - 3% van het chromosomale DNA (de Ley, 1969). Als een transducerend faagpartikel eenzelfde hoeveelheid bacterieel DNA kan inpakken als het faaggenoom dan is het waarschijnlijk dat cotransductie van twee dicht bij elkaar gelegen genen door PP8 en PP12 kan optreden.

Bestuderen van cotransductie heeft alleen zin als er voldoende transductanten opkomen, overwegend meer dan terugmutanten en als de transductie een reproduceerbare gebeurtenis is. Doordat de nadruk van het onderzoek op de ontwikkeling van technieken is komen te liggen is geen diepgaand onderzoek naar cotransductie tussen genen gedaan.

De resultaten die hieronder gegeven worden zijn slechts mede door de slechte reproduceerbaarheid, aanwijzingen voor mogelijke koppeling.

IV.4.2 RESULTATEN

Gekeken werd naar cotransduceerbaarheid van de genen betrokken bij de afbraak van atropine met auxotrofe kenmerken. Door de lage transductiefrequentie van *atr* en *tro* waren stammen met mutaties voor

deze kenmerken ongeschikt voor de bestudering van cotransductie, indien ze als acceptor gebruikt werden. Door deze stammen als faag-donoren te gebruiken voor transducties naar o.a. L3, kon toch de mogelijkheid van cotransductie onderzocht worden.

Daarnaast werden de makkelijker verkrijgbare *trp*-transductanten van de dubbelmutanten onderzocht op cotransductie voor de andere kenmerken.

In tabel 11 zijn de transducties waarbij cotransductie gevonden is weergegeven. De transducties werden voornamelijk uitgevoerd met PP8 vandaar ook dat er minder resultaten voor PP12 transducties zijn.

TABEL 11

Transducties met aantoonbare cotransducties

transductie	selectie kenmerk	gecotrans- duceerd gen	percentage cotransductanten
PP8 (408) bestraald x L301	<i>met3</i>	<i>troB</i>	11
PP8 (408) bestraald x L3		<i>troB</i>	2 - 45
		<i>atr</i>	20 - 99
PP8 (L1) x AG15.1	<i>trp</i>	<i>met16</i>	1
PP8 (L1) x AG15.2	<i>trp</i>	<i>leu</i>	1
PP8 (L1) x AG15.3	<i>trp</i>	<i>his</i>	1.2
PP8 (L1) x AG15.4	<i>trp</i>	<i>ilv</i>	1.9
PP12(L1) x AG15.1	<i>trp</i>	<i>ilv</i>	1.9
PP12(320) x L301	<i>met3</i>	<i>atr</i>	80
	<i>atr</i>	<i>met3</i>	80

Tegenover deze transducties waarbij cotransductie gevonden werd staat een zeer groot aantal waarbij dit niet aantoonbaar was. De enige redelijk-reproduceerbare experimenten waren PP8(L408) bestraald x L3; zij het dat de frequentie nogal varieerde binnen de aangegeven grenzen. Het is echter bekend dat de cotransductiefrequentie nadelig beïnvloed wordt door U.V.-bestraling van het faag-

lysaat (Holloway e.a., 1962; Gunsalus e.a., 1968; Benzinger en Hartman, 1962). Cotransductie voor *trp* met andere kenmerken werd slechts in enkele gevallen gevonden bij selectie voor transductie van het *trp*-gen. Bij selectie voor het andere gen werd geen cotransductie gevonden.

De aanwijzingen die uit deze resultaten te halen zijn is de koppeling die aanwezig moet zijn tussen *atr*, *tro*, *his* en *met3* enerzijds, en anderzijds tussen het *trp*-gen van AG15 en *met16*, *ilv*, *leu* en *his*.

IV.5 DISCUSSIE EN SAMENVATTING

In dit hoofdstuk is het transducerend vermogen van PP8 beschreven. Het blijkt dat PP8 een aantal genen, te weten: *met*, *his*, *leu*, *arg*, *trp*, *cys*, *ilv*, *ser*, *pro*, *atr*, *troA* en *troB* kan transduceren. PP8 is dus een algemeen transducerende faag.

Hoewel PP8 een virulente faag is, blijkt transductie mogelijk te zijn door de bescherming van potentiële transductanten tegen herinfectie door de afscheiding van faagadsorberend materiaal bij de lysis van geïnfecteerde cellen. De afscheiding van deze faagadsorberende stof kon aannemelijk gemaakt worden na het isoleren van PP12, een gastheermutant van PP8, en 320-R een celwandmutant van L1.

De transductiefrequentie is zonder voorzorgsmaatregelen zeer laag, voornamelijk door de lysis van transductanten na herinfectie op de selectieplaten.

Verschillende methoden zijn bestudeerd om de transductiefrequentie te verbeteren door herinfectie te voorkomen door hetzij de faagvermenigvuldiging te blokkeren, hetzij de vrijkomende fagen te inactiveren. Faagvermenigvuldiging werd geblokkeerd door U.V.-bestraling en door de geïnfecteerde cellen na de transductie te incuberen bij 33°C. Een geringe verbetering was aantoonbaar in beide gevallen. Echter de transductiefrequentie bleef in het bijzonder voor de *atr*-genen erg laag.

Het inactiveren van de bij lysis vrijkomende fagen op de platen kan gebeuren door toevoegen van faagadsorberende stoffen, bijvoorbeeld antiserum. Door de moeilijkheden bij de bereiding van het antiserum (zie ook appendix) kon van antiserum geen uitgebreid ge-

bruik gemaakt worden. De verkregen resultaten wijzen er wel op dat met een goed serum de transductiefrequentie belangrijk verbeterd kan worden.

Het faagadsorberend materiaal dat aanwezig is in PP8 lysaten wordt in grotere mate afgescheiden door 320-R na infectie met PP12. In een faaglysaat van PP12 met 320-R als donor, werd voldoende van dit materiaal aan het transductiemengsel toegevoegd om een effectieve bescherming van transductanten te geven en de transductiefrequentie te verhogen. De verbetering van de transductiefrequentie was het grootst als 320-R als faagdonor gebruikt was en de acceptor van het L1-type was. De transductiefrequentie werd zelfs slechter met het zogenaamde R-type (d.i. PP11^R, PP12^S) als acceptorstam. Dit wordt verklaard door aan te nemen dat lysis van de cellen, ook potentiële transductanten, plaats vindt, door het op celwanden van de R-typen, overactieve PP12-lysozym.

De geïsoleerde gastheermutanten van PP8, nl. PP11 en PP12, resp. geïsoleerd op een PP8-resistente stam en een PP11-resistente stam (tevens PP8-resistent), worden beschouwd als lysozym-mutanten, die de onafhankelijk ingevoerde PP8-resistenties van L1 kunnen overwinnen. Echter zo dat de activiteit van de gemuteerde lysozymen geen voortijdige lysis van de L1-cellen veroorzaken, zoals het wilde type lysozym van PP8, en de fagen op L1 heldere plaques vormen. In een kolonie van L1-cellen blijken met hoge frequentie cellen voor te komen met variaties in de celwandstructuur zodat 320-R geïsoleerd kon worden waarop PP12 weer troebele plaques vormt, net als PP8 op L1.

Het lysozym van PP8 zowel als dat van PP12 veroorzaken op de respectievelijke stammen overmatige en snelle afbraak van de celwand waardoor veel faagadsorberende substantie in het medium wordt afgescheiden dat hierdoor visceus kan worden.

Deze bijzonder virulente eigenschap van PP12 en PP8 wordt verdoezeld door de vorming van troebele plaques door de groei van schijnresistente cellen in de plaque. Hierdoor hebben we in eerste instantie PP8 beschouwd als een gematigde faag met lysogeniserende eigenschappen in plaats van een virulente faag.

Het faagadsorberende materiaal bestaat zeer waarschijnlijk uit lipopolysacchariden. De aan dit materiaal geadsorbeerde fagen bevatten nog DNA zodat de adsorptie reversibel is, wat volgens Bartell e.a. (1971) alleen het geval is bij binding aan lipopolysacchariden.

Uit faaglysaten van PP12 gegroeid op L1 en 320-R kan faaginactiverend materiaal gezuiverd worden. Na zuivering, die specifiek is voor lipopolysacchariden (Clarke e.a., 1967; Sutherland en Wilkinson, 1971) blijkt het gezuiverde materiaal uit beide lysaten fagen te inactiveren, het materiaal van 320-R in zeker 2 x sterkere mate dan dat van L1. De structuur van de faagbindende partikels in de gezuiverde fractie lijkt sterk op die van lipopolysacchariden zoals deze beschreven wordt door Katayama e.a. (1971).

Het toevoegen van faagadsorberende stoffen is effectiever om de transductiefrequentie te verhogen dan het uitschakelen van de faagvermenigvuldiging door U.V.-bestraling of verhoogde incubatietemperatuur.

Ondanks de mogelijkheden de transductiefrequentie te verhogen blijft deze voor de meeste kenmerken laag. Voor het *trp*-gen van L108 en de AG15 stammen ligt de frequentie ongeveer 10 x hoger. Deze hogere frequentie gepaard gaande met een goede reproduceerbaarheid is niet afhankelijk van de stam. Uit de transducties met de dubbelmutanten, met een extra kenmerk naast de mutatie voor het *trp*-gen, blijkt dat het verschil veroorzaakt wordt door het transducerend DNA zelf, zodat we moeten concluderen dat we met een vorm van speciale transductie te maken hebben voor *trp*.

Speciale transductie wordt altijd gekoppeld aan lysogenie (Stent, 1963; Hayes, 1968). Lysogenisatie voor PP8 hebben we niet aan kunnen tonen. Uit de *trp*-transductanten worden ook geen lysaten verkregen hetzij spontaan, hetzij na inductie, die met zeer hoge frequentie *trp* transduceren. Dit zou een aanwijzing zijn voor recombinatie tussen het faag DNA en het bacterieel DNA bij *trp*. Speciale transductie door lysogenisatie met vorming van een induceerbare profaag bij *trp* vindt dus niet plaats.

Wij kunnen niet uitsluiten dat PP8 een "clear plaque" vorm kan zijn van een lysogene faag. Een "clear plaque" mutant kan een cel niet meer lysogeniseren, maar nog wel integreren in 't DNA zoals lambda clear, bij *Escherichia coli*, P22 bij *Salmonella typhimurium* en Pfl6 bij *Pseudomonas putida*. Deze fagen hebben elk in verschillende mate meer of minder voorkeur voor de plaats van integratie in 't chromosoom zonder de stam stabiel te lysogeniseren (Shimada e.a., 1972; Schmieger, 1973; Gunsalus e.a., 1968; Chakrabarty en Gunsalus,

1969). Recombinatie tussen het faag DNA en bacteriechromosoom levert transducerende deeltjes die voor een klein gedeelte uit faag DNA bestaan (o.a. Schmieger, 1968, 1970, 1971). De enige methode om het restant faag DNA in transductanten aan te tonen is "marker rescue". Dit was voor PP8 niet mogelijk.

Bij de meeste algemeen transducerende fagen worden de transducerende faagpartikels gevuld met stukken bacterieel DNA die door de faag geïnduceerde nucleases geknipt worden uit het bacteriechromosoom (Hayes, 1968). Het is waarschijnlijk dat de vorming van transducerende deeltjes op deze wijze niet willekeurig is (Ozeki, 1959). Op zichzelf verklaart dit niet dat alleen *trp* met een hogere frequentie op transducerend DNA voor zal komen en daardoor uiteraard ook met hogere frequentie getransduceerd wordt.

Een bijkomende mogelijkheid is dat het *trp*-transducerend DNA een grotere kans heeft om tot expressie te komen. Hierom moeten we ons afvragen wat er gebeurt in de cel met binnenkomend DNA. In de cel wordt het DNA blootgesteld aan de activiteit van restrictie endo- en exo-nucleasen indien dit gezien wordt als vreemd DNA (Meselson en Heywood, 1972; Boyer, 1971). Restrictie is een barrière voor uitwisseling van DNA tussen niet nauw verwante stammen. We moeten aannemen dat de DNA's van de verschillende mutantstammen van L1 het voor L1 karakteristieke modificatiepatroon vertonen waarmee de restrictie enzymen van de discriminatie zijn uitgesloten.

De niet-restrictie specifieke exonucleasen blijven over. Bij *Escherichia coli* is het exonuclease V bekend dat staafvormig dubbelstrengig DNA af kan breken. Normaliter zal dit enzym niet met overmaat in de cel aanwezig zijn anders blijft er geen transductie mogelijk. Een alternatieve hypothese is dat in PMBL-L1-stammen een exonuclease V type enzym overmatig actief is waardoor het binnenkomende DNA afgebroken wordt. De enige ontsnapping hieraan die mogelijk is, is het vormen van gesloten cirkels. De genen die gelegen zijn op die DNA-moleculen die cirkelvormig zijn kunnen tot expressie komen. De transductiefrequentie zal evenredig toenemen met de mate waarin de transducerende DNA-moleculen cirkels kunnen vormen.

Cirkelvorming kan optreden als er plaatsen met voldoende homologie aanwezig zijn op het DNA-molecuul. Het *trp*-gen moet dus op een zeer

gunstig gedeelte van het chromosoom liggen met aan weerskanten voldoende homologie, waardoor het altijd met hoge frequentie tot expressie kan komen.

Cirkelvormig DNA met een oorsprong van replicatie een zgn. replicon, is in staat tot gastheer onafhankelijke replicatie. Deze eigenschap impliceert dat een transductie voor genen gelegen op een replicon vormend DNA-molecuul minder abortief zal zijn, doordat handhaving als extrachromosomaal DNA mogelijk is tot integratie plaatsgevonden heeft.

In *P. putida* is het *trp*-gen zeer waarschijnlijk dichtbij de oorsprong van replicatie gelegen (zie hoofdstuk IV). Hierdoor bestaat de kans dat bij cirkelvorming van het *trp*-transducerend DNA een replicon gevormd wordt. Op deze wijze wordt zowel door het voorkomen van afbraak van het DNA als door vermindering van abortieve transductie de mogelijkheid om met hogere frequentie tot expressie te komen zeer aannemelijk.

Concluderend kunnen we vaststellen dat transductie voor PMBL-L1 met PP8 en PP12 redelijk uitvoerbaar is mits voldoende voorzorgsmaatregelen genomen worden om de lysis van transductanten te voorkomen.

Voor verder onderzoek zou het nuttig zijn als vorming van meer transducerende deeltjes gestimuleerd zou kunnen worden. De wijze waarop PP8 de transducerende deeltjes maakt is niet bekend. Indien door recombinatie tussen faag DNA en 't bacterieel DNA, zoals de algemeen transducerende faag P22 van *Salmonella typhimurium* (Schmieger, 1973) is dit te proberen door op de geïnfecteerde cellen condities toe te passen waarbij de recombinatie gestimuleerd wordt. Zoals U.V.-bestraling van de cellen en mogelijkwijs een korte incubatie bij 32°C waarbij de faagfuncties gestoord worden en recombinatie meer kans krijgt.

Voorts is het aan te bevelen om de exonuclease activiteit vast te stellen en stammen te isoleren met verlaagde nucleolytische activiteit. Transductie met dergelijke stammen als acceptoren moet als de bovengestelde hypothese juist is voor andere kenmerken dan *trp* een verbeterde transductiefrequentie geven.

HOOFDSTUK V

CONJUGATIE

V.1 INLEIDING

Conjugatie is bij bacteriën de meest geschikte techniek voor chromosoomkartering. De genen worden gelokaliseerd naar de volgorde waarin zij de acceptorcel binnenkomen. De tijd die hiervoor nodig is dient als maat om de onderlinge afstand aan te geven.

De stammen die hierbij als donor en acceptor gebruikt worden moeten zich respectievelijk als Hfr en F^- -stam onderscheiden.

De F^+ -stam, de donor, bezit een plasmide die overgedragen kan worden naar de F^- -stam, de acceptor. Als er voldoende homologie bestaat tussen het chromosoom en het plasmide kan door recombinatie een zogenaamde Hfr stam ontstaan, waardoor het chromosoom overgedragen kan worden. Willen we conjugatie als karteringstechniek gebruiken voor nieuw uit de natuur geïsoleerde stammen dan moeten deze hetzij een F-factor bezitten hetzij een F-factor over kunnen nemen van bekende F^+ -stammen.

Zijn de stammen reeds F^+ dan kunnen ze op verschillende manieren F^- gemaakt worden (zie V.3).

Zijn de stammen van nature F^- dan zal een F-factor geïntroduceerd moeten worden uit andere stammen, die bij voorkeur zoveel mogelijk verwant moeten zijn hoewel dit niet strikt noodzakelijk is.

Een goed overzicht van experimenten waarbij plasmide-overdracht verkregen werd tussen stammen met zekere verwantschap (uit verschillende genera binnen een familie, volgens de definitie van Bergey (1957)) en tussen stammen zonder verwantschap (uit verschillende families) wordt gegeven door Jones en Sneath (1970).

Nadat uit hierna te beschrijven experimenten bleek dat PMBL-L1 van nature F^- is (V.3) zijn wij er toe over gegaan F-factoren over te dragen van *Escherichia coli* naar L1. In V.4 wordt de keuze van

TABEL 12

De gebruikte stammen van *Escherichia coli*. Voor referentie: zie MBL-collectie (Körsch e.a. 1967).

collectie nr.	geslacht	kenmerken
KMBL 146	F ⁻	<i>arg ile his thi thy pyr leu thr lac tsz ton</i>
" 283	F-Lac	<i>arg ile his thi thy pyr leu thr lac tsz rec ton met str</i>
" 1144	Fts-gal ntc aro att pro wvr chl	<i>thr leu prp his thi arg Δbio</i>
" 1224	F ⁻	<i>thi pro Δlac</i>
" 1911	Fts-lac	<i>thr leu thi tlv prp thy arg his eys</i>
" 1948	Fts-gal ntc aro att pro wvr chl	<i>thi Δnic-bio</i>
" 2901	F ⁻	w.t. <i>E. coli</i> C
" 2916	F ⁻	met
KA 441	F-Laci (Mu-lots62) pro	<i>Δlac-pro thia</i>

isolatie nummers	geslacht	ingevoerde kenmerken	ouderstam	isolatie methode
2919	F ⁻	<i>str</i>	1901	spontaan
2920	F ⁻	<i>Lac str</i>	1919	NG
2921	F ⁻	<i>met str</i>	1916	spontaan
2924	F ⁻	<i>met str lac</i>	1921	NG

TABEL 13
De gebruikte *Pseudomonas putida* stammen

collectie nr.	kenmerken	ouderstam	behandeling
PMBL - L1	w.t.	-	isolatie op atropine
- L49	<i>ade</i>	L1	NG
- L73	<i>his ilv str</i>	L64	NG
- L90	<i>cys pro str</i>	L63	NG
<u>Isolatie nummers</u>			
200	<i>str</i>	L1	spontaan
201 t/m 207	F- <i>Lac</i>	KMBL 283 x L1	NG
209		KMBL 283 x 2141	
210	F- <i>Lac</i>	KMBL 283 x 2141	
220		KMBL 283 x 2141	
2111	F ⁻	201	A.O.
2121	F ⁻	202	A.O.
2131	F ⁻	203	A.O.
2141	F ⁻	204	A.O.
2151	F ⁻	205	A.O.
226	<i>str</i>	2141	spontaan
230	F- <i>Lac, ilv leu</i>	220	NG
231	F- <i>Lac, his</i>	220	NG
7B	F- <i>Laci (Mu-1ctsg2), his ilv</i>	KA 441 x L73	

E. coli als heterogene plasmidedonor verantwoord en worden de resultaten besproken. Van de verkregen sexductanten werd *Pseudomonas putida* F-lac getest op donor-eigenschappen. Uit de experimenten die weergegeven zijn in V.5 blijkt dat er geen functionele F-pili gevormd worden waardoor paarvorming onmogelijk wordt. In de discussie worden suggesties gedaan hoe dit opgelost zou kunnen worden.

V.2 MATERIAAL EN METHODEN

De gebruikte stammen staan vermeld in tabel 12 en 13. De fagen die gebruikt werden om F-pili aan te tonen waren MS2, f1 en Q β . Bij titratie van deze fagen werden de volgende media gebruikt: voor f1 en Q β : LC + MgSO₄ (0.1%)

MS2 : trypton bouillon.

De samenstelling van de media werd reeds gegeven in hoofdstuk II; afwijkingen worden apart vermeld.

Acridine oranje behandeling: Een exponentieel groeiende cultuur werd overgeënt tot een dichtheid van $\pm 10^5$ cellen per ml in NB met een pH van 7.6. Daaraan werd 50 γ /ml acridine oranje toegevoegd. Deze concentratie was voor L1 stammen optimaal bij een incubatieperiode van 36 uur. Bij deze concentratie treedt nog juist groei op van de cellen.

Conjugatie-experimenten: de donorstammen werden opgegroeid in NB + 0.4% glucose, zachtjes schuddend. De acceptorstammen werden gekweekt bij de normale kweektemperaturen, 37^o en 28^oC resp. voor *E. coli* en *P. putida*. De selectieplaten waren van M9-medium met toevoeging van selectieve C-bron, meestal lactose, en zonodig streptomycine. Details van de experimenten worden besproken bij de resultaten.

V.3 IDENTIFICATIE VAN DE SEX VAN DE L-STAMMEN

V.3.1 INLEIDING

Er zijn twee mogelijkheden: de L-stam is van nature F⁺ of F⁻. Alleen als de stammen F⁺ zijn kunnen we recombinanten verwachten

hetzij door de aanwezigheid van F^- -cellen, die spontaan de F-factor verloren hebben, hetzij door de acceptor F^- te maken.

Er bestaan verschillende methoden om F^+ -cellen F^- te maken, bijvoorbeeld:

- a. het elimineren van de F-factor door de cellen te behandelen met acridine oranje (Hirota, 1960). Deze methode berust erop dat de replicatie van de extrachromosomaal aanwezige F-factor geremd wordt (Stouthamer e.a., 1963).
- b. Het fenotypisch F^- maken van de stammen door suboptimale groei-condities toe te passen waardoor vorming van de F-pili achterwege blijft; of door de cultuur hard te schudden, wat resulteert in het afbreken van de F-pili (o.a. Curtiss e.a., 1968).
- c. Door selectie van F^- -cellen onder invloed van mutagene en bacterie-dodende agentia. Er zijn diverse plasmiden, waaronder ook sexfactoren, beschreven die de overgevoeligheid voor dergelijke agentia dragen. Cellen zonder plasmide zijn minder gevoelig waardoor het aantal F^- -cellen in de cultuur bij de aanwezigheid van dergelijke selectieve agentia toeneemt (Novick, 1969; Salisbury e.a., 1972). Deze laatste methode is sterk afhankelijk van het organisme en plasmide. Daarom hebben wij alleen de eerste twee methoden toegepast.

Om de chromosoom-overdracht te stimuleren werd in enkele experimenten de donor bestraald met U.V. waarvan bekend is dat het de recombinatie en daardoor de integratie van de F-factor in het chromosoom bevordert (Hayes, 1952; Evenchik e.a., 1969).

Chromosoom-overdracht kan ook door andere plasmiden dan de F-factor gestimuleerd worden, mits deze plasmiden zelf uitwisselbaar zijn (Novick, 1969). Bekend werd van *Pseudomonas putida* dat genen die specifiek zijn voor de afbraak van complexe voedingsstoffen zoals kamfer, naftaleen, octaan en salicylzuur, soms gelegen zijn op plasmiden die overgedragen kunnen worden (Rheinwald e.a., 1973; Dunn en Gunsalus, 1973; Chakrabarty, 1972; Chakrabarty en Gunsalus, 1973). Voor het CAM-plasmide (hierop zijn de genen voor de kamfer-afbraak gelegen) is zelfs onlangs aangetoond dat het chromosoom-overdracht mogelijk maakt (Shaham e.a., 1973). Wegens de specificiteit van de *atr*-genen die de afbraak van atropine mogelijk maken en de koppeling die waarschijnlijk bestaat tussen

de genen (hoofdstuk II), werd ook de mogelijkheid onderzocht of de L-stammen een ATR-plasmide bevatten.

V.3.2 RESULTATEN

V.3.2.1

Om te onderzoeken of de PMBL-L-stam van *Pseudomonas putida* F⁺ of F⁻ is werden kruisingen uitgevoerd waarbij L1 (wilde type) en L49 (*ade*) als donors werden gebruikt.

Als acceptor werden L73 (*his, ilv, str*) en L90 (*cys, pro, str*) genomen. Geselecteerd werd voor recombinanten voor elk van de auxotrofe kenmerken *his, ilv, cys* en *pro*. Voor contraselectie van de donor werd streptomycine in de platen toegevoegd. Voor L49 als donor was de adenine-behoefte een extra beperking.

Alleen als de stammen F⁺ zijn kunnen we recombinanten verwachten.

In eerste instantie werden de kruisingen uitgevoerd zonder speciale behandeling van donor en acceptor.

Daarnaast werden in enkele experimenten de acceptor-stammen eerst behandeld met acridine oranje om de eventuele F-factor te verwijderen; of zij ondergingen een behandeling om de stam fenotypisch F⁻ te maken (uit laten groeien tot stationaire fase onder heftige aeratie). Deze behandelingen werden ook gecombineerd toegepast. De donorcellen werden zonder behandeling gebruikt ervan uitgaande dat in een cultuur van de F⁺-cellen in een zeker percentage van de cellen de F-factor geïntegreerd is en dus in staat is tot chromosoom-overdracht.

Tevens werd de donorcultuur met U.V. bestraald, tot + 50% overleving, om de integratie van een aanwezige F-factor in het chromosoom en daardoor chromosoom-overdracht te stimuleren.

Bij al deze kruisingen kon geen enkele recombinant gevonden worden zodat geconcludeerd moest worden dat de L-stammen van *P. putida* geen F-factor bevatten.

V.3.2.2

Om aan te tonen of de L-stammen mogelijkterwijs een ATR-plas-

mide bezitten werd geprobeerd dit plasmide te verwijderen met behulp van acridine oranje en mitomycine C (Dunn en Gunsalus, 1973). De gevoeligheid voor mitomycine C ligt voor L1 bij 5 γ /ml. De proef werd gedaan met 5 γ en 10 γ per ml. Het aantal geteste kolonies was per concentratie zowel voor acridine oranje als voor mitomycine C, en in de controle, voldoende om een eliminatie-frequentie van 0.5% en hoger aan te kunnen tonen. De opgegeven frequentie is voor het CAM- en NAH-plasmide spontaan resp. 0.01% en 0.2% en met mitomycine C 1 - 10% voor beide afhankelijk van concentratie en stam (Rheinwald e.a., 1973; Dunn en Gunsalus, 1973).

Zowel spontaan als na behandeling met de twee agentia, werden geen kolonies gevonden die het vermogen om op atropine te groeien verloren hadden.

Ook hebben wij geprobeerd een plasmide aan te tonen door scheiding van het bacterieel en het eventueel aanwezige plasmide-DNA door centrifugatie in een CsCl-gradient. De cultuur werd voor de isolatie van het DNA gekweekt in M9-medium met atropine als C-bron, zodat verwacht mag worden dat alle cellen het plasmide hebben. Als referentie en controle werd een monster van het L1-DNA meegenomen gemengd met een fractie T4-DNA waarvan de ρ 1.698 g/cm³ is. Het L1-DNA onderscheidde zich in een aparte piek van het T4-DNA met een dichtheid van 1.721 g/cm³. De piek was symmetrisch van vorm, zodat geen kleine fractie met een gering verschil in dichtheid aanwezig was. Ook werd geen extra piek voor DNA van een plasmide gevonden zodat of de dichtheid van het plasmide-DNA overeenkomt met het chromosomale-DNA, of er is geen plasmide aanwezig.

Op grond van de beschreven experimenten (V.3) zijn wij tot de conclusie gekomen dat de L-stammen F⁻ zijn en geen ATR-plasmide, dat mogelijk naar analogie van het CAM-plasmide chromosoom-overdracht mogelijk had kunnen maken, bevat.

Vervolgens zijn wij er toe overgegaan een F-factor van een andere, heterogene stam over te brengen.

V.4 OVERDRACHT VAN F-FACTOREN VAN *ESCHERICHIA COLI* NAAR *PSEUDOMONAS PUTIDA*

V.4.1 INLEIDING

Het zoeken naar een bacteriestam als F-donor voor *Pseudomonas putida* liet niet veel keus. Van *Pseudomonas aeruginosa* als redelijk verwant aan *P. putida* was overdracht van sexfactoren naar *P. putida* nog niet gelukt (Holloway e.a., 1971). De interspecies-overdracht van het CAM-plasmide is onlangs beschreven (Shaham e.a., 1973) maar was niet meer relevant voor ons onderzoek.

Bekend is dat overdracht van plasmiden tussen *Escherichia coli* en *Pseudomonas* mogelijk is (Lebek 1963; Sykes en Richmond, 1970). Belangrijk is daarbij dat na een geslaagde terugkruising van *P. putida* naar *E. coli* de experimentele mogelijkheden met *E. coli* het grootst zijn.

Een ander aspect waardoor *E. coli* als F-donor aantrekkelijk is, is de mogelijke toepasbaarheid van faag Mu bij de integratie van de F-factor in het chromosoom in *P. putida*, zoals beschreven is voor *E. coli* (van de Putte en Gruijthuijzen, 1972). De colifaag Mu kenmerkt zich door recombinatie met het chromosoom zonder een duidelijk herkenbare homologie. Als gevolg hiervan kan deze faag overal in het chromosoom integreren.

De Graaff e.a. (1973) hebben deze eigenschap van Mu toegepast om Hfr-stammen te verkrijgen uit *Citrobacter feundii* stammen die een F-factor van *E. coli* hadden overgenomen en waarin bij gebrek aan homologie tussen het *coli* DNA en het *Citrobacter* chromosoom de F-factor niet vanzelf in het chromosoom integreerde. Op deze wijze is conjugatie in *Citrobacter* mogelijk geworden.

Aangenomen dat paarvorming tussen *E. coli* en *P. putida* tot stand kan komen dan zal de F-factor waarschijnlijk onderworpen worden aan gastheerrestrictie. Een aanmerkelijke verlaging van het aantal sexductanten is hierdoor te verwachten tot beneden het waarneembare niveau (Jones en Sneath, 1970; de Graaff, 1971). Eisenstark (1965) beschrijft hoe onder invloed van het mutageens NG de frequentie van de kruising tussen *E. coli* en *Salmonella typhimurium* toeneemt door gelijktijdige selectie van Res⁻mutanten (Middleton en Mojica-a, 1971).

Om de restrictie-barrière te overwinnen werden de meeste experimenten uitgevoerd met toevoegen van NG.

V.4.2 RESULTATEN

V.4.2.1 Overdracht van F-lac, F-gal en F-lac (Mu-1c562)

Omdat een mogelijke overdracht van de F-factoren zeer waarschijnlijk met een lage frequentie zal plaats vinden, werden stammen van *Escherichia coli* uitgezocht met F-factoren waarop de genen voor de afbraak van lactose of galactose gelegen zijn waardoor het mogelijk is voor overdracht te selecteren. Deze suikers worden door *Pseudomonas putida* niet afgebroken. Indien *putida*-stammen na kruising Lac⁺ of Gal⁺ zijn geworden dan kunnen ze als kruisingsproducten beschouwd worden.

De donor, *E. coli*, werd gekweekt bij 33°C tot midden logfase; de acceptor *P. putida* bij 28°C eveneens tot midden logfase. De donor en acceptor werden gemengd in een verhouding 3 : 1 resp. en geïncubeerd bij 33°C, stilstaand gedurende 60 minuten. Na incubatie werden de cellen uitgeplaat op M9-medium met lactose of galactose als C-bron en eventueel met toevoeging van streptomycine in de concentratie van 200 γ/ml. Parallel werden platen bij 28°C en 33°C geïncubeerd.

De NG-behandeling werd op twee manieren uitgevoerd:

1. L1 als acceptor werd vooraf behandeld met NG zoals is beschreven in hoofdstuk II en 's nachts geïncubeerd; de volgende dag overgeënt en gekweekt voor kruising.

Als donor werden gebruikt KMBL 1144 (F-gal), KMBL 1911 (F-lac) en KMBL 1948 (F-gal). Met een frequentie van $\pm 1 \times 10^{-8}$ per acceptor werden van elk van de kruisingen sexductanten geïsoleerd zowel Lac⁺ als Gal⁺. Deze verworven eigenschappen gingen bij verder kweken niet verloren.

2. De kruising werd eerst uitgevoerd. Als acceptor werd L1 gebruikt als donor KMBL 283 (F-lac).

Pas na het uitplaten werd NG toegevoegd op een filter als een verzadigde oplossing.

Na 10 dagen verschenen concentrisch om de filters kolonies. De

grootste werden op Lac-platen doorgestreken waarna na 48 uur normale kolonies verschenen (d.w.z. vergelijkbaar met wilde type kolonies na 24 uur op glucosemedium).

Enkele van deze kolonies segregeerden in grote en kleine kolonies. De grote werden 1 - 2 maal doorgestreken en waren daarna stabiel. Zes van deze Lac⁺-sexductanten (201 t/m 206) werden getest op *putida*-eigenschappen. De stammen waren gevoelig voor PP8, groeiden op atropine en waren ongevoelig voor λ-vir en moeten dus beschouwd worden als *P. putida*'s die de Lac⁺-eigenschap van *E. coli* hebben gekregen.

Op dezelfde wijze werden L73 en L226 gekruist met KA441 (*F-lac* (*Mucts*)). Van beide kruisingen werden Lac⁺ kolonies geïsoleerd die resistent waren voor λ-vir en gevoelig voor PP8. Zij groeiden op atropine, terwijl de kruisingsproducten van L73 daarbij *his* en *ilv* gebleven waren.

De *putida F-lac*-stammen werden bij verdere experimenten gebruikt.

V.4.2.2 Acridine-gevoeligheid voor *P. putida F-lac*

201 t/m 206 werden behandeld met acridine-oranje en getest op verlies van de Lac⁺-eigenschap. Vijf van de zes stammen verloren met een frequentie voor 2 - 22% het vermogen om op lactose te groeien. Spontaan ligt dit percentage beneden de 0.5% indien de stam op NB aangehouden wordt.

V.4.2.3 Overdracht van *F-lac* van KMBL 283 naar gecureteerde *P. putida F-lac* stammen

Als onder invloed van NG in de eerste kruisingen restrictie negatieve mutanten zijn ontstaan waarin de *F-lac* tot expressie kon komen dan verwachten we een aanzienlijk verschil in de frequentie bij de overdracht van de *F-lac* naar L1 en naar gecureteerde *putida*

F-*lac* stammen.

Vergeleken werd de overdracht van de F-factor van KMBL 283 naar L1 en naar de gecureteerde *putida* F-*lac* stammen (2111 t/m 2151, zie tabel 2) zonder NG toe te voegen.

Omdat mogelijkterwijs paarvorming tussen *E. coli* en de zeer beweeglijke *P. putida* in vloeistof cultures zeer slecht tot stand komt, werd bij deze kruisingen het mengsel van de beide stammen afgefilterd over een millipore-filter van 0.45 μ . De filters met cellen werden geïncubeerd op NB + 0.4% glucose-platen bij 33°C. Daarna gesuspendeerd en uitgeplaat op selectieplaten. Op deze wijze werd bij de kruising 283 x 2141 een verbetering verkregen van de overdrachtfrequentie met een factor van ongeveer 4 ten opzichte van het incuberen in suspensie gedurende 60 minuten. Verlenging van de incubatietijd tot 120 minuten gaf een maximale verbetering met een factor 10.

Bij de kruisingen uitgevoerd op filters met 120 minuten incuberen lagen de frequenties van de overdracht van F-*lac* van KMBL283 naar 2111 t/m 2151 tussen 4×10^{-7} en 3×10^{-6} per acceptorcel en voor de overdracht van F-*lac* naar L1 bij 1×10^{-7} per acceptorcel.

Onder deze verbeterde omstandigheden blijkt de overdracht van de F-*lac* naar L1 spontaan dus zonder NG, al redelijk hoog te zijn en bijna vergelijkbaar met interspecies overdracht van plasmiden (Rheinwald e.a., 1973) in *Pseudomonas*.

Door de gecureteerde *P. putida* F-*lac* stammen als acceptors te gebruiken in kruisingen met KMBL283 als donor wordt dus de frequentie ten opzichte van L1 als acceptor 4 - 30 maal verbeterd. De restrictie die L1 uitoefent op het *coli*-DNA is dus niet groot, hetzij dat het modificerend vermogen erg groot is en de overhand heeft, hetzij dat er geen of nauwelijks restrictie uitgeoefend wordt.

De overdracht van F-factoren van *E. coli* naar *P. putida* heeft ongeacht de lengte van het plasmide geen problemen gegeven. De frequentie blijkt zelfs redelijk te zijn. De overgedragen F-factor blijkt als een extrachromosomaal element in de *putidacel* te blijven bestaan. De nieuw verworven eigenschap om lactose als C-bron te kunnen gebruiken komt redelijk tot expressie zij het dat een groei-vertraging ten opzichte van de groei op glucose waarneembaar is.

In het volgende gedeelte werden de donoreigenschappen van enkele *P. putida* F-lac stammen getest.

V.5 P. PUTIDA F-LAC ALS DONOR

V.5.1. INLEIDING

Enkele van de verkregen sexductanten *P. putida* F-lac werden getest om hun vermogen om als donor te fungeren in kruisingen met *P. putida* zelf en met *Escherichia coli*.

De kruisingen hadden geen positief resultaat.

De colifagen MS2, Q β en f1, die specifiek adsorberen aan F-pili werden gebruikt om aan te tonen of de *putida* F-lac stammen wel functionerende pili maken. Functionerende F-pili zijn een sine qua non voor een donorstam om een kruising te doen plaats vinden.

V.5.2 RESULTATEN

V.5.2.1 Kruisingen met *P. putida* als acceptor

Als acceptoren voor de kruisingen werden L73, 200 en 226 gebruikt. De kruisingen werden uitgevoerd op membraanfilters zoals beschreven in V.4.2.3 en met streptomycine in de selectieplaten als contraselectie voor de donor. 226 is een gecureteerde F-lac stam die voor de selectie bij de kruising resistent tegen streptomycine gemaakt is. 226 onderscheidt zich van L73 en 200 door de isolatie als *putida* F-lac onder invloed van NG als een Res⁻.

Indien de van *E. coli* overgenomen F-factor in L1 gemodificeerd is tot herkenbaar *putida*-DNA, dan zijn met alle drie acceptoren kruisingsproducten te verwachten met een redelijke frequentie.

Is het *coli*-DNA niet gemodificeerd en blijkbaar niet onderhevig aan restrictie in de L-stammen dan kunnen eveneens met redelijke frequentie kruisingsproducten verwacht worden. In beide situaties gaan we er van uit dat paarvorming geen probleem is. Sexductanten werden echter niet gevonden. Restrictie kan hierbij geen rol spelen, dus moet paarvorming moeilijk gaan.

V.5.2.2 *Kruisingen met Escherichia coli als acceptor*

Bij een lage overdracht moeten wij er zeker van zijn dat de geselecteerde kolonies geen terugmutanten zijn van de acceptor. Als acceptor werd KMBL1224 uitgezocht, die een deletie bezit voor *lac*. Tevens werd gekruist met *E. coli* C die zich kenmerkt door van nature het restrictie-modificatiesysteem te missen.

Met beide *coli*-stammen werden geen sexductanten gevonden. Om twee redenen kan de kruising niet gelukt zijn:

- 1: door restrictie; en 2: door het uitblijven van paarvorming.
1. Is in *P. putida* het *coli*-DNA gemodificeerd dan is bij terugkruising naar *E. coli* de F-*lac* van *putida* aan restrictie onderhevig. Uit de negatieve resultaten van de kruising met *E. coli* blijkt dat het falen van de kruising niet te wijten is aan restrictie. Dit bleek ook al uit de kruisingen met *putida* zelf.
2. Gezien de resultaten met de kruisingen tussen de *putida*-L-stammen zelf is het mogelijk dat paarvorming tussen donor en acceptor moeilijk is. Dit kan geweten worden aan verschil in structurele eiwitten van de celwand van *E. coli* en *P. putida* waardoor onder invloed van de *coli* F-factor geen goede F-pili gemaakt kunnen worden in de *putida*-cel. Waarbij tevens verslechtering van de genexpressie van *coli* genen in de *putida*-cel een negatieve invloed heeft op de opbouw van de F-pili. (Hierop wordt nader ingegaan in de discussie (V.6)).

De oorzaak van het niet kunnen isoleren van kruisingsproducten werd gezocht in het niet functioneren van F-pili.

V.5.2.3 *Controle op aanwezigheid van F-pili*

Met fagen die specifiek adsorberen aan F-pili werd de aanwezigheid van F-pili aan de *putida* F-*lac* getest. Gebruikt werden de *coli*-fagen MS2, Q β en f1. De eiwitten die gecodeerd worden door gastheer vreemd DNA, zoals in onze proeven *coli*-DNA in een *putida*-cel, blijken structureel geen verandering te ondergaan en daardoor lijkt het zeer waarschijnlijk dat de daaruit opgebouwde structuren

zoals F-pili evenmin van het oudertype zullen afwijken. Toch zijn kleine veranderingen aangetoond in de F-pili in hybride cellen (zie voor overzicht Meynell e.a., 1968). Een geringe doch ingrijpende verandering is direkt waar te nemen aan afname in adsorptievermogen van de fagen, waardoor plaque-vorming en faagvermenigvuldiging beïnvloed worden. Deze drie aspecten hebben we getest.

V.5.2.3.1 Plaquevorming

Op een dun gegroeid dek van een aantal F-lac stammen van *putida* en de controles (L1 en KMBL283) werden faagsuspensie gedruppeld met een concentratie van 10^{10} p.f.u. per ml. Geïncubeerd werd zowel bij 28° als 33°C. Alleen op de controleplaten van KMBL283 was lysis te zien.

V.5.2.3.2 Adsorptie

Adsorptie werd getest met 220 en KMBL283. Het infectiemengsel werd 20 minuten geïncubeerd bij 33°C, daarna direkt 1 : 100 maal verdund in medium + 0.01 M KCN, en afgecentrifugeerd; het supernatant werd verder verdund en getitreerd op KMBL283 als indicator. De resultaten staan in tabel 14.

Hieruit kunnen we concluderen dat geen van de drie fagen adsorbeert aan *P. putida* F-lac 220. De kleine variatie ten opzichte van de controle valt binnen de meetfouten.

V.5.2.3.3 Faagvermenigvuldiging

De faagvermenigvuldiging werd getest door de specifiek aan F-pili adsorberende faag MS2 gedurende enige tijd te incuberen met *P. putida* F-lac.

MS2 werd met een m.o.i. van 0.1 gemengd met vijf *putida* F-lac stammen, en met L1 en KMBL283 als controlestammen. Gedurende 15 uur werden de mengsels geïncubeerd bij 33°C.

Na incubatie werden de mengsels afgecentrifugeerd; het supernatant werd 15 minuten geïncubeerd met chloroform en daarna verdund en getitreerd met KMBL283 als indicator en de stammen zelf. De titers van de culturen en de toename ten opzichte van de controle zonder bacteriën staan hieronder weergegeven. Voor titratie op KMBL 283 met de stammen zelf als indicator werden geen plaques gevormd (zie tabel 15).

TABEL 14

Titers van de supernatanten van de infectiemengsels en controle (alleen faag + medium) na 20 min. adsorptie.

Super- natanten	Q8		f1		MS ₂	
	p.f.u/ml	adsorptie %	p.f.u/ml	adsorptie %	p.f.u/ml	adsorptie %
controle	8.5×10^6	0	4×10^6	0	2.8×10^7	0
283 + faag	1.0×10^6	89	3.5×10^5	91.2	8×10^6	71.5
220 + faag	8×10^6	6	4×10^6	0	3×10^7	0

TABEL 15

Titers van culturen geïnfecteerd met MS₂ na 15 uur incuberen bij 33°C; getitreerd op KMBL 283.

bacteriestam	titer	toename t.o.v. controle
controle (MS ₂ + medium)	7×10^6	1.0
204	1.2×10^7	1.7
226	9×10^6	1.28
210	7.8×10^6	1.1
7B	1.2×10^7	1.7
L1	7×10^6	1.0
KMBL 283	2.2×10^{11}	3.1×10^4

Uit deze resultaten blijkt dat MS2 zich niet heeft kunnen vermenvuldigen op *P. putida* F-lac.

De kleine toename van 1.0 tot 1.7 die in enkele gevallen gemeten werd (zie tabel 15) zou afkomstig kunnen zijn van een enkele Lac⁺ cel in de cultuur die herkenbare F-pili maakt.

Het lijkt ons gerechtvaardigd uit de proeven te concluderen dat de *P. putida* F-lac stammen geen goede F-pili maken, zodat het noodzakelijke contact tussen de donor en acceptorcellen niet tot stand kan komen. Het falen van de kruisingen is hieraan te wijten.

V.6. SAMENVATTING EN DISCUSSIE

De L-stammen blijken geen F-factor (in 't algemeen sexfactor) te bezitten die gebruikt kan worden voor chromosoomoverdracht. Evenmin blijken de *atr*-genen op een plasmide gelokaliseerd te zijn dat analoog aan het CAM-plasmide (Shaham e.a., 1973) chromosomale genen kan transporteren.

Het blijkt mogelijk van *Escherichia coli* naar *Pseudomonas putida* een F-lac, F-gal, Fts-lac, Fts-gal of een F-laci (Mu-lets62) episoom over te dragen. De F-lac stammen zijn verder onderzocht.

De frequentie waarmee van KMBL283 de F-lac factor overgedragen kon worden naar *putida*-stammen was vergeleken met de frequenties opgegeven voor kruisingen binnen de *Enterobacteriaceae* (de Graaff, 1971; Chatterjee e.a., 1972) en binnen *Pseudomonas* (Dunn en Gunsalus, 1973; Rheinwald e.a., 1973) niet laag. Het effect van NG op de overdracht was veel geringer dan verwacht werd. Rekening moet gehouden worden met de waarschijnlijkheid dat L1 verminderd Res⁺ is of Res⁻ is.

Restrictie en modificatie eigenschappen kunnen pas gedetecteerd worden bij verdere kruisingen tussen de *putida*'s onderling en bij terugkruisingen naar *E. coli*.

De overdracht van F-lac van de *putida* Lac⁺ stammen naar Lac⁻ stammen bleek onmogelijk te zijn door 't ontbreken van functionerende F-pili.

Adsorptie van MS2, f1 en Q ϕ , F⁺ specifieke-fagen, aan Lac⁺ *putida*-

cellen kon niet worden vastgesteld. Evenals de *lac*-genen die tot expressie moeten komen om te kunnen groeien op lactose, zullen waarschijnlijk ook de structurele genen voor de F-pili die ook op de F-factor liggen, tot expressie gebracht worden.

Hoewel er niet veel bekend is over de expressie van structurele donorgenen in hybride stammen is er voldoende aanleiding om te stellen dat de donorfuncties in meer of mindere mate afhankelijk zijn van de gastheer-hybride en daardoor minder efficiënt tot uitdrukking komen dan in de oorspronkelijke stam (Meynell e.a., 1968; Jones en Sneath 1970). Met name is er een negatief effect geconstateerd bijvoorbeeld op de nitraat-inbouw en acetyleen-reductie in hybriden van *Klebsiella pneumonia* en *Escherichia coli* (Dixon en Postgate, 1972), op de vorming van β -galactosidase in *Proteus*-hybriden na overdracht van F-*lac* uit *Escherichia coli* (Falkow e.a., 1964). De vorming en functie van F-pili kan negatief beïnvloed worden (Falkow e.a., 1964; de Haan e.a., 1963). Tevens kunnen er deleties ontstaan in 't gastheer vreemde DNA zoals is vastgesteld voor het *lacy*-gen in *Shigella*-hybriden (Brenner en Falkow, 1971).

Genexpressie is afhankelijk van de specificiteit van het gastheer RNA-polymerase voor de promotor sites, die uitgeoefend wordt door de cofactor σ (Burgess, 1969). Het hierbij betrokken RNA-polymerase is voor *P. putida* ATCC 12633 beschreven door Johnson e.a. (1971). Enige overeenkomst in structuur tussen de core-enzymen van *E. coli* en *P. putida* werd aangetoond, terwijl ook duidelijke verschillen gevonden werden. Het *putida* RNA-polymerase gaf in vitro met T4 DNA een 5 - 6 maal minder efficiënte RNA-synthese dan met DNA van faag gh-1 die ATCC 12633 als gastheer heeft.

Het is dus niet onwaarschijnlijk dat in *P. putida* F-*lac* stammen de transcriptie van het *coli*-DNA door het *putida*-polymerase inefficiënt plaats vindt.

Een aanwijzing hiervoor werd verkregen na het overbrengen van de F-*lac*(*Muets*) van KA 441 naar de L-stammen L73 en 226. Onder omstandigheden dat de F-*lac*(*Muets*) tot expressie moest komen, dus op platen met lactose als voedingsbron, zagen de kolonies er altijd uit alsof ze gedeeltelijk lyseerden. Op media met andere C-bronnen zagen ze er homogeen uit. Het lijkt er dus op dat in de

putida-cel geen goede immuniteit verkregen wordt doordat er onvoldoende repressor gemaakt wordt. Daarnaast lukte het niet om fagen te isoleren. Bij titratie van Mu op Ll om een gastheermutant te isoleren, werden "plaques" gevormd waaruit geen fagen geïsoleerd konden worden. Dus behalve een slechte aanmaak van repressor, wordt eveneens een te laag niveau van andere Mu-enzymen bereikt waardoor geen goede fagen geproduceerd worden. De cellen gaan dood door een soort "un-balanced growth".

Bij een trage adsorptie van MS2, waardoor in 20 minuten geen adsorptie aangetoond kon worden, aan de *putida* F-lac cel die bemoeilijkt wordt door slechte F-pili, is het mogelijk dat faagvermenigvuldiging niet aangetoond kon worden door verminderde genexpressie. Tevens is de vertraagde groei op lactose een aanwijzing voor een laag enzym niveau.

Het ontbreken van of niet functioneren van de F-pili kan een structurele oorzaak hebben doordat geen evenwichtige productie van de structurele eiwitten plaats vindt.

Behalve de slechte genexpressie kan een bijkomende oorzaak een verschil in celwandstructuur zijn tussen *P. putida* en *E. coli*, waardoor de *coli*-eiwitten eenvoudig niet passen in de celwand van *P. putida*. Ook hierdoor kan de structuur van de F-pili zodanig verstoord zijn dat de functie verloren is gegaan.

Aangezien er geen restrictie voor het *coli*-DNA binnen de *putida*-cel wordt uitgeoefend, is het overdragen van F-factoren met één of meerdere genen geen probleem. Deze barrière die gevormd wordt door de specificiteit van het RNA-polymerase en mogelijk ook van de celwand-samenstelling kan opgelost worden door *P. putida* genetisch te beïnvloeden.

Met de F-factor als een soort paard van Troje, zouden *coli*-genen voor het RNA-polymerase overgedragen kunnen worden van *E. coli* naar *P. putida*. Verwacht wordt dat door het *coli*-RNA-polymerase de expressie van de *coli*-genen zoveel verbeterd wordt, dat onder andere goed functionerende F-pili verkregen worden.

Spontane integratie van de *coli*-F-factor in het chromosoom is nauwelijks te verwachten in *P. putida*, daar dit ook niet gebeurde in de meer aan *E. coli* verwante bacteriesoort *Citrobacter freundii* (de Graaff e.a., 1973). Door ook in *P. putida* kunstmatig via faag Mu homologie aan te brengen tussen de F-factor en het chromosoom

HOOFDSTUK VI

MUTATIEKARTERING IN SYNCHRONE CULTURES

VI.1 INLEIDING

Transductie als karteringstechniek is alleen geschikt voor zeer kleine gebieden van het chromosoom. Daarom werd tevens een methode bestudeerd waarmee over het gehele chromosoom genen gelokaliseerd konden worden. In het voorgaande hoofdstuk werden proeven beschreven waarmee conjugatie in *Pseudomonas putida* mogelijk moest worden. Uit de bereikte resultaten bleek dat in ieder geval op korte termijn geen conjugatie mogelijk zou zijn. Daarom werd nagegaan of mutatiekartering in synchrone cultures voor *P. putida* toepasbaar zou zijn.

Deze methode is gebaseerd op de eigenschap van het mutagene agens N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NG) om bij voorkeur in te werken op het DNA op de plaats waar de replicatievork zich bevindt zoals is aangetoond door Cerda-Olmedo e.a. (1968).

Toepassing van een NG-behandeling op monsters van een synchroon groeiende cultuur, genomen met kleine tijdsintervallen na elkaar, resulteert in een verhoging van de mutatiefrequentie voor dat gen dat gerepliceerd wordt op het moment van monstereen. In volgorde van de verhoogde terugmutatiefrequenties kunnen de overeenkomstige mutaties gerangschikt worden ten opzichte van de replicatietijd.

Deze techniek voor genlokalisatie is beschreven voor bacteriën: *Escherichia coli* (Cerda-Olmedo e.a., 1968; Ward en Glaser, 1969; Newton e.a., 1972), *Staphylococcus aureus* (Altenbern, 1966), *Streptococcus faecalis* (Stone Hill, 1966); en algen: *Anacystis nidulans* (Asato en Folsome, 1970) en *Chlorella* (Wanka en Moors, 1970). De toepasbaarheid blijkt algemeen te gelden voor micro-organismen waarin chromosoom-replicatie te synchroniseren is.

Voor *Pseudomonas putida* is nog geen synchronisatietechniek be-

schreven. De verscheidene synchronisatie procedures voor *E. coli* zijn niet allemaal geschikt voor mutatiekartering.

Twee procedures die bruikbaar zijn worden beschreven door Brostrom en Binkley (1969) en Ward e.a. (1970). Met beide methoden werd bij *E. coli* goede synchronisatie verkregen gedurende meerdere generaties in een cultuur waarin de celdichtheid hoog genoeg was om terugmutatiefrequenties te kunnen bepalen.

Brostrom beschrijft synchronisatie door middel van FPA, parafluorphenylalanine, een aminozuuranaloog van phenylalanine. De inbouw van FPA in plaats van phenylalanine in eiwitten verstoort indirect de DNA-synthese zodanig dat geen nieuwe replicatiecyclus in de cellen geïnitieerd wordt. Na verwijdering van FPA begint de DNA-synthese synchroon in alle cellen bij de oorsprong van replicatie (Carpenter en Binkley, 1968).

Ward beschrijft synchronisatie door middel van nalidixinezuur, NAL. NAL werkt direct en alleen in op de DNA-synthese waardoor deze specifiek geremd wordt (Goss e.a., 1964, 1965; Winshell en Rosenkranz, 1970). Het overbrengen van de met NAL behandelde cellen in vers medium zonder NAL resulteert in een synchrone initiatie van een nieuwe replicatiecyclus als de incubatie met NAL voldoende lang geweest is. Dat wil zeggen dat de incubatie moet duren tot en met het moment waarop normaliter initiatie op zou treden. Bij initiatie van een nieuwe replicatievork gaat de geblokkeerde oude replicatievork niet verder (Ward e.a., 1969, 1970). Beide chemicaliën hebben het voordeel dat alle stammen op een vergelijkbare manier tot synchrone groei gebracht worden.

Met *Pseudomonas putida* L-stammen hebben we zowel met FPA als met NAL synchronisatie kunnen bereiken. In VI.3 wordt de synchronisatie met FPA behandeld. De toepasbaarheid van NAL wordt besproken in VI.4.

Na de bepaling van de optimale condities voor de NG-behandeling (VI.5) wordt de mutatiekartering in cultures die met NAL gesynchroniseerd waren beschreven (VI.6).

VI.2 MATERIAAL EN METHODEN

Chemicaliën: FPA (parafluorphenylalanine) werd opgelost in water

tot de concentratie van $10^{-2}M$ als stockoplossing die bewaard werd bij $-20^{\circ}C$.

NAL (nalidixinezuur) werd direct voor het gebruik opgelost in 0.1 N NaOH (vlgs. Hane 1971) in de concentratie van 2 mg/ml.

Stammen: de stammen die gebruikt werden staan vermeld in VI.3 t/m VI.7.

Synchronisatie: de procedures voor het verkrijgen van synchronisatie worden behandeld in VI.3 en VI.4.

De controle op synchronisatie gebeurde met een PDP8 DEC-computer op de volgende wijze:

Te verwachten is dat door synchronisatie de groeicurve (log N/t) sprongsgewijs verloopt. De generatiecycli zijn door een gelijkblijvend aantal cellen per cyclus te herkennen aan plateau's, die door gelijktijdige deling met een factor 2 onderling verschillen. De methode is erop gebaseerd dat plateau's zich kenmerken door lineariteit zonder regressie. De berekening is afgeleid van Hald (1959). De eis werd gesteld dat bij synchronisatie de groeicurve in significant verschillende plateau's verdeeld wordt, die de duur van een generatiecyclus hebben.

DNA-bepaling: De colorimetrische bepaling van het DNA gebeurde met de diphenylamine-reactie volgens Burton (1956). De celmonsters werden hiertoe voorbereid op de manier beschreven door Lindquist (1971) voor de radiometrische bepaling van H^3 DNA in *E. coli* cellen. Voor de diphenylamine reactie werd aan de suspensies na hydrolyse van RNA in 0.1N NaOH albumine tot 0.4% eindconcentratie toegevoegd en daarna aangezuurd door toevoeging van een gelijk volume 14%-ige PCA. De suspensies werden gecentrifugeerd en de pellets volgens voorschrift verder behandeld. Voor het bepalen van de extinctie werden de monsters gecentrifugeerd en de supernatanten doorgemeten bij 595nm en 650nm. De extinctie bij 650nm werd bepaald om de extinctie door zeer fijne deeltjes die nog in de supernatanten achterbleven te meten. Uitgezet werd de extinctie bij 595nm verminderd met de E650, aangegeven met E(595-650).

VI.3 SYNCHRONISATIE DOOR FPA

VI.3.1 INLEIDING

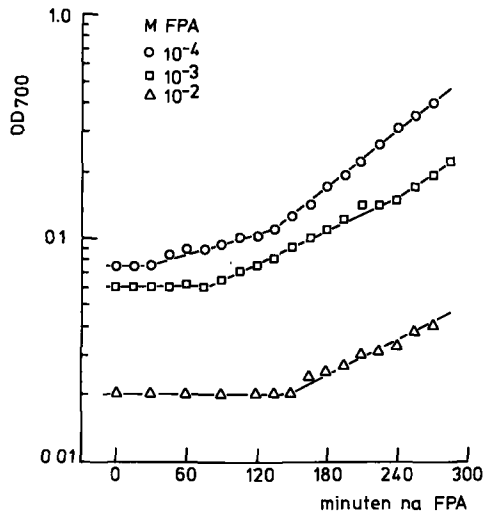
In eerste instantie werd FPA gebruikt om te synchroniseren. Dit gebeurt in synthetisch medium.

Voor *Escherichia coli* is incubatie gedurende 80 minuten met 10^{-3} M FPA voldoende om de DNA-synthese te remmen. Na overbrengen van de cellen in medium zonder FPA wordt de DNA-synthese synchroon geïnitieerd. Zowel de DNA-synthese als de celgroei starten onmiddellijk zonder lag-fase en blijven drie generaties synchroon. Er worden geen lethale bij-effecten beschreven (Carpenter en Binkley, 1968; Brostrom en Binkley, 1969).

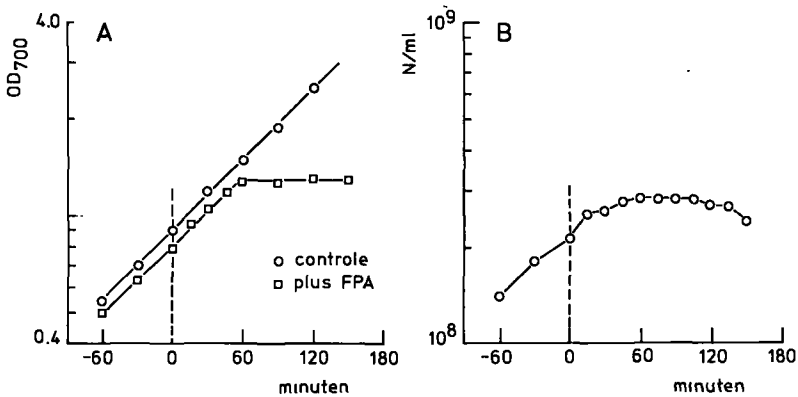
Van *Pseudomonas putida* stam PMBL-L werd eerst de gevoeligheid voor FPA bepaald. Hierop werd gebaseerd welke concentraties en incubatietijd voor synchronisatie toegepast konden worden. De proeven zijn gedaan met PMBL-L1, waarvan alle gebruikte mutanten zijn afgeleid.

VI.3.2 WERKWIJZE

De bacteriën werden vooraf gekweekt in M9-medium, waaraan 3×10^{-5} M phenylalanine toegevoegd was. Phenylalanine werd toegevoegd om de synthese van phenylalanine te drukken met de bedoeling dat FPA na toevoegen dan sneller opgenomen zou worden. Bij een celdichtheid van $\pm 5 \times 10^8$ cellen per ml werd de cultuur 1 : 2 overgeënt in medium zonder phenylalanine. Om eerst de phenylalanine in de cel op te laten maken werd pas na 15 minuten FPA toegevoegd. Na incubatie met FPA werd de cultuur afgefiltreerd over een 0.45 μ m Millipore-filter en gewassen met M9. De cellen werden van het filter geresuspendeerd in M9-medium 1 : 10 verdund en, nadat phenylalanine toegevoegd was tot 3×10^{-5} M, verder gekweekt. Gedurende de hele proef werd de OD₇₀₀ gevolgd.



Figuur 8. De invloed van incubatie met FPA (gedurende 80 minuten) op het hervatten van de groei na uitwassen van de FPA, gemeten voor drie concentraties 10^{-2} , 10^{-3} en 10^{-4} M FPA.



Figuur 9. Controle op de gevoeligheid van L1 voor FPA.

A. Het verloop van de OD₇₀₀ onder invloed van FPA vergeleken met die van een controle zonder FPA.

B. De verandering van het aantal kolonievormende cellen onder invloed van FPA gemeten gedurende 150 minuten.

Op $t = 0$ werd aan drie parallel culturen FPA toegevoegd in drie concentraties: 10^{-3} , 3×10^{-4} en 10^{-4} M. Er werd geen verschil in de gevoeligheid gemeten voor deze concentraties.

VI.3.3 RESULTATEN

VI.3.3.1 Gevoeligheid voor FPA

a. Om de optimale concentratie voor de synchronisatie te bepalen werden drie culturen met verschillende concentraties FPA geïn-cubeerd resp. 10^{-2} , 10^{-3} en 10^{-4} M, gedurende 80 minuten (dit is één delingstijd). Gekeken werd naar het hervatten van de groei na overbrengen in medium zonder FPA. In figuur 8 zijn de resultaten weergegeven. Uit de groeicurves voor de drie verschillende concentraties blijkt dat in tegenstelling tot *E. coli* bij *P. putida*:

1. een lag-fase optreedt die afhankelijk is van de concentratie; gemeten werd voor 10^{-4} M een lag-fase van 30 minuten, voor 10^{-3} M 60 minuten en voor 10^{-2} M 150 minuten.
2. als de groei hervat wordt blijkt de verdubbelingstijd gedurende enige tijd langer te zijn dan normaal ($\pm 1\frac{1}{2}$ x). Concentraties lager dan 10^{-4} M werden niet bestudeerd omdat al uit voorlopige proeven gebleken was dat bij 10^{-4} M al geen synchronisatie optrad (zie VI.3.3.2). Wegens de lange lag-fase zijn concentraties hoger dan 10^{-3} M niet bruikbaar voor synchronisatie.

b. Bekeken werd of 80 minuten incuberen met FPA een reële tijd is om groeistop te veroorzaken. De invloed van FPA op de celgroei werd nagegaan voor de concentraties 10^{-3} , 3×10^{-4} en 10^{-4} M.

In figuur 9 is weergegeven de OD_{700} en het aantal vitale cellen tegen de duur van de incubatie met FPA. Uit de grafieken blijkt dat na 60 minuten na toevoegen van FPA de celtoename geremd is en de OD_{700} niet meer toeneemt. Het verloop is voor de drie concentraties gelijk. Na 120 minuten begint het aantal kolonievormende cellen af te nemen. De incubatie met FPA is dus optimaal tussen 60 en 120 minuten. In de experimenten werd een incubatietijd van 80 minuten aangehouden.

De sterfte die gaat optreden bij 120 minuten incuberen bij FPA is een indicatie voor de grote schade die FPA aan het metabolisme toebrengt. De langere delingstijd die waargenomen wordt na het hervatten van de groei (zie figuur 8) na de FPA-behandeling is te wijten aan een lethale nawerking van FPA.

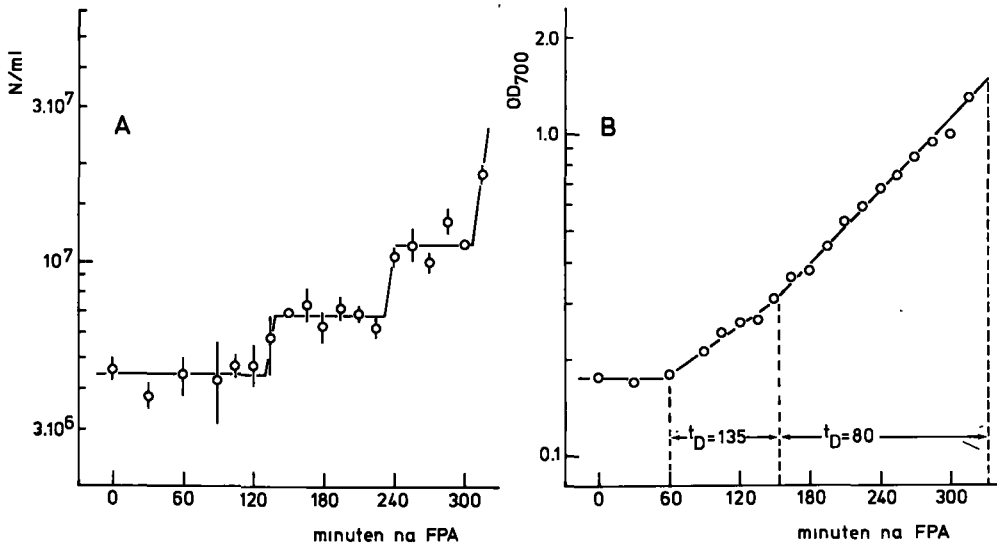
Ondanks het afwijkende gedrag van *P. putida* ten opzichte van *E. coli* in die zin dat bij *P. putida* na behandeling met FPA een lag-fase en een lethale nawerking worden waargenomen, werd toch synchronisatie door FPA bestudeerd.

VI.3.3.2 Synchronisatie met FPA

Voor de synchronisatie-experimenten werd aan de hand van de vorige proeven een incubatietijd van 80 minuten en een concentratie van 10^{-3} tot 10^{-4} M FPA aangehouden. Na de FPA-behandeling werden om het kwartier monsters genomen. Bepaald werden de OD₇₀₀ en het aantal kolonievormende cellen.

Met 10^{-4} M werd slechte synchronisatie verkregen voor hooguit één generatie. Bij 10^{-3} M duurde het erg lang (+ vier uren) voordat de eerste celdeling optrad die wel gesynchroniseerd bleek te zijn.

Synchronisatie voor meerdere generaties werd verkregen met $3 - 5 \times 10^{-4}$ M en is voor 3×10^{-4} M weergegeven in figuur 10. In de



Figuur 10. Synchronisatie onder invloed van 3×10^{-4} M FPA.
 A. De verandering van het aantal kolonievormende cellen (N/ml) uitgezet tegen de incubatie-tijd na de FPA-behandeling.
 De horizontale plateau's zijn berekend; de verticale lijntjes door de punten geven de spreiding weer.
 B. De groei gemeten als de OD₇₀₀ na de incubatie met FPA.

grafiek zijn de berekende plateau's gegeven.

De eerste deling is te zien na 2 uur en de sprongsgewijze toename vindt plaats binnen een kwartier. Dit geldt voor drie generaties. De toename is echter kleiner dan 2. Dit effect wordt nog sterker bij hogere concentraties. Dit wijst erop dat een deel van de cellen niet deelneemt aan de celdeling en een deel van de dochtercellen niet vitaal is.

Volgens de OD-curve krijgen we eerst een lag-fase van ± 60 minuten waarna de verdubbelingstijd langer is dan 80 minuten. Door de plateau's wordt een generatiecyclus van ± 80 minuten weergegeven. Waaruit blijkt dat de groeisnelheid niet beïnvloed wordt, maar een deel van de populatie niet meedoet aan het delingsproces. De lethale nawerking wordt bij hogere concentraties sterker zodat dit een ongunstige invloed heeft op de synchronisatie, bijvoorbeeld bij 10^{-3} M is pas na 4 uren de eerste celdeling zichtbaar.

Wegens de lag-fase en de lethale nawerking werd vervolgens synchronisatie door middel van NAL bestudeerd.

VI.4 SYNCHRONISATIE DOOR NAL

VI.4.1 INLEIDING

Synchronisatie door nalidixinezuur (NAL) heeft als voordeel boven FPA dat zowel in rijk medium als in minimaal medium geïncubeerd kan worden. De experimenten beschreven voor *Escherichia coli* (Ward e.a., 1969, 1970; Newton e.a., 1972) werden alle gedaan in synthetisch medium. *E. coli* heeft in rijk medium een zeer korte delingstijd en daardoor meerdere replicatievorken per replicatiecyclus. Deze methode is dan voor genkartering niet bruikbaar door een vermeerderd aantal terugmutatie-frequentiepleken voor een gen per cyclus. De replicatiesnelheid is bij *E. coli* onafhankelijk van de groeisnelheid. Bij een delingssnelheid van 40 minuten en langer (in minimaal medium) heeft *E. coli* maar één replicatievork per cyclus. (Helmstetter en Cooper, 1968; Maaløe en Kjeldgaard, 1966; Pritchard e.a., 1969; Ward en Glaser, 1969).

Hoe de relatie delingssnelheid en replicatiesnelheid bij *Pseudomonas putida* is en tot uitdrukking komt in het aantal replicatie-

punten op het chromosoom in de verschillende media's is niet bekend. Om hierin enig inzicht te verkrijgen werd onderzocht hoe de DNA-synthese verloopt in een gesynchroniseerde cultuur in M9-medium en in NB.

Daarvoor hebben we eerst nagegaan wat de optimale concentratie NAL is om te gebruiken voor synchronisatie van *P. putida*. Omdat EDTA nodig bleek te zijn om de doorlaatbaarheid van de celwand voor NAL te verbeteren, hebben we eerst de gevoeligheid van *P. putida* voor EDTA bepaald. Gebruikt werd PMBL-L1 als ouderstam van alle mutanten.

VI.4.2 WERKWIJZE

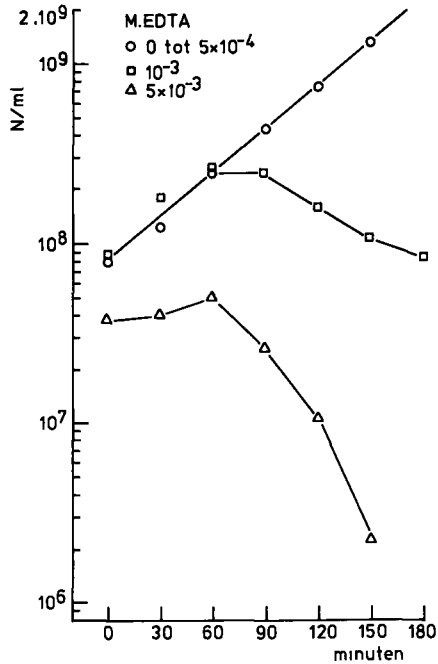
Een exponentieel groeiende cultuur met een celdichtheid van $\pm 2 \times 10^8$ cellen per ml werd onder verschillende condities geïncubeerd met NAL. Om na de NAL-behandeling de NAL te verwijderen werden de cellen gecentrifugeerd, gewassen en overgebracht naar vers medium. De groei werd gedurende het gehele experiment gevolgd met de bepaling van OD₇₀₀.

VI.4.3 RESULTATEN

VI.4.3.1 Gevoeligheid voor NAL; invloed van EDTA

Aanvankelijk werd geen effect van NAL op *P. putida* gevonden, ook niet bij hoge concentraties. Verondersteld werd dat dit te wijten kon zijn aan een slechte doorlaatbaarheid van de celwand voor NAL. Het is bekend dat voor een aantal stoffen die door o.a. *Pseudomonas* slecht opgenomen worden, de doorlaatbaarheid sterk beïnvloed wordt na toevoegen van EDTA (Brown en Richards, 1965; Brown en Melling, 1969; Smith 1970; Cleeland e.a., 1970; Haslam e.a., 1970).

De invloed van EDTA op de werking van NAL werd nagegaan. Daarom moest eerst de gevoeligheid voor EDTA bepaald worden. In figuur 11 is het verloop van het aantal kolonievormende cellen uitgezet tegen de incubatietijd met verschillende concentraties EDTA. Bij een concentratie van 5×10^{-4} M is er geen effect te zien op het

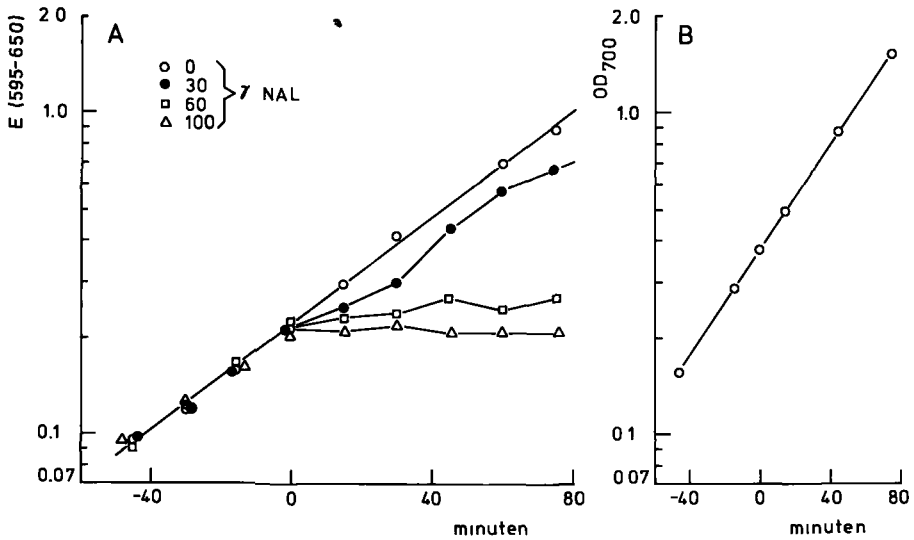


Figuur 11. Invloed van verschillende concentraties EDTA op het aantal kolonievormende cellen in een L1-cultuur in NB. De verandering van N/ml vallen voor 0, 5×10^{-5} , 10^{-4} en 5×10^{-4} M EDTA samen en zijn als een lijn weergegeven.

verloop van de groeicurve.

De gevoeligheid voor NAL werd weer nagegaan nu na toevoeging van 10^{-4} M EDTA aan het medium. Bepaald werd de DNA-synthese onder invloed van 0 - 100 γ NAL per ml, zie figuur 12. Het blijkt dat de DNA-synthese geremd wordt bij concentraties hoger dan 60 γ . Figuur 13 illustreert de invloed van EDTA op de werking van NAL. Daaruit blijkt dat met 70 γ NAL zonder EDTA geen remming plaats vindt en met EDTA wel.

Toevoegen van EDTA aan het medium om de celwand beter doorlaatbaar te maken heeft geen invloed op de hoeveelheid intracellulair DNA (zie figuur 14). Het verschil in E(595-650) in figuur 13 is dus toe te schrijven aan de remming van de DNA-synthese door NAL.



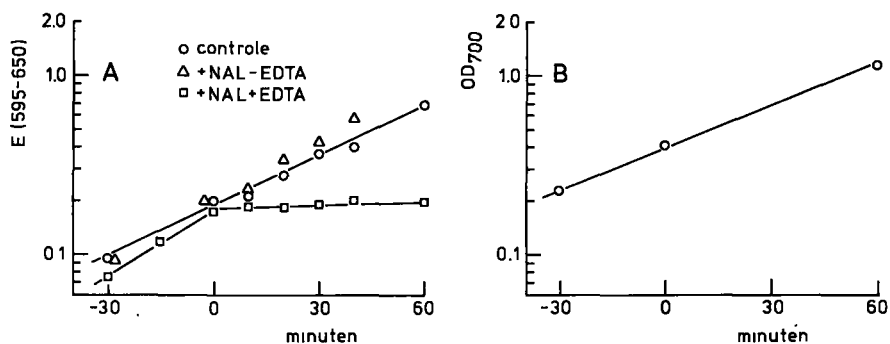
Figuur 12. De invloed van verschillende concentraties NAL op de DNA-synthese en de toename van de celmassa (OD₇₀₀) van een L1 cultuur in NB. Op t = 0 werd aan drie parallel cultures NAL toegevoegd in de concentratie van 30, 60 en 100 γ NAL/ml. Aan de controle werd een gelijke hoeveelheid 0.1 N NaOH zonder NAL toegevoegd.

A. De verandering van de DNA-synthese onder invloed van NAL uitgezet tegen de incubatietijd.

B. De toename van de celmassa voor de vier culturen gedurende de incubatie met en zonder NAL. Er werd geen verschil gemeten voor de OD van de verschillende culturen en zijn in een lijn weergegeven.

Vervolgens werd bepaald of de DNA-synthese weer op gang komt na uitwassen van NAL. Daarvoor hebben we een cultuur geïncubeerd met 100 γ NAL per ml gedurende een halve generatietijd, de duur van de incubatie met NAL toegepast bij *E. coli*, en een hele generatieduur van 45 minuten in NB. Uit figuur 15 blijkt dat de DNA-synthese weer meteen op gang komt, ook na langdurig incuberen.

Omdat de DNA-synthese met NAL onmiddellijk geremd wordt en na verwijdering van NAL meteen weer hervat wordt werd de synchronisatie door NAL verder bestudeerd.



Figuur 13. A. De verandering van de DNA-synthese van een L1 cultuur onder invloed van NAL met EDTA in het medium vergeleken met de DNA-synthese van een cultuur met NAL zonder EDTA en van een cultuur zonder NAL.

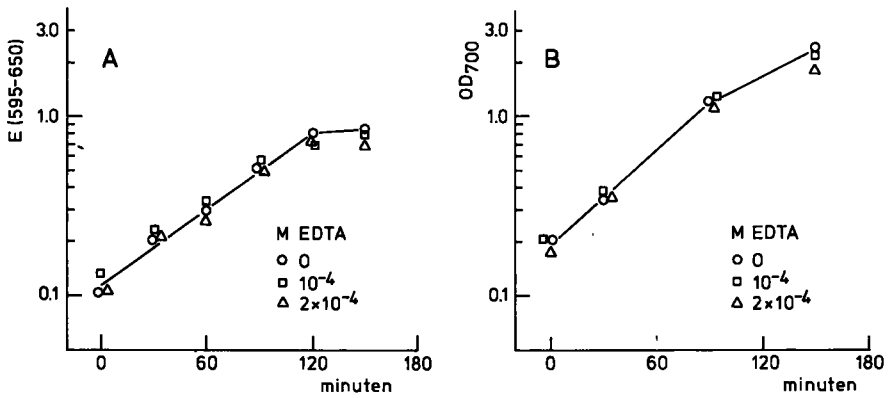
Op $t = 0$ aan de cultuur met EDTA (10^{-4} M) NAL toegevoegd in de concentratie van $70 \mu\text{g/ml}$.

B. De groei van de drie culturen weergegeven als de OD_{700} .

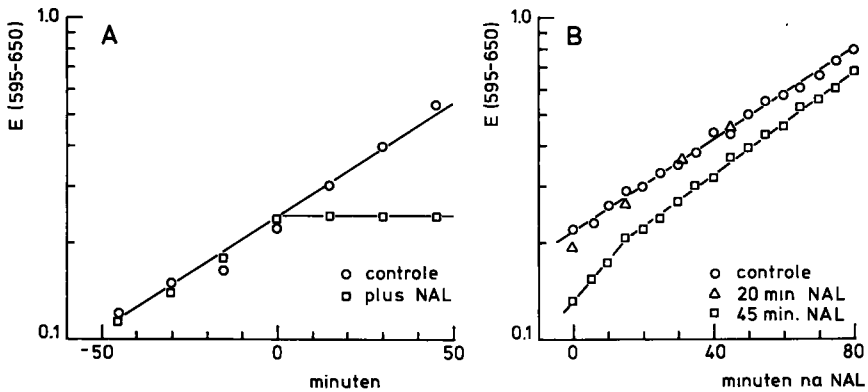
VI.4.3.2 Synchronisatie

Synchronisatie van de DNA-synthese kan gemeten worden aan de sprongsgewijze celtoename zoals bij FPA werd gedaan. Synchronisatie is aan de DNA-synthese zelf alleen aantoonbaar als deze discontinue verloopt, dat wil zeggen als de generatietijd langer is dan de DNA-replicatietijd. De synchronisatie van de DNA-synthese werd gelijk met de celdeling bestudeerd in M9-medium waarin *P. putida* een verdubbelingstijd (t_D) van ± 80 minuten heeft. De resultaten staan uitgezet in figuur 16.

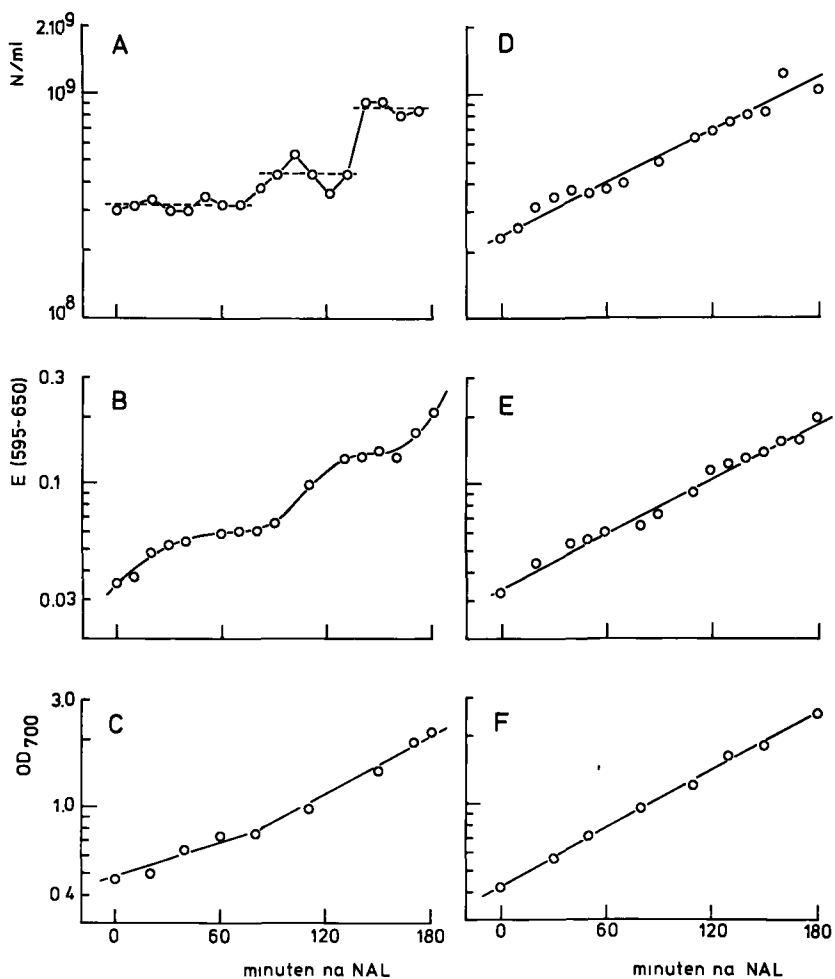
In figuur 16 A t/m C is weergegeven de invloed van $80 \mu\text{g}$ NAL. Te zien is dat de eerste sprong in de celdeling na 75 minuten plaatsvindt en zich herhaalt na 70 minuten. De generatietijd is 75 minuten. De DNA-synthese verloopt duidelijk discontinue en vindt plaats gedurende 40 - 50 minuten. Zowel de celdeling als de DNA-synthese zijn gesynchroniseerd. De toename van beide is bij de eerste sprong kleiner dan 2, bij de tweede sprong zeker 2.



Figuur 14. Invloed van EDTA op het DNA-gehalte in de cellen.
 A. Weergegeven wordt de verandering van de E(595-650) voor een controle cultuur zonder EDTA (O) en voor twee cultures met EDTA, 10^{-4} en 2×10^{-4} M.
 B. De verandering van de OD₇₀₀ voor de controle cultuur en de twee cultures met EDTA.
 Zowel de toename van de celmassa (OD₇₀₀) als de toename van het DNA-gehalte vallen voor de drie cultures geheel samen en zijn in beide figuren als een lijn gegeven.



Figuur 15. DNA-synthese tijdens incubatie met NAL en na het uitwassen van NAL.
 A. De DNA-synthese gemeten tijdens incubatie met 100γ NAL/ml; en vergeleken met een cultuur zonder NAL. Op $t=0$ NAL toegevoegd.
 B. De DNA-synthese van een cultuur na 20 minuten en na 45 minuten incuberen met 100γ NAL/ml vergeleken met een controle die op dezelfde manier behandeld is maar zonder NAL.



Figuur 16. A t/m C. Synchronisatie van L1 in M9-medium na incubatie gedurende 60 minuten met 80γ NAL/ml.

Uitgezet zijn tegen de incubatietijd na de NAL-behandeling de verandering van het aantal kolonievormende cellen per ml (A) de DNA-synthese E(595-650) (B), en de groei als de OD₇₀₀ (C).

D t/m F. Het aantal kolonievormende cellen, de DNA-synthese en de OD₇₀₀ van een controle cultuur die gelijk behandeld werd als de NAL-cultuur, zij het zonder NAL.

Figuur 16 D t/m F geeft een controle-experiment weer zonder NAL-behandeling. De celdeling, DNA-synthese en OD₇₀₀ curve verlopen continue.

Evenals bij de FPA-synchronisatie blijkt ook bij NAL bij de eerste deling een deel van de populatie niet mee te doen. Dit wordt ook weergegeven in de OD₇₀₀ waarvan de verdubbelingstijd langer is dan 80 minuten gedurende de eerste generatie na de NAL-behandeling. Bij FPA was dit effect langer waar te nemen gedurende meerdere generaties. Tevens trad na behandeling met FPA een lag-fase op voordat de groei hervat werd. Na de behandeling met NAL treedt geen lag-fase op.

Dit zijn twee nadelen van FPA ten opzichte van NAL en de redenen waarom voor de mutatiekartering NAL gebruikt werd om de culturen te synchroniseren.

Mutatiekartering werd bij *E. coli* gedaan in minimaal medium waarin de replicatietijd en de delingstijd evenlang waren. Voor *P. putida* hebben we vastgesteld dat in M9-medium de replicatiecyclus \pm 45 minuten duurt. Als bij *P. putida* de replicatiesnelheid onafhankelijk is van de groeisnelheid zoals aangetoond is voor *E. coli* met uitzondering van extreme situaties, dan vallen voor *P. putida* de generatietijd en replicatietijd in NB samen. Daarom werd voor de mutatiekartering gekweekt in NB. De synchronisatie werd gedaan met 60 tot 100 γ NAL per ml en een incubatietijd van minstens 20 minuten werd aangehouden.

VI.5 OPTIMALE CONDITIES VAN DE NG-BEHANDELING

VI.5.1 INLEIDING

Om de terugmutatie-frequentie van de verschillende mutaties te kunnen bepalen moet de mutagene werking van NG zo groot mogelijk zijn en de overleving moet zo hoog mogelijk blijven.

De optimale condities zoals ze voor *Escherichia coli* zijn uitgezocht zijn als volgt. De hoogste opbrengst aan mutanten wordt verkregen onder groeicondities. Daarbij treedt echter een onevenredig grote sterfte op. De optimale pH voor de werking van NG ligt bij pH 5 - 6. De grootste toename van mutanten wordt gevonden tijdens

de eerste 15 minuten van de NG-behandeling. Voor de mutagene werking van NG is geen actieve replicatie nodig tijdens de NG-behandeling. (Adelberg e.a., 1965; Cerda-Olmedo e.a., 1967; Cerda-Olmedo en Hanawalt, 1968b; Querola e.a., 1971; Süssmuth en Lingens, 1968; Süssmuth en Haerlin, 1972).

Omdat voor de mutatiekartering de replicatietijd als referentie gebruikt wordt moet de replicatie al direct bij monstereen gestopt worden en mag tijdens de NG-behandeling niet op gang komen.

Wij hebben voor *P. putida* deze verschillende aspecten nagegaan met PMBL-L1 en L67 (*his*, *ilv*).

TABEL 16

Terugmutatiefrequentie van *his* en *ilv* (kenmerken van L67) onder invloed van NG.

A: concentratie NG gevarieerd; incubatietijd is 15 minuten.

concentratie NG in mg/ml	overleving t.o.v. 0 in %	terugmutatiefrequentie ($\times 10^{-7}$)	
		<i>his</i>	<i>ilv</i>
0	100	0.9	0.5
0.25	85	6.7	26
0.5	73	11.0	36
0.75	60	23.4	56
1.0	55	25.6	40
1.5	42	28.2	48

B: incubatietijd gevarieerd; concentratie NG is 1.0 mg per ml.

incubatietijd (min)	overleving t.o.v. 0 in %	terugmutatiefrequentie ($\times 10^{-6}$)	
		<i>his</i>	<i>ilv</i>
10	66	1.3	3.7
20	44.5	2.6	3.7
30	24.4	-	4.3
40	15.6	1.6	3.0
60	6.7	1.0	3.0

VI.5.2 RESULTATEN

VI.5.2.1 Overleving *Pseudomonas putida* bij pH 5 - 6

Gekeken werd naar de invloed van verschillende buffers bij verschillende pH's op de overleving van *P. putida* PMBL-L1. In de range pH 5 tot 6 die optimaal is voor de werking van NG, treedt geen sterfte op in 0.05 M Tris-maleaat-buffer pH 5.0 (Adelberg e.a., 1965) en in 0.15 M Na-Ac-buffer tot pH 5.5. Vervolgens werd de overleving van L1 voor NG in deze twee buffers bepaald bij resp. pH 5.0 en 5.8 met een incubatietijd van 15 minuten. In Tris-maleaat neemt de overleving snel af tot $\pm 2\%$ bij 100 γ NG per ml. In de Na-Ac-buffer is de overleving bij 1500 γ NG/ml nog 65%. Omdat de overleving zoveel beter was in de acetaatbuffer werden de NG-behandelingen verder uitgevoerd in deze buffer.

VI.5.2.2 Optimale concentratie en incubatie-tijd

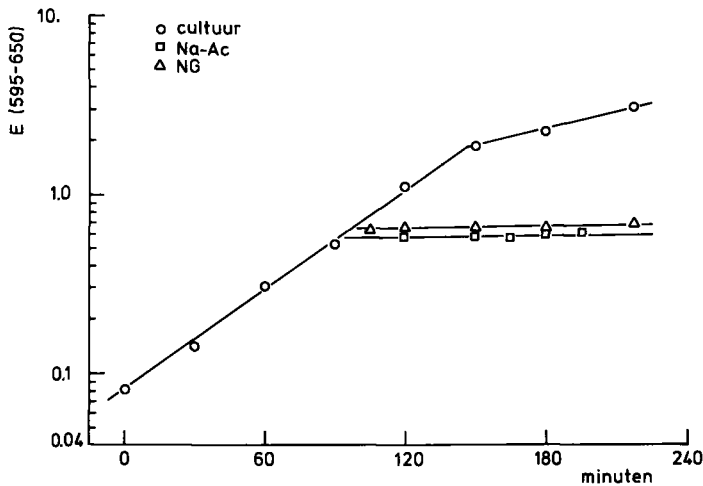
Voor het bepalen van de optimale concentratie NG en incubatietijd werden de terugmutatiefrequenties bepaald voor de kenmerken *his* en *ilv* van L67. Zowel de concentratie als de incubatietijd werden gevarieerd. De resultaten zijn weergegeven in tabel 16. De beste resultaten werden verkregen met 15 minuten incuberen en 1.0 mg NG per ml.

VI.5.2.3 DNA-synthese in Na-Ac-buffer

Het is belangrijk voor de mutatiekartering dat de replicatie geblokkeerd is en ook blijft tijdens de NG-behandeling. Wij hebben de DNA-synthese vergeleken van een cultuur in NB met monsters geïncubeerd in Na-Ac-buffer met en zonder NG gedurende 120 minuten. Zie figuur 17. Het is duidelijk dat in koude Na-Ac-buffer de DNA-synthese direct stopt en niet op gang komt tijdens incubatie bij 28°C, ook niet tijdens de NG-behandeling.

VI.5.2.4 Procedure NG-behandeling

De procedure die hieruit volgde voor de NG-behandeling was als volgt:



Figuur 17. De DNA-synthese van L1 in NB, in Na-Ac-buffer en in NG. Op $t = 90$ werden uit de NB cultuur 10 monsters genomen die een gelijk volume Na-Ac-buffer gekoeld werden tot 0° . Na afcentrifugeren werden vijf monsters verder geïncubeerd in NG (opgelost in Na-Ac) terwijl de overige vijf in de NB + Na-Ac verder geïncubeerd werden bij 28°C . Op verschillende tijden werd het DNA-gehalte van de monsters bepaald. Uitgezet zijn de waarden voor de $E(595 - 650)$ van monsters uit de cultuur (cultuur), en na $t = 90$ voor de NG-monsters en de Na-Ac-monsters.

Na monsteren uit de gesynchroniseerde cultuur werden de monsters direct gekoeld in 0.15 M Na-Ac buffer pH 5.8, afgecentrifugeerd en de cellen geresuspendeerd in een NG-oplossing in dezelfde buffer met een concentratie van 1.0 mg NG per ml. De NG-suspensies werden 15 minuten geïncubeerd bij 28°C , daarna met buffer 1 : 1 verdund en direct afgecentrifugeerd en gewassen met M9 van 0°C en opgenomen in NB + M9 (1 : 1 gemengd). De cellen werden uitgeplaat op selectieplaten waaraan 1% NB (v/v) was toegevoegd.

VI.6 MUTATIEKARTERING

VI.6.1 INLEIDING

Bij deze techniek van genkartering wordt de replicatietijd als referentie gebruikt om de genen te lokaliseren.

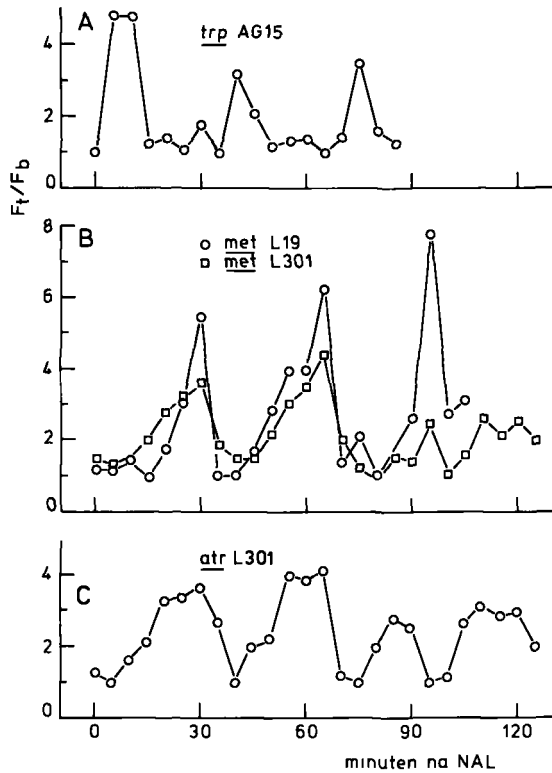
Pritchard e.a. (1968) en Ward e.a. (1970a) hebben aangetoond dat de DNA-synthese na de NAL-behandeling weer start bij de oorsprong van replicatie. Bij zorgvuldige monsterring uit de synchrone cultuur komt de tijd na de NAL-behandeling waarop een terugmutatiepiek verschijnt praktisch overeen met het tijdstip van replicatie van dat gen in de replicatiecyclus. Om de genen ten opzichte van elkaar te kunnen plaatsen moet de replicatietijd nauwkeurig vastgesteld kunnen worden. Wij zijn er in eerste instantie van uitgegaan dat uit de herhaling van de terugmutatiepieken in een tweede en derde generatie de replicatietijd bepaald kan worden. De plaats van de genen werd bepaald ten opzichte van de replicatiecyclus en daarnaast als extra referentie ten opzichte van het gemeenschappelijk *trp* kenmerk in de AG15 stammen.

VI.6.2 WERKWIJZE

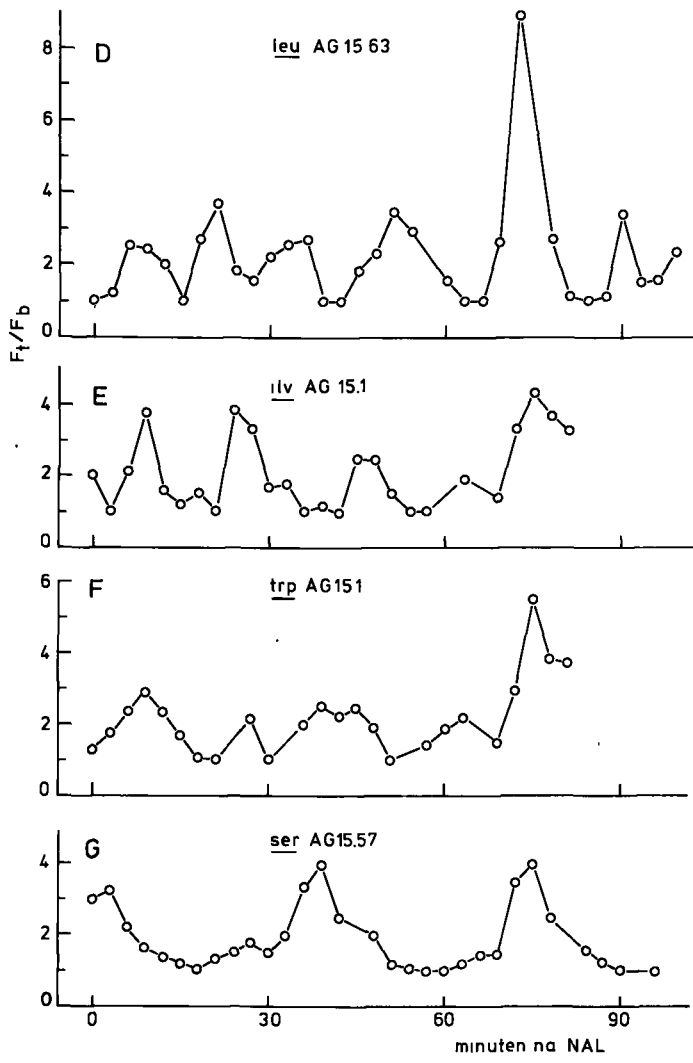
Uit een in NB met NAL gesynchroniseerde cultuur (zie VI.4) werden op korte tijdsintervallen na elkaar 5 ml monsters genomen die afgekoeld werden in Na-Ac-buffer en met NG behandeld werden (zie VI.5). Het eindvolume van de monsters was meestal 1.5 ml. Hieruit werd het aantal kolonievormende cellen bepaald. Van twee verdunningen werden in duplo monsters van 0.2 ml op selectieplaten uitgestreken. Gedurende het gehele experiment werd om de 15 minuten de OD₇₀₀ bepaald en het aantal kolonievormende cellen.

VI.6.3 RESULTATEN

In figuur 18 zijn de resultaten gegeven van de invloed van NAL en NG op het verloop van de terugmutatiefrequenties van de kenmerken *met* en *atr* van L19 en L301, en van de kenmerken *trp*, *ilv*, *leu* en *ser* van AG15, AG15.1, AG15.63 en AG15.57. Uitgezet zijn de veranderingen van de terugmutatiefrequenties van de genen ten opzichte van de basisfrequentie (F_t/F_p) tegen de tijd



Figuur 18. De verandering van de terugmutatie-frequentie van verschillende genen onder invloed van NG na synchronisatie door NAL. Uitgezet is het quotiënt van de verhoogde terugmutatie-frequentie en de basisfrequentie (F_t/F_b) tegen de tijd van monstereen. Geïncubeerd werd met 60γ NAL/ml gedurende 20 minuten.



van monsteren.

In de eerste plaats: we krijgen onder invloed van NG in synchrone cultures pieken in de terugmutatiefrequenties. Op grond van de herhaling van de pieken vallen de stammen uiteen in twee groepen, nl. groep I, waarbij de ruimte tussen de pieken 30 - 35 minuten is en groep II, waarbij de tijd tussen de pieken 15 - 20 minuten is. Dit is nog eens weergegeven in tabel 17.

Beide perioden wijken af van de replicatietijd die vastgesteld werd op \pm 45 minuten. De oorzaak van deze afwijking wordt besproken in VI.6.4.

TABEL 17

Plaats van de pieken voor de terugmutatiefrequentie van de genen uit figuur 18. De stammen zijn in twee groepen ingedeeld naar de groeisnelheid (zie tekst). Plaats van de pieken in minuten.

GROEP I: L19, L301, AG15, AG15.57

<u>gen</u>	<u>1° piek</u>	<u>2° piek</u>	<u>3° piek</u>	<u>4° piek</u>
<i>met</i>	25 - 30	60 - 65	95	
<i>atr</i>	25 - 30	60	85 - 90	115
<i>trp</i>	9	47	75	
<i>ser</i>	0 - 3	39	75 - 81	

GROEP II: AG15.1 en AG15.63

<u>gen</u>	<u>1° piek</u>	<u>2° piek</u>	<u>3° piek</u>	<u>4° piek</u>	<u>5° piek</u>
<i>trp</i>	9 - 12	25	45	63	57
<i>ilv</i>	3 - 9	25	47		78
<i>leu</i>	6 - 9	21 ; 33	51	72	90

Omdat in ieder geval de eerste frequentiepiek direct gekoppeld is aan de replicatiecyclus kunnen we gebaseerd op de plaats van de eerste piek de genen rangschikken.

Als de replicatietijd 45 minuten is en gesteld wordt op 1 dan is de plaatsing als volgt.

In een gebied van:

0 tot 0.1 *ser4*
0.07 tot 0.2 *ilv9*
0.1 tot 0.275 *leu22* en *trp6*

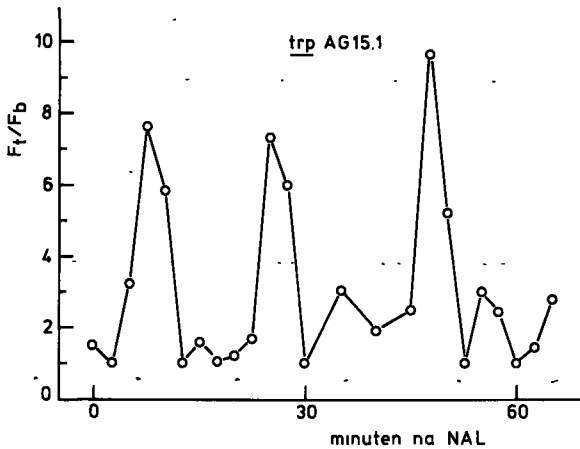
en van:

0.5 tot 0.7 *met3* en *atr17*

De genen voor *trp*, *ser*, *ilv* en *leu* vormen duidelijk een andere koppelingsgroep dan *met* en *atr*. De resultaten zijn niet nauwkeurig genoeg om de plaats van *trp*, *ilv* en *leu* onderling exact aan te geven evenmin van *met* en *atr*.

De nauwkeurigheid waarmee de genkartering kan plaats vinden hangt af van de scherpte van de frequentiepieken. Bij gelijkblijvend oppervlak van de pieken zal bij goede synchronisatie de piek hoger en smaller worden dan bij een minder goede synchronisatie.

Synchronisatie van NAL berust op de remming van de DNA-synthese tot minstens de groeifase van de cel bereikt wordt waarin normaliter initiatie plaats vindt van een replicatiecyclus (Ward e.a., 1970). Maximale synchronisatie is te verwachten bij een in-

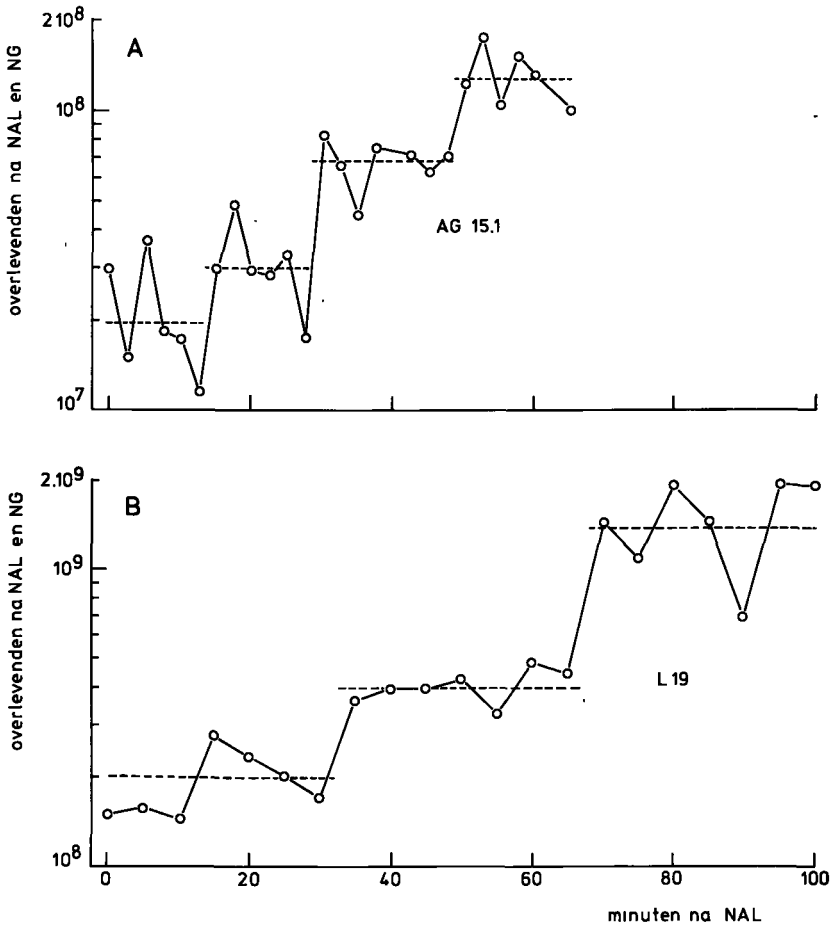


Figuur 19. De verandering van de terugmutatie-frequentie van het *trp*-gen van AG15.1 onder invloed van NG na synchronisatie door NAL (geïncubeerd met 100 γ /ml, gedurende 20 minuten. Uitgezet is tegen de tijd van monsteren, het quotiënt van de terugmutatiefrequentie en de basisfrequentie (F_t/F_b).

subatietijd die gelijk is aan een hele generatietijd. Dan immers zijn alle cellen in het stadium gekomen waarbij initiatie van een nieuwe replicatievork zal optreden.

Wij hebben geprobeerd met hogere doses NAL (80 en 100 γ per ml waarmee sneller remming van de DNA-synthese verkregen wordt en door langer te incuberen de synchronisatie te verbeteren.

In figuur 19 is het resultaat gegeven voor een synchronisatie van



Figuur 20. Het aantal vitale cellen in monsters van een synchronoon groeiende cultuur van AG15.1 (A) en L19 (B) na de NG-behandeling uitgezet tegen de tijd van monsteren. Voor synchronisatie werd geïncubeerd met 60 γ NAL/ml resp. gedurende 25 en 20 minuten.

AG15.1 met 100 γ NAL en een incubatietijd van 20 minuten. Hieruit blijkt dat het mogelijk is met een hogere concentratie NAL scherpere pieken te krijgen (vergelijk figuur 18F). In de meeste gevallen echter was het resultaat veel slechter door een bijkomende lethale nawerking van NAL.

Verlenging van de incubatietijd bracht eveneens een complicatie mee die in de volgende paragraaf (VI.6.4.1) besproken zal worden evenals de lethale nawerking (VI.6.4.2).

We kunnen als conclusie uit de resultaten vaststellen dat deze techniek voor genkartering in ieder geval geschikt is om genen te rangschikken op het chromosoom.

VI.6.4 COMPLICATIES BIJ DE NAL-SYNCHRONISATIE

VI.6.4.1 Versnelde reïnitiatie van de DNA-replicatie

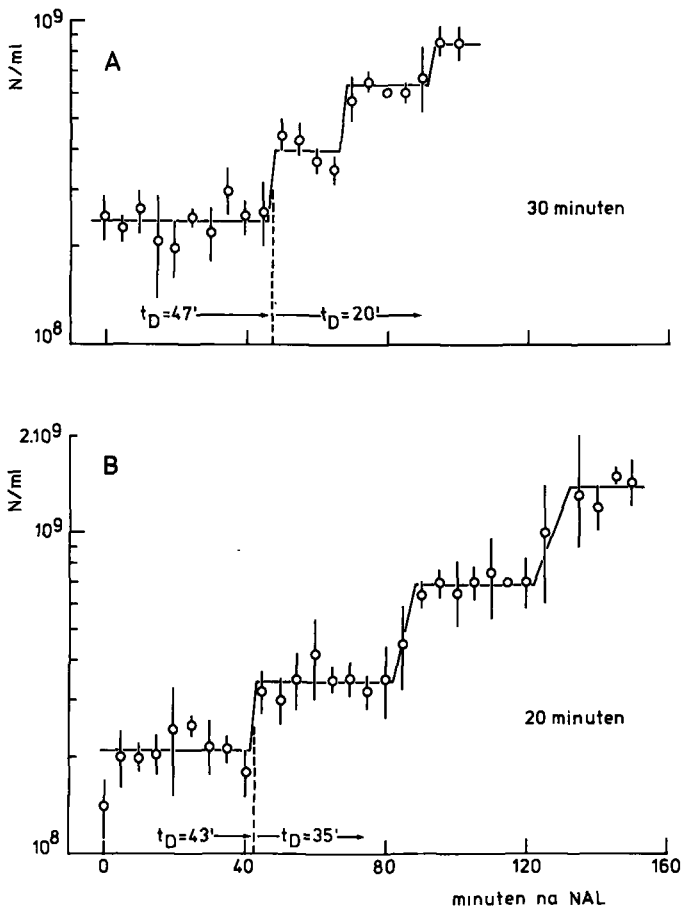
De tijdsintervallen waarmee de pieken in figuur 18 en 19 zich herhalen zijn korter dan de replicatietijd die vastgesteld was op 45 minuten (zie figuur 18) en variëren daarbij afhankelijk van de stam.

Bij *Escherichia coli* wordt slechts dan een tweede vork geïnitieerd voordat de oude vork de cyclus voltooid heeft als de delingstijd korter is dan de replicatiecyclus (o.a. Ward en Glaser, 1969b). In tegenstelling tot de resultaten van de synchronisatie-experimenten met NAL, zoals ze beschreven zijn voor *E. coli*, blijkt bij *Pseudomonas putida* na de NAL-behandeling versneld reïnitiatie van de replicatie op te treden in NB. De delingstijd die gekoppeld is aan initiatie van een replicatieronde (Pritchard e.a., 1968) moet in dat geval na de NAL-behandeling aantoonbaar korter zijn dan ervoor.

In figuur 20a en b is voor L19 en AG15.1 het aantal kolonievormende cellen in de celmonsters na de NG-behandeling uitgezet tegen de incubatietijd na de NAL-behandeling. De delingscycli zijn duidelijk af te leiden uit de "plateau's" en zijn resp. 30 en 15 minuten, wat goed overeenkomt met de tijd tussen de pieken in figuur 18 en 19 en zijn duidelijk korter dan de generatietijd van 45 minuten in NB zonder NAL. Bij nadere beschouwing blijken de gebruik-

te stammen in normale groeiers ($t_D = 45$ minuten) dit is groep I en snelle groeiers ($t_D = 35$ minuten) te weten groep II (zie tabel 17) verdeeld te kunnen worden.

In figuur 21 worden de resultaten gegeven van synchronisatie van L1 in NB door behandeling met NAL (60 γ /ml) gedurende 20 en



Figuur 21. Invloed van de duur van de incubatie met NAL op de delingstijd van L1. Geïncubeerd werd in NB met 60 γ NAL/ml gedurende A: 30 minuten en B: 20 minuten.

Uitgezet is de verandering van het aantal kolonievormende cellen tegen de incubatietijd na de NAL-behandeling. De horizontale plateau's zijn berekend; de verticale lijntjes door de punten geven de spreiding aan.

30 minuten. L1 heeft normaliter in NB een delingstijd van 45 minuten. Uit de grafieken blijkt dat na de NAL-behandeling de delingstijd in de tweede en derde generatie korter geworden is, afhankelijk van de incubatietijd resp. 35 en 20 minuten. De eerste generatiecyclus heeft de normale t_D van 43 en 47 minuten. De verkorte delingstijd in de volgende generaties is een gevolg van versnelde reïnitiatie van de DNA-replicatie.

In figuur 15 was de DNA-synthese weergegeven van L1 na een 45 minuten durende incubatie met NAL. Ten opzichte van de controle met een constante $t_D = 43$ minuten vertoont de NAL-cultuur een versnelde DNA-synthese.

De replicatietijd mag dus niet afgeleid worden uit de herhaling van de frequentiepieken voor een gen. Door versneld initiëren van meerdere replicatievorken binnen een replicatiecyclus wordt het onderscheidend vermogen van deze karteringstechniek gering. Deze versnelde reïnitiatie na de NAL-behandeling is een onverwachte complicatie.

Bij verder gebruik van deze techniek is het aan te bevelen die omstandigheden te kiezen waarbij de groeisnelheid zodanig vertraagd wordt, dat na NAL-behandeling de replicatiecycli elkaar niet overlappen. Hierbij wordt gedacht aan het gebruiken van minimaal medium eventueel verrijkt met iets NB zodanig dat de generatietijd na de NAL-behandeling niet korter wordt dan 45 minuten.

VI.6.4.2 Lethale nawerking van NAL

Om de synchronisatie te verbeteren werd ook met hogere concentraties NAL gesynchroniseerd.

De overleving voor 1000 γ NG/ml in acetaatbuffer was bepaald op 100% bij een geblokkeerde replicatie. Door de toepassing van de NG-behandeling op monsters uit een met NAL gesynchroniseerde cultuur (20 minuten incuberen) daalde de overleving afhankelijk van de concentratie NAL als volgt:

concentratie NAL	overleving
γ /ml	%
60	\pm 40
80	\pm 10
100	1-5

De overleving was niet voor alle monsters uit de verschillende fasen van de replicatiecyclus gelijk.

Langer incuberen had naast de ongewenste versnelde herhaling van de frequentiepieken ook een lagere overleving ten gevolge. De terugmutatie-frequentie werd hierdoor oncontroleerbaar beïnvloed en voor enkele mutaties o.a. in het *ilv*-gen van AG15.1 was het aantal terugmutanten te laag geworden om de terugmutatiefrequentie te kunnen bepalen. De sterfte na de NAL-behandeling wordt zeer sterk beïnvloed door de acetaatbehandeling en hangt zeer waarschijnlijk samen met de mutageniteit van NAL.

VI.6.4.3 Mutageniteit van NAL

De mutageniteit van NAL werd vastgesteld door te vergelijken met welke frequenties voor de kenmerken *trp* en *leu* van AG15.63 terugmutanten gevonden worden onder invloed van NAL, NG en Na-Ac-buffer (acetaat) en de combinaties (zie tabel 18), + Na-Ac wil zeggen dat de behandeling parallel verliep aan die met NG, alleen in acetaat zonder NG. Uit de tabel blijkt duidelijk dat NAL samen met acetaat bijna even mutageen is als NG.

De overleving na NAL alleen is $\pm 75\%$, zie figuur 16B en 21,

TABEL 18

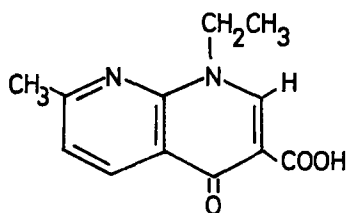
Terugmutatiefrequentie van *leu* en *trp* van AG15.63: spontaan (-NG -Ac), onder invloed van Na-acetaat (-NG +Ac) en van NG (+NG +Ac); zonder voorafgaande NAL-behandeling en na 25 minuten incuberen met 80 γ NAL per ml. Frequentie per 10⁷ bacteriën.

	<i>leu</i>		<i>trp</i>	
	zonder NAL	na NAL	zonder NAL	na NAL
- NG - Ac	5	20	0.5	2.0
- NG + Ac	10	100	1.0	80
+ NG + Ac	1000	5000	300	500

na de eerste generatie. Een deel van de populatie neemt geen deel aan het delingsproces. Na de NAL + acetaat is de overleving even slecht als hierboven gegeven is voor NAL + NG + acetaat. Van een mutagene werking van NAL is voor *Escherichia coli* niets bekend en wordt tegengesproken door controleproeven van Ward e.a. (1970). Het is een vervelende bijkomstigheid die mogelijkterwijs te wijten is aan onzuiverheid van het gebruikte Calbiochem product. Bij chemische analyse (Wills, 1973) konden als verontreiniging aangetoond worden de ethylester en het carbon-amide van het nalidixinezuur, beide tot 2%, en het NH_4^- en HCl-zout tot 5%.

Het is raadzaam om vast te stellen of het nalidixinezuur zelf mutageen is. Het is mogelijk dat door de veel geringere gevoeligheid van *Pseudomonas putida* voor NAL deze bijwerking makkelijker aantoonbaar is dan voor *Escherichia coli* waarvoor de lethale dosis veel lager ligt dan voor *P. putida*.

Het lijkt niet uitgesloten dat onder daarvoor gunstige omstandigheden methylering van het DNA door NAL kan plaatsvinden (zie structuurformule van nalidixinezuur figuur 22) waarbij in vivo een wisselwerking tussen acetaat en NAL een rol kan spelen.



Figuur 22: nalidixinezuur

VI.7 DISCUSSIE EN SAMENVATTING

Het doel van dit hoofdstuk om aan te tonen of mutatiekartering in *Pseudomonas putida* mogelijk is, is positief beantwoord. Voor de terugmutatiefrequenties worden pieken verkregen die scheiding mogelijk maken qua ligging op het chromosoom voor verschillende genen.

Om dit mogelijk te maken moesten we eerst een synchronisatie-techniek ontwikkelen voor *P. putida*. Twee methoden worden beschre-

ven. *P. putida*-culturen zijn goed te synchroniseren met FPA (parafluorphenylalanine) en NAL (nalidixinezuur). Wegens de lange lag-fase die na de FPA-behandeling optreedt voordat de groei zich herstelt en de lethale nawerking van FPA gedurende meerdere generaties, werd voor de mutatiekartering de voorkeur gegeven aan NAL om te synchroniseren.

Synchronisatie met NAL kan zowel in rijk medium als in minimaal medium plaatsvinden. In M9-medium werd de synchronisatie van zowel de DNA-synthese als de celdeling aangetoond. Uit de DNA-synthese werd voor *P. putida* een replicatietijd van 45 minuten afgeleid. Onder de toegepaste omstandigheden werd geen enkele aanwijzing gevonden om te veronderstellen dat door de NAL-behandeling een versnelde initiatie van de replicatie-cyclus, en kortere delingstijd, wordt veroorzaakt. Voor de mutatiekartering werd voor *P. putida* dezelfde situatie aangehouden als toegepast werd bij *Escherichia coli*, nl. die omstandigheden waarbij de delingstijd en replicatietijd evenlang zijn. Daarbij werd ervan uitgegaan dat de replicatietijd constant is en onafhankelijk van het medium zoals geldt voor *E. coli* en werd NB als medium gekozen.

Aangetoond werd dat door de NAL-behandeling vervroegd initiatie optreedt waardoor extra terugmutatiepieken binnen een replicatiecyclus gevormd worden. Door versnelde herhaling van de pieken wordt de nauwkeurigheid van het scheidend vermogen van deze techniek sterk beïnvloed. De vervroegde initiatie is op zich zelf te verklaren zowel met de verdunningstheorie van Pritchard e.a. (1968) als met de initiator-autorepressortheorie van Sompayrac en Maaløe (1973). In de theorie van Pritchard speelt het celvolume een beslissende rol, waardoor een vast aantal moleculen initiatie-remmer zo uitverdund wordt dat initiatie op kan treden. Sompayrac gaat uit van een vast aantal moleculen initiator dat nodig is om initiatie te krijgen, en wat bij een bepaald groeistadium bereikt wordt. In beide situaties is de synthese van initiator-eiwit continue. Tijdens de remming van de DNA-synthese door NAL gaat de synthese van andere metabolieten, o.a. RNA en eiwitten, gewoon door. Het celvolume neemt dus voortdurend toe, terwijl alle celmetabolieten o.a. DNA-precursors en initiator-eiwit zich ophopen. Na verwijdering van NAL treedt direct initiatie op van een nieuwe replicatiecyclus. De concentratie stofwisselingsprodukten is, afhankelijk

van de incubatietijd met NAL, zo groot dat in meer of mindere mate een versnelde DNA-synthese aangetoond kan worden zelfs als de cellen zijn overgebracht in incompleet medium (Boyle e.a., 1967; Pritchard e.a., 1968). Boyle heeft aangetoond dat de inductie voor deze versnelde DNA-synthese alleen optreedt door de behandeling van NAL en dat initiatie van replicatie hierbij een rol kan spelen. Aanwijzingen hiervoor zijn niet beschreven door andere onderzoekers die met NAL synchroniseren (Ward e.a., 1970; Newton e.a., 1972). In de figuren van Ward komen echter dubbele pieken voor die heel goed met versnelde initiatie verklaard kunnen worden. In hoeverre het medium waarin de synchronisatie plaatsvindt belangrijk is voor de mate waarin versnelde initiatie optreedt moet onderzocht worden. Het blijkt dat in NB een situatie gecreëerd wordt waarbij meerdere generatiecycli versneld worden, terwijl in M9 medium hiervoor geen enkele aanwijzing gevonden werd.

De mate van synchronisatie is eveneens belangrijk voor een goede scheiding van frequentiepieken voor de diverse genen. Een verbetering zou verkregen kunnen worden met hogere concentraties NAL, mits de lethale nawerking van NAL uitgeschakeld kan worden. Daarvoor is het nodig eerst vast te stellen of de voor *P. putida* waargenomen mutageniteit en lethale werking te wijten is aan onzuiverheid van het gebruikte product of aan NAL zelf. Zelf zijn wij niet meer in de gelegenheid geweest dit te testen.

HOOFDSTUK VII

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt de ontwikkeling van drie technieken beschreven die de genetica van *Pseudomonas putida* PMBL-L1 en van daarvan afgeleide stammen mogelijk moeten maken. Dit organisme is één van de stammen die uit de grond geïsoleerd werden met de specifieke eigenschap atropine als enige koolstofbron te benutten. Het atropine-esterase van PMBL-L1 neemt een centrale plaats in bij het onderzoek naar de wisselwerking tussen organofosfaten en serine-esterasen. Informatie over de invloed van structurele wijzigingen op de activiteit van dit enzym kan alleen verkregen worden met mutant-enzymen. Dit maakte genetisch onderzoek noodzakelijk.

Voor de lokalisatie van de *atr*-genen werd met de transductie begonnen. PMBL-L1 is van nature geen lysogene stam. Daarom werden uit afvalwater enkele fagen geïsoleerd o.a. PP8 die een algemeen transducerende faag bleek te zijn (hoofdstukken III en IV). Uit de eigenschappen van deze faag blijkt dat PP8 een virulente faag is, hoewel PP8 troebele plaques vormt op L1.

Dat transductie aangetoond kan worden ondanks de virulentie van de faag komt door een beschermende werking van celwandfragmenten (waarschijnlijk lipopolysacchariden) die de vrije fagen binden alvorens deze kunnen adsorberen aan intacte cellen. Deze celwandfragmenten worden vrijgemaakt na infectie waarschijnlijk door een overmatig actief lysozym van PP8. Op deze wijze wordt herinfectie van getransduceerde cellen voorkomen.

De aanwezigheid en de rol van de celwandfragmenten kon aangetoond worden na de isolatie van een faagmutant PP12 en de isolatie van een celwandmutant van L1 (320-R).

De transductie voor de meeste genen is erg laag. Door de faag te bestralen met U.V. kan de frequentie iets verbeterd worden.

PP8 is van nature temperatuurgevoelig. Incubatie bij 33°C in plaats van 28°C vergrootte de opbrengst van transductanten in geringe mate door het voorkomen van herinfectie. Door dit effect waren de kolonies van de transductanten bij 33°C gaaf en niet gelyseerd zoals bij 28°C.

Toepassen van antiserum tegen de faag kan ook een verbetering geven. Door moeilijkheden (zie appendix) bij de bereiding ervan hebben wij hier niet meer van kunnen profiteren bij ons onderzoek.

Is de transductie voor de meeste genen laag ook na toepassen van methoden om de herinfectie en lysis van transductanten te voorkomen, voor *trp* is de transductie hoog (1×10^{-6} per acceptorcel) en goed reproduceerbaar. Wij hebben aangetoond dat dit niet inherent is aan de acceptor-stam, maar aan het *trp*-transducerend DNA.

Aan kartering van genen in het *atr*-locus zijn we niet toegekomen. De lage transductiefrequentie voor de *atr*-genen maakt studie van cotransductie onmogelijk. Een enkele indicatie voor een mogelijke koppeling tussen *trp* en de genen *ilv*, *leu* en *met16* en tussen *atr* en *tro* en de genen *met3* en *his* werd wel verkregen.

Naast de transductie werd gezocht naar een methode om een chromosoomkaart van *P. putida* te kunnen maken. In hoofdstuk V worden experimenten beschreven waarmee conjugatie mogelijk moest worden. De L-stammen bleken van nature F^- te zijn. Evenmin hebben zij een ATR-plasmide wat als sexfactor kan fungeren naar analogie van de zeer recentelijke geslaagde experimenten van de groep van Gunsalus om daarvoor het CAM-plasmide te gebruiken.

Wij hebben vanuit *Escherichia coli* een *F-lac* overgebracht naar *P. putida* die redelijk stabiel in de *putida*-cel blijft. De *lac*-genen die gelocaliseerd zijn op de F-factor komen tot expressie. Fenotypische expressie kon van de genen van de F-factor zelf niet aangetoond worden, zodat de *P. putida* *F-lac* stammen niet als donor voor conjugaties gebruikt konden worden.

Als derde karteringstechniek wordt de mutatiekartering beschreven in hoofdstuk VI. Deze techniek is geslaagd voor *Escherichia coli* waarvoor de resultaten vergeleken konden worden met de bestaande met andere technieken bepaalde posities van diverse genen op het chromosoom. Alvorens tot de echte genkartering over

te gaan moesten methoden gevonden worden om de celdeling in *P. putida* culturen te synchroniseren. Zowel met FPA (parafluorphenylalanine) als met NAL (nalidixinezuur) is synchronisatie mogelijk. De lethale nawerking van FPA en de lange lagfase na de FPA-behandeling die niet zijn waargenomen bij *E. coli*, deden ons besluiten om voor de mutatiekartering met NAL te synchroniseren. NAL had als voordeel dat de DNA-synthese evenals bij *E. coli* direct gestart werd na uitwassen van NAL. Voor de mutatiekartering werd NB als medium gebruikt waarin de generatietijd en replicatietijd even lang zijn.

Afgezien van enige complicaties kan gesteld worden dat met mutatiekartering een chromosoomkaart in grote lijnen gemaakt kan worden. Ook hierbij werd een koppeling gevonden tussen *trp*, *leu* en *ilv* enerzijds en *atr* en *met3* anderzijds. De nauwkeurigheid van de plaatsing is afhankelijk van de scherpte van de pieken en daarmee van de mate waarmee synchronisatie bereikt wordt. Hierbij werden we geconfronteerd met een lethale nawerking die sterk afhankelijk is van de te gebruiken concentratie en incubatietijd. Tevens werd een mutagene werking van NAL aangetoond. Winshell en Rosenkranz (1970) hebben eveneens een postlethaal effect gevonden bij *E. coli* zij het na veel langere incubatie met NAL. Een mutageen effect van NAL wordt voor *E. coli* niet beschreven. De mogelijkheid wordt niet uitgesloten dat de mutagene werking veroorzaakt wordt door bijproducten in het Calbiochem produkt.

Een andere complicatie die optrad na de NAL-behandeling in NB is de versnelde initiatie van de DNA-replicatie waardoor de pieken voor de terugmutatiefrequenties zich herhalen binnen een replicatiecyclus. Een methode om hieraan te ontkomen is het kweken in arm medium waardoor ook na de NAL-behandeling de delingstijd niet korter wordt dan de replicatietijd.

SUMMARY

In this thesis the development of three techniques for the genetics of *Pseudomonas putida* strain PMBL-L and its derivatives has been described.

PMBL-L is one of the strains isolated from soil that are able to use atropine as sole carbon-source for its growth. The enzyme atropine-esterase involved in the breakdown of atropine is essential in the research for the interaction between organofosphates and serine-esterases. Information on the influence of structural changes on the activity of this enzyme can only be obtained with mutant-enzymes.

The purpose of this work was the localization of *atr*-genes on the bacterial chromosome of *P. putida*. Transduction was chosen as the first technique to develop. In chapter III and IV the isolation and characterization of a transducing phage and transduction-experiments with this phage are described. Several phages have been isolated from sewage. One of them, PP8, appeared to be a general transducing phage. From the characteristics of PP8 it became clear that this phage is virulent, although its plaques on L1 are turbid. In spite of its virulence transduction is possible because the transductants are protected against a second infection. This happens by cellwall particles which can bind free phages before they will be adsorbed to the cells. The cellwall fragments are freed from the cellwalls directly after infection with phage. The presence and action of the fragments (probably lipopolysaccharides) could be shown after isolation of the phage-mutant PP12 and a cell-wall-mutant of L1, 320-R.

The transduction-frequency is very low for most of the genes. After irradiation of the phage with U.V. the frequency can be slightly improved.

Naturally PP8 is thermosensitive. The number of transductants could be increased by incubating the selective-plates after transduction at 33° instead of 28°C.

Also the addition of antiserum against the phages improved the transduction. However due to complications during the preparation of the serum (see appendix) we could not take full advantage of this method.

Even under optimal conditions which prevent reinfection and lysis of transductants the transduction-frequencies remained low for most of the genes. However for the *trp*-gene (of L108 and AG15) the transduction-frequency is high (1×10^{-6} per acceptor cell) and very well reproducible. We have proved that this is due to the transducing donor-DNA and not to the acceptor-strains.

The low transduction-frequency found for the *atr*-genes made a detailed study by transduction not feasible. Only some indications were obtained that the genes *atr* and *tro* were linked to *met3* and *his*, and the gene *trp* with *ilv*, *leu* and *met16*.

Besides transduction we looked for the possibility to use conjugation in *P. putida* as a method for general gene-mapping. In chapter V the conjugation-experiments are described.

The strain PMBL-L appeared to be F^- by nature and do not possess a plasmid which may function like a sexfactor as recently was shown for the CAM-plasmid by Shaham e.a. (1973).

We transferred some F-factors from *Escherichia coli* to *P. putida* PMBL-L1 which appeared to be stable in *P. putida* cells.

It was found that the lac-genes of *E. coli* which are located on a F-lac come to expression. No phenotypic expression could be shown for the genes of the F-factor itself. No F-pili were made and the F-lac *putida* strains could not be used as donors in conjugations.

As the third technique, mutation mapping in synchronised cultures has been described in chapter VI. This technique have been found to be successful for *Escherichia coli* for which the results could be compared with the position of the genes on the chromosome as determined with other known techniques.

In the first place two techniques for synchronization of cell-division were studied. Synchronization is possible with FPA (parafluorphenylalanine) as well as with NAL (nalidixic acid). In contrast with *E. coli* we found a long lag-phase and a lethal effect after treatment with FPA. For these reasons we decided to use NAL for synchronization for the mapping experiments.

The mapping experiments were performed in NB-medium.

Besides some complications it was found that this technique can also be used in *P. putida* to get an impression of the distribution of genes on the chromosome.

However the precision of the localization depends on the distinction of peaks. In trying to improve the synchronization-procedure we were confronted with three strongly interfering complications.

Firstly a lethal effect proportional to the concentration and incubation-time with NAL was found. This effect is very probably linked with the mutagenic action of NAL which is the second complication. Thirdly the NAL-treatment in NB-medium accelerated the division-cycle and caused a reinitiation of the DNA-replication before a round of replication was finished. As a consequence the peaks for the reversion-rate were repeated within one replication-cycle. This reinitiation can probably be avoided by culturing the bacteria in minimal medium. Under these conditions the division takes more time than the replication also after treatment with NAL.

LITERATUUR

- ADAMS, M.H. (1959).
Bacteriophages. Interscience Publishers, New York.
- ADELBERG, E.A., M. MANDEL en Gr. CHEM CHING CHEN (1965).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 788.
- ALTENBERN, R.A. (1966).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 346.
- AMELINK-KOUTSTAAL, J.M. en P. VAN DE PUTTE (1971).
Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch., Ser. C, 74, 153.
- ARBER, W. (1958).
Arch. Sci. (Geneva) 11, 259.
- ASATO, Y. en C.E. FOLSOME (1970).
Genetics 65, 407.
- BARTELL, P.F., T.E. ORR, J.F. REESE en T. IMADA (1971).
J. Virology 8, 311.
- BENZINGER, R. en Ph.E. HARTMAN (1961).
Virology 18, 614.
- BERENDS, F. (1973).
Werkprogramma van het Medisch Biologisch Laboratorium TNO,
p. 91.
- BERGEY'S
Manual of determinative bacteriology. 7th ed. Baltimore, The
Williams and Wilkins Company 1957.
- BERTLAND, A.U. (1964).
Isolation of bacteriophage for fluorescent Pseudomonads.
Pseudomonads workshop, Cold Spring Harbor Lab. of Quant.
Biol. Cold Spring Harbor, New York.
- BOYER, H. (1971).
Ann. Rev. Microbiol. 25, 153.
- BOYLE, J.V., W.A. GOSS en Th.M. COOK (1967).
J. Bacteriol. 94, 1664.
- BRADSHAW, W.H., H.E. CONRAD, E.J. COREY, I.C. GUNSALUS en
D. LEDNICER (1959).
J. Am. Chem. Soc. 81, 5507.
- BRENNER, D.J. en S. FALKOW (1971).
Advances in Genetics 16, 81.
- BOSTROM, M.A. en St.B. BINKLEY (1969).
J. Bacteriol. 98, 1271.
- BROWN, M.R.W. en R.M.E. RICHARDS (1965).
Nature 207, 1391.
- BROWN, M.R.W. en J. MELLING (1969).
J. Gen. Microbiol. 59, 263.
- BURGESS, R.R. (1969).
J. Biol. Chem. 244, 6160 en 6168.
- BURTON, K. (1956).
J. Biol. Chem. 62, 315.

- CARPENTER, C. en St.B. BINKLEY (1968).
J. Bacteriol. 96, 939.
- CERDA-OLMEDO, E., P.C. HANAWALT en N. QUEROLA (1968a).
J. Mol. Biol. 33, 705.
- CERDA-OLMEDO, E. en P.C. HANAWALT (1968b).
Molec. Gen. Genetics. 101, 191.
- CHAKRABARTY, A.M., C.F. GUNSALUS en I.C. GUNSALUS (1968).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 60, 168.
- CHAKRABARTY, A.M. en I.C. GUNSALUS (1969).
Virology 38, 92.
- CHAKRABARTY, A.M. en I.C. GUNSALUS (1970).
J. Bacteriol. 103, 830.
- CHAKRABARTY, A.M. (1972).
J. Bacteriol. 112, 815.
- CHAKRABARTY, A.M., G. CHOU en I.C. GUNSALUS (1973).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 70, 1137.
- CHATTERJEE, A.K. en M.P. STARR (1972).
J. Bacteriol. 111, 169.
- CLARKE, K., G.W. GRAY en D.A. REAVELY (1967).
Biochem. J. 105, 759.
- CLEELAND, R., G. BESKID en E. GRUNBERG (1970).
Infec. Immun. 2, 370.
- COETZEE, J.H. en T.G. SACKS (1960).
J. Gen. Microbiol. 23, 445.
- COOPER, S. en C.E. HELMSTETTER (1968).
J. Molec. Biol. 31, 519.
- CURTISS, R., L.J. CHARAMELLA, D.R. STALLIONS en J.A. MAYS (1968).
Bacteriol. Rev. 32, 320.
- DAVIES, J.I. en W.C. EVANS (1964).
Bioch. J. 91, 251.
- DE LEY, J. (1969).
J. Theoret. Biol. 22, 89.
- DEMEREK, J., E.A. ADELBERG, A.J. CLARK en P.E. HARTMAN (1966).
Genetics 54, 61.
- DEN DOOREN DE JONG, L.E. (1926).
 Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces.
 Proefschrift, Technische Hogeschool Delft.
- DIXON, R.A. en J.R. POSTGATE (1972).
Nature 237, 102.
- DREXLER, H. (1970).
Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A. 66, 1083.
- DUNN, N.W. en J.C. GUNSALUS (1973).
J. Bacteriol. 114, 974.
- EISENSTARK, A. (1965).
Genetics 54, 117.
- EVANS, W.C. (1947).
Bioch. J. 41, 373.
- EVENCHIK, A., K.A. STACEY en W. HAYES (1969).
J. Gen. Microbiol. 56, 1.
- FALKOW, S.J.A., WOHLHIETER, R.V., CITARELLA en L.S. BARON (1964).
J. Bacteriol. 87, 209.
- GOSS, W.A., W.H. DEITZ en Th.M. COOK (1964).
J. Bacteriol. 88, 1112.
- GOSS, W.A., W.H. DEITZ en Th.M. COOK (1965).
J. Bacteriol. 89, 1068.
- GRAAFF, J. de (1971).
J. Gen. Microbiol. 67, 91.

- GRAAFF, J. de, P.C. KREUMING en P. VAN DE PUTTE (1973).
Molec. Gen. Genetics. 123, 283.
- GUNSALUS, I.C., C.F. GUNSALUS, A.M. CHAKRABARTY, S. SIKES en I.P. CRAWFORD (1968).
Genetics 60, 419.
- HAAN, P.G. de, A.H. STOUTHAMER, H.S. FELIX en A.K. MOL (1963).
Antonie van Leeuwenh. J. Microbiol. Serol. 29, 407.
- HALD, A. (1959).
Statistical theory with engineering applications. John Wiley & Sons, Inc. London.
- HANE, M.W. (1971).
J. Bacteriol. 105, 46.
- HASLAM, D.F., G.K. BEST en N.N. DURHAM (1970).
J. Bacteriol. 103, 523.
- HAYES, W. (1953).
J. Gen. Microbiol. 8, 72.
- HAYES, W. (1968).
The genetics of bacteria and viruses. Studies in basic genetics and molecular biology. 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- HEGEMAN, G.O. (1966).
J. Bacteriol. 91, 1140.
- HELMSTETTER, C.E. en S. Cooper (1968).
J. Mol. Biol. 31, 507.
- HIROTA, J. (1960).
Proc. Natl. Acad. Sci. Wash. 46, 57.
- HOLLOWAY, B.W. (1955).
J. Gen. Microbiol. 13, 572.
- HOLLOWAY, B.W. en M. MONK (1959).
Nature 184, 1426.
- HOLLOWAY, B.W., M. MONK, L. HODGINS en B. FARGIE (1962).
Virology 18, 89.
- HOLLOWAY, B.W. en P. VAN DE PUTTE (1968).
Nature 217, 459.
- HOLLOWAY, B.W. (1969).
Bacterial Reviews 1969, 419.
- HOLLOWAY, B.W., V. KRISHNAPILLAI en V. STANISCH (1971).
Ann. Rev. Genetics 5, 425.
- JOHNSON, J.C., M. DEBACKER en J.A. BOEZI (1971).
J. Biol. Chem. 246, 1222.
- JONES, D. en P.H.A. SNEATH (1970).
Bacteriol. Rev. 34, 40.
- KATAYAMA, Y., H. HATTORI en A. SIYAMA (1971).
J. Bacteriol. 108, 1412.
- KHAN, N.C. en S.P. SEN (1967).
J. Gen. Microbiol. 49, 201.
- LEBEK, G. (1963).
Experiment. B. Z.bl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. 189, 213.
- LINDQUIST, H. (1971).
Molec. Gen. Genetics 110, 178.
- LURIA, S.E., J.N. ADAMS en R.C. TING (1960).
Virology 12, 328.
- MAALØE, O. en N.O. KJELDGAARD (1966).
Control of macromolecular Synthesis. Benjamin, New York.
- MANDEL, M. (1969).
Ann. Rev. Microbiol. 23, 239.

- MANDELL, J.D. en A.D. HERSHEY (1960).
Anal. Biochem. 1, 66.
- MARMUR, J. (1961).
J. Mol. Biol. 3, 208.
- MARR, A.G., P.R. PAINTER en E.H. NILSON (1969).
Growth and division of individual bacteria. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge.
- MESELSON, M., R. YUAN en J. HEYWOOD (1972).
Ann. Rev. Biochem. 41, 447.
- MEYNELL, E., G.G. MEYNELL en N. DATTA (1968).
Bacteriol. Rev. 32, 55.
- MIDDLETON, R.B. en T. MOJICA-A (1971).
Advanc. Genetics 16, 53.
- NEWTON, A., B. MORSYS, E. LEONARDI en D. WYGAL (1972).
Nature, New Biology, 236, 19.
- NIBLACK, J.F. (1968).
Host suppression of Pseudomonas phage pfl Mutations. Thesis University of Illinois Urbana, Illinois.
- NOVICK, R.P. (1969).
Bacteriol. Rev. 33, 210.
- OOSTERBAAN, R.A. en F. BERENDS (1971).
Proc. Kon. Ned. Acad. Wetensch. Ser. C. 74, 158.
- OZEKI, H. (1959).
Genetics 44, 457.
- PRITCHARD, R.H., P.T. BARTH en J. COLLINS (1969).
Control of DNA synthesis in bacteria. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge.
- PUTTE, P. VAN DE en M. GRUIJTHUIJZEN (1972).
Molec. Gen. Genetics 118, 173.
- QUEROLA, M., J.L. INGRAHAM en E. CERDA-OLMEDO (1971).
Nature, New Biology, 230, 122.
- RHEINWALD, J.G., A.M. CHAKRABARTY en J.C. GUNSALUS (1973).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 885.
- RÖRSCH, A., A.M. SCHEPMAN, P. VAN DE PUTTE, I.E. MATTERN, C.A. VAN SLUIS, H. ZWENK en W. STEVENS (1967).
The Culture collection of the department for Microbiol. Genetics. MBL Report 1967 - 5.
- RÖRSCH, A., F. BERENDS, H.C. BARTLEMA en W.F. STEVENS (1971).
Proc. Kon. Ned. Acad. Wetensch., Ser. C, 74, 132.
- SALISBURY, V., R.W. HEDGES en N. DATTA (1972).
J. Gen. Microbiol. 70, 443.
- SCHANS, G.P. VAN DER, J.B.T. ATEN en Joh. BLOK (1969).
Anal. Bioch. 32, 14.
- SCHMIEGER, H. (1968).
Molec. Gen. Genetics 102, 336.
- SCHMIEGER, H. (1970).
Molec. Gen. Genetics 109, 323.
- SCHMIEGER, H. (1971).
Molec. Gen. Genetics 110, 238.
- SCHMIEGER, H. (1973).
Molec. Gen. Genetics 120, 181.
- SCHNEIDER, W.C. (1957).
In: Methods In Enzymology, vol. 3. S.P. Colowick en N.O. Kaplan, eds. Acad. Press Inc. New York, p. 680.

- SHAHAM, M., A.M.CHAKRABARTY en J.C. GUNSALUS (1973).
J. Bacteriol. 116, 944.
- SHIMADA, K., R.A. WEISBERG en M.E. GOTTESMAN (1972).
J. Mol. Biol. 63, 483.
- SMITH, G. (1970).
J. Med. Lab. Technol. 27, 203.
- SOMPAYRAC, L. en O. MAALØE (1973).
Nature, New Biology 241, 133.
- STANIER, R.Y., N.J. PALLERONI en M. DOUDOROFF (1966).
J. Gen. Microbiol. 43, 159.
- STENT, G.S. (1963).
Molecular Biology of Viruses. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
- STEVENS, W.F. (1969).
De enzymologie en regulering van het metabolisme van atropine in *Pseudomonas putida*. Proefschrift. Rijks Universiteit Leiden.
- STONE HILL, E.H. en D.J. HUTCHISON (1966).
J. Bacteriol. 92, 136.
- STOUTHAMER, A.H., P.G. DE HAAN en E.J. BULTEN (1963).
Genet. Res. Camb. 4, 305.
- SYKES, R.B. en M.H. RICHMOND (1970).
Nature 226, 952.
- SÜSSMUTH, R. en F. LINGENS (1968).
Naturwissenschaften 55. Jg., Heft 2, 85.
- SÜSSMUTH, R. en R. HAERLIN (1972).
Zbl. Bakt. Hyg. J. Abt. Orig. A. 220, 464.
- SUTHERLAND, I.W. en J.F. WILKINSON (1971).
In: Methods in Microbiology, vol. 5B, J.R. Norris en D.W. Ribbons, eds, Acad. Press London 1971, p. 345.
- VINOGRAD, J., R. BRUNER, R. KENT en J. WEIGLE (1963).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 49, 902.
- WANKA, F. en J. MOORS (1970).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 85.
- WARD, C.B. en D.A. GLASER (1969a).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 62, 881.
- WARD, C.B. en D.A. GLASER (1969b).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 63, 800.
- WARD, C.B., M.W. HANE en D.A. GLASER (1970a).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 66, 365..
- WARD, C.B. en D.A. GLASER (1970b).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67, 255.
- WENSINCK, F. (1971).
Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. Ser. C, 74, 153.
- WILLETS, N. (1972).
Ann. Rev. of Genetics 6, 257.
- WILLS, E.R.J. (1973).
Werkverslag 73W12 van het Chemisch Laboratorium, RVO - TNO.
- WILSON, D.E. (1960).
Virology 11, 533.
- WINSHELL, E.B. en H.S. ROSENKRANZ (1970).
J. Bacteriol. 104, 1168.

APPENDIX

ANTISERUM TEGEN PP8

1 Inleiding

Een van de methoden om lysis van transductanten te voorkomen is het toevoegen van een tegen de fagen gericht antiserum aan de bacteriesuspensie, voordat de cellen op de platen gebracht worden. Het serum blokkeert de adsorptie van de fagen die bij lysis van geïnfecteerde cellen op de platen vrijkomen. Een tweede infectie van transductanten wordt zo voorkomen. Het antiserum moet specifiek zijn voor de fagen doch geen bacteriën inactiveren. Het is gebleken dat antiserum opgewekt door het inspuiten van een faagpreparaat dat over CsCl werd gezuiverd toch nog antibacteriële activiteit bezat.

De inactiveringsconstante K van het serum wordt berekend als $K = 2.3 \times \frac{D}{t} \times \log \frac{P_0}{P_t}$ waarin D = verdunningsgraad van het serum; t = de incubatietijd van het serum + fagen; P₀ en P_t = de p.f.u.'s op resp. t = 0 en t; de K-waarde wordt bepaald in het gebied waarin tot 90% afname van de p.f.u. gevonden wordt (Adams, 1959).

2. Procedures voor het maken van antiserum

2.1

Voor het verkrijgen van antiserum werden in eerste instantie konijnen gebruikt.

Antiserum met een hoge K-waarde, waarmee enige tijd een goede verhoging van de transductiefrequentie werd verkregen was afkomstig van een konijn dat volgens het volgende schema ingeënt werd met faagpartikels:

1^e week: om de andere dag oplopende doses; 1^e dag 2×10^{10} fagen intraveneus (i.v.) en de daarop volgende dagen resp. 4, 6, en

8×10^{10} interperitoneaal (i.p.); 3 weken rust; daarna 5 dagen lang elke dag 8×10^{10} fagen i.p.; hierna 7 - 10 dagen rust en vervolgens ontbloeden. Voor het ontbloeden 1 dag vasten.

Gebruikt werden PP8 fagen, geconcentreerd door differentiële centrifugatie, en gesuspendeerd in gebufferde fysiologische zoutoplossing (0.7 M fosfaatbuffer + 0.15M NaCl).

Het zo verkregen serum had vers een K-waarde van 810 min^{-1} . De transductiefrequentie voor het *his*-gen bij transductie van PP8(L1) x L3 werd verhoogd van 1.4×10^{-8} naar 2.7×10^{-7} door serum toe te voegen in een eindconcentratie van 3 : 100. Ook de controles werden vergeleken met en zonder serum. Echter het aantal terugmutanten op de controles werd door het serum sterk gereduceerd en het aantal kolonies van L1 op telplaten werd door dit serum tot 25% verminderd.

Na enige weken werd de invloed van het serum op de transductie opbrengst beduidend minder tot na 1 - 2 maanden de antibacteriële werking de overhand kreeg (zie tabel 19). Dit berustte waarschijnlijk op een labiliteit van het antiserum tegen de PP8 fagen.

Conventieel gefokte konijnen bleken van nature al een titer tegen L1 te hebben variërend van 100 - 3200 (titer is de reciproke verdunningsgraad waarbij nog agglutinatatie optreedt). Ratten en cavia's vertoonden geen natuurlijke antilichaamvorming. Bij ratten, waaronder een groep kiemvrij gekweekte ratten, werd geprobeerd antiserum te maken met een hoge K en zonder een titer voor L1. Hoewel over CsCl-gradienten gezuiverde faagpreparaten gebruikt werden voor injectie bevatten ook deze sera een antibacteriële component.

TABEL 19

1e konijneserum; verloop van de K-waarde met de tijd.

tijd na ontbloeden	K-waarde	agglutinatatie titer
10 dagen	810	400.000
30 dagen	414	400.000
120 dagen	275	400.000

De K was variërend 30 - 80 min⁻¹, en de titer tegen L1 was 32.

De aanmaak van de antilichamen tegen L1 wordt gestimuleerd door het faagpreparaat. Dit kan verklaard worden met de ontdekking van de aan de fagen gebonden celwandfragmenten in gezuiverde faagpreparaten (zie IV.4).

2.2

De antibacteriële component kan voor een groot deel verwijderd worden door adsorptie met gedode bacteriën. De K-waarde loopt echter hierdoor terug (zie tabel 20). De K-waarde was van alle sera te laag om transductanten te beschermen in die mate dat een verhoogde transductie-opbrengst gevonden kon worden.

Om een zo specifiek mogelijk antiserum tegen faag te verkrijgen werd een procedure toegepast die gebaseerd is op de regulerende mechanismen beschreven door Uhr en Möller (1968) in: Effect of antibodies on the immune response.

De procedure komt er op neer dat bij de inenting van twee antigenen A en B in combinatie met een antiserum gericht tegen antigeen A het proefdier in hoofdzaak antilichamen zal produceren tegen antigeen B. Beschouwen we de celwandpartikels als het antigeen A en de fagen als het andere antigeen B, dan verwachten we dat bij injectie van fagen samen met antiserum tegen L1 celwanden, alleen tegen de fagen antistoffen gemaakt worden. Als proefdier werden konijnen gebruikt. *Procedure*: eerst werd antiserum tegen L1 celwanden gemaakt. Ingespoten werd een celwandsuspensie overeenkomstig $5 - 10 \times 10^8$ cellen, gedurende 5 weken, elke week 1 keer; de eerste keer intraveneus en

TABEL 20

le konijneserum; verandering van K-waarde en agglutinatietiter na passages van L1 bacteriën.

aantal adsorpties	K-waarde voor adsorptie	K-waarde na adsorptie	agglutinatietiter
2x	275	181	10.000
6x	181	49	48

de daarop volgende keren interperitoneaal.

Een week na de laatste injectie werd 't bloed afgenomen waarmee een titer tegen L1 van 1 : 1600 werd gevonden.

De celwand suspensie werd als volgt gemaakt: $5 \times 10^{10} - 10^{11}$ cellen lyseren in 0.02M EDTA, gedurende 15 minuten. Afcentrifugeren en opnemen in 1% formaline, na 30 minuten afcentrifugeren, wassen en opnemen in gebufferde fysiologische zoutoplossing. Met een titer 1 : 1600 werd berekend dat voor een konijn 6 ml serum per injectie nodig was voor inenting samen met 't faagpreparaat, totaal bestaande uit $1 - 2 \times 10^{10}$ faagdeeltjes. Het serum werd intraveneus en de fagen interperitoneaal ingespoten volgens het volgende schema:

dag 0 en 14 serum
3 en 17 serum
7 en 21 serum + fagen
8 en 22 fagen.

dag 28: serum + fagen
29: fagen
30: serum + fagen
31 fagen
37: ontbloed.

Gemonsterd werd op dag 0, 14 en 28 om de tussentijdse K-waarde en titer te bepalen (zie tabel 21).

Het is dus mogelijk om op deze gecombineerde manier voor fagen antiserum te krijgen met een redelijke K-waarde en een lage titer tegen de bacteriën. De oorspronkelijke titer is zelfs gereduceerd met een factor 1 : 50.

Van het serum met de hoogste K-waarde werd de titer tegen L1 verder gereduceerd door 4 x achter elkaar 10 ml te adsorberen aan L1 bacteriën, totaal $10^{10} - 10^{11}$ cellen. De titer liep terug van 64 naar 2 en de K van 185.5 min naar 47.5 min. Dit serum werd na filtratie gebruikt bij transductie van PP12(L1) x 301 in een eindverdunding van 1 : 4. De opbrengst was 3 x meer *atr* transductanten met serum dan zonder serum. Het serum is niet verder uitgetest.

TABEL 21

Immuun respons tegen fagen en bacteriën van het 2e konijneserum verkregen met gecombineerde injectie van faag en antiserum tegen L1 bij twee konijnen.

tijdstip afname bloedmonster in dagen		K-waarde	agglutinatietiter
0	konijn 1	-	3200
	2	-	3200
14	1	2.1	32
	2	2.7	64
28	1	11.8	32
	2	29.6	128
serum	1	167.5	64
	2	185.5	64
serum 2 na 4 passages van L1	2	47.5	2

3. Conclusie

Inenting van gezuiverde fagen met de bedoeling een specifiek antiserum tegen PP8 te verkrijgen leverde een niet bruikbaar antiserum op. Dit wordt geweten aan de aan fagen gebonden celwandfragmenten. Er kan een relatie bestaan tussen de antilichamen tegen de fagen en faagreceptoren (Michael, 1968). Het is echter mogelijk om een goed faaginactiverend serum te krijgen met een lage agglutinatietiter tegen de bacteriën door de fagen in te enten samen met antiserum tegen L1 celwanden. De effectiviteit van de aangegeven procedure is te vergroten door:

1. het konijn over een langere periode en vaker in te spuiten dan wij gedaan hebben.
2. de agglutinatietiter van het serum tegen de bacteriën hoger op te voeren.

Dit kan mogelijk verbeterd worden, door een andere lysismethode voor de bacteriën toe te passen in plaats van EDTA, zonder dat de essentiële structuren voor een deel verloren gaan. Bijvoorbeeld

door ultrasone trillingen. De antigene werking van een preparaat kan zowel afhangen van de lysismethode en verdere zuivering als van het proefdier (Chipley, 1972). In plaats van een celwandsuspensie is inenting van de gezuiverde faagbindende partikels uit PP12-lysaten van 320-R misschien al zeer effectief. De na zuivering beschikbare hoeveelheid was echter te weinig om deze methode toe te passen.

LITTERATUUR

1. MICHAEL, J.G., 1968. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 28: 434.
2. CHIPLEY, J.R., 1972. Appl. Microbiol. 23, 651.
3. UHR, J.W. en C. MÖLLER, 1968. Advances in Immunology 8, p 81. Acad. Press. New York/London.

NAWOORD

Graag wil ik van deze gelegenheid gebruik maken mijn dank te betuigen aan allen die op enigerlei wijze hebben bijgedragen tot het tot standkomen van dit proefschrift. Een enkeling wil ik met name noemen.

Allereerst mijn moeder, in nagedachtenis, die door haar persoonlijke belangstelling mij in deze richting geactiveerd heeft. Het spijt mij dat zij zelf deze voltooiing van mijn academische opleiding niet meer mee heeft mogen maken.

Van mijn promotor Prof. Dr. Ir. A. Rörsch heb ik op prijs gesteld dat op kritieke momenten zijn positieve houding de nodige impulsen heeft gegeven.

Dr. Ir. P. van de Putte dank ik voor de kritische discussies tijdens de werkzaamheden en bij het voorbereiden van dit proefschrift.

De dagelijkse assistentie bij het werk, die ik zeer hoog waardeer, werd verleend door mevrouw M.M.H. Kraak-Gruijthuijzen en mejuffrouw W.L. van der Maas.

Voor het uitvoeren van speciale fysisch chemische experimenten, de computerbewerking van profresultaten en electronenmicroscopie heb ik bijzonder veel hulp gekregen van achtereenvolgens Dr. G.P. van der Schans, Drs. A.C.M. van der Drift, Dr. M. Wijnans en mevrouw M.K.I. Hannaart-Toen. De heer E.R.J. Wills dank ik voor zijn bereidwilligheid het nalidixinezuur chemisch te analyseren.

Dr. O. Brocades Zaalberg ben ik erkentelijk voor zijn hulp bij de bereiding van het antiserum.

Het personeel van de bacteriologische keuken en mejuffrouw M. van der Spek leverden een daadwerkelijke ondersteuning door het verzorgen van het glaswerk.

De heren H.E. Groot Bramel en M.J.M. Boermans dank ik voor de zorg waarmee zij de foto's, figuren en tabellen voorbereid hebben om in dit proefschrift opgenomen te kunnen worden.

Dit onderzoek werd verricht van 1968 tot 1973 in dienst van de Nederlandse Organisatie voor Zuiver-Wetenschappelijk Onderzoek (Z.W.O.) en het Laboratorium voor Moleculaire Genetica van de Rijksuniversiteit te Leiden. In de periode tussen het beëindigen van mijn dienstverband en het drukken van dit proefschrift heb ik zo goed mogelijk geprobeerd op de hoogte te blijven van de nieuw verschenen

relevante litteratuur. De medewerking verleend door de heer P.G.M. van Rossum is hierbij onmisbaar geweest.

Tenslotte ben ik het bestuur van de Rijksverdedigingsorganisatie TNO zeer erkentelijk voor de gastvrijheid, die zij mij geboden heeft, het experimentele werk dat tot dit proefschrift heeft geleid in het Medisch Biologisch Laboratorium te mogen doen.

Dit proefschrift beslaat $4\frac{1}{2}$ jaar experimenteel werk, bevat 176.000 letters getikt op 244 meter carbonlint. Elk uur onderzoek voegde 20 letters toe aan dit proefschrift, of anders gezegd:
Voor elke regel was 2 uur en 48 minuten research nodig.