

2

DE INVLOED VAN GENETISCHE FACTOREN OP DE STRALINGSGEVOELIGHEID VAN ESCHERICHIA COLI STAM B.

PROEFSCHRIFT

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE LEIDEN OP GEZAG VAN DE
RECTOR MAGNIFICUS DR. S. DRESDEN, HOOG-
LERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN
WIJSBEGEERTE, PUBLIEK TE VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 10 OKTOBER 1962 TE 16 UUR**

DOOR

ARTHUR RÖRSCH

GEBOREN TE ROTTERDAM IN 1933

GRAFISCH BEDRIJF AVANTI — DELFT

PROMOTOR : PROF. DR. J. A. COHEN

STELLINGEN

I.

De bij micro-organismen waargenomen efficiëntie waarmee de desintegratie van geïncorporeerd ^{32}P inactivering veroorzaakt, wordt niet door de richting van de recoil bepaald. Veeleer wordt deze efficiëntie door een reactiveringsmechanisme beïnvloed.

G. S. Stent & C. R. Fuerst, *Adv. Med. Biol. Phys.*, 7, 1, 1960.
R. F. Hill, *Nature*, 188, 412, 1960.

II.

Het fractioneringspatroon van de componenten met lage sedimentatieconstante in een celvrij extract van *E. coli* op een DEAE kolom is door McCarthy en Aronson onjuist geïnterpreteerd.

B. J. McCarthy & A. I. Aronson, *Biophys. J.*, 1, 227, 1961.
E. Otaka et al. *Bioch. Biophys. Acta*, 55, 310, 1962.

III.

De door Woodward gegeven verklaring voor de labiliteit van de β -lactamring in penicilline dient met een beschouwing over de invloed van andere groepen in het molecuul te worden aangevuld.

E. Brandl & H. Margreiter, *Oster. Chem. Z.*, 55, 11, 1954;
Chem. Abstr. 48, 10296b, 1954.

R. B. Woodward, in *The Chemistry of the Penicillins*, pag. 443.
Princeton University Press, 1949.
S. A. Bernhard et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 2421, 1962.

IV.

Het effect van gentiaanviolet op de nucleotide-stofwisseling van *M. pyogenes* behoeft waarschijnlijk niet aan een verontreiniging van het gentiaanviolet te worden toegeschreven.

J. L. Strominger, *J. Biol. Chem.*, 234, 1520, 1959.

V.

De eerste nauwkeurige alcoholtabel (alcoholgehalte als functie van het s.g.) is in 1798 door Lowitz opgesteld. Ten onrechte wordt de eerste alcoholtabel door Darmstaedter aan Tralles (1811) toegeschreven.

J. T. Lowitz, *Nov. Acta Petropolitanae*, 11, 14, 1798.
Ludwig Darmstaedters *Handbuch zur Geschichte der Naturwissenschaften und der Technik*, Springer Verlag, Berlin, 1908.

VI.

Het bij de fosforylasereactie door Engström en Agren gevonden intermediaire fosforylenzym moet aan het gebruik van een onzuiver enzympreparaat worden toegeschreven.

L. Engström & G. Agren, *Acta Chem. Scand.*, 10, 877, 1956.
M. Cohn, *J. Biol. Chem.*, 180, 771, 1949.

VII.

De door Spiegelman beschreven incorporatie van ^{14}C aminozuren in de geïsoleerde membraanfractie van *E. coli* moet aan een verontreiniging van deze membraanfractie met ribosomen worden toegeschreven.

S. Spiegelman, in *Recent Progress in Microbiology*, VII International Congress for Microbiology, pag. 81,
Almquist & Wiksell, Stockholm 1958.

VIII.

Fotoprotectie tegen bestraling met kortgolvig ultraviolet licht wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een reactiveringsmechanisme waaraan groeiremming ten grondslag ligt.

R. S. Weatherwax, *J. Bact.* 72, 124, 1956.
J. Jagger, *Rad. Research*, 13, 521, 1960.

Arthur Römer

*Aan Truus,
Aan myn vader
en schoonouders*

INHOUD

INLEIDING	pag.
1. De stralingsgevoeligheid van bacteriën.	1
2. Literatuuroverzicht.	5
HOOFDSTUK I.	
Biochemische en microbiologische werkwijzen. De isolering van een stralingsresistente en van een stralingsgevoelige mutant van E. coli B.	
1. Herkomst van de gebruikte stammen.	7
2. Media.	7
3. De bepaling van de bacterieconcentratie in suspensies.	8
4. De bestraling met ultraviolet licht.	9
5. De röntgenbestraling.	9
6. De fractionering van celmateriaal.	9
7. Overige analyse methoden.	10
8. De isolering van een stralingsresistente mutant.	10
9. De isolering van een stralingsgevoelige mutant.	11
10. De keuze van het medium voor kwantitatief biochemisch onderzoek.	12
11. De groei van E. coli B op een medium met een beperkende hoeveelheid substraat.	13
HOOFDSTUK II.	
Fenotypische analyse van de mutaties die tot een gewijzigde stralingsgevoeligheid leiden.	
1. Het nucleïnezuurgehalte van E. coli B _I , de stralingsresistente stam B _{II} en de stralingsgevoelige stam B _{III} .	20
2. De fysiologische verschillen tussen de stammen B _I , B _{II} en B _{III} .	21
3. Nomenclatuur.	21
4. De stam B _{IV} ^{syn⁻fil⁻} .	22
5. Het naast elkaar aantonen van syn en fil mutaties.	22
6. Samenvatting en conclusies.	25
HOOFDSTUK III.	
Het effect van röntgenstraling, ultraviolet licht en desintegratie van geïncorporeerd ³² P op syn ⁻ en fyl ⁻ mutanten van E. coli B.	
1. Inleiding	26
2. Het effect van röntgenstraling.	27
3. Het effect van ultraviolet licht.	28

4. Het effect van de desintegratie van geïncorporeerd 32p.	32
5. Het effect van penicilline en novobiocine.	43
6. De vermenigvuldiging van door UV bestraling geïnactiveerde bacteriofaag op syn ⁺ en syn ⁻ stammen.	45
7. Samenvatting en conclusies.	47

HOOFDSTUK IV.

Het effect van ultraviolet licht op de eiwit- en nucleïnezuursynthese.

1. Inleiding.	48
2. De remming van de nucleïnezuur- en β galactosidasesynthese.	50
3. Het sedimentatiepatroon van een homogenaat van E. coli B in een sucrose gradiënt.	51
4. Het effect van UV bestraling op het sedimentatiepatroon.	55
5. Het effect van chlooramfenicol op het sedimentatiepatroon.	57
6. Samenvatting en conclusies.	57

HOOFDSTUK V.

Het genetische karakter van de stralingsgevoeligheid.

1. Inleiding	59
2. Het isoleren van mutanten van E. coli B.	62
3. De conjugatie.	65
4. De resultaten van F ⁺ x F ⁻ conjugaties.	68
5. De resultaten van (F ⁺ gal ⁺)gal ⁻ x F ⁻ conjugaties.	69
6. De plaats van het syn kenmerk op het chromosoom.	71
7. De overdracht van het syn ⁻ kenmerk naar E. coli C.	73
8. Samenvatting en conclusies.	75

SAMENVATTING.	76
---------------	----

SUMMARY.	78
----------	----

LITERATUUR.	80
-------------	----

AFKORTINGEN

DNA	desoxyribonucleïnezuur
RNA	ribonucleïnezuur
UV	ultraviolet licht
MLD	37% dosis
OD	optische dichtheid
TRIS	trihydroxymethylaminomethaan
M ₉	een synthetisch medium, zie tabel II.
CAS	een "Difco" aminozuurhydrolysaat van caseïne, zie tabel II.
DG	drooggewicht van bacteriën
σ	standaard-deviatie
dpm	activiteit van radioactief preparaat in geregisteerde deeltjes per min.
n_D^{20}	brekingsindex bij 20°C voor de D lijn van Na
K ^r	kanamycine-resistentie
pen ^r	penicilline-resistentie
citru ^l	citrulline
ind	indool

Voor de aanduiding van andere genetische kenmerken zie onderschrift fig. 37, pag. 61.

INLEIDING

1. De stralingsgevoeligheid van bacteriën.

Bacteriën worden door ultraviolet licht en door ioniserende straling gedood. De eerste onderzoeken die op dit effect betrekking hebben, dateren reeds uit het einde van de vorige en het begin van deze eeuw (Downes and Blunt, 1877; Green, 1904) en sindsdien is een groot aantal publikaties over dit onderwerp¹⁾ verschenen. Onze kennis van de wijzen waarop straling de levensverrichtingen van microorganismen beïnvloedt, is echter nog verre van volledig. Ongetwijfeld is vooral in de laatste tien jaar ons inzicht in deze materie sterk verdiept, mede dank zij de enorme vooruitgang die op het gebied van de eiwit- en nucleïnezuurchemie is geboekt. In deze periode werden tal van belangwekkende stralingseffecten op de synthese van stoffen, die voor de cel van vitaal belang zijn, beschreven. Hoe interessant echter elk effect van straling op de stofwisseling van cellen op zich zelf ook moge zijn, de betekenis van deze effecten voor de bactericide werking is vaak twijfelachtig gebleven. We kunnen dit aan een enkel voorbeeld demonstren. Door bestraling van een cultuur van *E. coli* B met een dosis van 200 erg/mm² UV wordt de snelheid van de synthese van het adaptieve enzym β galactosidase tot 50% van de onbestraalde controle gereduceerd, terwijl onder dezelfde omstandigheden de fractie kolonievormende cellen tot 10% afneemt. Ongetwijfeld is de eiwitsynthese voor een cel van vitaal belang. Toch is uit het experiment niet af te leiden of het onvermogen van 90% van de cellen in de cultuur tot een kolonie uit te groeien in verband staat met de geconstateerde remming van de eiwitsynthese. Temeer omdat in bacteriën onder invloed van chlooramfenicol ook een remming van de eiwitsynthese waargenomen wordt zonder dat dit antibioticum een bactericide werking uitoefent, is het twijfelachtig of er een oorzakelijk verband tussen beide bovengenoemde stralingseffecten bestaat.

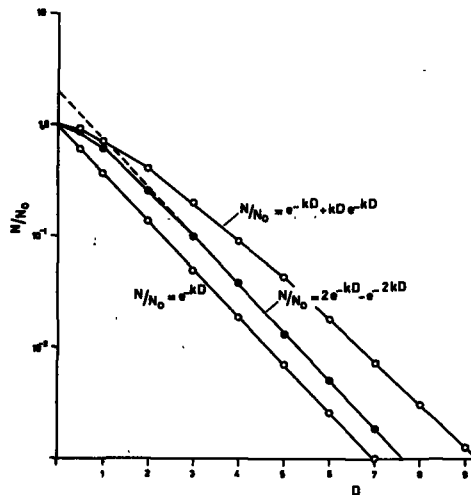
Steeds worden wij in de radiobiologie met het probleem geconfronteerd in hoeverre onmiddellijk na bestraling waargenomen biochemische of morfologische verschijnselen met het letale effect te correleren zijn. Het is duidelijk dat een goed begrip van deze samenhang van groot belang is om de factoren die in bacteriën de stralingsgevoeligheid bepalen, te doorgronden. Alvorens de experimentele mogelijkheden die ons voor de oplossing van dit probleem ten dienste staan onder ogen te zien, zullen wij echter het begrip stralingsgevoeligheid zoals dit in deze dissertatie gebruikt wordt, scherper dienen te formuleren. Reeds blijkt uit het in het voorgaande aangehaalde experiment dat de stralingsgevoeligheid van een organisme, indien deze ge-

1) Voor literatuuroverzichten zie Giese, 1950; Tatum en Perkins, 1950; Kaplan, 1952; Wyss en Haas, 1953; Spiegelman en Landman, 1954; Zelle, 1955; Kimball, 1957; Sparrow en Forro, 1953; Mortimer en Beam, 1955; Powels, 1957.

definieerd wordt als de verhouding tussen de grootte van een bepaald effect en de daarvoor benodigde dosis, sterk afhankelijk is van het bestudeerde effect. Wij kunnen b. v. spreken van de stralingsgevoeligheid van de nucleïnezuursynthese of van de stralingsgevoeligheid van de deling; indien in dit proefschrift evenwel sprake is van de stralingsgevoeligheid zonder nadere aanduiding, dan wordt daarbij uitsluitend gedacht aan het, door bestraling geïnduceerde, onvermogen van de bacteriën tot een kolonie uit te groeien. De fractie kolonievormende cellen neemt in culturen van verscheidene bacteriestammen exponentieel met de dosis af. Dit is in overeenstemming met de zogenaamde treffertheorie (Eng.: target theory; voor een overzicht zie Lea, 1955) waarin men van de veronderstelling uitgaat dat niet iedere excitatie (bij UV bestraling) of niet iedere ionisatie (bij ioniserende straling) in de cel een letaal effect heeft, maar dat slechts treffers (Eng.: hits) op een zeer discrete zogenaamde stralingsgevoelige trefplaats (Eng.: target) leiden tot het onvermogen van de cel tot een kolonie uit te groeien. Indien sprake is van cellen waarin één treffer op een stralingsgevoelige trefplaats voldoende en een noodzakelijke voorwaarde is om de dood van een cel te veroorzaken, dan neemt het aantal kolonievormende cellen in overeenstemming met de treffertheorie met de dosis af volgens de vergelijking

$$N/N_0 = e^{-kD} \quad (I)$$

waarin N het aantal kolonievormende cellen na bestraling met de dosis D , N_0 het aantal oorspronkelijk aanwezige kolonievormende cellen en k een constante is. Door middel van de constante k kan dus de stralingsgevoeligheid van bacteriën in een getal worden uitgedrukt. Gewoonlijk gebruikt men hiervoor de reciproke waarde van k , $1/k = \text{MLD}$ (Eng.: "mean lethal dose"), dat is dan die dosis waarbij de fractie $N/N_0 = 1/e = 37\%$ is.



Figuur 1.
Model-inactiveringscurven.

Voor slechts een beperkt aantal bacteriestammen is de overlevingscurve, waaronder we hier verstaan de $\log N/N_0$ als functie van de dosis D , een rechte. Sommige overlevingscurven vertonen een schouder (fig. 1). De vorm van deze curven kunnen we soms verklaren door aan te nemen dat in een cel

- a) meer dan één trefplaats door tenminste één treffer getroffen moet worden, of dat
- b) één trefplaats door verscheidene treffers getroffen moet worden om het organisme te doden (zie o. a. Fano, 1954).

Bevat een cel b.v. twee trefplaatsen die elk eenmaal getroffen moeten worden dan krijgt de overlevingscurve de vorm

$$N/N_0 = 1 - (1 - e^{-kD})^2 = 2e^{-kD} - e^{-2kD} \quad (\text{II})$$

Bevat een cel een trefplaats die tweemaal getroffen moet worden dan krijgt de overlevingscurve de vorm

$$N/N_0 = e^{-kD} + kDe^{-kD} \quad (\text{III})$$

De constante k illustreert in de functies (II) en (III) niet zoals in functie (I) de stralingsgevoeligheid van de cel, maar die van de trefplaatsen. Daarom zullen wij in die gevallen waarbij van niet lineaire overlevingscurven sprake is, de stralingsgevoeligheid zoveel mogelijk grafisch illustreren aan de hand van de overlevingscurve.

De stralingsgevoeligheid van bacteriën hangt van een groot aantal factoren af, zoals b.v. de groeifase van de bacteriën, de samenstelling van het medium waarin de cellen voor en na bestraling gekweekt worden en de zuurstofconcentratie van het medium waarin de bestraling wordt uitgevoerd. Juist van dit feit, dat de stralingsgevoeligheid met een aantal parameters verandert, heeft men gebruik gemaakt om inlichtingen over de bactericide werking te verzamelen. Door een vergelijkend onderzoek van bacteriën onder verschillende condities is men tot de hypothese gekomen dat behalve de primaire interactie van de straling met de trefplaats, ook een aantal reactiveringsverschijnselen bij het tot stand komen van het letale effect van grote betekenis zijn. Men heeft bewust naar het voorkomen van herstel-enzymen gezocht en inzake het verschijnsel der fotoreactivering bij door kortgolvig ultraviolet licht geïnactiveerde bacteriën zijn deze pogingen inderdaad met succes bekroond (zie Rupert, 1961).

Vergelijkend radiobiologisch onderzoek heeft ook andere belangrijke feiten aan het licht gebracht. Reeds in 1928 bestudeerde Gates het relatieve effect van licht van verschillende golflengten. Het actiespectrum voor ultraviolet licht vertoonde een grote overeenkomst met het absorptiespectrum der nucleïnezuren, op grond waarvan men moet aannemen dat nucleïnezuren, althans voor ultraviolet licht, primaire aangrijpingspunten (= trefplaatsen) vormen. Door middel van een ander vergelijkend onderzoek heeft men argumenten verzameld die de veronderstelling steunen dat voor het tot stand komen van het letale effect van ioniserende straling en van ultraviolet licht, speciaal het DNA een belangrijke rol speelt. Kaplan en medewerkers (1961) vergeleken daartoe de stralingsgevoeligheid van "normale" bacteriën met die waarin het thymine in het DNA door 5-broomuracil vervangen was.

Laatstgenoemde bleken een sterk toegenomen stralingsgevoeligheid te bezitten.

Behalve de verschillen in stralingsgevoeligheid van één bacteriestam onder verschillende condities, bestaan er ook grote verschillen in gevoeligheid tussen bacteriën onderling. Een *Micrococcus roseus* is honderdmaal minder gevoelig voor ioniserende straling dan een *Staphylococcus aureus* (Niven, 1958). Ook tussen stammen van één soort kunnen aanzienlijke verschillen voorkomen. *E. coli* B is ongeveer driemaal zo gevoelig als de colistam "Texas" (Stapleton, 1955). De stralingsgevoeligheid is dus op één of andere manier genetisch bepaald. Ook een vergelijkend onderzoek van de stralingsgevoeligheid van verschillende stammen zou wellicht inlichtingen kunnen verschaffen over de wijze waarop de door bestraling aangebrachte verandering in de cel verwerkt wordt. Een dergelijk onderzoek kan echter slechts vrucht afwerpen indien daarbij nauw verwante bacteriestammen onderzocht worden. Zulke stammen zijn voor het eerst in 1946 door Witkin beschreven (zie Witkin, 1947). Zij isoleerde uit *E. coli* B spontane mutanten die meer resistent tegen ioniserende straling en ultraviolet licht waren. In 1958 beschreef Hill voor het eerst een mutant van *E. coli* B met een verhoogde stralingsgevoeligheid. Op grond van de waargenomen mutatiefrequenties moet hier in beide gevallen sprake zijn van één enkele mutatie.

Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek is een bijdrage te leveren tot de kennis van de factoren die in *Escherichia coli* B de stralingsgevoeligheid bepalen. Daartoe werd het onderzoek naar de oorzaak van het verschil in gevoeligheid tussen stralingsgevoelige, resp. stralingsresistente mutanten van *E. coli* B en het wilde type, ter hand genomen, enerzijds met het oogmerk inlichtingen te verzamelen over de genetische constitutie van deze merkwaardige mutanten en anderzijds om nieuwe wegen te zoeken om onmiddellijk na bestraling waar te nemen verschijnselen met de letale werking van ioniserende straling en ultraviolet licht te correleren. Omdat bij deze mutanten sprake is van op één kenmerk na isogene stammen, moet aan het verschil in stralingsgevoeligheid en aan verschillen in onmiddellijk na bestraling waar te nemen fenomenen, een gemeenschappelijke oorzaak ten grondslag liggen.

In Hoofdstuk I wordt de isolering beschreven van een stralingsresistente en van een stralingsgevoelige mutant, waarvan de eigenschappen enige overeenkomst vertonen met die van de door Witkin beschreven mutant *E. coli* B/r en die van de door Hill beschreven mutant *E. coli* B_g. Bovendien worden in dit hoofdstuk de bij de onderzoeken toegepaste microbiologische werkwijzen toegelicht. In Hoofdstuk III worden experimenten weergegeven waaruit blijkt in hoeverre de mutanten behalve verschillen in gevoeligheid voor ioniserende straling en ultraviolet licht, ook verschillen vertonen in gevoeligheid voor de desintegratie van geincorporeerd radioactief fosfor en voor een aantal, specifiek de celdeling remmende stoffen. In Hoofdstuk II wordt beschreven hoe de mutaties die tot een gewijzigde stralingsgevoeligheid leiden, onmiddellijk na bestraling onafhankelijk van elkaar tot fenotypische expressie kunnen komen. In Hoofdstuk IV wordt de fenotypische expressie van één van beide mutaties nader omschreven. Tenslotte wordt in Hoofdstuk V aan de hand van conjugatie-experimenten bewezen dat deze mutaties in van elkaar onafhankelijke loci op het bacteriechromosoom plaatsvinden.

2. Literatuuroverzicht.

Het zou te ver voeren de theorieën over het werkingsmechanisme van ioniserende straling en ultraviolet licht in extenso te behandelen. Het hierna volgende literatuuroverzicht blijft beperkt tot die beschouwingen die betrekking hebben op de tussen E.coli B en de daarvan afgeleide stralingsgevoelige (E.coli B_s) en stralingsresistente (E.coli B/r) stammen waargenomen verschillen.

De stralingsresistente stammen van het type E.coli B/r zijn spontane mutanten van het wilde type. Witkin (1947) berekende uit een fluctuatietest een mutatiefrequentie van 10^{-5} per bacterie per deling. Een cultuur van het wilde type van 10^9 cellen zal dus steeds een aanzienlijk aantal E.coli B/r cellen bevatten. Witkin isoleerde ongeveer 50 resistente stammen die niet alle identiek bleken; sommige vertoonden tevens een verhoogde resistentie voor penicilline, andere een verhoogde resistentie voor natriumthiazol. Dit merkwaardige verschijnsel heeft tot 1960 nauwelijks de aandacht getrokken (Adler and Haskins, 1960). In het wilde type wordt de deling door bestraling met een lage dosis UV (50 erg/mm²) sterk geremd; de bacteriën groeien in zogenaamde filamenten. Geen van de door Witkin geïsoleerde stralingsresistente stammen vertoonden dit verschijnsel.

De eigenschappen van door UV bestraling geïnduceerde filamenten van E.coli B zijn in detail bestudeerd door Deering (1958, 1959). Het actiespectrum voor filamentvorming vertoont evenals het actiespectrum voor inactivering, veel gelijkenis met het absorptiespectrum der nucleïnezuuren. Filamentvorming gaat niet gepaard met remming van eiwit- en nucleïnezuursynthese. Tenminste een gedeelte van de door UV bestraling geïnduceerde filamenten kan tot een kolonie uitgroeien. Deze filamenten zijn voor daarop volgende röntgenbestraling gevoeliger dan normale cellen. Toch bevatten filamenten meerdere kernlichamen; Deering leidde hieruit af dat een beschadiging aan één der kernlichamen voldoende is om het uitgroeien tot een kolonie te blokkeren. Filamenten van E.coli B/r, die onder bepaalde omstandigheden in een continue culture geïnduceerd kunnen worden, blijken daarentegen resistenter dan normale B/r cellen (Mudson and McLean, 1961).

Vrij veel vergelijkend onderzoek is verricht inzake de na bestraling waargenomen reacteringsverschijnselen. Anderson (1951) vond in E.coli B een hoger percentage overlevende indien de incubatietemperatuur na UV bestraling van 37° tot 45° werd verhoogd. Een gelijksoortig effect wordt waargenomen indien de cellen na bestraling eerst enige tijd in buffer (Woodside c.s., 1960), in natriumacetaat (Ellison c.s., 1955) of met chlooramfenicol (Okagaki, 1960 en Alper en Gillies, 1960) geïncubeerd worden. E.coli B/r vertoont deze verschijnselen niet of in veel geringere mate. Zowel E.coli B als E.coli B/r kunnen echter na inactivering met kortgolvig UV door bestraling met zichtbaar licht of langgolvig UV, gereactiveerd worden (zie o.a. Hill en Simson, 1961).

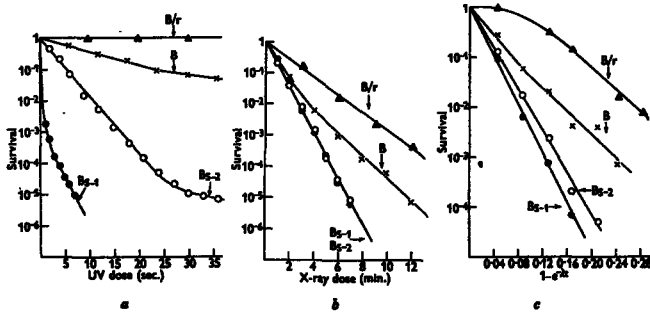
Tal van andere pogingen om het verschil in stralingsgevoeligheid tussen E.coli B en E.coli B/r te correleren met andere verschillen tussen deze stammen hebben niet tot het gewenste resultaat geleid. De mutatie tot resistentie tegen bacteriofaag T₁ onder invloed van UV en röntgenstraling is in beide stammen even frequent (Demerec en Latarjet, 1946). Kaplan c.s. (1953) meldden dat de adaptieve synthese van het enzym β galactosidase

door UV bestraling in beide stammen even sterk geremd wordt.

Noch Harold en Ziporin (1958), noch Hill en Simson (1961), noch Errera (1958) vonden een significant verschil in nucleïnezuurgehalte tussen de beide stammen. Morse en Carter (1949) meenden daarentegen dat de E. coli B/r stam tweemaal zoveel nucleïnezuur bevatte als het wilde type. Dit zou de vorm van de bolle overlevingscurve van B/r kunnen verklaren. Ook Ogg en Zelle (1957) maakten melding van een hogere stralingsresistentie in door kamferbehandeling geïsoleerde E. coli mutanten met een hoger nucleïnezuurgehalte. Waarschijnlijk is toch het door Morse en Carter geconstateerde verschil in nucleïnezuurgehalte beperkt tot de speciaal door hen bestudeerde stammen, gezien het grote aantal onderzoekers dat in dit opzicht geen verschil tussen E. coli B/r en het wilde type gevonden heeft.

In 1958 isoleerde Hill voor het eerst door UV bestraling van E. coli B een mutant die gevoeliger voor UV en röntgenbestraling bleek te zijn dan het wilde type. Zij noemde deze stam E. coli B_S. Na bestraling vormt deze B_S stam geen filamenten maar vertoont reactiveringsverschijnselen overeenkomstig met die van het wilde type.

In 1960 beschreven Ellison, Feiner en Hill een opmerkelijk verschil in vermogen tussen E. coli B en B_S om bestraalde bacteriofaag T₁, T₃ of T₇ te vermenigvuldigen. Terwijl de onbestraalde suspensie van één van deze



Figuur 2.

(Hill and Simson, 1961). Survival of E. coli strain B and its mutants after (a) UV irradiation, (b) X-irradiation, and (c) decay of incorporated ³²P. The dose rates were 5.6 erg/mm²/sec for UV, and 3000 roentgens/min for X-rays; the specific activity of the ³²P in each strain was 20 mc/mg total P.

fagen op beide stammen evenveel plaques vormt, is de fractie plaques-vormende deeltjes in de suspensie na UV-bestraling geringer indien de B_S stam in plaats van de B stam als gastheer wordt gebruikt. Bij de bacteriofagen T₂ en T₅ wordt een dergelijk effect van de gastheer echter niet waargenomen. Hill concludeerde hieruit: "that the mutation of strain B to strain B_S involves a gene whose function is trivial in the growth of normal phage, but which is essential for replication of UV irradiated phage".

Tenslotte vonden Hill en Simson (1961) een verschil in gevoeligheid tussen de drie stammen E. coli B, B/r en B_S voor de desintegratie van geïncorporeerd ³²P (zie fig. 2).

HOOFDSTUK I

BIOCHEMISCHE EN MICROBIOLOGISCHE WERKWIJZEN. DE ISOLERING VAN EEN STRALINGSRESISTENTE EN VAN EEN STRALINGSGEVOELIGE MUTANT VAN E. COLI B.

1. Herkomst van de gebruikte stammen.

De gebruikte E.coli B stam is afkomstig uit de verzameling van het Laboratorium voor Technische Microbiologie van de Technische Hogeschool te Delft. De stam wordt sinds januari 1957 in het Medisch Biologisch Laboratorium (MBL) aangehouden. De stam is een nakomeling van de E.coli B "Luria" die kort na de tweede wereldoorlog door Prof. Winkler (Utrecht) naar Nederland is overgebracht. De stam verschilt echter toch in tenminste twee opzichten van een in januari 1959 van Prof. Luria ontvangen stam, namelijk in de fermentatie van salicine en sucrose (zie Tabel I).

Tabel I.
Fermentatiespectrum van enige E. coli
stammen.

Stam	glucose	lactose	maltose	sucrose	rhamnose	arabinose	xylose	mannitol	dulcitol	sorbitol	inositol	adonitol	salicine	indool	methyl- rood	urease
B (MBL)	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
B (Luria)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
A 15 1)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
M 2)	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
K 12 3)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
C 3)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-

1) Geïsoleerd uit de darmflora van een rhesusaap.

2) Uit de verzameling van het Laboratorium voor Technische Microbiologie te Delft.

3) Uit de verzameling van het Laboratorium voor Microbiologie der Rijksuniversiteit te Utrecht.

2. Media.

De samenstelling van de gebruikte media wordt in Tabel II weergegeven. Deze media zijn gebaseerd op de voorschriften van Roberts c.s. (1957).

De glucose wordt op de gebruikelijke wijze afzonderlijk gesteriliseerd door driemaal achtereenvolgens op 100°C te verhitten.

Tabel II
Samenstelling van gebruikte media.

		Mg	Mg-CAS	TRIS-yP	TRIS-yP-CAS	pepton- bouillon
NH ₄ Cl	g/l	1	1	2	2	-
Na ₂ HPO ₄	g/l	6	6	-	-	-
KH ₂ PO ₄	g/l	3	3	-	-	-
NaCl	g/l	5	5	3	3	3
MgSO ₄	g/l	0,1	0,1	0,1	0,1	-
TRIS	g/l	-	-	12,1	12,1	-
extra P (als PO ₄)	mg/l	-	-	y	y	-
1 N HCl	ml/l	-	-	80	80	-
glucose	g/l	0,25	10	0,25	10	10
CAS. 1)	g/l	-	2	-	2	-
Difco bactopecton	g/l	-	-	-	-	10
Difco vlees- extract	g/l	-	-	-	-	5
pH		7,0	7,0	7,2	7,2	7,0

- 1) De afkorting CAS. heeft betrekking op een Difco aminozuurhydrolysaat van caseïne dat vrij van vitaminen is. Het wordt aan het medium toegevoegd uit een afzonderlijk gesteriliseerde, 10% oplossing. Voor de meting van de incorporatie van ³²P wordt een gedefosforyleerd preparaat gebruikt (2,7 mg/l anorg. P, nihil org. P). Voor de meting van de incorporatie van ¹⁴C aminozuren wordt een speciaal geanalyseerd preparaat gebruikt. De samenstelling hiervan is per g droge stof: 0,287 mMol asparaginezuur, 0,191 mMol threonine, 0,275 mMol serine, 0,560 mMol proline, 0,446 mMol glutaminezuur, 0,134 mMol glycine, 0,211 mMol alanine, 0,269 mMol valine, een spoor cystine en minder dan 0,005 mMol cysteinezuur, 0,0985 mMol methionine, 0,189 mMol isoleucine, 0,379 mMol leucine, 0,375 mMol tyrosine, 0,404 mMol fenylalanine, 0,480 mMol NH₄, 0,340 mMol lysine, 0,0975 mMol histidine, 0,108 mMol arginine, (tryptofaan niet bepaald).

3. De bepaling van de bacterie-concentratie in suspensies.

Het aantal kolonievormende cellen in vloeibare culturen werd bepaald door 1 ml van een geschikte verdunning uit te zaaien op een vaste voedingsbodem waarvan de samenstelling overeenkomt met één van de in Tabel II genoemde media en waaraan bovendien tot 1½% Difco agar is toegevoegd.

Het drooggewicht der bacteriën (in mg/ml) werd berekend uit de optische dichtheid van de cultuur bij de golflengte 700 mμ, gemeten in een Unicam model SP500 spectrofotometer. (Dr. A. A. van Soestbergen van het Medisch Biologisch Laboratorium vond bij deze golflengte een lineaire correlatie tussen de optische dichtheid en het drooggewicht per ml voor *E. coli* B. Een optische dichtheid van 0,100 correspondeert met 0,058 mg DG/ml.).

4. De bestraling met ultraviolet licht.

UV bestraling werd uitgevoerd met een lage druk kwiklamp (Philips 30 watt TUV) die 90% van zijn stralingsenergie bij de golflengte 254 mμ uitzendt. Bacteriesuspensies werden in een laagje van 1 mm in petri-schalen bestraald op een afstand van 59 cm van de lamp. Voor biochemisch onderzoek werd bij bestraling een maximale concentratie van 0,1 mg DG/ml, voor het meten van overlevingscurven een concentratie van 0,02 mg DG/ml gebruikt. De intensiteit van de straling werd bepaald volgens de methode van Bowen (1946). In een mengsel van natriumoxalaat en uranyloxalaat ontleeft het oxalaat fotochemisch volgens de vergelijking:



Door terugtitratie van de overmaat oxalaat met KMnO_4 wordt de hoeveelheid fotochemisch omgezet oxalaat bepaald. 1 gae oxalaat komt overeen met een hoeveelheid geabsorbeerde stralingsenergie van $3,92 \times 10^{12}$ erg bij een golflengte van 254 mμ. De intensiteit van de straling bedroeg op een afstand van 59 cm van de lamp 13,1 erg/mm²/sec. ($\sigma = 0,3$).

5. De röntgenbestraling.

Röntgenbestraling werd uitgevoerd met een Machlett OEG-60 buis met beryllium venster. De uitgezonden röntgenstraling heeft een effectieve energie van 8 keV en een halveringsdikte in water van ca. 0,7 mm. Monsters van 0,5 ml werden onder heftig schudden door middel van een luidsprekerconus, bestraald in kleine bekerglaasjes (Ø 1,8 cm), op een afstand van 12 cm van de buis. Bij een afgelezen-buisstroom van 10 resp. 30 mA bedroeg de doseringssnelheid 200 rad/sec., resp. 650 rad/sec. bij een spanning van 50 kV.¹⁾

6. De fractionering van celmateriaal.

Het nucleïnezuurgehalte, het eiwitgehalte of de incorporatie van radioactieve isotopen werd in bacteriesuspensie gemeten na een fractionering volgens Roberts c.s. (1957). Deze fractionering is gebaseerd op de methode van Schmidt-Tannhauser. Met koud perchloorzuur (0,2 N) wordt eerst het

Tabel III
De verdeling van de radioactiviteit over de verschillende celfracties
na fractionering volgens Roberts c.s.

	¹⁴ C glycine	¹⁴ C dl alanine	³² PO ₄ ^{'''}
0,2 N HClO ₄ extract	7,9	7,8	28,1
70% alcohol extract:	6,5	13,0	9,5
alcohol-ether extract	1,4	1,1	2,4
0,5 N HClO ₄ extract (DNA+RNA)	37,2	6,0	54,2
trypsin extract	38,5	56,0	2,4
residu	8,6	15,7	3,3
totaal teruggevonden	100,1 %	99,6 %	99,9 %

1) De opstelling van de bestralingsapparatuur werd verzorgd door Dr. Joh. Blok en M. Huguenin, de doseringssnelheid gemeten door Dr. Joh. Blok en R. Dekker.

zogenaamde zuuroplosbare extract afgescheiden. Lipiden en verwante verbindingen worden verwijderd door achtereenvolgens uit te trekken met 70 % alcohol (30 min. bij 50°C) en 70% alcohol/ether 1:1 (15 min. bij 50°C). Door het resterende neerslag gedurende 20 min. bij 70°C met 0,5 N HClO₄ te verhitten worden de nucleïnezuuren in oplossing gebracht. Een scheiding tussen RNA en DNA kan men bewerkstelligen door het precipitaat na de alcohol/ether extractie eerst gedurende 18 uur bij 37° met 0,1 N NaOH te incuberen, waarbij alleen het RNA hydrolyseert en vervolgens het DNA met 0,5 N HClO₄ in oplossing te brengen. Na de extractie van het nucleïnezuur bestaat het neerslag voornamelijk uit eiwit, dat door incubatie met trypsine in oplossing kan worden gebracht. Het residu dat dan nog overblijft bestaat waarschijnlijk uit celwandcomponenten.

De verdeling van de radioactiviteit over de verschillende fracties na gedurende drie generaties incuberen met respectievelijk ¹⁴C glycine, ¹⁴C dl alanine of ³²PO₄''' in TRIS-5P-CAS medium, blijkt uit Tabel III.

7. Overige analyse methoden.

Organisch en anorganisch fosfaat werd bepaald volgens de methode Fiske-SubbaRow, in een modificatie van Bartlett (1959). RNA werd bepaald volgens de methode van Mejbaum (Dische, 1955), DNA volgens de methode van Burton (1956). Eiwit werd bepaald volgens de methode van Lowry c.s. (1951).

De synthese van het enzym β galactosidase werd gemeten na inductie met lactose (2,5 mg/l) volgens Rotman (1958).

De gebruikte radioactieve stoffen waren alle afkomstig van The Radiochemical Centre, Amersham, Engeland. ³²PO₄''' en ³⁵SO₄''' werden drager-vrij geleverd, de specifieke activiteit van ¹⁴C aminozuren varieerde van 5 tot 10 mc/mMol.

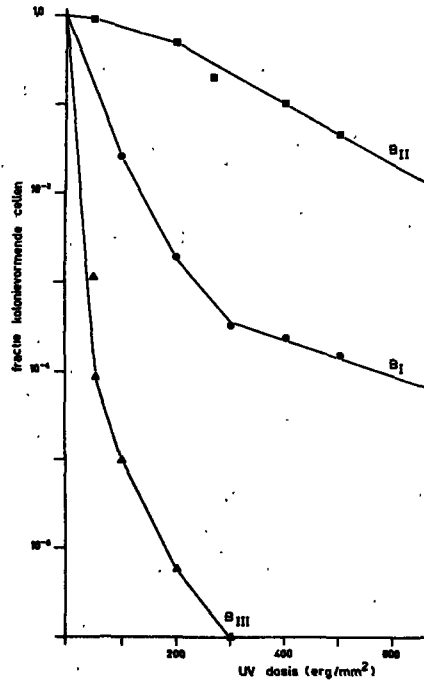
De radioactiviteit van ³²P preparaten werd op telbakjes gemeten met behulp van een Geiger-Müller buis, uitgerust met een eindvenster; voor de meting van ¹⁴C en ³⁵S werd gebruik gemaakt van een met gas doorstroomde telbuis met zeer dun eindvenster (tel- en registratieapparatuur fabriek Nuclear Chicago, respectievelijk model 181b, C-111B).

De zuurstofconcentratie in bacterieculturen werd langs polarografische weg bepaald met behulp van een "Clark"-membraan elektrode (Clark, 1956).

8. De isolering van een stralingsresistente mutant.

Uit E.coli B werd een stralingsresistente mutant (B_{rr}) geïsoleerd volgens een door Witkin (1947) beschreven methode. Uit een logaritmisch groeiende cultuur werden ongeveer 10⁷ cellen op het oppervlak van een pepton-agar-plaat gebracht en bestraald met een dosis van 50 erg/mm² UV. Door deze dosis wordt de deling van het wilde type gedurende de hierop volgende incubatie volledig geremd; de in de cultuur voorkomende spontane mutanten van het resistente type kunnen in 2 uur tot een micro-kolonie van ongeveer 16 cellen uitgroeien. Na 2 uur wordt de plaat opnieuw bestraald maar nu met 1000 erg/mm² UV. Micro-kolonies van cellen van het resistente type kunnen deze dosis overleven terwijl de fractie cellen van het wilde type een factor 10⁻⁵ gereduceerd wordt. Na deze bestraling werd de plaat 18 uur bij 37°C geïncubeerd. Van de opgekomen kolonies werden nieuwe cul-

turen gemaakt die daarna op hun stralingsgevoeligheid werden onderzocht. Eén uit vier kolonies bleek uit cellen van het resistente type te bestaan. Na drie achtereenvolgende passages op M₉ agarplaten, waarbij steeds één kolonie werd overgeënt, werd één stam gevriesdroogd en tevens op schuine agar-buizen aangehouden. De overlevingscurve van deze stam (B_{II}) voor UV bestraling wordt in Fig. 3 weergegeven.



Figuur 3.
Het effect van UV bestraling op ● E.coli B_I (wilde type), ■ E.coli B_{II} en ▲ E.coli B_{III}. Culturen gekweekt in peptonbouillon en bestraald in de stationaire fase.

9. De isolering van een stralingsgevoelige mutant.

Uit E. coli B werd een stralingsgevoelige mutant geïsoleerd (B_{III}) volgens een door Hill (1958) beschreven methode. Dertig pepton-agar platen met ongeveer 10⁷ E. coli B cellen per plaat werden bestraald met een dosis van 3000 erg/mm². Na 18 uur incuberen werden gemiddeld 4 kolonies per plaat aangetroffen. Honderd van deze kolonies werden op het voorkomen van stra-

lingsgevoelige mutanten onderzocht. Eén kolonie leverde een mutant op (B_{III}) die een gevoeligheid vertoonde overeenkomend met die van de door Hill beschreven stam E. coli B_S. Ook deze mutant werd na drie achtereenvolgende passages op M₉ agar, waarbij steeds één kolonie werd overgeënt, gevriesdroogd en tevens op schuine agar-buizen aangehouden. De overlevingscurve van de stam B_{III} voor UV bestraling wordt in Fig. 3 weergegeven.

10. De keuze van het medium voor kwantitatief biochemisch onderzoek.

Bij de keuze van een medium laat men zich meestal slechts leiden door de gedachte dat het te kweken organisme hierop snel en goed moet kunnen groeien. Bij een vergelijkend onderzoek naar de stralingsgevoeligheid van verschillende bacteriestammen is een hoge mate van reproduceerbaarheid van een bepaalde fysiologische conditie echter een eerste vereiste. Hier toe is men aangewezen op het gebruik van synthetische media. Op een rijk medium zoals b. v. peptonbouillon groeit E. coli zeer snel (delingstijd 25 min. bij 37°C) maar sterft na het bereiken van de stationaire fase ook weer snel af. Na overenten van zo'n cultuur in de afstervingsfase op een vers medium, is het tijdstip waarop de groei hervat wordt, sterk afhankelijk van de mate waarin de afsterving heeft plaats gehad. Op een arm medium, b. v. M₉, groeit de bacterie langzaam (delingstijd 60 min. bij 37°C) maar in de stationaire fase vindt, indien de omstandigheden goed gekozen worden, afsterving niet plaats; het aantal kolonievormende cellen kan zelfs 5 dagen achtereenvolgend constant blijven. Dit heeft een gunstige invloed op de reproduceerbaarheid van de experimenten, zoals in het onderstaande nader zal worden toegelicht.

Ook vanuit chemisch standpunt bezien, biedt het gebruik van een synthetisch medium voordelen. Bij tal van experimenten kan met vrucht gebruik gemaakt worden van radioactieve isotopen. In een synthetisch medium is in het algemeen de specifieke activiteit gemakkelijker te regelen dan in een gecompliceerd peptonmedium.

De groei van E. coli B op het synthetische medium M₉ werd door Roberts c. s. (1957) in details bestudeerd. Toch kon dit medium niet zonder meer in alle experimenten gebruikt worden omdat nog een andere factor bij de keuze van het medium een rol speelt. De na bestraling waargenomen effecten zijn namelijk sterk afhankelijk van de samenstelling van het medium. In het algemeen geldt dat na bestraling de fractie overlevende cellen op een rijk medium zoals b. v. peptonbouillon lager is dan op een synthetisch medium. Een stralingseffect komt dus op een rijk medium sterker tot uitdrukking. Dit blijkt ook voor de stammen B_I en B_{III} het geval te zijn (Tabel IV).

Tabel IV

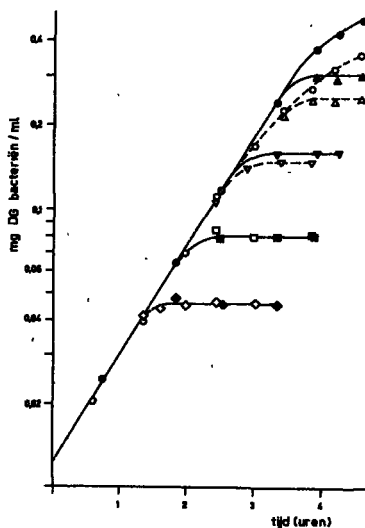
De fractie kolonievormende cellen op verschillende agarmedia in een logaritmisch groeiende cultuur van E. coli B, bij bestraling met 55 erg/mm² UV.

Stam	M ₉ medium	M ₉ medium met 0,2% CAS	peptonbouillon medium
B _I	0,39	0,14	0,12
B _{II}	0,65	0,71	0,64
B _{III}	0,011	< 0,003	< 0,003

Wordt Mg medium evenwel gesupplementeerd met een geringe hoeveelheid caseïnehydrolysaat (0,2%) dan blijkt een stralingseffect even sterk tot uitdrukking te komen als op peptonbouillon. Het gebruik van Mg agarplaten waaraan caseïnehydrolysaat is toegevoegd, biedt bovendien het voordeel dat kolonies reeds na 18 uur incuberen zichtbaar zijn, terwijl op zuivere Mg platen hiervoor 36 uur nodig is. Wordt vloeibaar Mg medium met 0,2% caseïnehydrolysaat verrijkt, dan neemt de groeisnelheid van *E. coli* hierin ook sterk toe. De snelheid waarmee experimenten met dit medium kunnen worden uitgevoerd, wordt hierdoor aanzienlijk verhoogd. Om met dit verrijkte medium toch nog experimenten met ^{14}C gemerkte aminozuren te kunnen uitvoeren, werd de aminozuursamenstelling van het caseïnehydrolysaat bepaald met behulp van de "Spinco Model 120 automatic amino acid analyzer" (zie Tabel II).

11. De groei van *E. coli* B op een medium met een beperkende hoeveelheid substraat.

Het synthetische medium Mg bevat een hoeveelheid minerale zouten, fosfor en zwavel (Roberts c.s. 1957) die voor de meeste proeven voldoende is. In de praktijk heeft men slechts met de koolstofbron en de zuurstof als beperkende substraten rekening te houden.

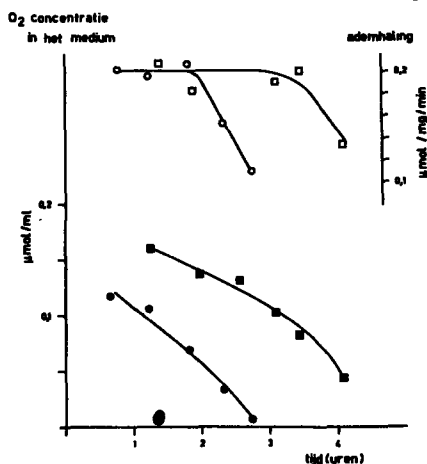


Figuur 4.

De groei van *E. coli* B in een medium met een beperkende hoeveelheid glucose. Gesloten figuren: culturen geïncubeerd onder standaardcondities (25 ml in 250 ml kolf, schudfrequentie 100 bewegingen per min). Open figuren: slecht geaëreerde culturen (200 ml in 250 ml kolf).

◆ 0,01% glucose, ■ 0,02% glucose, ▽ 0,04% glucose
▲ 0,08% glucose, ● 0,2% glucose.

Op een medium met 0,025% glucose groeit de coli-stam tot een dichtheid van 0,1 mg drooggewicht per ml. Binnen zekere grenzen is de eindconcentratie aan bacteriemateriaal evenredig met de glucose concentratie in het medium (Fig. 4). Boven een zekere glucose concentratie, waarvan de waarde afhangt van de aëratie-efficiëntie, neemt de opbrengst aan bacteriën per mg glucose af. Fig. 4 illustreert de groei van goed geaëreerde culturen (25 ml geschud in een 250 ml kolf) en van slecht geaëreerde culturen (200 ml geschud in een 250 ml kolf). Zodra een cultuur een zekere bacteriedichtheid bereikt, daalt de zuurstofconcentratie in het medium (Fig. 5) ten gevolge waarvan de facultatief anaërobe *E. coli* op glycolyse overgaat.



Figuur 5.

Zuurstofconcentratie in (gesloten figuren) en ademhaling van (open figuren) een cultuur van *E. coli* B in M₉ medium met 0,2% glucose.

■ cultuur geïncubeerd onder standaardcondities,

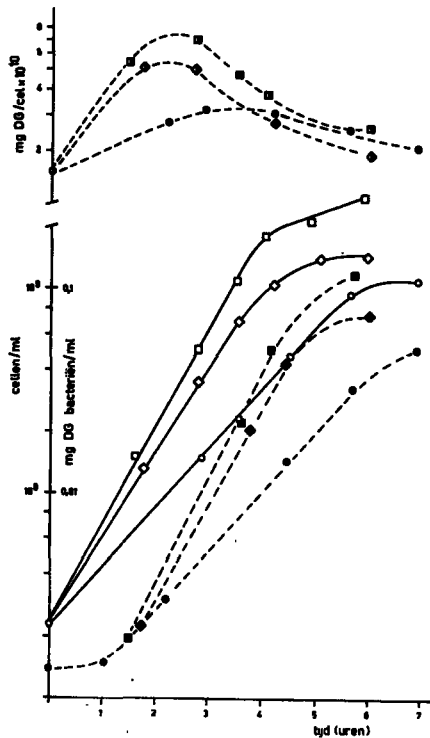
● slecht geaëreerde cultuur.

De tijdas correspondeert met die van Fig. 4, waaruit de dichtheid van de cultuur op elk tijdstip kan worden afgelezen.

Per mg glucose wordt dan per mg bacteriën minder zuurstof opgenomen. Het is niet mogelijk om te voorspellen op welk moment de bacterie zijn stofwisseling wijzigt. De gang van dit geleidelijk verlopende proces hangt samen met de aëratie-efficiëntie, die weer afhangt van de schudfrequentie, van de hoeveelheid cultuurvloeistof en van de vorm en de grootte van het kweekvat. Om de cultuurcondities toch volledig onder controle te houden werd besloten de cultures, door de hoeveelheid substraat (glucose) te beperken, tot een zekere grenswaarde te laten groeien, waarbij nog geen glycolyse optreden kan. In een 25 ml cultuur van M₉ met 0,025% glucose in een 250 ml kolf (geschud in een waterbad van 37°C met een frequentie van 100 heen en weer gaande bewegingen per minuut) bleken de cellen steeds de maximaal waargenomen hoeveelheid zuurstof per mg bacteriën op te ne-

men, tot op het moment waarop de koolstofbron uitgeput is. De groei en de ademhaling stoppen dan abrupt.

Wordt zo'n stationaire cultuur overgeënt op vers medium dan beginnen de cellen onmiddellijk te groeien; er wordt direct een toeneming van het drooggewicht waargenomen. Er vindt echter gedurende het eerste uur na overenten géén deling plaats. Ten gevolge hiervan stijgt gedurende deze aanloophase (Eng.: lag-phase) het gemiddelde drooggewicht per cel. In Fig. 6 is de toeneming van het drooggewicht (mg DG/ml), de toeneming van het aantal cellen en de gemiddelde grootte van de cellen (mg DG/cel) als functie van de tijd na overenten uit een cultuur in de stationaire fase uitgezet. Uit deze figuur blijkt eveneens de groeistimulerende werking van de toevoeging van caseïnehydrolysaat aan het medium.



Figuur 6.

De groei van *E. coli* B in M9 medium.

● met 0,04% glucose,

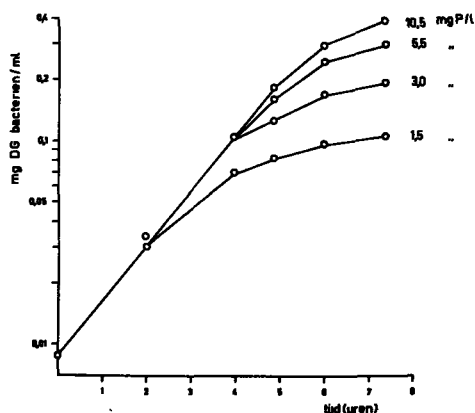
◆ met 0,04% glucose en 0,02% CAS.,

■ met 0,04% glucose en 0,2% CAS.

Open figuren: mg DG bacteriën/ml, gesloten figuren:

aantal kolonievormende cellen per ml; half gesloten figuren: mg DG per cel.

Het Mg medium is vanwege de hoge fosfaat-concentratie (2,5 g P/l) als zodanig weinig geschikt voor de meting van de incorporatie van radioactief fosfor ($^{32}\text{PO}_4^{'''}$). Voor de groei is een hoge fosfaat-concentratie niet belijst noodzakelijl. Het fosfaat fungeert in Mg medium mede als buffer. In het TRIS medium is de fosfaatbuffer vervangen door een trihydroxymethylaminomethaan (TRIS) buffer. De fosfor behoefte van E.coli B werd bepaald door culturen in dit TRIS medium met 0,4% glucose en met diverse fosfaatconcentraties te kweken (zie Fig. 7, de hoeveelheid fosfaat wordt steeds uitgedrukt in mg P/l). Het bleek dat E.coli op dit TRIS medium met slechts enkele mg P/l even goed groeit als op Mg medium. Voor routinegebruik

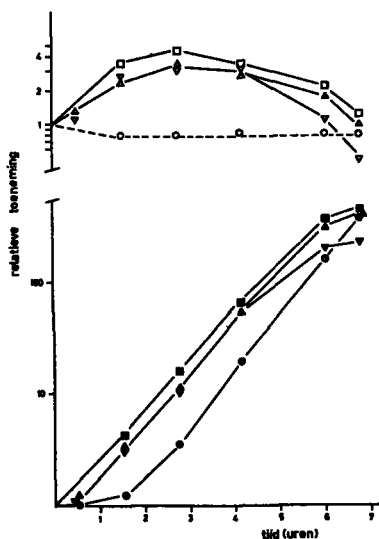


Figuur 7.
Het effect van een groei-beperkende hoeveelheid fosfaat in TRIS medium op de groei van E.coli B.

werd een TRIS medium met 5 mg P/l als anorganisch fosfaat (TRIS-5P medium) gekozen. Ook het Difco caseïnehydrolysaat heeft een hoog fosforgehalte; een 10% oplossing in gedestilleerd water bevat 380 mg/l anorganisch P (organisch P is nihil). Het fosfaat werd hieruit als MgNH_4PO_4 geprecipiteerd. Na deze bewerking bevatte een 10% oplossing nog slechts 2,7 mg P/l. Wordt dit gedefosforyleerde caseïnehydrolysaat (CAS-P-) aan TRIS-5P medium toegevoegd, dan kunnen ook hiermede ^{32}P incorporatie-experimenten worden uitgevoerd.

De relatie tussen de toeneming van de bacteriemassa (mg DG/ml) en de toeneming van het aantal cellen werd in een cultuur in TRIS-5P medium met 0,02% CAS-P- opnieuw bestudeerd. Door gelijktijdig de incorporatie van ^{32}P in de DNA en RNA fractie te meten, kon bovendien de synthese van de nucleïnezuuren worden gevolgd. Daartoe werd E.coli B eerst gekweekt in TRIS-5P medium zonder CAS met 0,025% glucose en $0,3 \mu\text{C } ^{32}\text{P}/\mu\text{g P}$. Hierdoor werd een uniform met ^{32}P gemerkte cultuur in de stationaire fase verkregen. Deze cultuur werd vervolgens 1 op 500 verdund in vers medium met 0,02% CAS-P- en met dezelfde specifieke activiteit. Onder deze

omstandigheden is de incorporatie van ^{32}P recht evenredig met de hoeveelheid gesynthetiseerd nucleïnezuur. De resultaten van dit experiment worden in Fig. 8 grafisch weergegeven. Het blijkt dat de DNA en RNA synthese

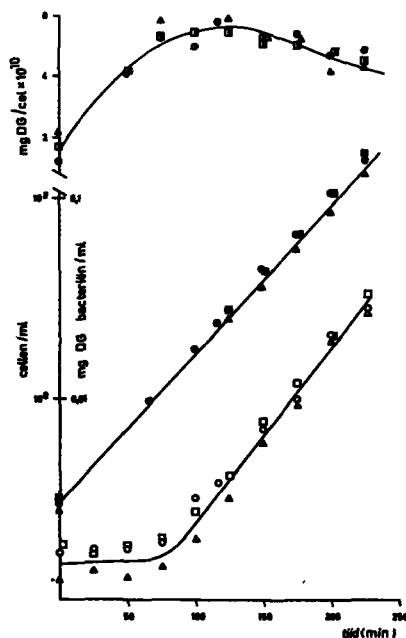


Figuur 8.

Celdeling, drooggewicht, DNA- en RNA-toeneming in een cultuur van *E. coli* B (TRIS-5P medium met 0,1% glucose, 0,02% CAS). Ordinaat: relatieve toeneming in de cultuur van ● aantal cellen/ml, ▲ incorporatie van ^{32}P in DNA fractie, ▼ incorporatie ^{32}P in RNA fractie, ■ mg DG bacteriën/ml, □ mg DG/cel, Δ ^{32}P in DNA/cel, ▽ ^{32}P in RNA/cel, ○ ^{32}P in DNA/mg DG.

niet parallel lopen met de vermeerdering van het aantal cellen in de cultuur, maar veeleer met de vermeerdering van het drooggewicht (mg DG/ml).

Evenals in M_9 medium wordt in TRIS-5P medium een aanlooffase waargenomen waarin geen deling plaatsvindt. De duur van deze aanlooffase en de daarmee gepaard gaande toeneming van de gemiddelde celgrootte (mg DG/cel) bleek in verschillende experimenten weinig te variëren. Deze hoge mate van reproduceerbaarheid wordt bereikt door steeds uit te gaan van een stationaire cultuur, verkregen door de cellen op een medium met een beperkende hoeveelheid glucose (0,025%) te kweken. In Fig. 9 worden drie groeicurves weergegeven respectievelijk voor de B_I , B_{II} en de B_{III} stam, gemeten op drie achtereenvolgende dagen. In de stationaire fase werd enige variatie gevonden in de gemiddelde celgrootte ($1,5 - 2,3 \times 10^{-10}$ mg DG/cel). In verhouding tot de toeneming van de grootte van de cellen in de aanloop-



Figuur 9.

De groei van *E. coli* B in M₉ medium (0,04% glucose, 0,2% CAS). Open figuren: aantal kolonievormende cellen/ml, gesloten figuren: mg DG bacteriën/ml, half gesloten figuren: mg DG/cel.

● stam B_I, ■ stam B_{II}, ▲ stam B_{III}.

fase en het begin van de logaritmische groeifase, is deze variatie echter gering. De verschillen tussen de stammen onderling bleken niet significant te zijn.

Reeds werd ter sprake gebracht dat in de praktijk slechts de koolstof-bron en de zuurstof als beperkende substraten bij het kweken van *E. coli* een rol spelen. Hierbij is voorbij gegaan aan de zogenaamde sporenelementen die door sommige onderzoekers aan een volledig synthetisch medium worden toegevoegd. Toevoeging van Cu, Mn, Co, Zn, Fe of Ca-ionen aan de hier beschreven M₉ en TRIS media oefende geen stimulerende invloed uit op de groei van *E. coli* B. Toevoeging van 3×10^{-5} M ethyleendiamine-tetra-acetaat (EDTA, TRITRIPLEX III, Merck) remde de groei evenwel volledig. Deze remming kon door toevoeging van meer Mg ionen (10^{-4}) niet

worden opgeheven. Waarschijnlijk moet de remmende werking van EDTA dus worden toegeschreven aan de binding van voor groei noodzakelijke sporenelementen, die in het synthetisch medium als verontreiniging voorkomen.

HOOFDSTUK II

FENOTYPISCHE ANALYSE VAN DE MUTATIES DIE TOT EEN GEWIJZIGDE STRALINGSGEVOELIGHEID LEIDEN.

1. Het nucleïnezuurgehalte van *E. coli* B_I, de stralings-resistente stam B_{II} en de stralingsgevoelige stam B_{III}.

Morse en Carter (1949) vermeldden dat de door hen bestudeerde *E. coli* B en *E. coli* B/r verschillen vertoonden in nucleïnezuurgehalte, terwijl een aantal andere onderzoekers een dergelijk verschil tussen stammen van deze typen niet constateerde (zie literatuuroverzicht). Daarom werd nagegaan of de mutaties in de door ons geïsoleerde stammen gepaard gaan met dergelijke eenvoudig te constateren veranderingen in macromoleculaire constitutie.

Wordt een groeiende cultuur van *E. coli* B aan microscopisch onderzoek onderworpen, dan blijken de afmetingen van de cellen een grote spreiding te vertonen. Het getal dat het gemiddelde nucleïnezuurgehalte aangeeft - uitgedrukt in DNA/cel en RNA/cel - heeft door de heterogeniteit van de populatie weinig betekenis. Bovendien werd in Hoofdstuk I aangetoond dat de gemiddelde celgrootte sterk afhankelijk is van de tijd die verstreken is sinds de cultuur in vers medium werd overgeënt. In een cultuur in M₉ medium met een beperkende hoeveelheid glucose (0,025%) blijken de cellen, enige tijd nadat de koolstofbron uitgeput is, nog het meest uniform van grootte te zijn. Bovendien wordt in deze stationaire fase de best reproduceerbare waarde voor de gemiddelde celgrootte gevonden. Daarom werd in cultures van de drie stammen in deze fase het gemiddelde nucleïnezuurgehalte der cellen bepaald. In de cultures werden het DNA en RNA volgens de methode van Burton (1956) en Mejbaum (Dische, 1955) en het aantal aanwezige cellen door microscopische telling, bepaald. Zoals uit Tabel V blijkt, vertonen de stammen B_I, B_{II} en B_{III} evenals de door Hill en Simson (1961) bestudeerde stammen *E. coli* B, *E. coli* B/r en *E. coli* B_S, geen significant verschil in nucleïnezuurgehalte.

Tabel V.
Het nucleïnezuurgehalte van *E. coli* B.

Stam	DNA gehalte. μg/10 ⁹ cellen (σ = 0,4)	RNA gehalte μg/10 ⁹ cellen (σ = 1,5)
B _I	11,5	50,0
B _{II}	12,0	51,0
B _{III}	12,0	50,0

2. De fysiologische verschillen tussen de stammen B_I, B_{II} en B_{III}.

De stammen B_I, B_{II} en B_{III} vertonen geen verschillen in nucleïnezuur-gehalte (Tabel V) of in groei- en delingssnelheid (Fig. 9). Evenmin werden verschillen gevonden in groei behoeften, fermentatiespectrum, ademhalings-snelheid en in het sedimentatiepatroon in de analytische ultracentrifuge van celvrije extracten van de drie stammen. Aan de hand van de tot nu toe besproken experimenten kunnen we de stammen slechts van elkaar onderscheiden op grond van hun overlevingscurven voor ultraviolet licht (Fig. 3). Toch komen de mutaties in de B_{II} en B_{III} stam nog op een andere manier tot fenotypische expressie.

Na bestraling met 50 erg/mm² UV kunnen cellen van het wilde type nog wel groeien, maar niet meer delen. Dientengevolge bestaat een cultuur van het wilde type enige tijd na bestraling vrijwel volledig uit zogenaamde filamenten. In de resistente stam B_{II} wordt door een dosis van 50 erg/mm² UV noch de groei noch de deling geremd; derhalve worden in een cultuur van deze stam geen filamenten waargenomen. Reeds Witkin (1947) had een overeenkomstig verschil tussen het wilde type en resistente stammen van het type *E. coli* B/r geconstateerd. Uit het oogpunt van vergelijkend radiobiologisch onderzoek is dit feit van groot belang. Omdat de stammen B_I en B_{II} op één enkele mutatie na isogeen zijn, moet aan het verschil in gevoeligheid en het verschil in morfologisch gedrag een gemeenschappelijke oorzaak ten grondslag liggen.

De stralingsgevoelige stam B_{III} vormt na UV bestraling, evenals het wilde type, filamenten. Zoals uit de hierna volgende experimenten zal blijken wordt in B_{III} echter zowel de groei als de deling na UV bestraling geremd. De mutatie B_I → B_{III} is dus van geheel andere aard dan de mutatie B_I → B_{II}. Eerstgenoemde mutatie heeft een specifieke invloed op de groei, de tweede mutatie op de deling na bestraling.

3. Nomenclatuur.

Alvorens de verschillen tussen de drie stammen nader te omschrijven, worden eerst de symbolen toegelicht die in het hierna volgende gebruikt worden om de verschillende eigenschappen die de stralingsgevoeligheid beïnvloeden aan te geven. Voor de aanduiding van de verschillende stammen is tot nu toe volstaan met de nummering I, II en III. In deze aanduiding missen wij echter de weerspiegeling van specifieke eigenschappen. Met opzet werd evenwel het gebruik van de door andere onderzoekers gebezigde nomenclatuur vermeden. Adler en Haskins (1960) constateerden dat *E. coli* B/r stammen, geïsoleerd in verschillende laboratoria, verschillende eigenschappen bezaten. Op grond hiervan stelden zij voor de notatie *E. coli* B/r uitsluitend te gebruiken voor een oorspronkelijk door Witkin geïsoleerde mutant. Een ander argument om nieuwe symbolen te introduceren is het feit dat de stralingsgevoelige mutant B_{III} waarschijnlijk in ten minste één opzicht afwijkt van de stam *E. coli* B_S van Hill. Laatstgenoemde stam vormt namelijk in tegenstelling tot de stam B_{III} na UV bestraling géén filamenten (Hill en Simson, 1961).

De eigenschappen die de stralingsgevoeligheid in de stammen beïnvloeden worden aangegeven door de symbolen syn en fil.

Het wilde type, dat is de stam B_I, vormt na bestraling met 200 erg/mm² UV filamenten, terwijl groei noch eiwitsynthese sterk beïnvloed worden. Daarom wordt deze stam aangeduid als B_Isyn⁺fil⁺. De resistente stam B_{II} vormt na bestraling géén filamenten. Deze stam wordt dus aangeduid als B_{II}syn⁺fil⁻. De gevoelige stam B_{III} vormt na bestraling wel filamenten en bovendien worden groei en eiwitsynthese sterk geremd. De symbolen voor deze stam moeten dus zijn B_{III}syn⁻fil⁺.

4. De stam B_{IV}syn⁻fil⁻.

Uit de waarneming dat de mutaties syn⁻ en fil⁻ op verschillende manieren tot fenotypische expressie komen, kunnen we de gevolgtrekking maken dat deze in verschillende en onafhankelijke loci plaatsvinden. In de loop van het onderzoek werd uit de mutant B_{III}syn⁻fil⁺ een nieuwe (spontane) mutant (de stam B_{IV}) geïsoleerd, waarin beide mutaties syn⁻ en fil⁻ naast elkaar voorkomen. Het bestaan van deze mutant is een steun voor de veronderstelling dat syn⁻ en fil⁻ onafhankelijke mutaties zijn. De mutant B_{IV}syn⁻fil⁻ vertoont evenals de stam B_{III}syn⁺fil⁻ géén filamentvorming na UV bestraling, maar de groei wordt na bestraling even sterk geremd als bij stam B_{III}syn⁻fil⁺. In het volgende hoofdstuk (fig. 13 en 15) zal op de consequentie van het voorkomen van beide mutaties syn⁻ en fil⁻ in één stam voor de stralingsgevoeligheid uitvoerig worden ingegaan.

De mutatie van de B_{II} stam van fil⁺ → fil⁻ behoeft niet noodzakelijk in hetzelfde locus te hebben plaats gehad als de gelijknamige mutatie in de B_{IV} stam. Daarom worden beide mutaties waar zulks nodig is van elkaar onderscheiden door de aanduiding fil₁⁻ en fil₂⁻.

De eigenschappen van de mutanten worden in Tabel VI nogmaals kort geresumeerd.

TABEL VI

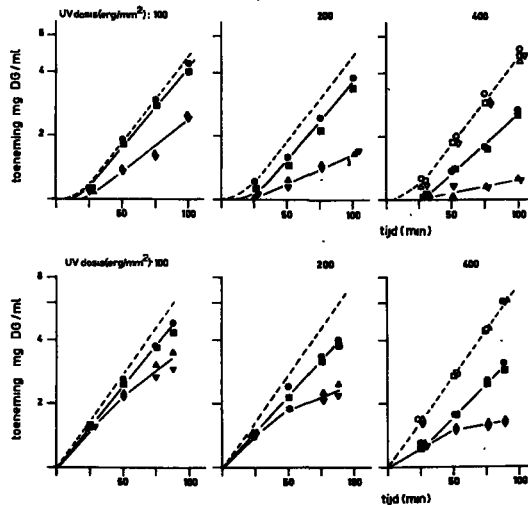
Aanduiding en eigenschappen van stralingsresistente en stralingsgevoelige mutanten van E. coli B.

Stam	Vertoont fenotypisch overeenkomst met	Gedrag na UV bestraling met 200 erg/mm ² UV	
		Filamentvorming	groei-remming
B _I syn ⁺ fil ⁺	E. coli B	+	-
B _{II} syn ⁺ fil ₁ ⁻	E. coli B/r	-	-
B _{III} syn ₁ ⁻ fil ⁺	?	+	+
B _{IV} syn ₁ ⁻ fil ₂ ⁻	E. coli B _s	-	+

5. Het naast elkaar aantonen van syn en fil mutaties.

In figuur 10 wordt het effect van UV bestraling op de groei van de stammen weergegeven. Culturen van de vier stammen (0,1 mg DG/ml) in de stationaire en de logaritmische groeifase werden aan bestraling met res-

pectievelijk 100, 200 en 400 erg/mm² UV onderworpen. Bestraalde en onbestraalde suspensies werden 1 op 4 in vers M₉ medium met 0,1% CAS en 0,1% glucose verdund en de toeneming van het drooggewicht werd gedurende de eerste 100 minuten na bestraling gevolgd. Steeds bleek de groei van de



Figuur 10.

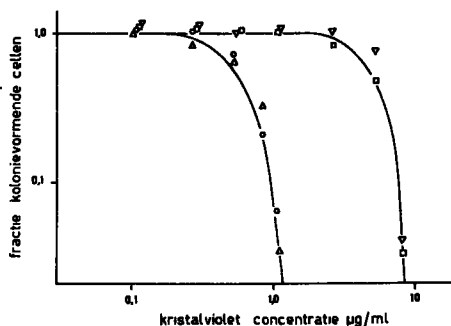
Het effect van UV bestraling op de groei van *E. coli* B. ● stam B_Isyn⁺fil⁺, ■ stam B_{II}syn⁺fil⁻, ▲ stam B_{III}syn⁻fil⁺, ▼ stam B_{IV}syn⁻fil⁻.

Open figuren (en stippellijnen): groei van onbestraalde culturen. Gesloten figuren: groei van met resp. 100, 200 en 400 erg/mm² UV bestraalde culturen. Bovenste reeks figuren: voor culturen, 18 uur in de stationaire fase, onderste reeks figuren: voor culturen in de logaritmische groeifase.

syn⁻ stammen B_{III} en B_{IV} sterker geremd dan van de syn⁺ stammen B_I en B_{II}. De snelheid waarmede zich na UV bestraling het celmateriaal vermeerderd, is dus onafhankelijk van het feit of een stam van het fil⁺ dan wel van het fil⁻ type is. Werden de culturen in het voorgaande experiment 100 minuten na bestraling microscopisch onderzocht dan bleken deze in twee andere groepen uiteen te vallen: in culturen van de B_I en B_{II} stam werden filamenten, in culturen van de B_{II} en B_{IV} stam werden slechts cellen van normale lengte aangetroffen. De B_{III} stam vormde echter ogenschijnlijk minder langgerechte cellen dan de B_I stam. Dit is begrijpelijk: door UV bestraling wordt in de B_{III} stam de groei eveneens sterk geremd. Indien in de twee stammen B_{III} en B_I de deling even sterk geremd wordt, dan kunnen in dezelfde tijd na bestraling cellen van de B_I stam tot langere filamenten uitgroeien dan cellen van de B_{III} stam. De mate waarin bij een

stam na UV bestraling filamentvorming optreedt is dus niet onafhankelijk van het feit of deze van het syn^+ dan wel van het syn^- type is. Het naast elkaar aantonen van syn^- en fil^- mutaties aan de hand van hun fenotypische expressie wordt hierdoor bemoeilijkt. Omdat vooral deze fenotypische expressie bij ons onderzoek van belang is, werd naar een mogelijkheid gezocht om genoemde moeilijkheid te ondervangen.

Het bleek dat de stof kristalviolet evenals UV bestraling een filament-inducerende werking bezit. Werde aan M9 medium 1 tot 2 $\mu\text{g/ml}$ kristalviolet toegevoegd, dan werd daarin de deling van de stammen B_I en B_{III} sterk doch die van de stammen B_{II} en B_{IV} in het geheel niet geremd. Bovendien bleek de toevoeging van kristalviolet noch in syn^+ noch in syn^- stammen een remmende werking op de groei uit te oefenen. Op deze wijze is dus het voorkomen van de fil^- mutatie ook in aanwezigheid van de syn^- mutatie ondubbelzinnig vast te stellen.



Figuur 11.

Het effect van kristalviolet op *E. coli* B.

○ stam B_I syn^+fil^+ , □ stam B_{II} syn^+fil^- , Δ stam B_{III} syn^-fil^+ , ▽ stam B_{IV} syn^-fil^- .

De filament-inductie door kristalviolet gaat gepaard met een reductie van het aantal kolonievormende cellen. Aan de hand hiervan is de gevoeligheid van een stam voor kristalviolet kwantitatief te bepalen. Dit blijkt uit het door Fig. 11 geïllustreerde experiment. In logaritmisch groeiende culturen van de vier stammen werd de fractie kolonievormende cellen bepaald op M9 agarplaten (met 0,1% CAS en 1% glucose), waaraan kristalviolet in verschillende concentraties was toegevoegd. Uit de vergelijking van de vier stammen bleek dat de fractie kolonievormende cellen op voedingsbodems met kristalviolet onafhankelijk van het voorkomen van een syn^- mutatie is.

In de loop van het onderzoek werden tal van andere fil^- mutanten geïsoleerd. Deze bleken alle dezelfde verhoogde resistentie tegen kristalviolet

te vertonen. Van deze stof kan dus een nuttig gebruik gemaakt worden om fil^+ van fil^- mutanten te onderscheiden ¹⁾.

Ook een aantal andere stoffen bleek in een bepaalde concentratie de deling van fil^+ stammen wel en van fil^- stammen niet te remmen. Dit wordt in Hoofdstuk III nader toegelicht.

6. Samenvatting en conclusies.

In de stralingsresistente stam $\text{B}_{11}\text{syn}^+\text{fil}^-$ wordt de deling door bestraling met ultraviolet licht of door behandeling met kristalviolet minder sterk geremd dan in het wilde type ($\text{B}_1\text{syn}^+\text{fil}^+$). In de stralingsgevoelige stam $\text{B}_{111}\text{syn}^-\text{fil}^+$ wordt de groei na bestraling sterker geremd dan in het wilde type. Hier is steeds sprake van, op één mutatie na, isogene stammen. De onmiddellijk na bestraling waargenomen verschijnselen moeten dus gecorreleerd zijn met de oorzaken van de verschillen in stralingsgevoeligheid van de stammen.

De studie van deze direct na bestraling waar te nemen verschijnselen biedt nieuwe mogelijkheden om tenminste twee van de factoren die de stralingsgevoeligheid van *E. coli* B beïnvloeden, te onderzoeken en voor biochemisch onderzoek te ontsluiten.

Uit een vergelijking van vier stammen, waarin de mutaties syn^- en fil^- in verschillende combinaties voorkomen, blijkt dat deze mutaties van verschillende aard zijn en onafhankelijk van elkaar tot fenotypische expressie komen.

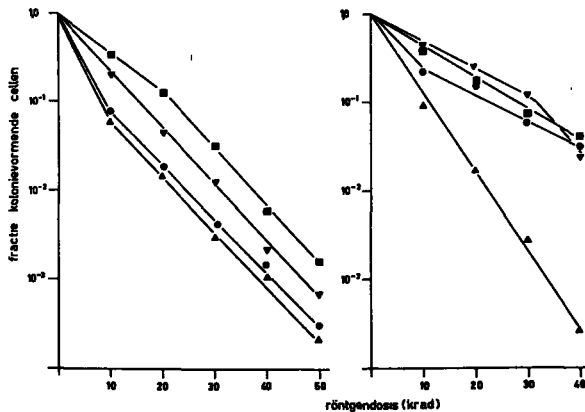
-
- 1) Bij het gebruik van kristalviolet rezen in de loop van het onderzoek moeilijkheden toen de gevoeligheid van de B_1 stam plotseling van 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tot 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kristalviolet daalde. Deze stijging viel samen met het in gebruik nemen van een nieuwe voorraad kristalviolet (Gurr, Michrome brand). Aanvankelijk werd hierin de oorzaak gezocht maar deze bleek toch van geheel andere aard te zijn. De aanvankelijk gebruikte oplossing van kristalviolet was een alcoholische oplossing die voor gebruik met gedestilleerd water verdund werd. De naderhand bereide oplossing was direct met gedestilleerd water aangemaakt. Deze oplossing bleek bij nader onderzoek geen echte oplossing maar een colloïdale suspensie te zijn. Werd een colloïdale suspensie van 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tot 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdund, dan steeg de extinctie bij 590 m μ van de verdunning in 40 minuten tot de viervoudige waarde. Werd de geconcentreerde suspensie echter in 1% agar verdund, dan werd geen extinctiestijging waargenomen. In dit milieu is dus de effectieve kristalvioletconcentratie te laag. Door kristalviolet eerst in 100% alcohol op te lossen en vervolgens voor gebruik met water te verdunnen, wordt de vorming van een colloïdale suspensie voorkomen.

HOOFDSTUK III

HET EFFECT VAN RÖNTGENSTRALING, ULTRAVIOLET LICHT EN DESINTEGRATIE VAN GEÏNCORPOREERD ^{32}P OP SYN^- EN FIL^- MUTANTEN VAN *E. COLI* B.

1. Inleiding.

De fil^- en syn^- mutanten van *E. coli* B vertonen een zelfde verschil met het wilde type in gevoeligheid voor ultraviolet licht als de reeds bekende mutanten *E. coli* B/r en *E. coli* B_g. Volgens Witkin (1947) en Hill (1961) verschillen laatstgenoemde mutanten ook van het wilde type in gevoeligheid voor röntgenstraling en voor desintegratie van geïncorporeerd radioactief fosfor (^{32}P suicide). Daarom werd nagegaan of de hier beschreven mutaties ook in dit opzicht met die van *E. coli* B/r en *E. coli* B_g overeenkomen. Bovendien werd in dit onderzoek de stam B_{IV}, die zowel de "resistente" als de "gevoelige" eigenschap bezit (fil^- , syn^-), betrokken om de consequenties van het voorkomen van beide typen mutaties in één stam na te gaan. Bovendien werd nog het effect bestudeerd van een aantal stoffen die overeenkomstige verschijnselen als kristalviolet in bacteriën teweegbrengen, zoals b.v. penicilline en novobiocine, die eveneens de celdeling sterk remmen.



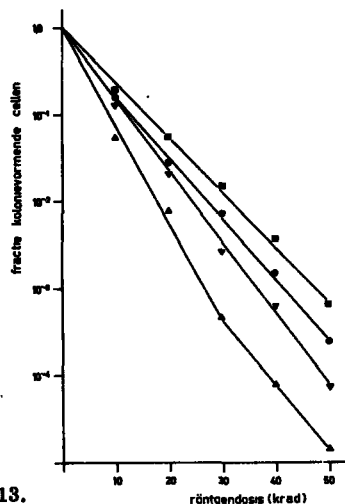
Figuur 12.

Het effect van röntgenstraling op *E. coli* B. Culturen gekweekt in peptonbouillon, kolonievormende cellen bepaald op peptonagar-platen. Links logaritmisch groeiende cultuur. Rechts cultuur in de stationaire fase.

● stam $\text{B}_{\text{fil}^+ \text{syn}^+}$, ■ stam $\text{B}_{\text{III} \text{syn}^+ \text{fil}^-}$,
▲ stam $\text{B}_{\text{II} \text{Isyn}^- \text{fil}^+}$, ▼ stam $\text{B}_{\text{IV} \text{syn}^- \text{fil}^-}$.

2. Het effect van röntgenstraling.

Het effect van röntgenstraling op in peptonbouillon gekweekte culturen van de vier stammen blijkt uit Fig. 12, op in M₉ medium gekweekte culturen uit Fig. 13. Het verschil in gevoeligheid voor röntgenstraling tussen B_I, B_{II} en B_{III} blijkt aanmerkelijk geringer te zijn dan door Witkin en Hill voor E.coli B, E.coli B/r en E.coli B_s beschreven is.



Figuur 13.

Het effect van röntgenstraling op E.coli B, gekweekt in M₉ medium en bestraald in de stationaire fase.

● stam B_Ifil⁺syn⁺, ■ stam B_{II}syn⁺fil⁻,
▲ stam B_{III}syn⁻fil⁺, ▼ stam B_{IV}syn⁻fil⁻.

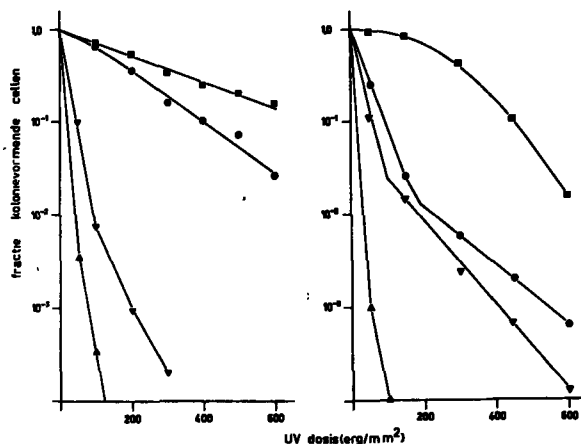
Wat betreft het voorkomen van beide mutaties syn⁻ en fil⁻ in één stam en de consequentie daarvan voor de stralingsgevoeligheid, blijkt dat een peptonbouillon cultuur van B_{IV}syn⁻fil⁻ een grotere resistentie tegen röntgenstraling vertoont dan een peptonbouilloncultuur van de B_I stam. In de stationaire fase heeft stam B_{IV} zelfs een grotere resistentie dan de stam B_{II}syn⁺fil⁻. In dit verband wordt erop gewezen dat fil⁻ in B_{II} en fil⁻ in B_{IV} onafhankelijke mutaties zijn die respectievelijk in een B_I en in een B_{III} cultuur hebben plaats gehad. Dat een stam, die behalve een "resistente" (fil⁻) ook een "gevoelige" (syn⁻) mutatie draagt, onder bepaalde omstandigheden toch een grotere resistentie vertoont dan een stam die uitsluitend een "resistente" (fil⁻) mutatie heeft, is b.v. begrijpelijk, indien men aanneemt dat de fil⁻ mutatie van de eerste stam "effectiever" is dan die van de tweede stam. Indien de stammen op synthetisch medium gekweekt zijn, dan blijkt de B_{IV} stam toch weer gevoeliger dan de B_{II} stam en zelfs gevoeliger dan het wilde type (B_I) te zijn. Ook dit is voorstelbaar als men aanneemt dat in synthetisch medium de constitutie van de cellen in zoverre verschilt van die in peptonbouillon, dat in synthetisch medium de syn⁻ eigenschap de stralingsgevoeligheid in sterkere mate verhoogt. Tal van onderzoekers hebben reeds vastgesteld dat de stralingsgevoeligheid van bacteriën sterk afhangt van de samenstelling van het medium. Indien het complex van

factoren dat de stralingsgevoeligheid van een bacterie bepaalt, samengesteld is uit een aantal componenten (zoals hier b.v. in *syn* en *fil*) dan is het heel goed denkbaar dat invloeden die de stralingsgevoeligheid als geheel bezien veranderen, niet op alle componenten daarvan een even groot effect hebben.

Wij mogen echter uit de waarnemingen die door Fig. 12 en 13 worden weergegeven niet afleiden dat de *fil*₂ mutatie inderdaad tot een hogere resistentie aanleiding geeft dan de *fil*₁ mutatie. Er is voor bovengenoemde verschijnselen nog een andere verklaring te geven. Hoewel wij door een bepaalde keuze van de omstandigheden de mutaties *syn*⁻ en *fil*⁻ onafhankelijk van elkaar tot fenotypische expressie kunnen brengen (zie Hoofdstuk II) is het toch heel goed mogelijk dat beide mutaties, voor zover dit het letale effect van röntgenstraling betreft, elkaar beïnvloeden. Indien in een *syn*⁻*fil*⁻ mutant de groei door röntgenstraling sterker geremd wordt dan in een *syn*⁺*fil*⁻ mutant, dan zou het bezit van de *syn*⁻ eigenschap onder bepaalde omstandigheden misschien juist een extra bescherming kunnen geven, daar beschadigd celmateriaal langer aan de invloed van een herstelproces onderhevig zou zijn, omdat de cel door de vertraagde groei op een later tijdstip in deling zal gaan.

3. Het effect van ultraviolet licht.

Het effect van ultraviolet licht op in peptonbouillon gekweekte culturen van de vier stammen blijkt uit Fig. 14, het effect op in M₉ medium gekweekte stammen uit Fig. 15. De invloed van de groeifase op de stra-

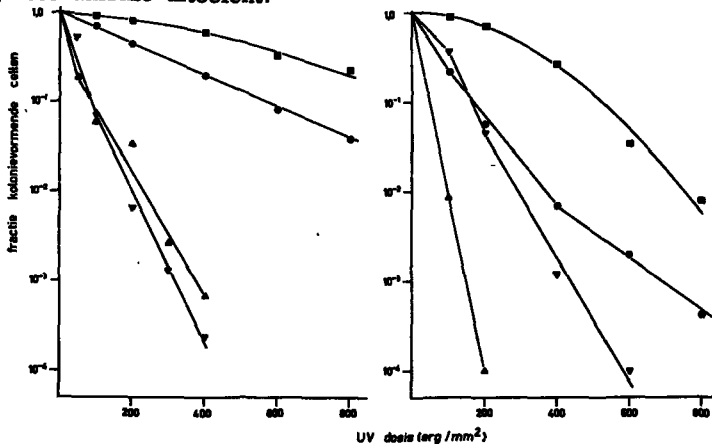


Figuur 14.

Het effect van UV op *E. coli* B. (culturen gekweekt in peptonbouillon, bestraald in M₉ medium, kolonievormende cellen bepaald op peptonagar-platen). Links: cultuur in de stationaire fase, rechts: cultuur in de logaritmische groeifase.

● stam B_{fil}⁺*syn*⁺, ■ stam B_{fil}⁺*syn*⁺*fil*⁻,
▲ stam B_{fil}⁺*syn*⁻*fil*⁺, ▼ stam B_{fil}⁺*syn*⁻*fil*⁻.

lingsgevoeligheid van de bacteriën wordt hier weer duidelijk gedemonstreerd. Zo is het verschil in gevoeligheid tussen fil^+ en fil^- stammen in delende culturen veel groter dan in rustende culturen. Dit ligt in de lijn der verwachting omdat de fil eigenschap een specifieke invloed op het delingsmechanisme uitoefent.



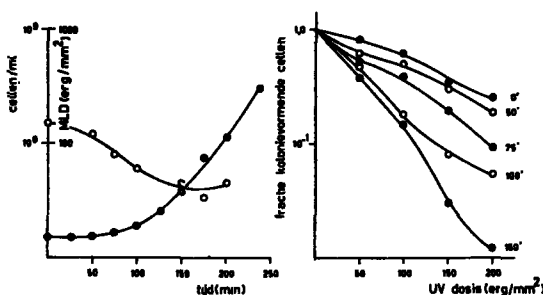
Figuur 15.

Het effect van UV op *E. coli* B. (culturen gekweekt in M_9 medium, kolonievormende cellen bepaald op platen met M_9 -agar en 0,2% CAS). Links: culturen in de stationaire fase, Rechts: culturen in de logaritmische groeifase.

● stam $B_{fil^+syn^+}$, ■ stam $B_{fil^-syn^+}$,
▲ stam $B_{fil^+syn^-}$, ▼ stam $B_{fil^-syn^-}$.

De verandering van de stralingsgevoeligheid werd van de stam B_I nauwkeurig bepaald na overenten van een stationaire cultuur in M_9 medium, in vers medium met 0,02% CAS en 0,1% glucose. Zowel de vermeerdering van de bacteriemassa als van het aantal cellen werd gemeten, terwijl op verschillende tijden het effect van UV bestraling op het vermogen van de cellen om een kolonie te vormen, werd bepaald (Fig. 16). Tijdens dit experiment bleek de stralingsgevoeligheid continu toe te nemen. We kunnen dit echter niet aan één bepaalde oorzaak toeschrijven. Na overenten op vers medium neemt niet alleen de delingssnelheid maar ook de metabolische activiteit van de cellen sterk toe. Bovendien verandert de celgrootte en daarmee het nucleïnezuurgehalte; volgens de treffertheorie zal ook dit consequenties voor de stralingsgevoeligheid met zich meebrengen. Aan de hand van de volgende experimenten werd getracht de invloeden die deze factoren uitoefenen, te analyseren.

In het door Fig. 16 geïllustreerde experiment daalde de MLD van 150 erg/mm^2 in de stationaire fase tot ca. 45 erg/mm^2 in de logaritmische groeifase. Werde de stam B_I uit een M_9 cultuur in de stationaire fase overgeënt in vers M_9 medium zonder caseïnehydrolysaat, dan werd een overeenkomstige verandering van de stralingsgevoeligheid waargenomen. De MLD daalde echter in dit medium in de logaritmische groeifase slechts tot een minimumwaarde van ca. 85 erg/mm^2 . Uit een vergelijking van de stra-



Figuur 16.

De gevoeligheid van *E. coli* B_I voor UV bestraling na overenten van een cultuur in de stationaire fase (M₉ met 0,025% glucose) op vers M₉ medium (met 0,1% glucose en 0,02% CAS).

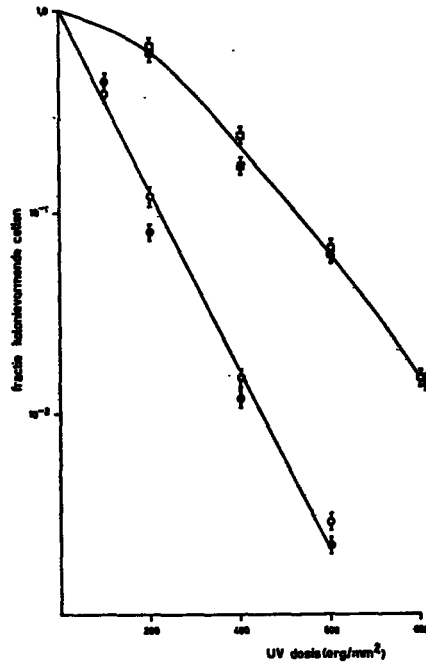
Linker figuur: groeicurve, ● toeneming aantal cellen/ml, ○ MLD (erg/mm²).

Rechter figuur: overlevingscurven, resp. 0, 50, 75, 100 en 150 minuten na overenten.

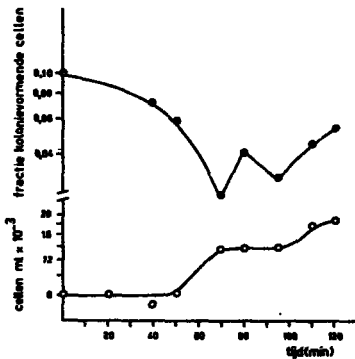
lingsgevoeligheid van een cultuur in M₉ medium met en zonder caseïne-hydrolysaat kunnen we echter niet het effect van bovengenoemde factoren afzonderlijk afleiden. In M₉ medium zonder caseïnehydrolysaat is immers zowel de delingssnelheid als de groeisnelheid kleiner dan in M₉ medium met caseïnehydrolysaat; bovendien is de verandering van de gemiddelde celgrootte eveneens geringer (Fig. 6).

Dat echter geen verband gelegd kan worden tussen de vorm of de helling van de overlevingscurve en de gemiddelde grootte van de cellen in een cultuur, blijkt uit het volgende experiment. Logaritmisch groeiende culturen van de B_I en B_{II} stam werden 300 minuten na overenten in vers M₉ medium door een "millipore" membraanfilter met poriediameter 1,2 μ, gefiltreerd. Door het membraan kunnen alleen de kleine cellen uit de cultuur passeren. Het filtraat bevatte ca. 0,01% van het aantal vóór filtratie aanwezige cellen. Zowel het filtraat als de niet gefiltreerde cultuur werden aan UV bestraling onderworpen en de fractie kolonievormende cellen bepaald. De aldus verkregen overlevingscurven worden in Fig. 17 weergegeven. Het blijkt dat de stralingsgevoeligheid van de gefiltreerde culturen van dezelfde orde van grootte is als die van de ongefiltreerde.

Anderson en Pettijohn (1960) constateerden dat in een, door een dergelijk membraanfilter gefiltreerde cultuur, de cellen bij verder incuberen synchroniseren. Helaas kon met de hier gebruikte *E. coli* B stam, ondanks een dertigtal pogingen, niet zulk een perfecte synchronisatie bewerkstelligd worden als door deze onderzoekers beschreven werd. Toch werd in het door Fig. 18 weergegeven experiment een voldoende hoge synchronisatiegraad bereikt om een indruk te kunnen krijgen van de verandering van de stralingsgevoeligheid van de B_I stam ten gevolge van het in deling gaan van de cellen. Tijdens de incubatie na filtratie werd het aantal aanwezige cellen



Figuur 17.
Het effect van filtratie door een milliporefilter (poriediameter 1,2 μ) op de stralingsgevoeligheid van E.coli B culturen. Open figuren: overlevingscurven voor ongefiltreerde, logaritmisch groeiende culturen; gesloten figuren: overlevingscurven na filtratie. O Stam B_Isyn⁺fil⁺, □ stam B_{II} syn⁺fil⁻.



Figuur 18.
De deling en de stralingsgevoeligheid van E.coli B_I na filtratie door een membraanfilter (poriediameter 1,2 μ).
O aantal kolonievormende cellen/ml,
● fractie kolonievormende cellen na bestraling met 200 erg/mm² UV.

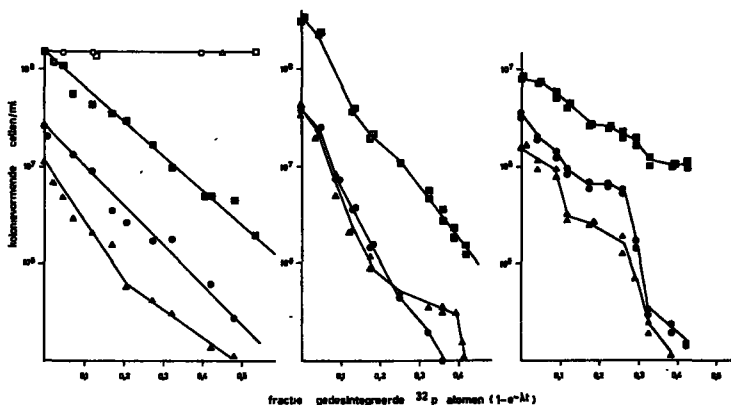
en de fractie kolonievormende cellen na bestraling met 200 erg/mm^2 UV bepaald. Reeds was gebleken dat de stralingsgevoeligheid van een cultuur vlak na filtratie gelijk is aan die van een cultuur vóór filtratie (Fig. 17). Bij incuberen van de door filtratie afgezonderde, aanvankelijk niet delende cellen, neemt de stralingsgevoeligheid daarvan toe als de cellen in deling gaan. Hieruit volgt dat delende cellen ongetwijfeld gevoeliger zijn dan niet delende cellen, maar dat de stralingsgevoeligheid in een ongefilterde cultuur, waarin cellen in verschillende delingsstadia voorkomen, toch bepaald wordt door de gevoeligheid van de cellen die niet in deling zijn. Het aantal cellen dat in een groeiende cultuur in een voor bestraling gevoelig delingsstadium verkeert is dus klein; anders uitgedrukt: de fase van de delingscyclus die als gevoelig moet worden aangemerkt is klein ten opzichte van de gehele cyclus.

4. Het effect van de desintegratie van geïncorporeerd ^{32}P .

Nadat Hershey en medewerkers (1951) het letale effect van de desintegratie van in het DNA geïncorporeerd ^{32}P bij bacteriophagen hadden aangetoond, werd dit effect voor het eerst voor bacteriën door Fuerst en Stent (1956) bij *E. coli* B/r beschreven. ^{32}P gaat onder het uitzenden van een β deeltje met een gemiddelde energie van $0,7 \text{ MeV}$ over in ^{32}S . Uit een berekening van de door het β deeltje in de onmiddellijke nabijheid van het DNA molecuul gedissipeerde energie volgde, dat de inactiverende werking van de desintegratie bij bacteriophagen niet kan worden toegeschreven aan de β straling en de daarmee gepaard gaande ionisaties. Het effect moet dus veroorzaakt worden door de overgang van een fosforatoom in een zwavelatoom. Niet iedere conversie van de geïncorporeerde ^{32}P atomen is evenwel letaal. In bacteriophagen leidt ca. 1 op de 10, in bacteriën 1 op de 50 conversies in het DNA tot inactivering van het organisme. Volgens een theorie van Stent zijn uitsluitend die fosfor-zwavel overgangen letaal waarbij de "terugstoot" van het zwavelatoom door het uitgezonden β deeltje zodanig gericht is dat in beide ketens van het DNA molecuul een breuk teweeggebracht wordt. Dat een bacterie niet door andere, buiten het DNA optredende conversies geïnactiveerd wordt, bleek uit een experiment waarbij de ^{32}P incorporatie in een thymine behoeftige stam (*E. coli* 15T-) had plaats gehad, zonder dat thymine in het medium aanwezig was. Onder deze omstandigheden wordt het merendeel der ^{32}P in het RNA opgenomen. In deze cultuur nam het aantal kolonievormende cellen als functie van het aantal gedisintegreerde atomen veel minder sterk af dan in een homogeen met ^{32}P gemerkte cultuur. Bij de inactivering door middel van geïncorporeerd ^{32}P is de plaats in de cel waar primair een beschadiging wordt aangebracht dus met grotere nauwkeurigheid bekend dan bij de inactivering ten gevolge van bestraling. Om deze reden werd het onderzoek naar het effect van de desintegratie van geïncorporeerd ^{32}P op de stralingsgevoelige en stralingsresistente stammen van *E. coli* B ter hand genomen.

De hierbij gevolgde procedure komt in grote trekken overeen met de door Fuerst en Stent (1956) beschreven methode. Bacterieculturen werden in TRIS medium met 1 tot $5 \mu\text{g P/ml}$ als anorganisch fosfaat gekweekt. In sommige gevallen werd om de groeisnelheid te verhogen, tot $0,2\%$ gedefosforyleerd caseïnehydrolysaat (CAS-P) toegevoegd. Met dragervrij $^{32}\text{P}_4$

("PBS 1 solution", Radiochemical Centre, Amersham) werd de specifieke activiteit van het medium op 15 tot 25 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$ P gebracht. Na een ongeveer honderdvoudige vermeerdering van het bacteriemateriaal hierin werden de culturen 1 op 10 verdund in zogenaamd invriesmedium¹⁾ en gedurende ca. 14 dagen bij -78°C in vast koolzuur/ethanol bewaard. Dagelijks werden één of meer monsters ontdooid, waarin het aantal kolonievormende cellen na verdunning werd bepaald door uitzaaien op M_9 agarplaten waaraan 0,2% caseïnehydrolysaat was toegevoegd. De resultaten werden grafisch verwerkt door het aantal kolonievormende cellen uit te zetten tegen de fractie gedestintegreerde ^{32}P atomen ($N/N_0 = 1 - e^{-\lambda t}$). De resultaten van drie experimenten met de stammen B_I , B_{II} en B_{III} worden in Fig. 19 weergegeven. Nu blijkt allereerst dat er reeds bij het begin van de experimenten grote verschillen in het aantal kolonievormende cellen per ml tussen de B_{II} enerzijds en de B_I en B_{III} stam anderzijds voorkomen. In het experiment, weergegeven in de meest linkse grafiek van Fig. 19, hadden de culturen van de drie stammen op het moment van invriezen toch alle dezelfde optische dichtheid bereikt en was in alle culturen dezelfde hoeveelheid radioactiviteit in de DNA en RNA fractie geïncorporeerd (zie Tabel VII). Bij microscopisch



Figuur 19.

Het effect van de desintegratie van geïncorporeerd ^{32}P op *E. coli* B in ingevroren suspensies (-80°C).

● stam B_I syn⁺fil⁺, ■ stam B_{II} syn⁺fil⁻, ▲ stam B_{III} syn⁻fil⁺. Open figuren: controles, ^{32}P toegevoegd vlak voor invriezen. Linker en middelste figuur: culturen 6 uur geïncubeerd in TRIS medium met 0,2% CAS P⁻, 2,5 μg P/ml, 25 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$ P en daarna ingevroren. Rechter figuur: culturen 9 uur geïncubeerd in TRIS medium met 1 μg P/ml, 15 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$ P en daarna ingevroren.

1) De samenstelling van het invriesmedium is (per liter):

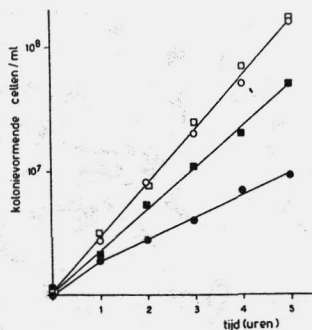
7 g K_2HPO_4 , 0,5 g Nacitraat, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ aq.}$, 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2 g KH_2PO_4 , 30 g glycerol en 100 g runderserumalbumine.

Tabel VII
HET EFFECT VAN ^{32}P OP DE GROEI EN DE NUCLEÏNEZYNSYNTHESE
De culturen werden gedurende 5 uur geducebeerd in TRIS medium met 0,2% gedefosforyleerd caseïnehydrolysaat, 5 $\mu\text{g P/ml}$, O, 1% glucose.

Stam	^{32}P	Inoculum cellen/ml	Na 5 uur groei cellen/ml	Radioactiviteit RNA fractie tikken/sec/ml cultuur x 10^{-4}	Radioactiviteit DNA fractie tikken/sec/ml cultuur x 10^{-4}	O. D. 700 m μ
B ₁ syn ⁺ tl ⁺	-	7,5 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁸	-	-	0,143
B ₁ syn ⁺ tl ⁺	25 $\mu\text{g}/\mu\text{g P}$	7,5 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁷	14,6	5,7	0,153
B ₁ syn ⁺ tl ⁻	-	8,1 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁸	-	-	0,151
B ₁ syn ⁺ tl ⁻	25 $\mu\text{g}/\mu\text{g P}$	8,1 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁸	14,0	5,0	0,139
B ₁ syn ⁻ tl ⁺	-	7,1 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁸	-	-	0,167
B ₁ syn ⁻ tl ⁺	25 $\mu\text{g}/\mu\text{g P}$	7,1 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁷	15,0	5,2	0,179

onderzoek bleek de cultuur van de B_{II} stam uit normale cellen, maar de cultuur van de B_I stam en de cultuur van de B_{III} stam uit extreem lange filamenten te bestaan (zie PLAAT I, en Rörsch en v.d. Kamp 1961). Zonder dat dus een remming van de nucleïnezuursynthese of van de groei geconstateerd werd, vond een sterke remming van de deling in de fil⁺ stammen plaats, hetgeen verklaart waarom de B_I en B_{III} cultuur veel minder kolonievormende cellen bevatten dan de B_{II} cultuur. Dit verschil tussen de stammen komt dus reeds tot uitdrukking tijdens de incubatie in radioactief medium.

De filamentvorming hangt niet samen met de absolute activiteit van het medium maar met de specifieke activiteit daarvan. In culturen in M₉ medium, dat 2,5 mg P/ml bevatte, werd met 300 µc/ml nog geen remming van de deling geconstateerd. In het door Fig. 20 weergegeven experiment blijkt de remming van de deling evenredig met de specifieke activiteit. Hieruit volgt dat de door radioactief fosfor geïnduceerde filamentvorming waarschijnlijk geen stralingseffect is. Overigens is de stralingsenergie die door zelfabsorptie in het medium wordt opgenomen in een medium met 54 µc/ml ³²P (Fig. 20) van de orde van grootte van 100 rad/uur ¹). Het optreden van filamentvorming onder invloed van ioniserende straling is beschreven voor doses in de grootte-orde van enige duizenden röntgen (Spoerl c.s., 1954) zodat hier de remming van de deling niet aan de β straling kan worden toegeschreven. Dit werd nog geverifieerd door de delingssnel-

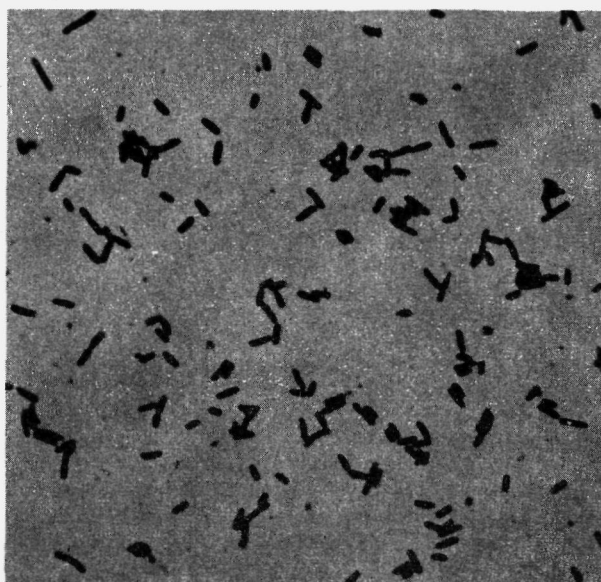


Figuur 20.

Het effect van de specifieke activiteit van het medium (³²P) op het aantal kolonievormende cellen in een logaritmisches groeiende cultuur van E. coli B_I.

- 2,1 µg P/ml zonder ³²P.
- 4,0 µg P/ml zonder ³²P.
- 2,1 µg P/ml met 54 µc/ml (25,7 µc/µg P)
- 4,0 µg P/ml met 54 µc/ml (13,5 µc/µg P)

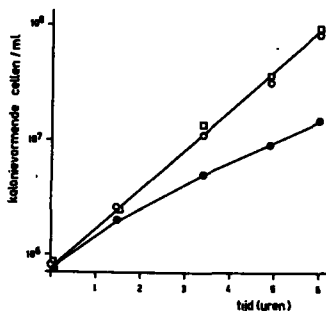
1) 1 MeV = $1,6 \times 10^{-6}$ erg; 1 rad = 100 erg/g; $1 \mu\text{c} = 3,7 \times 10^4$ desintegraties/sec; $1 \mu\text{c} = \frac{3,7 \times 10^4 \times 0,7 \times 1,6 \times 10^{-6}}{100} = 4,0 \times 10^{-4}$ rad/sec = 1,4 rad/uur.



Plaat I.

E.coli B1syn⁺fil⁺ cellen in de stationaire fase, gekweekt in TRIS-5P medium met 0,025% glucose. Boven, na 5 uur groei in een medium met 25μc ³²P/μg P; onder, zonder ³²P.

heid van de B_I stam in een medium met 41 µc/ml ³²P (18 µc/µg P) te vergelijken met een cultuur die 450 µc/ml ³⁵SO₄ bevatte. In beide culturen werden per tijdseenheid vergelijkbare hoeveelheden stralingsenergie opgenomen (gemiddelde energie van de β straling van ³²P is 0,7 MeV, van ³⁵S 0,056 MeV). Zoals uit Fig. 21 blijkt werd de deling in de ³²P houdende cultuur wel, in de ³⁵S houdende cultuur niet geremd. De filamentvorming wordt dus veroorzaakt door de desintegratie van geïncorporeerd ³²P.

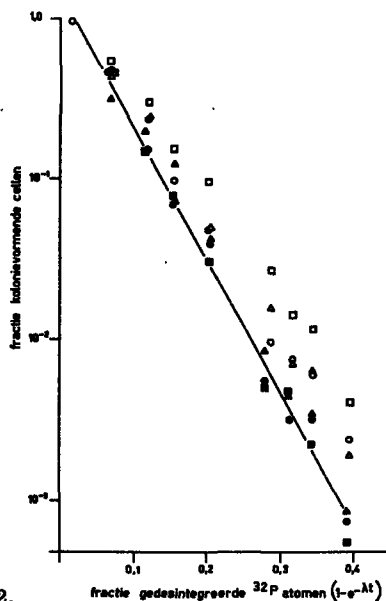


Figuur 21.
Het effect van ³²P en ³⁵S op het aantal kolonievormende cellen in logaritmisches groeiende culturen van E. coli B_I. (TRIS medium met 2,5 µg/ml P).

- noch ³²P noch ³⁵S toegevoegd,
- met 450 µc/ml ³⁵SO₄"
- met 41 µc/ml ³²PO₄^{'''} (16,4 µc/µg P).

In het door Fig. 20 weergegeven experiment werd de cultuur met 25 µc/µg P en de niet radioactieve controle na 5 uur incubatie overgeënt in vers medium met 100 µg P/ml zonder ³²P. De toeneming van het aantal kolonievormende cellen werd in beide culturen gedurende 4 uur gevolgd waarbij bleek dat het percentage kolonievormende cellen in de oorspronkelijke radioactieve cultuur ten opzichte van de niet radioactieve cultuur van 6% tot 28% steeg. Hieruit volgt dat tenminste een gedeelte van de door ³²P geïnduceerde filamenten, bij overenten in niet radioactief medium, tot kolonievormende cellen kan regenereren.

Vanwege de filamentvorming wordt de waarde van de door fig. 19 weergegeven overlevingscurven voor ingevroren suspensies twijfelachtig. Een vergelijking van de drie stammen heeft onder deze omstandigheden weinig zin omdat de culturen sterke morfologische verschillen vertonen. Deze moeilijkheid kon ondervangen worden door culturen van de drie stammen vóór invriezen aan filtratie door een "millipore" membraan met poriediameter 1,2 µ te onderwerpen. Hierdoor kunnen uitsluitend de kleine cellen en zeker niet in de cultuur voorkomende filamenten passeren. Zowel voor als na filtratie werden monsters van de suspensies van de drie stammen ingevroren, waarin de afneming van het aantal kolonievormende cellen met de fractie gedesintegreerde ³²P atomen werd bepaald (Fig. 22). De gevoeligheid van de kleine cellen van de drie stammen voor de desintegratie van geïncorporeerd ³²P blijkt niet uiteen te lopen.



Figuur 22.

Het effect van filtratie door een milliporefilter (poriediameter $1,2 \mu$) op de inactivering tengevolge van de desintegratie van geïncorporeerd ^{32}P ($15 \mu\text{c}/\mu\text{g P}$).

● stam $\text{B}_{1\text{syn}}^{+\text{fil}}$, ■ stam $\text{B}_{11\text{syn}}^{+\text{fil}}$, ▲ stam $\text{B}_{111\text{syn}}^{+\text{fil}}$.

Open figuren: overlevingscurven voor ongefiltreerde culturen, ingevroren in de logaritmische groeifase, gesloten figuren: overlevingscurven na filtratie.

Aan de hand van een berekening van de efficiëntie waarmee geïncorporeerd ^{32}P inactivering veroorzaakt, kunnen we de gevoeligheid van een groeiende (filamentvormende) cultuur met die van een ingevroren cultuur vergelijken. De inactiveringscoëfficiënt a is gedefinieerd als de waarschijnlijkheid dat een desintegratie van een geïncorporeerd ^{32}P atoom een organisme inactieveert. Om deze te kunnen berekenen, leidden Hershey c. s. (1951) de volgende vergelijking af, waarin uitsluitend experimenteel te bepalen grootheden voorkomen:

$$10 \log S = -1,48 \times 10^{-6} \times a \times A_0 \times (1 - e^{-\lambda t}) \times N$$

In deze vergelijking die uitsluitend geldt voor het geval dat één desintegratie de cel kan inactiveren, ("single hit"), is

S de fractie overlevende

N het totaal aantal fosforatomen per cel in het materiaal waarin ^{32}P conversies letaal kunnen zijn,

A_0 de specifieke activiteit in $\mu\text{c}/\mu\text{g P}$

$(1 - e^{-\lambda t})$ de fractie gedesintegreerde ^{32}P atomen.

Voor de berekening van de inactiveringscoëfficiënt a voor een ingevroren suspensie kunnen S en $(1 - e^{-\lambda t})$ uit Fig. 22 worden afgeleid. Het aantal

kolonievormende cellen neemt een factor 10 af ($\log S = -1,0$) indien een fractie 0,125 ^{32}P atomen desintegreert bij een specifieke activiteit $A_0 = 15,0 \mu\text{C}/\mu\text{g P}$.

N, dat is het aantal fosforatomen per cel in het DNA, kan uit het DNA gehalte berekend worden. E.coli B_I bevat $12,0 \times 10^{-9} \mu\text{g DNA}$ per cel (Tabel V). Stellen we het fosforgehalte van DNA op ca. 10% dan bevat een cel dus $1,2 \times 10^{-9} \mu\text{g PDNA}$. 1 $\mu\text{g P}$ komt overeen met $1,94 \times 10^{16}$ atomen. Een cel bevat dus in het DNA $2,3 \times 10^7 \text{ P}$ atomen. Worden al deze waarden in bovenstaande vergelijking ingevuld:

$$-1,0 = -1,48 \times 10^{-6} \times a \times 15,0 \times 2,3 \times 10^7 \times 0,125$$

dan vinden we voor a 0,015. Deze waarde stemt redelijk overeen met de door Stent en Fuerst (1960) berekende waarde van $a = 0,02$ voor E.coli B/r.

Het effect van ^{32}P in groeiende culturen kunnen we als volgt berekenen. In het door fig. 20 weergegeven experiment neemt het aantal cellen in de niet radioactieve cultuur toe volgens de vergelijking

$$N_t = N_0 2^{t/T}$$

en in de radioactieve culturen bij benadering volgens de vergelijking

$$N_t' = N_0' 2^{t/T'}$$

waarin N_t het aantal cellen op tijdstip t , T de delingstijd van de niet radioactieve cultuur en T' de delingstijd van een radioactieve cultuur weergeeft.

Nu is $S = N_t'/N_t = 2^{t(1/T' - 1/T)}$

$\log S$ is dus gelijk aan $t(1/T' - 1/T) \log 2$.

Nemen we nu voor de tijdsduur t de verdubbelingstijd van de niet radioactieve cultuur dan is

$$\log S = (T/T' - 1) \log 2.$$

In dit tijdvak is dus een fractie $(1 - e^{-\lambda T})$ ^{32}P atomen gedesintegreerd. Beide grootheden kunnen we nu in de oorspronkelijk voor ingevroren suspensies gebruikte vergelijking invullen. In het door Fig. 20 weergegeven experiment werd voor de niet radioactieve cultuur, de cultuur met specifieke activiteit $13,5 \mu\text{C}/\mu\text{g P}$ en voor de cultuur met specifieke activiteit $25,7 \mu\text{C}/\mu\text{g P}$ respectievelijk een delingstijd gemeten van 42, 60 en 110 minuten. Hieruit volgt respectievelijk voor de $13,5 \mu\text{C}/\mu\text{g P}$ en voor de $25,7 \mu\text{C}/\mu\text{g P}$ bevattende cultuur een waarde van S van -0,09 en -0,186.

De desintegratie constante λ heeft voor ^{32}P een waarde van $5,73 \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$. De fractie gedesintegreerde ^{32}P atomen in het tijdvak $T = 42$ minuten bedraagt derhalve $1,37 \times 10^{-3}$. Voor de cultuur met $13,5 \mu\text{C}/\mu\text{g P}$ krijgen we dus:

$$-0,09 = -1,48 \times 10^{-6} \times a \times 13,5 \times 2,3 \times 10^7 \times 1,37 \times 10^{-3}$$

waaruit volgt $a = 0,14$

en voor de cultuur met $25,7 \mu\text{C}/\mu\text{g P}$:

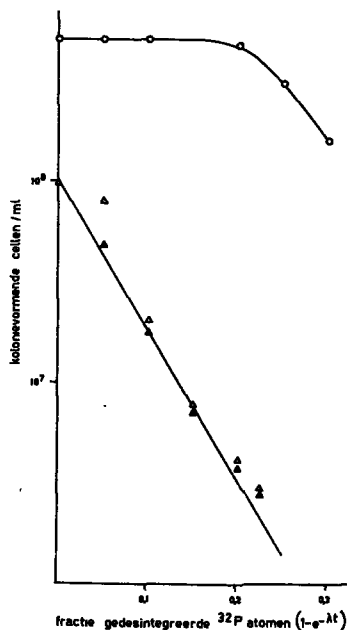
$$-0,186 = -1,48 \times 10^{-6} \times a \times 25,7 \times 2,3 \times 10^7 \times 1,37 \times 10^{-3}$$

waaruit volgt $a = 0,15$.

Om een met de inactiveringscoëfficiënt voor ingevroren suspensies vergelijkbare

waarde voor a te krijgen, werd de berekening hier uitgevoerd alsof uitsluitend desintegraties in het DNA tot filamentvorming aanleiding geven. Hier is geen experimenteel bewijs voor geleverd en misschien moet met de mogelijkheid rekening gehouden worden dat ook desintegraties in het RNA filamentvorming in de hand werken. *E. coli* B bevat ca. 5x zoveel RNA als DNA. De factor N wordt in de inactiverings-vergelijking indien RNA een rol speelt, 5x zo groot, de waarde voor a dus 5x zo klein. Dus, indien uitsluitend desintegraties in het DNA verantwoordelijk voor de filamentvorming zijn, dan is 1 op de 7 (1 op de 1/0,15) desintegraties per cel in staat de deling te remmen, indien desintegraties in het RNA een rol spelen 1 op de 35.

Voor een ingevroren suspensie werd een waarde van a van 0,015 berekend. Onder deze conditie is dus ca. 1 op de 65 desintegraties letaal. Een groeiende cultuur is dus veel gevoeliger voor de desintegratie van geïncorporeerd ^{32}P dan een ingevroren suspensie, althans van de stam B₁. Nu is



Figuur 23.

Vergelijking van het effect van de desintegratie van geïncorporeerd ^{32}P bij 37°C en -80°C bij *E. coli* B₁. O niet radioactieve cultuur in de stationaire fase, onder schudden geïncubeerd bij 37°C .

Δ cultuur in de stationaire fase, onder schudden geïncubeerd bij 37°C , gekweekt in medium met $15 \mu\text{C}/\mu\text{g P}$.

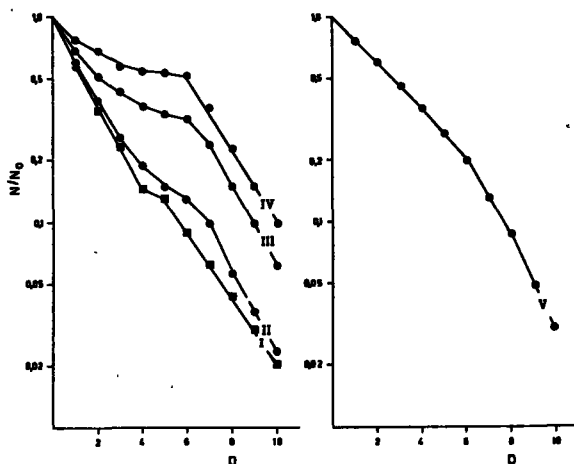
Δ suspensie van cellen gekweekt in een medium met $15 \mu\text{C}/\mu\text{g P}$ en daarna ingevroren bij -80°C bewaard.

het effect van ^{32}P in een groeiende cultuur bij 37°C , maar in een ingevroren suspensie bij -78°C gemeten. Volgens Stent en Fuerst (1955) is de waarde van a bij bacteriofagen sterk van de temperatuur afhankelijk. Dat het verschil in gevoeligheid tussen een groeiende cultuur en een ingevroren suspensie niet door een dergelijke temperatuurs-afhankelijkheid veroorzaakt wordt, blijkt uit het volgende experiment. Een in TRIS medium met $2,5\text{ }\mu\text{g P/ml}$, $15\mu\text{C}/\mu\text{g P}$ en $0,025\%$ glucose gegroeide cultuur van de B_1 stam werd twee uur na het bereiken van de stationaire fase in tweeën gedeeld. Het eerste deel werd verdund in invriesmedium en bij -78°C bewaard, het andere deel werd onder schudden bij 37° verder gefincubeerd. In de niet radioactieve controle trad gedurende de eerste 5 dagen geen verandering in het aantal kolonievormende cellen op. Gedurende deze periode werden zowel monsters van de cultuur bij 37°C als bij -78°C op het aantal kolonievormende cellen onderzocht. Zoals uit Fig. 23 blijkt, neemt het aantal kolonievormende cellen voor beide gevallen even snel met de fractie gedisintegreerde ^{32}P atomen af. Het verschil in gevoeligheid tussen een logaritmisch groeiende cultuur en een ingevroren suspensie wordt dus niet veroorzaakt door een temperatuursafhankelijkheid van de inactiveringscoëfficiënt.

De waarde van de inactiveringscoëfficiënt voor een logaritmisch groeiende cultuur van de stam B_1 ($a = 0,15$) is van dezelfde orde van grootte als die voor bacteriofagen (0,1). Wij constateren dus een vijf- tot bijna tienvoudig verschil in gevoeligheid tussen bacteriofagen en logaritmisch groeiende cellen enerzijds en cellen in de stationaire fase en ingevroren cellen anderzijds. Nu wordt in culturen in de stationaire fase, zowel als in ingevroren suspensies van cellen in de logaritmische groeifase, bij overenten in vers medium een langdurige aanloopfase waargenomen. Worden deze systemen dus op het aantal kolonievormende cellen onderzocht, dan duurt het geruime tijd voordat de cellen waarin ^{32}P desintegratie heeft plaats gehad, in deling gaan. Zulks is bij logaritmisch groeiende culturen en bij bacteriofagen niet het geval. Worden deze systemen op het aantal levensvatbare organismen onderzocht, dan zullen de cellen, respectievelijk bacteriofagen, waarin desintegratie heeft plaats gehad, zich snel vermenigvuldigen. Het verschil in gevoeligheid tussen beide typen systemen kunnen we wellicht hieraan toeschrijven. Dit zou erop wijzen dat bij het effect van de desintegratie van gefincorporeerd ^{32}P een herstelproces een rol speelt. Hill (1960) heeft hiervoor langs een geheel andere weg eveneens aanwijzingen gevonden. Zij constateerde dat men in culturen waarin desintegratie van ^{32}P heeft plaats gehad, een hoger percentage overlevende cellen vindt, indien de voedingsbodems waarop men dit percentage bepaalt, bij 45°C in plaats van bij 37°C gefincubeerd worden. Dit verschijnsel vertoont veel overeenkomst met het na UV bestraling waargenomen herstelproces dat als warmtereactivering bekend staat.

Tenslotte zullen we nog enige aandacht wijden aan de vorm van de door Fig. 19 weergegeven overlevingscurven. De bij deze proeven experimenteel bepaalde punten wijken sterker af van een lineaire correlatie tussen de logaritme van de fractie overlevende cellen en de fractie gedisintegreerde ^{32}P atomen dan men op grond van foutenbronnen zou mogen verwachten. In sommige gevallen werd zelfs een soort plateau waargenomen. Een dergelijk plateau werd eveneens door Hill (1960) voor het effect van ^{32}P op *E. coli* B beschreven. Aanvankelijk werd door ons verondersteld dat een

dergelijk plateau veroorzaakt wordt door het voorkomen van tijdens de groei geïnduceerde filamenten waarvan een gedeelte in staat is tot een kolonie uit te groeien. Een bij de eerste deling geïnduceerd filament heeft na 6 delingen een lengte van $64x$ die van een normale cel. Indien dergelijke filamenten nu ook 64 stel trefplaatsen bezitten, dan zou de overlevingscurve voor deze filamenten een extreem grote schouder vertonen. Voor een aantal theoretische gevallen, waarbij in een cultuur naast gewone cellen filamenten voorkomen, is de overlevingscurve berekend (zie Fig. 24, curve I t/m. IV).



Figuur 24.

Modelinactiveringscurven.

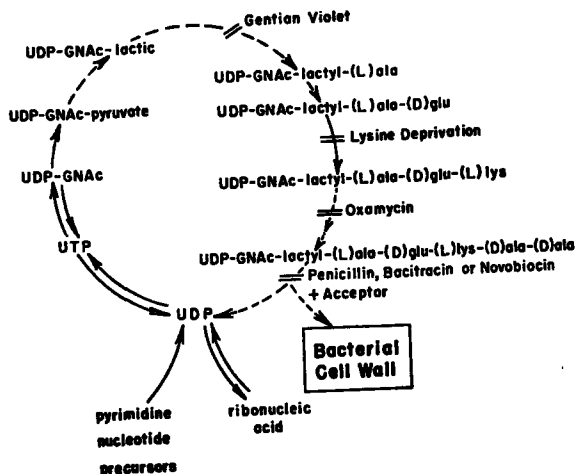
- I. $N/N_0 = 0,95 e^{-cD} + 0,05 (1 - (1 - e^{-cD})^{128})$
- II. $N/N_0 = 0,90 e^{-cD} + 0,10 (1 - (1 - e^{-cD})^{64})$
- III. $N/N_0 = 0,7 e^{-cD} + 0,3 (1 - (1 - e^{-cD})^{64})$
- IV. $N/N_0 = 0,5 e^{-cD} + 0,5 (1 - (1 - e^{-cD})^{64})$
- V. $N/N_0 = 0,43 e^{-cD} + 0,14 (1 - (1 - e^{-cD})^2) + 0,11 (1 - (1 - e^{-cD})^4) + 0,10 (1 - (1 - e^{-cD})^8) + 0,08 (1 - (1 - e^{-cD})^{16}) + 0,07 (1 - (1 - e^{-cD})^{32}) + 0,06 (1 - (1 - e^{-cD})^{64})$

Bij deze berekening werd verondersteld dat naast normale cellen slechts één soort filamenten van één bepaalde lengte voorkomen. Deze veronderstelling is echter waarschijnlijk niet juist. Een groeiende cultuur bevat een spectrum van filamenten waarvan slechts de langste na 6 delingen in radioactief medium een lengte van 64 eenheden bereiken. Daarnaast komen filamenten voor die $32x$, $16x$, $8x$ en $4x$ de lengte van een normale cel hebben. Voor een cultuur, waarin zich per deling 40% van de cellen door filamentvorming aan deling onttrekt, werd de verdeling van de filamenten van verschillende lengten na zes delingen berekend. De overlevingscurve voor dit geval wordt door de functie V in Fig. 24 weergegeven, waarbij wederom vooropgesteld werd dat het aantal trefplaatsen per filament, evenredig met de grootte daarvan, toeneemt.

Deze curve vertoont géén buigpunten. Het is dus niet gerechtvaardigd de in de overlevingscurven voor ^{32}P suicide waargenomen "onregelmatigheden" zonder meer aan het voorkomen van levensvatbare filamenten toe te schrijven. Het ontbreekt ons nog aan experimentele gegevens om andere verklaringen voor het verschijnsel aannemelijk te kunnen maken¹⁾.

5. Het effect van penicilline en novobiocine.

Reeds Witkin (1947) heeft vastgesteld dat na UV bestraling *E. coli* B wel en *E. coli* B/r geen filamenten vormt. Bovendien constateerde zij een gering verschil tussen beide stammen in de gevoeligheid voor het antibioticum penicilline. Deze waarneming heeft weinig aandacht getrokken, waarschijnlijk omdat destijds nog niet veel over het werkingsmechanisme van penicilline bekend was. Onze aandacht werd hierop gevestigd door de ontdekking van het effect van kristalviolet op de celdeling. Volgens Strominger (1960)



Figuur 25.

(Strominger, 1960), A scheme for the biosynthesis of part of the cell wall of *S. aureus*. The enzymatic reactions indicated by solid arrows have been characterized. The position of the inhibitors is indicated with reference to the compounds which accumulate with each substance. This representation does not imply that these substances specifically inhibit the indicated reactions.

- 1) Tijdens het onderzoek naar het effect van ^{32}P op de deling deed zich een moeilijkheid voor die nader dient te worden toegelicht.

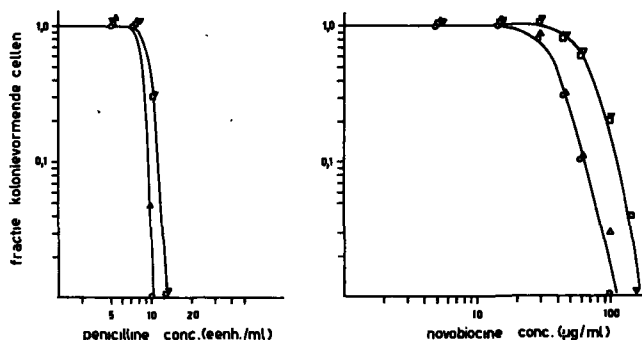
Bij incubatie van de stam B₁ in een medium met hoge specifieke activiteit van ^{32}P wordt de deling sterk geremd, zonder dat een remming van de groei te constateren is (Tabel VII). Met sommige ^{32}P oplossingen werd echter ook een sterke groeiremming gevonden. Deze groeiremming was afhankelijk van de ouderdom van de ^{32}P oplossing en van de dichtheid van de gebruikte bacteriesuspensie. De groeiremmende factor kon volledig verwijderd worden door de ^{32}P oplossing van tevoren gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur met 1 µg/ml katalase te incuberen. Noch verhitte katalase noch runderserumalbumine bezaten dit vermogen. De groeiremming moet dus worden toegeschreven aan door zelfbestraling van de ^{32}P oplossing gevormde peroxyde.

Uit voorzorg werden derhalve alle beschreven experimenten uitgevoerd met ^{32}P oplossingen die met katalase waren voorbehandeld.

grijpen zowel kristalviolet (= gentiaan violet) als penicilline bij *Staphylococcus aureus* in op de celwandsynthese. De synthese van het in de celwand voorkomende peptide

d alanine - d glutaminezuur - 1 lysine - d alanine - d alanine wordt door beide stoffen geremd. De aangrijpingspunten liggen echter waarschijnlijk op verschillende plaatsen (zie fig. 25).

De gevoeligheid voor penicilline en voor novobiocine werd voor de vier stammen B_I, B_{II}, B_{III} en B_{IV} bepaald. In vloeibare culturen met 5 eenheden/ml penicilline of 50 µg/ml novobiocine vormden de fil⁺B_I en B_{III} wel, de fil⁻ stammen B_{II} en B_{IV} geen filamenten. De verschillen in gevoeligheid tussen de vier stammen werden nauwkeuriger bepaald door uit logaritmisch groeiende culturen (M₉ medium) op M₉-CAS-agarplaten met verschillende concentraties van de antibiotica, uit te zaaien en de fractie kolonievormende



Figuur 26.

Het effect van penicilline (links) en novobiocine (rechts) op *E. coli* B.

○ stam B_Isyn⁺fil⁺, □ stam B_{III}syn⁺fil⁻

△ stam B_{III}syn⁺fil⁺, ▽ stam B_{IV}syn⁻fil⁻.

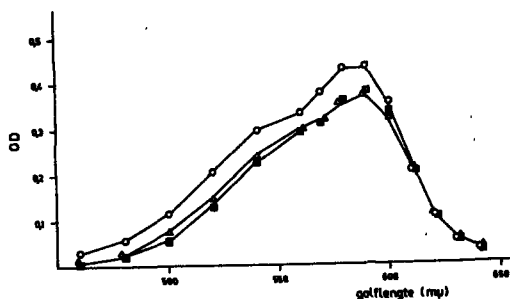
cellen te bepalen. De resultaten zijn verzameld in Fig. 26. Het verschil in gevoeligheid voor penicilline tussen fil⁺ en fil⁻ stammen is zeer klein. Het is evenwel significant. Worden vloeibare culturen met 10 eenheden per ml penicilline geïncubeerd, dan neemt het aantal kolonievormende cellen in fil⁻ stammen toe en in fil⁺ stammen af.

Dr. A.P. Struyk en Dra. I. Hoette (Koninklijke Nederlandse Gist- en Spiritusfabriek, Delft) bepaalden de hoeveelheid penicilline in culturen van de stammen B_I, B_{II} en B_{III} na 3 uur incubatie in een medium waaraan 10 eenheden penicilline per ml was toegevoegd. Zij vonden respectievelijk in culturen van de B_I stam 8,7 en 8,8 eenheden/ml, van de B_{II} stam 8,4 en 9,0 eenheden/ml en van de B_{III} stam 8,2 en 8,4 eenheden/ml. Het verschil in gevoeligheid tussen de stammen kan dus niet worden toegeschreven aan een verschil in penicillinase activiteit.

De penicilline-resistentie van een fil⁻ stam is echter te onderscheiden van die van een stam die speciaal voor penicillineresistentie geselecteerd is. Volgens Witkin verdraagt zo'n stam in tegenstelling tot een stralings-resistente stam, enige tientallen eenheden penicilline meer dan het wilde type. Dit blijkt eveneens zo te zijn met de door ons geïsoleerde penicilline-resistente mutant van het wilde type (mutant MBLCB 76). Deze mutant is

van het fil^+ type maar kan 90 eenheden/ml penicilline in het medium weerstaan.

Aan de hand van het syntheseschema van het Strominger-peptide is een samenhang tussen filamentvorming en een verhoogde kristalviolet-penicilline- en novobiocineresistentie min of meer begrijpelijk. De samenhang met een verhoogde stralingsresistentie en een verhoogde resistentie voor de desintegratie van geïncorporeerd ^{32}P is echter minder evident. Uit het actiespectrum voor filamentvorming (Deering, 1958) blijkt dat bij UV bestraling een nucleïnezuurfractie het primaire aangrijpingspunt moet zijn. Dit is ongetwijfeld ook bij desintegrerend ^{32}P het geval. In vitro werd ook tussen kristalviolet en de nucleïnezuren een interactie waargenomen. Wordt aan een oplossing van kristalviolet DNA of RNA toegevoegd, dan verandert het absorptiespectrum van het kristalviolet (Fig. 27).



Figuur 27.

Absorptiespectra.

O 2,5 $\mu\text{g/ml}$ kristalviolet,

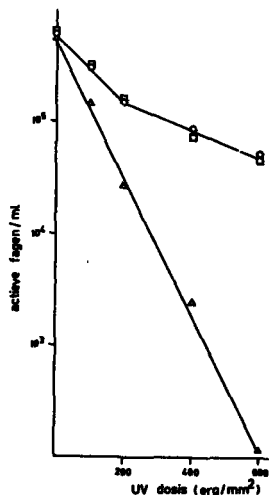
Δ 2,5 $\mu\text{g/ml}$ kristalviolet + 1200 $\mu\text{g/ml}$ DNA,

$\blacksquare$ 2,5 $\mu\text{g/ml}$ kristalviolet + 1200 $\mu\text{g/ml}$ RNA.

Dit verschijnsel wordt met een mengsel van purine- en pyrimidineribosefosfaten of desoxyribosefosfaten niet waargenomen. Mogelijk ligt dus ook voor kristalviolet het aangrijpingspunt in de nucleïnezuurfractie.

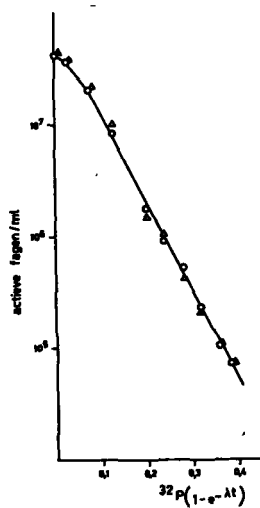
6. De vermenigvuldiging van door UV bestraling geïncorporeerde bacteriofaag op syn^+ en syn^- stammen.

Het vergelijkende onderzoek van Ellison, Feiner en Hill (1960) van het vermogen van de stammen *E. coli* B en *E. coli* B₈ om bestraalde bacteriofaag T₁ te vermenigvuldigen, werd met de stammen B₁ en B₁₁ herhaald. Bovendien werd het effect van de gastheer bepaald voor de inactivering van bacteriofaag T₁ door desintegratie van geïncorporeerd ^{32}P . De resultaten



Figuur 28.
Overlevingscurven voor bacteriofaag T₁ voor UV be-
straling.

O bij uitzaaien op E. coli B₁syn⁺fil⁺
 □ bij uitzaaien op E. coli B₁₁₁syn⁺fil⁻
 Δ bij uitzaaien op E. coli B₁₁₁syn-fil⁺



Figuur 29.
Overlevingscurven voor bacteriofaag T₁ voor ³²P
suicide (400 μc/μg P).

O bij uitzaaien op E. coli B₁syn⁺fil⁺
 Δ bij uitzaaien op E. coli B₁₁₁syn-fil⁺.

van deze proeven zijn verzameld in fig. 28 en fig. 29. Het blijkt dat de stam B_{III} zich evenals de stam E.coli B_S van het wilde type onderscheidt door een geringer vermogen om bestraalde T₁ faag te vermenigvuldigen. Een dergelijk effect werd echter niet voor de aan ³²P suicide onderworpen faag geconstateerd.

7. Samenvatting en conclusies.

Door een vergelijking van de eigenschappen van vier stammen waarin de mutaties fil en syn in verschillende combinaties voorkomen, werd door de in dit hoofdstuk, evenals door de in het vorige hoofdstuk beschreven experimenten duidelijk, dat deze mutaties onafhankelijk en van verschillende aard zijn. Fil⁺ en fil⁻ stammen onderscheiden zich niet alleen van elkaar door een verschil in stralingsgevoeligheid en een verschil in gevoeligheid voor kristalviolet maar ook door een verschil in gevoeligheid voor ³²P desintegraties en door een verschil in gevoeligheid voor penicilline en novobiocine. Syn⁺ en syn⁻ stammen onderscheiden zich behalve door een verschil in groeisnelheid na UV bestraling (Hoofdstuk II) ook van elkaar door een verschil in vermogen om bestraalde bacteriofaag T₁ te vermenigvuldigen.

Het effect van desintegrerend ³²P (³²P suicide) is in fil⁺ stammen reeds merkbaar tijdens de incubatie in radioactief medium met hoge specifieke activiteit. In tegenstelling tot fil⁻ stammen vormen fil⁺ stammen in dit medium filamenten. Geen verschil in gevoeligheid voor de desintegratie van geïncorporeerd ³²P werd echter tussen de stammen B_I, B_{II} en B_{III} waargenomen in ingevroren suspensies. In alle drie de stammen leidt onder deze conditie 1 op de 65 desintegraties in het DNA per cel tot inactivering. In fil⁺ stammen in logaritmisch groeiende culturen is echter 1 op de 7 desintegraties voldoende om filamentvorming te induceren.

Nu op tal van gronden de syn en fil eigenschap scherp van elkaar te onderscheiden zijn, wordt in de hiernavolgende hoofdstukken om praktische redenen de aandacht vooral op één van beide factoren gericht. Hiervoor wordt de syn eigenschap gekozen omdat hiervan, in vergelijking tot de mutatie die tot stralingsresistentie leidt, betrekkelijk weinig bekend is.

Wij hebben vastgesteld dat evenals bij E.coli B en E.coli B_S een verschil tussen de stammen B_I syn⁺ en B_{III} syn⁻ reeds tot uitdrukking kan komen zonder dat de cellen zelf worden bestraald. Het verschil openbaart zich wanneer de vermenigvuldiging van extracellulair beschadigd DNA (T₁ bacteriofaag) wordt bestudeerd. Hieruit volgt dat een verschil in gevoeligheid tussen de syn⁺ en de syn⁻ wellicht niet veroorzaakt wordt door een verschil in primaire interactie van de straling met de voor inactivering verantwoordelijke trefplaats. Indien ook bij de bestraling van de stammen zelf het DNA als aangrijpingspunt een belangrijke rol speelt, hetgeen we voor UV wel mogen aannemen, dan is het essentiële verschil tussen de stammen vermoedelijk een verschil in reactie op de door bestraling aan het DNA aangebrachte beschadiging; een verschil dus in het vermogen tot herstel. Deze veronderstelling zal wederom in overweging genomen worden nadat in Hoofdstuk IV de fenotypische expressie en in Hoofdstuk V de genetische constitutie van de syn eigenschap nader omschreven is.

HOOFDSTUK IV

HET EFFECT VAN ULTRAVIOLET LICHT OP DE EIWIT- EN NUCLEÏN- ZUURSYNTHESE.

1. Inleiding.

In hoofdstuk II werd aangetoond dat de stam $B_{III}syn^{-}$, in tegenstelling tot de stam $B_{I}syn^{+}$, na bestraling met ultraviolet licht een sterke groei-remming vertoont. De verwachting was dat de oorzaak hiervan op een specifiek effect op de DNA of eiwitsynthese zou zijn terug te voeren. Zowel de DNA synthese als de synthese van adaptieve enzymen worden bij bacteriën thans algemeen als gevoelig voor UV bestraling beschouwd¹⁾. Alvorens onze experimenten te beschrijven volgt eerst een kort literatuuroverzicht.

Wat betreft de remming van de DNA synthese wezen Barner en Cohen in 1956 op de overeenkomst in het gedrag van een coli cultuur na UV bestraling en het gedrag van een thymine behoeftige stam bij groei in een medium waaraan thymine ontbreekt. In een cultuur van deze laatste stam, *E. coli* 15T⁻, neemt het aantal kolonievormende cellen ten gevolge van de thymine-deficiëntie na één delingstijd incuberen snel af. Zonder thymine kan deze stam DNA niet synthetiseren; RNA en eiwit blijken echter wel gevormd te worden. Er ontstaat dus een abnormale verhouding tussen de hoeveelheid DNA en de hoeveelheid RNA en eiwit per cel. Deze "onevenwichtige groei" (Eng. ; unbalanced growth) zou de oorzaak zijn van de na één delingstijd waargenomen afsterving.

Na bestraling met ultraviolet licht zou *E. coli* nu een overeenkomstig gedrag vertonen: zowel de RNA synthese als de synthese van constitutief eiwit zouden na bestraling minder sterk geremd worden dan de DNA synthese. Hier wordt dus de inactivering ten gevolge van UV bestraling niet gezien als het resultaat van zogenaamde letale mutaties, maar als het gevolg van het optreden van onevenwichtige groei. De selectieve remming van de DNA synthese wordt echter pas na bestraling met betrekkelijk hoge dosis waargenomen. Het is niet bekend welke rol "onevenwichtige groei" bij het tot stand komen van het stralings-effect speelt bij een dosis waarbij de DNA synthese niet significant sterker dan de RNA- of eiwitsynthese geremd wordt (dat is b.v. bij 200 erg/mm² UV).

De remming van de adaptieve enzym synthese bij bestraling met lage dosis UV werd bestudeerd door Swenson en Giese (1950) aan galactosimase in gist, door Torriani (1956) aan penicillinase in *Bacillus cereus*, door Blicher c. s. aan lysinedecarboxylase in *B. cadaveris* en door Rushizky c. s. (1960) aan tryptofanase en β galactosidase in *E. coli*.

1) Swenson en Giese, 1950; Kelner, 1953; Kanazir en Errera, 1954; Torriani, 1956; Iverson en Giese, 1957; Hanawalt en Buehler, 1960.

Rushizky c.s. (1960) bepaalden behalve het actiespectrum tevens een dosis-effect curve voor de remming van de synthese van β galactosidase. Zoals voor filamentvorming en voor reductie van het aantal kolonievormende cellen, vertoont het actiespectrum grote gelijkenis met het absorptiespectrum der nucleïnezuuren. Uit de dosis-effect curve trachten deze onderzoekers tevens aan de hand van de treffertheorie de grootte van het nucleïnezuur-molecuul, verantwoordelijk voor de synthese van β galactosidase, te berekenen. Nu is de efficiëntie waarmee ultraviolet licht beschadigingen aan het nucleïnezuur aanbrengt, niet nauwkeurig bekend. Bij hun berekening kan hierdoor dit molecuulgewicht van 3 tot 7×10^5 variëren. Deze grootte komt zowel overeen met die van een (klein) RNP deeltje (ribosoom) als met die van het lac-locus op het bacteriechromosoom. Op grond van deze berekening krijgen we dus geen uitsluitsel omtrent de aard van de trefplaats.

De remming van de synthese van β galactosidase na UV bestraling gaat niet gepaard met een remming van de RNA synthese. Dit is een opmerkelijk verschijnsel omdat volgens de heersende opvatting RNA synthese steeds met eiwitsynthese gepaard gaat. Het is evenwel mogelijk dat toch de synthese van een bepaalde RNA fractie gelijktijdig met de eiwitsynthese geremd wordt, zoals b.v. ook onder invloed van chlooramfenicol is waargenomen. (Nomura en Watson, 1959). Zo meenden Susuki c.s. (1959) dat UV bestraling wel degelijk een invloed op de RNA synthese uitoefent. Het na bestraling gevormde RNA zou aanmerkelijk minder stabiel dan "normaal" RNA zijn.

Onder de verzamelnaam "RNA" vat men in feite een groep polymeren samen met uiteenlopende functies en van uiteenlopende grootte. Men onderscheidt thans:

- a) RNP - RNA, dat is het in de ribosomen gelokaliseerde RNA met molecuulgewicht van 7 tot 25×10^5 . De ribosomen zelf onderscheidt men naar hun sedimentatieconstante in de analytische ultracentrifuge in 100S, 70S, 50S en 30S deeltjes.
- b) s-RNA, het zogenaamde oplosbare RNA (Eng.: soluble RNA) dat een rol speelt bij het transport van "geactiveerde aminozuren" naar de matrijs waar de eiwitsynthese plaatsvindt. Dit RNA heeft een molecuulgewicht van $0,25 \times 10^5$ en een sedimentatieconstante van 4S.
- c) m-RNA, het zogenaamde boodschapper RNA (Eng.: messenger RNA) met molecuulgewicht tussen de 2,5 en 5×10^5 en een sedimentatieconstante tussen 4 en 20S. Dit zou een functie bij de informatieoverdracht van chromosoom naar matrijs vervullen.

Uit een recent onderzoek van Aronson en McCarty (1961) blijkt nog dat naast 30S en 50S ribosomen (die de bouwstenen voor de zwaardere ribosomen 70S en 100S zijn) ook een kleine fractie 20S ribosomen voorkomt. De 20S ribosomen onderscheiden zich van de andere door een lager eiwitgehalte. Alle ribosomen zijn echter opgebouwd uit 18S en 28S RNA eenheden, die volgens deze onderzoekers uit 4S en 8S RNA eenheden gevormd worden. Ook deze 4S en 8S RNA eenheden komen als zodanig in een celvrij extract voor.

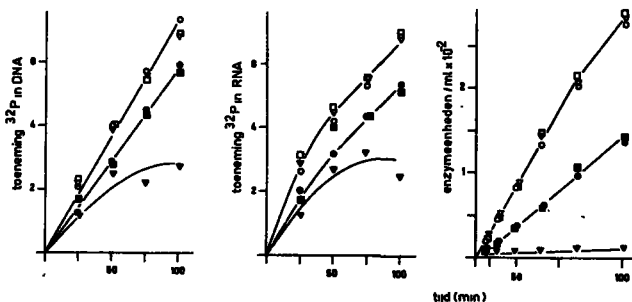
Drakulic (1959) paste voor het eerst na UV bestraling een RNA fractiënering op een coli-extract toe. Zij onderscheidde een hoogmoleculaire RNA fractie (RNP fractie) en een laagmoleculaire RNA fractie. Na bestraling was de incorporatie van ^{14}C adenine in de laagmoleculaire fractie verhoogd en in de hoogmoleculaire fractie verlaagd.

Door het beschikbaar komen van preparatieve ultracentrifuges, uitgerust met rotors met uitzwaaiende bekens ("swinging bucket rotor"), kan de heterogeniteit van het RNA op zeer fraaie wijze door centrifugatie in een dichtheidsgradiënt (van b.v. sucrose) gedemonstreerd worden. Bij deze werkwijze worden moleculen en subcellulaire deeltjes op grond van hun sedimentatieconstante gekarakteriseerd. Omdat de bewerking tevens op preparatieve schaal kan worden uitgevoerd, is het mogelijk gelijktijdig de incorporatie van met ^{14}C en ^{32}P gemerkte verbindingen in de diverse fracties te meten en aldus de synthesesnelheid daarvan te bepalen.

Bij het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek werd van bovenstaande fractioneringsmethode gebruik gemaakt om een effect van UV bestraling op de RNA stofwisseling aan te tonen.

2. De remming van de nucleïnezuur- en β galactosidase-synthese.

Bij een dosis van 200 erg/mm^2 UV, dat is een dosis waarbij stralings-gevoelige en stralingsresistente stammen op grond van hun morfologisch en biochemisch gedrag reeds van elkaar te onderscheiden zijn, wordt in een logaritmisch groeiende cultuur van één der drie stammen B_I, B_{II} en B_{III} de DNA of RNA synthese significant sterker geremd dan de vermeerdering van de totale bacteriemassa (vergelijk Fig. 30 met Fig. 10 in Hoofdstuk II). Dit geldt evenwel niet voor de adaptieve synthese van het enzym β galactosidase. Deze werd in op glycerol groeiende culturen, waaraan 2,5



Figuur 30.

Het effect van UV bestraling (200 erg/mm^2) op de DNA, RNA en adaptieve β galactosidase-synthese in logaritmisch groeiende culturen van *E. coli* B ($0,2 \text{ mg DG/ml}$ bacteriën in TRIS-5P medium met $0,1\%$ glycerol).

Open figuren: onbestraalde culturen, gesloten figuren: bestraalde culturen.

● stam B_I^{syn+fil+}, ■ stam B_{II}^{syn+fil-}, ▼ stam B_{III}^{syn+fil-}.

mg/ml lactose als inductor was toegevoegd, gevolgd. Gedurende de eerste 50 minuten na inductie vermeerderde de bacteriemassa in de onbestraalde cultuur van de stam B_I met een factor 2,8, in de met 200 erg/mm² UV bestraalde cultuur met een factor 2,2. De vermeerdering van de bacteriemassa in de bestraalde cultuur bedraagt dus 80% van die in de onbestraalde cultuur. Na 50 minuten werd in de bestraalde cultuur echter slechts 44% van de in de onbestraalde cultuur gevormde hoeveelheid β galactosidase aangetroffen. De rechter grafiek in Fig. 30 geeft het verloop van de synthese van β galactosidase onder deze condities voor de stammen B_I, B_{II} en B_{III} weer¹⁾. In alle stammen wordt dus de enzymsynthese door UV bestraling sterker geremd dan de groei en de DNA en RNA synthese. Bovendien wordt in de syn⁻ stam B_{III} de enzymsynthese, evenals de groei, sterker geremd dan in de syn⁺ stammen. De discrepantie tussen de na bestraling waargenomen nucleïnezuursynthese en enzymsynthese blijkt nog het duidelijkst in de stam B_{III}: hoewel de hoeveelheid nucleïnezuur zich nog kan verdubbelen, wordt vrijwel geen β galactosidase gevormd.

Het vergelijken van de stralingsgevoeligheid van de β galactosidasesynthese in groeiende culturen van de drie stammen is echter niet geheel correct omdat de groei van de stammen door bestraling in verschillende mate geremd wordt en ook dit een weerslag op de gesynthetiseerde hoeveelheid enzym heeft. Daarom werd het effect van UV bestraling eveneens bestudeerd onder voorwaarden waarbij de totale hoeveelheid bacteriemateriaal niet vermeerderen kan. Wordt een logaritmisch groeiende cultuur afgecentrifugeerd en gesuspenderd in Mg medium, waarin het NH₄Cl gehalte van 1 g/l tot 1 mg/l is teruggebracht, dan neemt bij incubatie met 0,025% lactose het aantal mg drooggewicht bacteriën per ml gedurende de eerste uren niet méér dan 10% toe, terwijl toch een meetbare hoeveelheid β galactosidase gevormd wordt. Ook onder deze omstandigheden werd de vorming van β galactosidase in de B_{III} stam door UV bestraling sterker geremd dan in de B_I en B_{II} stam (zie Fig. 31).

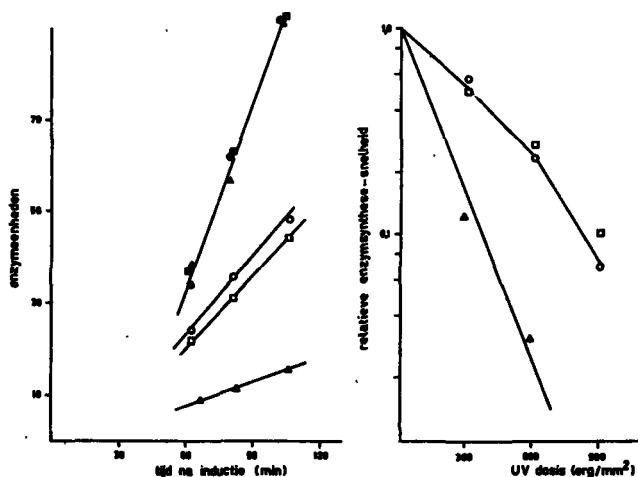
De hoge UV gevoeligheid van de groei en de eiwitsynthese in de stam B_{III}syn⁻ blijken specifieke stralingseffecten te zijn. Syn⁺ en syn⁻ stammen vertoonden geen verschil in gevoeligheid voor de antibiotica chlooramfenicol en puromycine en voor de stof 5-fluoruracil. Deze stoffen oefenden alle in de B_I en B_{II} stam een even sterke remming op de eiwitsynthese uit.

3. Het sedimentatiepatroon van een homogenaat van E.coli B in een sucrosegradiënt.

De in de preparatieve Spinco-ultracentrifuge (Model L) onderzochte celvrije extracten werden uit logaritmisch groeiende culturen in TRIS-10P medium met 0,1% glucose bereid. 15 tot 20 mg drooggewicht bacteriën werden na wassen met 0,05 M TRIS-buffer, pH 7,4, 10⁻⁴ M MgSO₄, in een mortier gedurende 2 tot 5 minuten met aluminiumoxyde²⁾ gewreven, waarbij 50

1) De gevormde hoeveelheid enzym is hier in feite uitgezet als functie van de tijd in de vorm (ekt - 1). In een logaritmisch groeiende cultuur wordt de vermeerdering van de bacteriemassa Y weergegeven door de functie $Y = Y_0 e^{kt}$, de vermeerdering van de hoeveelheid enzym door $dE = KY dt = KY_0 e^{kt} dt$. Hieruit volgt voor de totaal na inductie gevormde hoeveelheid enzym $E = \frac{KY_0}{k} (e^{kt} - 1)$. E is dus recht-evenredig met (ekt - 1).

2) "Alcoa" (Alum. Corp. of America).



Figuur 31.

Het effect van UV bestraling op de adaptieve synthese van β galactosidase in niet groeiende culturen van *E. coli* B in M_9 medium met 1 mg/l NH_4Cl , 0,025% lactose. Gesloten figuren: onbestraalde culturen, Open figuren: bestraalde culturen.

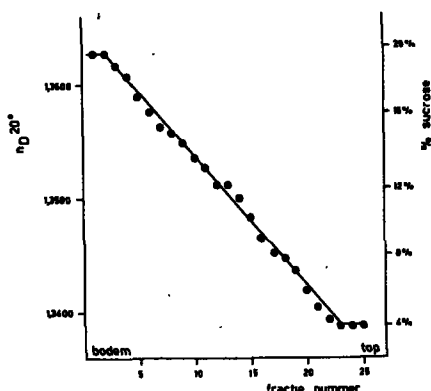
Linker grafiek: het effect van 200 erg/mm² UV. Bacterieconcentratie 0,2 mg DG/ml. Ordinaat, enzym-eenheden/mg DG.

Rechter grafiek: dosis-effect curve.

○ B₁syn⁺fil⁺, □ B₁syn⁺fil⁻, Δ B₁syn⁻fil⁺

tot 100% van de cellen desintegreert. Het homogenaat werd opgenomen in 3,5 ml TRIS-buffer van bovengenoemde samenstelling en de Alcoa en de overgebleven hele cellen verwijderd door twee achtereenvolgende centrifugaties bij 9000 toeren/min in de Spinco-rotor no. 40. Het visceuse extract werd vervolgens in aanwezigheid van 2 $\mu\text{g/ml}$ DNAase gedurende een nacht bij 4° C tegen 0,005 M TRIS-buffer pH 7,4, 10^{-4} M MgSO_4 gedialyseerd. Een gedeelte van het extract (ca. 1,5 mg eiwit, 0,5 mg RNA) werd vervolgens op een sucrosegradiënt gebracht die discontinu in een 30 ml Spinco-centrifugebuis werd ingesteld door voorzichtig 5 ml porties 20%, 16%, 12%, 8% en 4% sucrose in 0,005 M TRIS-buffer (pH 7,4, 10^{-4} M MgSO_4) achtereenvolgens in de buis te laten stromen. Na het opbrengen van het extract werd het geheel aan centrifugatie in rotor no. 25 bij 24.000 toeren/min onderworpen (gemiddelde g waarde: 60.000). Tijdens het centrifugeren stelt zich een vrijwel continue gradiënt in. Deze werd bepaald door de brekingsindex van uit de buis gewonnen fracties te meten (Fig. 32).

De eigenlijke fractionering werd uitgevoerd door na een bepaalde tijd centrifugeren aan de onderkant van de, in een statiefflem geplaatste, plasticen centrifugebuis, met een injectienaald een opening aan te brengen waardoor de inhoud er in ongeveer een half uur kan uitstromen. In kleine



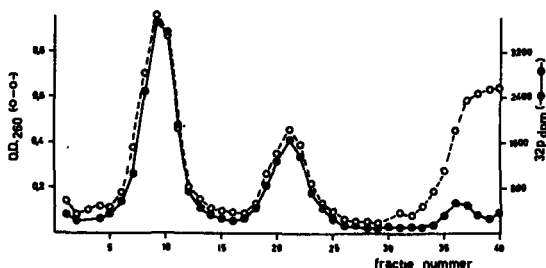
Figuur 32.
Sucrose-gradiënt na 3 uur centrifugeren bij 24.000
omwentelingen per min.

centrifugebuizen werden 30 tot 70 fracties (4 tot 8 druppels elk) verzameld. In met ^{32}P gemerkte homogenaten werd de incorporatie in elk van de fracties bepaald na precipitatie met 0,2 N perchloorzuur. Daartoe werd aan iedere fractie 0,1 mg niet radioactief bacteriemateriaal als drager toegevoegd.

Het sedimentatiepatroon van een op deze wijze behandeld homogenaat wordt weergegeven in Fig. 33. Hierbij is uitgegaan van een cultuur die gedurende 15 generaties op een medium met $0,3 \mu\text{C}^{32}\text{P}/\mu\text{g P}$ is gegroeid. In het sedimentatiepatroon van zo'n homogeen gemerkte cultuur komen dus drie duidelijk te onderscheiden pieken voor, die gerekend vanaf de bodem van de centrifugebuis (links) een sedimentatieconstante van ca. 50S, 30S en 4S bezitten¹⁾. De verticale assen zijn in Fig. 33 zo gekozen dat de curve voor de optische dichtheid en de curve voor geïncorporeerd ^{32}P elkaar in de 50S piek juist dekken. De 30S piek is evenals de 50S piek een ribosoomfractie, met dezelfde eiwit/RNA verhouding. Ook hier dekken de curven elkaar dus precies. In de 4S piek, dat is het gebied waarin het oplosbare RNA (ca. 10% van het totale RNA) en het niet aan deeltjes gebonden eiwit (ca. 50% van de totaal aanwezige hoeveelheid eiwit) terecht komt, ligt de verhouding tussen de extinctie en de ^{32}P activiteit volgens de verwachting geheel anders.

Uit een op deze wijze geanalyseerd bacteriehomogenaat blijkt niet het bestaan van het zogenaamd boodschapper RNA dat een sedimentatieconstante tussen de 10 en 20S zou bezitten. (Gros, c.s. 1961). Het voorkomen hiervan kan echter worden aangetoond door de bacteriën (vóór analyse) niet gedurende lange, maar slechts gedurende korte tijd in radioactief medium te incuberen. Aan een logaritmisch groeiende cultuur in TRIS-10P medium

1) Volgens een onderzoek van de betreffende fracties in de analytische Phywé-ultracentrifuge door Drs. J. B. Th. Aten bedragen deze constanten respectievelijk 47S, 30S en 4S.



Figuur 33.

Het sedimentatiepatroon van een *E. coli* B homogenaat in een sucrose gradiënt. Bacteriën gedurende 15 generaties in TRIS-5P medium met $0,3 \mu\text{C}/\text{ml}$ $^{32}\text{P}_4$ gekweekt. Homogenaat bereid in 10^{-4} M MgSO_4 . Gedurende 6 uur bij 24.000 omwentelingen per min. gecentrifugeerd in een gradiënt van 4 tot 20% sucrose.

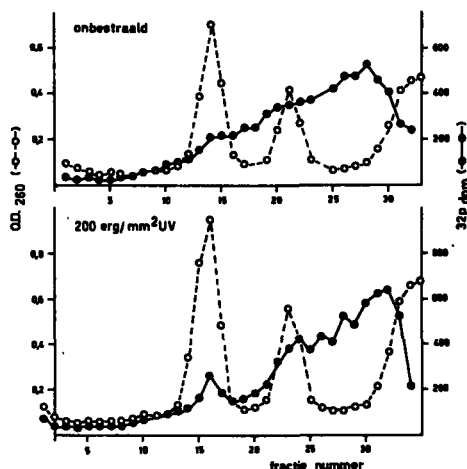
Stippellijn: absorptie bij 260 m μ , getrokken lijn: verdeling van de radioactiviteit in 0,2 N HClO_4 precipitaat.

(0,2 mg DG bacteriën/ml) werd $500 \mu\text{C}/\text{ml}$ dragervrij $^{32}\text{P}_4$ toegevoegd. Na vijf minuten werd de incorporatie door snel fijn gemalen ijs toe te voegen, gestopt. Het sedimentatiepatroon van het uit deze bacteriën bereide celvrije extract wordt in de bovenste grafiek van Fig. 34 weergegeven. Het merendeel van de radioactiviteit blijkt nu tussen de 30S en 4S piek te sedimenteren. Werd na 5 minuten incuberen met ^{32}P de groei niet onmiddellijk gestopt, maar werd vervolgens nog gedurende 20 minuten met grote overmaat niet radioactief fosfaat ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$ P) doorgekweekt, dan bleek vrijwel alle radioactiviteit uit het gebied tussen de 30 en 4S piek te verdwijnen en in de 50S en 30S ribosomen-fractie te worden opgenomen (zie onderste grafiek van Fig. 35). Uit deze laatste twee experimenten blijkt dus dat in een bacteriehomogenaat naast de 50S, 30S en 4S fractie ook nog een (30-10)S fractie, die aan hoge "turnover" onderhevig is, voorkomt. Op grond van de op dit moment ten dienste staande literatuurgegevens moet deze fractie als het zogenaamd boodschapper RNA worden beschouwd (Gros, c.s. 1961).

Het sedimentatiepatroon van een homogenaat, bereid uit bacteriën die na een 5 minuten ^{32}P -puls, 20 minuten met niet radioactief fosfaat geïncubeerd zijn, wijkt in twee opzichten van een homogeen gemerkt homogenaat af:

- 1) de 4S piek is zeer veel kleiner,
- 2) de 50S piek is even groot als de 30S piek.

In verband met de in het hiernavolgende te beschrijven stralingseffecten, verdient vooral de migratie van de radioactiviteit in het 4S gebied de aandacht. Na een 5 minuten puls strekt de radioactiviteit zich over een wijd



Figuur 34.

De sedimentatie van de radioactiviteit in een *E. coli* B_{III} homogenaat, bereid uit een cultuur waarin gedurende 5 minuten ³²P werd geïncorporeerd (³²P puls).

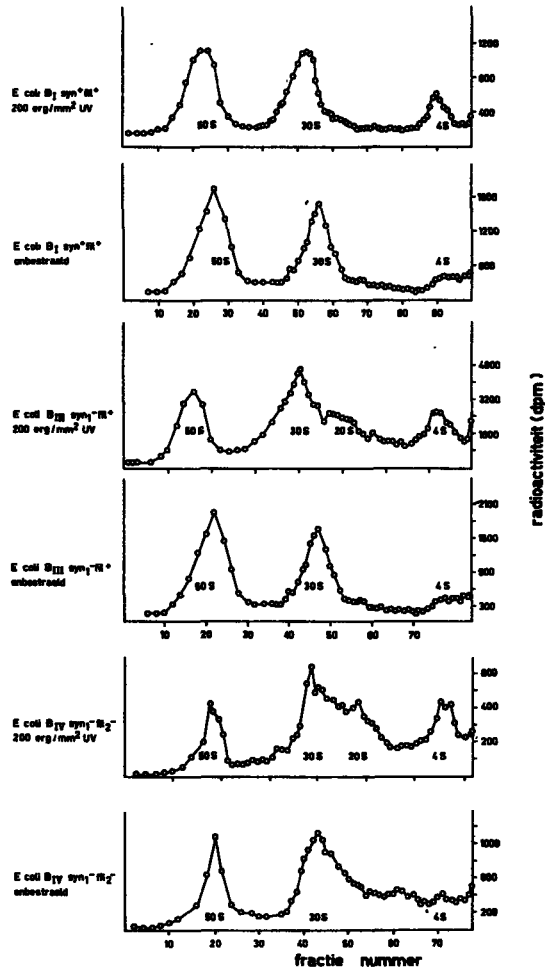
Stippellijn: absorptie bij 260 mμ, getrokken lijn: verdeling van de radioactiviteit in 0,2 N HClO₄ precipitaat.

Bovenste grafiek: onbestraalde cultuur, Onderste grafiek: cultuur bestraald met 200 erg/mm² UV.

gebied tussen 30 en 4S uit, waarbij ook ³²P in de 4S fractie wordt aangetroffen. Door na een vijf minuten puls met niet radioactief fosfaat te incuberen verdwijnt de radioactiviteit uit deze 4S fractie. Ook dit 4S materiaal is dus aan een hoge "turnover" onderhevig. In een homogeen gemerkt homogenaat wordt echter wel een 4S piek aangetroffen, bestaande uit materiaal dat kennelijk niet zulk een hoge "turnover" als (30-10)S RNA heeft. Het ligt voor de hand te veronderstellen dat de 4S piek, afhankelijk van de incorporatiecondities, zowel uit boodschapper (messenger) RNA als uit oplosbaar (transfer) RNA kan bestaan.

4. Het effect van UV bestraling op het sedimentatiepatroon.

Suspensies van de stammen B₁syn⁺fil⁺, B_{III}syn⁻fil⁺ en B_{IV}syn⁻fil⁻ werden bestraald met 200 erg/mm² UV, waarna de synthese van boodschapper RNA door middel van een 5 minuten ³²P puls bestudeerd werd. In het sedimentatiepatroon werd evenals bij de onbestraalde controles, tussen de



Figuur 35.
De sedimentatie van de radioactiviteit in homogenaten van E.coli B waarin gedurende 5 minuten incorporatie van ^{32}P , gevolgd door 20 minuten incorporatie van niet radioactief fosfaat heeft plaats gehad.

30S en 4S radioactiviteit aangetroffen. Voor de B_{III} stam wordt dit in Fig. 34 geïllustreerd.

Een stralingseffect op het sedimentatiepatroon werd pas duidelijk waargenomen indien na bestraling van de culturen de ³²P puls gevolgd werd door een 20 minuten durende incubatie in niet radioactief fosfaat. De resultaten van deze experimenten worden in Fig. 35 weergegeven. In alle gevallen werd na bestraling een ophoping van radioactief materiaal in de 4S fractie gevonden. Bovendien wordt in de syn⁻ stammen aan de rechterkant van de 30S piek een schouder met een sedimentatieconstante van ca. 20S aangetroffen¹⁾. Het verschijnen van deze schouder blijkt ten koste te gaan van de 50S piek die in bestraalde culturen verhoudingsgewijs kleiner is dan in onbestraalde culturen.

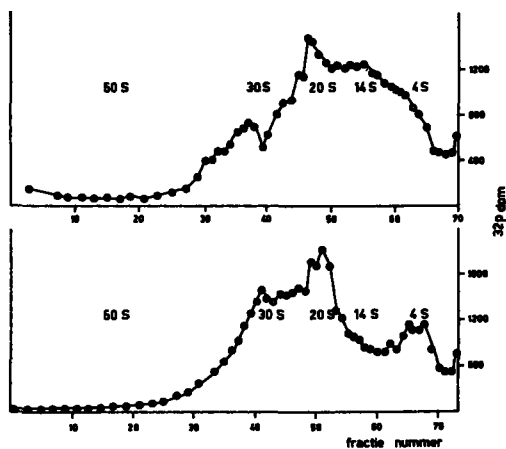
5. Het effect van chlooramfenicol op het sedimentatiepatroon.

Een logaritmisch groeiende cultuur van de stam B_I in TRIS-10P medium werd gedurende 5 minuten met 500 µg/ml ³²PO₄^{'''} in aanwezigheid van 50 µg/ml chlooramfenicol gefnecubeerd. In een volgend experiment werd na de 5 minuten ³²P puls nog gedurende 30 minuten met overmaat niet radioactief fosfaat in aanwezigheid van het antibioticum doorgekweekt. De sedimentatiepatronen van celvrije extracten van deze culturen worden in Fig. 36 weergegeven. De incorporatie van ³²P in de (30-10)S RNA fractie wordt klaarblijkelijk evenals door UV bestraling, niet gehinderd. Ook hier komt een duidelijk effect pas tot uiting indien de migratie van de radioactiviteit naar de 30S en 50S ribosomenfractie bestudeerd wordt. Onder invloed van chlooramfenicol accumuleert de radioactiviteit, behalve in de 4S fractie, zeer sterk in een 20S fractie, terwijl bij de gebruikte concentratie van het antibioticum 50S ribosomen in het geheel niet gevormd worden.

6. Samenvatting en conclusies.

Door bestraling van een syn⁺ stam met 200 erg/mm² UV wordt de synthese van DNA en RNA niet sterker geremd dan de groei (dat is de vermeerdering van het celmateriaal in mg drooggewicht). Daarentegen vindt na bestraling met deze dosis wel een sterk verminderde synthese van het adaptieve enzym β galactosidase plaats. Door fractionering van een celvrij extract van met UV behandelde bacteriën wordt echter ook een invloed op het RNA metabolisme van de cel waarneembaar. Onmiddellijk na bestraling wordt ³²P wel in een laagmoleculaire RNA fractie gefnecorporeerd, maar de migratie van deze radioactiviteit vindt niet meer zoals in onbestraalde culturen, voor 100% naar de zogenaamde ribosomenfracties plaats. In dit opzicht vertoont het effect van UV bestraling enige overeenkomst met het effect van incubatie met chlooramfenicol. Deze overeenkomst is in syn⁻ stammen sprekender dan in syn⁺ stammen omdat in syn⁺ stammen uitsluitend een accumulatie van radioactiviteit in een 4S component waargenomen wordt, terwijl

1) De sedimentatieconstanten van pieken tussen 30 en 4S werden door Ir. A. Edelman door interpolatie, volgens de door Nomura c.s. (1960) aangegeven methode, berekend.



Figuur 36.

De sedimentatie van de radioactiviteit in een *E. coli* B homogenaat bereid uit culturen waarin de incorporatie van ^{32}P in aanwezigheid van $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ chlooramfenicol heeft plaats gehad.

Bovenste grafiek: verdeling bij 5 min ^{32}P puls, Onderste grafiek: verdeling bij 5 min ^{32}P puls gevolgd door 20 minuten incuberen in niet radioactief medium.

in syn⁻ stammen zich bovendien een 20S component ophoopt, zoals ook bij chlooramfenicol behandeling in sterke mate het geval is.

Hieruit volgt dat de waargenomen ophoping van radioactiviteit in het 20 en 4S gebied van het sucrosegradiënt, ten gevolge van bestraling, waarschijnlijk geïnterpreteerd moet worden als een remming van de ribosoom-synthese.

Indien vóór UV bestraling gevormde ribosomen zelfstandig tot eiwitsynthese in staat zouden zijn, dan kunnen we begrijpen waarom UV bestraling géén sterke invloed uitoefent op de groei, maar wel op de synthese van adaptieve enzymen, waaraan waarschijnlijk "de novo" ribosoom-synthese vooraf gaat.

Ons inzicht in het mechanisme van de ribosoom-synthese is op dit ogenblik nog te gering om een ondubbelzinnige verklaring voor de hier beschreven verschijnselen te kunnen geven. Het is evenwel te verwachten dat in de nabije toekomst door het werk van andere onderzoekers zoveel feitenmateriaal over de ribosoom-synthese beschikbaar zal komen, dat hieruit een verklaring voor het effect van UV bestraling op de eiwitsynthese zal kunnen worden afgeleid.

HOOFDSTUK V

HET GENETISCHE KARAKTER VAN DE STRALINGSGEVOELIGHEID.

1. Inleiding.

Evenals bij hogere organismen denkt men zich de erfelijke eigenschappen bij bacteriën op chromosomen gerangschikt.

Het bewijs dat deze erfelijke eigenschappen aan een stoffelijke structuur, en wel het DNA, gebonden zijn, werd door Avery en medewerkers in 1944 aan de hand van de bekende transformatie-experimenten met pneumokokken geleverd. Dankzij de ontdekking van de recombinatie-verschijnselen bij bacteriën door Tatum en Lederberg in 1947, kan men thans ook tussen verschillende bacteriestammen een uitwisseling van erfelijke eigenschappen bewerkstelligen op een wijze, die enige overeenkomst vertoont met het kruisen van mannelijke en vrouwelijke individuen bij hogere organismen. Aan de hand van recombinatie-experimenten heeft men ook voor bacteriën een chromosoomkaart (Eng.: linkage map) kunnen opstellen.

Men onderscheidt thans bij bacteriën twee verschillende typen "mannelijke" cellen, die resp. als F^+ en Hfr worden aangeduid¹⁾. Cellen van een F^+ stam bevatten in hun cytoplasma een deeltje, het zg. F episoom. Bij contact (= conjugatie) met een F^- cel, dat is een cel waarin dit deeltje niet voorkomt, kan deze F factor daarop worden overgedragen. Men meent dat het F episoom in sommige cellen in staat is zich aan het bacteriechromosoom te hechten, waardoor tijdens een conjugatie een gedeelte van dit chromosoom naar de F^- cel wordt overgebracht. Dit chromosoomgedeelte van de F^+ cel kan met het chromosoom van de F^- cel recombineren, waardoor een nieuwe combinatie van erfelijke eigenschappen ontstaat.

In cellen van een Hfr stam (Hfr is een afkorting voor High frequency of recombination) heeft het F episoom zijn cytoplasmatische karakter verloren en zich permanent op één bepaalde plaats aan het bacteriechromosoom gehecht. Het verschil tussen F^+ en Hfr stammen blijkt uit het verschil in efficiëntie waarmee bepaalde kenmerken bij de conjugatie worden overgedragen. In een cultuur van een F^+ stam kan het F episoom zich in alle cellen op verschillende plaatsen aan het chromosoom hechten, zodat elke conjugerende F^+ cel een ander chromosoomgedeelte op de aanwezige F^- cellen zal overdragen. De totaal waargenomen overdracht van een zeker kenmerk (Eng.: marker) in een gemengde populatie van F^+ en F^- cellen is hierdoor zeer laag. In een cultuur van een Hfr stam daarentegen bevindt in alle Hfr cellen de F factor zich in dezelfde positie. Hierdoor dringt steeds één bepaald gedeelte van het chromosoom van de Hfr cel, de zg. "kop" (Eng.: origin), als eerste een F^- cel binnen. De positie van deze kop ten opzichte van de andere kenmerken is karakteristiek voor een be-

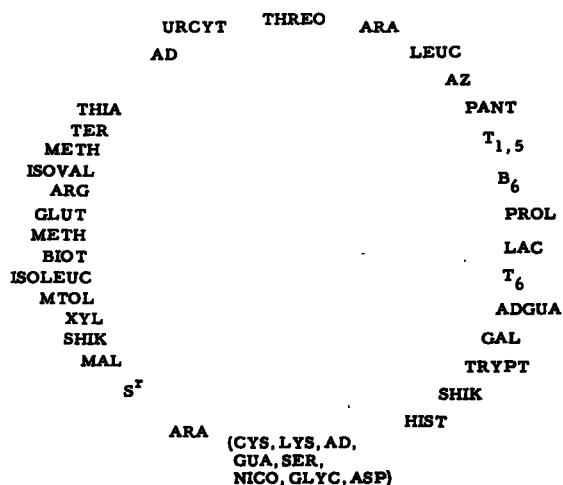
1) Voor een literatuur overzicht zie Adelberg, 1960.

paalde Hfr stam. Het vergt tenminste 90 minuten voordat het gehele chromosoom van een Hfr cel in een F⁻ cel is opgenomen. Tijdens dit transport kan de conjugatie voortijdig door een natuurlijke oorzaak of door een kunstgreep (heftig schudden) onderbroken worden. De kans dat een zeker kenmerk van de Hfr stam in de F⁻ stam doordringt, hangt dus af van de afstand van dit kenmerk tot de kop van het Hfr chromosoom. Hieruit volgt dat met een bepaalde Hfr stam zeer bepaalde kenmerken met zeer hoge frequentie en andere kenmerken met een lage frequentie zullen worden overgedragen.

Door tijdens een Hfr x F⁻ conjugatie het tijdstip te bepalen waarop elk kenmerk van de Hfr stam de F⁻ cel binnendringt, heeft men de volgorde van een groot aantal kenmerken op het bacteriechromosoom van *E. coli* K12 kunnen vaststellen. Hierbij is gebleken dat deze in een lineaire volgorde op slechts één enkel chromosoom gerangschikt zijn. Op grond van de onderlinge ligging van deze kenmerken moet aan dit bacteriechromosoom een cirkelvormige structuur worden toegekend. Men stelt zich voor dat de cirkelvorm onder bepaalde omstandigheden, b.v. tijdens een conjugatie, verbroken kan worden. Fig. 37 geeft de volgorde van de kenmerken, voor zover deze thans voor *E. coli* K 12 bekend is, weer (Jacob & Wollman, 1958). In dit schema zijn uitsluitend die kenmerken opgenomen die voor onze experimenten met *E. coli* B van belang zijn. Zo zijn b.v. alle profaagloci van *E. coli* K 12 weggelaten. Het chromosoom van *E. coli* B zelf is veel minder goed bekend dan van *E. coli* K 12 omdat slechts één onderzoeker (de Haan, 1954, 1957) conjugatie-experimenten met *E. coli* B heeft uitgevoerd. Het is evenwel te verwachten dat de onderlinge ligging van de in fig. 37 weergegeven kenmerken voor beide stammen in grote trekken gelijk zal zijn. De volgorde van de door de Haan bestudeerde loci in *E. coli* B komt in ieder geval overeen met de volgorde van de gelijknamige loci in *E. coli* K 12. Ook de volgorde van de loci in *Salmonella typhimurium* (Hartman, 1957) komt overeen met de volgorde in *E. coli*. Te verwachten is dat de chromosoomkaarten van alle Enterobacteriaceae een grote overeenkomst zullen vertonen.

Het fil⁻ kenmerk in de stam *E. coli* B_{II} en het syn⁻ kenmerk in de stam B_{III} zijn ongetwijfeld erfelijke eigenschappen. Toch volgt uit het feit dat de stralingsgevoeligheid van een bacterie erfelijk is niet zonder meer dat het chromosoom van die bacterie een aantal loci bevat die corresponderen met factoren die de stralingsgevoeligheid bepalen. Er zijn erfelijke factoren bekend die zg. cytoplasmatisch bepaald zijn. Eén voorbeeld hiervan is de reeds genoemde F factor. Dit is een erfelijke eigenschap gebonden aan een episoom dat zich onafhankelijk van het bacteriechromosoom kan gedragen en vermeerderen (voor een literatuur overzicht zie Sneath, 1962). Een ander voorbeeld zien wij bij de protozoën van het geslacht *Paramecium*, die soms zg. kappa-deeltjes bevatten die zelf-duplicerend zijn (voor een literatuur overzicht zie Sonneborn, 1959). Van de meeste bij bacteriën bestudeerde erfelijke eigenschappen is echter bekend dat daarmee op het chromosoom gelegen loci corresponderen. Het lag dus voor de hand allereerst naar een eventuele genetische samenhang van de syn en fil eigenschap met reeds bekende loci te zoeken.

De eenvoudigste manier om de onderlinge ligging van erfelijke eigenschappen op het bacteriechromosoom vast te stellen is, door tijdens een Hfr x F⁻ kruising het tijdstip waarop en de volgorde waarin, de kenmerken



Figuur 37.

Chromosoomkaart van *E. coli* K 12. Gebruikte afkortingen der kenmerken: leuc: leucine; ara: arabinose; threo: threonine; urcyt: uracil/cytosine; ad: adenine; thia: thiamine; ter: terramycine-resistentie; meth: methionine; isoval: isovaline; arg: arginine; glut: glutaminezuur; biot: biotine; isoleuc: isoleucine; mtol: mannitol; xyl: xylose; shik: shikiminezuur; mal: maltose; S⁺: streptomycine-resistentie; cys: cysteine; lys: lysine; gua: guanine; ser: serine; nico: nicotinezuur; glyc: glycine; asp: asparaginezuur; hist: histidine; trypt: tryptofaan; gal: galactose; adgua: adenine/guanine; T₆: resistentie tegen bacteriofaag T₆; lac: lactose; prol: proline; B₆: vitamine B₆; T_{1,5}: resistentie tegen bacteriofaagen T₁ en T₅; pant: pantotheenzuur; az: azideresistentie.

van de Hfr stam de F⁻ bacterie binnendringen, te bepalen. Bij het onderhavige onderzoek waren wij echter aangewezen op het gebruik van E. coli B, een stam waarvan geen Hfr stammen en slechts een beperkt aantal F⁺ stammen bekend zijn. Door Dr. P. G. de Haan (Laboratorium voor Microbiologie der Rijksuniversiteit te Utrecht) werd ons een dergelijke E. coli B F⁺ stam (No. 1287, 'rypt⁻', hist⁻) ter beschikking gesteld. Van deze stam werd met succes gebruik gemaakt. Bovendien werd een andere F⁺ mutant van E. coli B geïsoleerd (MBLCB 88, citrul⁻, leuc⁻, syn⁻, fil⁺) door opnieuw een F episoom van een K 12 stam (No. 5832) op een stralingsgevoelige mutant (syn⁻) over te brengen.

2. Het isoleren van mutanten van E. coli B.

Na conjugatie van twee bacteriestammen met verschillende kenmerken moet men de gevormde recombinanten kunnen antonen. De uitvoerbaarheid van het experiment hangt af van de mogelijkheden om bepaalde erfelijke eigenschappen in bacteriën te herkennen. De ervaring leert dat gemakkelijk te hanteren kenmerken zijn:

- a) het onvermogen, een bepaalde metaboliet te synthetiseren, b.v. tryptofaan (trypt⁻ stam),
- b) het onvermogen, een bepaalde koolstofverbinding als energiebron te benutten, b.v. lactose (lac⁻ stam),
- c) resistenties tegen antibiotica, b.v. streptomycine (S^r) en kanamycine (K^r).

Door behandeling met een mutageen agens (UV bestraling, salpeterigzuur) van het wilde type - dat is dus een stam die wel een gegeven aantal metabolieten kan synthetiseren en gevoelig voor bepaalde antibiotica is - kunnen mutanten geïsoleerd worden die één van deze eigenschappen missen. Het percentage mutanten dat in een cultuur onder invloed van een mutageen agens geïnduceerd wordt, is steeds zeer gering. De mogelijkheid om een bepaalde mutant in handen te krijgen hangt dus af van het bestaan van een selectiemethode voor deze mutant. Het is duidelijk dat een selectie van mutanten, resistent tegen antibiotica, eenvoudig is. Voor mutanten die een bepaalde metaboliet niet kunnen synthetiseren (zg. auxotrofe mutanten), is het probleem minder eenvoudig. Hiervoor is men aangewezen op de penicillinemethode van Lederberg & Zinder (1948) en Davis (1948). Penicilline remt selectief de celwandsynthese. Onder invloed van penicilline sterven daarvoor gevoelige bacteriën door lysis. Bacteriën die niet groeien, kunnen evenwel onder invloed van penicilline niet lyseren en zijn dus ongevoelig voor het antibioticum. Wordt dus een cultuur van cellen van het wilde type, die enkele auxotrofe mutanten bevat, met penicilline geïncubeerd zonder dat de voor de auxotrofe mutanten noodzakelijke metabolieten aanwezig zijn, dan lyseren de cellen van het wilde type wel en de auxotrofe mutanten niet. Er vindt dus een relatieve verrijking aan mutanten in de cultuur plaats. Bij het toepassen van deze methode heeft men steeds met tweeërlei moeilijkheden te kampen:

- a) een groot aantal cellen van het wilde type ontsnapt aan de penicilline-behandeling. De ervaring leert dat in een cultuur onder de proefomstandigheden steeds 0,01% van de cellen van het wilde type een penicilline-behandeling overleeft. Wanneer b.v. in een cultuur van 10⁷ cellen één

mutant geïnduceerd wordt, dan bevat deze na de behandeling nog steeds 1000 cellen van het wilde type tegen 1 mutant.

- b) tijdens de penicillinebehandeling komt door lysis van cellen van het wilde type een grote hoeveelheid bacteriemateriaal vrij, waarvan bepaalde bestanddelen door de auxotrofe mutanten voor groei gebruikt kunnen worden. In dichte bacteriesuspensies kunnen dus ook de auxotrofe mutanten gaan groeien, die dan eveneens gevoelig voor penicilline worden. De penicillinebehandeling schiet aan zijn doel voorbij.

Om deze moeilijkheden te ondervangen werden door Adelberg & Wyers (1953) en door Gorini & Kaufman (1960) twee verschillende wijzigingen in de oorspronkelijke methode van Lederberg & Zinder aangebracht. Beide wijzigingen werden door ons beproefd.

De belangrijkste, door Adelberg & Wyers aangebrachte, wijziging is dat de selectie niet in vloeibaar medium, maar op een vaste voedingsbodem wordt uitgevoerd. De praktische uitvoering verloopt als volgt:

In een petrischaal wordt een 5 ml M₉-agarlaag aangebracht. Hierop wordt 1 ml van een bacteriesuspensie die met een 1000 erg/mm² bestraald is en die vóór bestraling ca. 10⁷ cellen bevatte, gepipeteerd en gemengd met 10 ml M₉-agar. Zodra deze laag gestold is wordt hierover ter bescherming nog een 5 ml M₉-agarlaag gegoten. De petrischaal wordt vervolgens gedurende 7 uur bij 37° C geïncubeerd. De door bestraling geïnduceerde mutanten kunnen in deze periode tot fenotypische expressie komen en de niet gemuteerde bacteriën groeien tot een micro-kolonie uit. Daarna wordt een vierde, 5 ml M₉-agarlaag met 3000 eenheden/ml penicilline bovenop de andere gegoten. De petrischaal wordt dan gedurende 18 uur bij 40° C bewaard om de penicilline door alle agarlagen te doen diffunderen. Vervolgens wordt de petrischaal gedurende 24 uur bij 37° C geïncubeerd in welke periode dus de eigenlijke selectie plaats vindt. Daarna wordt de penicilline verwijderd door een vijfde 5 ml M₉-agarlaag met 1000 eenheden/ml penicillinase (K. N. G. & S. F.) aan te brengen en gedurende 48 uur te incuberen. Na deze periode verschijnen op de plaat kolonies die afkomstig zijn van cellen van het wilde type die de penicillinebehandeling overleefd hebben. Deze kolonies worden op de achterkant van de plaat met een in'tstip gemerkt. Tenslotte wordt dan een agarlaag aangebracht waarin zich de voor de groei van auxotrofe mutanten benodigde stoffen, b.v. een mengsel van aminozuren, vitaminen of purines en pyrimidines, bevinden. Nadat de plaat voor de laatste maal gedurende 24 uur bij 37° C geïncubeerd is, worden de dan verschenen kolonies overgeënt en op hun eigenschappen onderzocht.

Deze methode werd met succes toegepast. Een twintigtal auxotrofe mutanten kon op deze wijze geïsoleerd worden. Het aantal mutanten met verschillende kenmerken dat zo geïsoleerd kon worden bleek evenwel beperkt te zijn. Steeds werden grote aantallen van hetzelfde type mutaties gevonden, nl. arg⁻, hist⁻ en meth⁻. Toch werden op deze wijze ook threo⁻, tyr⁻, ad⁻, ser⁻, lac⁻ en ara⁻ mutanten geïsoleerd.

Volgens het voorschrift van Gorini & Kaufman (1960), dat is de tweede variant van de methode volgens Lederberg & Zinder, wordt de selectie met penicilline weer in vloeibaar milieu uitgevoerd. Dit medium bevat bovendien 20% sucrose, waarin de cellen onder invloed van penicilline niet lyseren maar in zg. sferoplasten worden omgezet. Hierdoor voorkomt men dat zich tijdens de penicillinebehandeling bacteriemateriaal door het medium ver-

spreadt dat auxotrofe mutanten voor groei zouden kunnen gebruiken. Bovendien wordt bij deze werkwijze reeds vóór de behandeling met penicilline een selectie toegepast. Men tracht bij iedere ophoping slechts één bepaalde mutant in handen te krijgen waardoor volgens Gorini & Kaufman het succes vergroot wordt. Dit bereikt men door een met een mutageen agens behandelde cultuur eerst in een vloeibaar synthetisch medium te incuberen waaraan slechts één organische verbinding - veronderstel de stof A - toegevoegd is; dat is dan die stof die de gezochte mutant (A^-) niet zelf synthetiseren kan. Op deze wijze selecteert men dus reeds één type auxotrofe mutant uit. Stel dat men een mutant zoekt die de stof A voor groei nodig heeft, dan verloopt de procedure volgens Gorini & Kaufman als volgt:

5 ml M_9 cultuur met ca. 10^8 cellen/ml wordt bestraald met 1000 erg/mm², verdund in vers M_9 medium met 0,025% glucose en 50 µg/ml A en gedurende 18 uur in een waterbad bij 37° C onder schudden geïncubeerd. Door daarna 5 ml van deze cultuur af te centrifugeren, te wassen met M_9 en op te nemen in 1 ml M_9 wordt de stof A verwijderd. 0,1 ml van deze suspensie wordt gemengd met 5 ml M_9 met 0,1% glucose, 20% sucrose en 0,01 M $MgSO_4$. Deze suspensie wordt 1 à 3 uur geïncubeerd tot de bacteriemassa ongeveer verdubbeld is. In deze tijd verbruiken de mutanten al het intracellulair aanwezige A op. Nadat penicilline tot een eindconcentratie van 2000 eenheden/ml is toegevoegd wordt in de stoof zonder schudden (om de gevormde fragiele sferoplasten niet te vernielen) geïncubeerd tot de vorming van sferoplasten microscopisch juist is vast te stellen. De cultuur wordt gekoeld tot 0° C, afgecentrifugeerd en opgenomen in M_9 . In dit stadium lysiseren de sferoplasten, gevormd uit cellen van het wilde type. Deze suspensie wordt op peptonagarplaten uitgestreken, waarvan na een nacht incuberen losliggende kolonies worden overgeënt en op hun eigenschappen onderzocht. 80% van de in tabel VIII vermelde mutanten is met behulp van deze methode geïsoleerd. In de loop van het onderzoek werd evenwel een modificatie aangebracht. Na de penicillinebehandeling werd de suspensie niet meer direct op agarplaten uitgestreken maar weer overgeënt in 200 ml vers M_9 medium met 0,025% glucose en 50 µg/ml A en gedurende 18 uur bij 37° C geïncubeerd. Van deze cultuur werd opnieuw 5 ml aan een penicillinebehandeling onderworpen. Door deze bewerking te herhalen wordt de verhouding mutant/cellen van het wilde type gunstig beïnvloed, hetgeen het opsporen van de mutanten na de penicillinebehandeling vergemakkelijkt.

Zowel in het oorspronkelijke voorschrift van Adelberg & Wyers als in het voorschrift van Gorini & Kaufman wordt UV bestraling als mutageen agens aanbevolen. Hieraan kleven twee bezwaren:

- a) Bij bestraling van het wilde type (stam B_I) wordt gemakkelijk een (spontane) resistente stam van het fil^- type opgehoopt. In een aantal gevallen werd uitgaande van een fil^+ stam na UV bestraling en daarop volgende behandeling met penicilline een auxotrofe fil^- stam geïsoleerd.
- b) Door de grote gevoeligheid van de stam B_{III} syn^- voor ultraviolet licht is het onmogelijk langs deze weg een auxotrofe B_{III} mutant in handen te krijgen.

Dr. B. W. Holloway (University of Melbourne) wees in 1961 op de mogelijkheid om $MnCl_2$ als mutageen agens toe te passen. In tegenstelling tot UV bestraling zou deze stof geen letale nevenwerking vertonen. De praktische uitvoering van de methode volgens Holloway verloopt als volgt:

Tabel VIII
MUTANTEN VAN E.COLI B

syn ⁺ fil ⁺	syn ⁺ fil ⁻	syn ⁻ fil ⁺
MBLCB 25 threo ₁ ⁻	MBLCB 26 leuc ₁ ⁻	MBLCB 21 citrul ₁ ⁻
27 hist ₂ ⁻	30 citrul ₄ ⁻	22 ser ₁ ⁻
28 hist ₂ ⁻	31 arg ₁ ⁻	23 citrul ₂ ⁻
29 citrul ₃ ⁻	32 hist ₄ ⁻	24 hist ₁ ⁻
38 threo ₂ ⁻	34 meth ₁ ⁻	33 citrul ₅ ⁻
39 tyr ₁ ⁻	35 meth ₂ ⁻	53 lys ₁ ⁻
56 lac ₁ ⁻	40 adgua ₁ ⁻	58 gal ₁ ⁻
76 pen ₁ ^r	41 ad ₁ ⁻	74 urcyt ₃ ⁻
78 urcyt ₂ ⁻	57 ara ₁ ⁻	60 hist ₁ ⁻ , meth ₅ ⁻
44 threo ₁ ⁻ , arg ₂ ⁻	72 urcyt ₆ ⁻	61 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻
50 threo ₁ ⁻ , isoleuc ₁ ⁻	73 urcyt ₄ ⁻	62 hist ₁ ⁻ , ind ₃ ⁻
51 tyr ₁ ⁻ , urcyt ₁ ⁻	36 citrul ₄ ⁻ , ind ₁ ⁻	63 hist ₁ ⁻ , trypt ₂ ⁻
54 threo ₁ ⁻ , isoleuc ₁ ⁻ , S ₁ ^r	42 citrul ₄ ⁻ , trypt ₁ ⁻	64 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , S ₇ ^r
55 tyr ₁ ⁻ , urcyt ₁ ⁻ , S ₂ ^r	43 leuc ₁ ⁻ , ind ₂ ⁻	65 hist ₁ ⁻ , ind ₃ ⁻ , S ₈ ^r
59 hist ₂ ⁻ , prol ₂ ⁻	45 threo ₁ ⁻ , cyst ₁ ⁻	77 hist ₁ ⁻ , meth ₅ ⁻ , S ₉ ^r
66 hist ₂ ⁻ , prol ₂ ⁻ , S ₃ ^r	46 threo ₂ ⁻ , cyst ₂ ⁻	80 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , S ₇ ^r , gal ₂ ⁻
77 tyr ₁ ⁻ , urcyt ₁ ⁻ , S ₂ ^r , gal ₆ ⁻	47 leuc ₁ ⁻ , meth ₃ ⁻	81 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , T ₁₂ ^r
85 arg ₂ ⁻ , threo ₁ ⁻ , ter ₁ ^r	48 leuc ₁ ⁻ , meth ₄ ⁻	83 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , ter ₃ ^r , T ₁₂ ^r
86 urcyt ₁ ⁻ tyr ₁ ⁻ , ter ₂ ^r	49 leuc ₁ ⁻ , cyst ₃ ⁻	98 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , K ₃ ⁻
89 urcyt ₁ ⁻ , tyr ₁ ⁻ , gal ₄ ⁻	52 meth ₁ ⁻ , prol ₁ ⁻	104 ser ₁ ⁻ , gal ₅ ⁻
90 urcyt ₁ ⁻ , tyr ₁ ⁻ , lac ₂ ⁻	68 citrul ₁ ⁻ , trypt ₁ ⁻ , S ₄ ^r	107 ser ₁ ⁻ , gal ₅ ⁻ , lys ₂ ⁻
93 threo ₁ ⁻ , isoleuc ₁ ⁻ , K ₁ ^r	69 leuc ₁ ⁻ , ind ₂ ⁻ , S ₅ ^r	82 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , isoleuc ₂ ⁻ , S ₇ ^r , gal ₂ ⁻
94 threo ₁ ⁻ , isoleuc ₁ ⁻ , K ₂ ^r	70 meth ₁ ⁻ , prol ₁ ⁻ , S ₆ ^r	84 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , isoleuc ₂ ⁻ , S ₇ ^r , gal ₂ ⁻ , xyl ₁ ⁻
95 arg ₂ ⁻ , threo ₁ ⁻ , gal ₃ ⁻	71 meth ₁ ⁻ , prol ₁ ⁻ , S ₆ ^r , lac ₃ ⁻	88 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , S ₇ ^r , gal ₂ ⁻ , (F gal ⁺)
96 arg ₂ ⁻ , threo ₁ ⁻ , gal ₃ ⁻ , T ₁₁ ^r	91 hist _h ⁻ , trypt _h ⁻ , citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , S ₇ ^r	101 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , S ₇ ^r , gal ₂ ⁻ , pen ₄ ^r , (F gal ⁺)
97 hist ₂ ⁻ , prol ₂ ⁻ , K ₃ ^r	113 leuc ₁ ⁻ , meth ₃ ⁻ , pen ₅ ^r	110 ser ₁ ⁻ , lys ₂ ⁻ , gal ₅ ⁻ , S ₁₀ ^r
99 arg ₂ ⁻ , threo ₁ ⁻ , gal ₃ ⁻ , T ₁₁ ^r , K ₅ ^r	114 hist _h ⁻ , trypt _h ⁻ , citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , S ₇ ^r , pen ₆ ^r	111 ser ₁ ⁻ , lys ₂ ⁻ , gal ₅ ⁻ , K ₇ ^r
100 citrul ₂ ⁻ , hist ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , K ₄ ^r		112 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , isoleuc ₂ ⁻ , xyl ₁ ⁻ , gal ₂ ⁻ , S ₇ ^r , K ₈ ^r
102 threo ₁ ⁻ , arg ₂ ⁻ , gal ₃ ⁻		
103 urcyt ₁ ⁻ , Tyr ₁ ⁻ , gal ₄ ⁻ , xyl ₂ ⁻		
105 urcyt ₁ ⁻ , tyr ₁ ⁻ , gal ₄ ⁻ , K ₆ ^r		
106 urcyt ₁ ⁻ , tyr ₁ ⁻ , gal ₄ ⁻ , xyl ₂ ⁻ , meth ₆ ⁻		
106 urcyt ₁ ⁻ , tyr ₁ ⁻ , gal ₄ ⁻ , xyl ₂ ⁻ , meth ₆ ⁻		
108 threo ₁ ⁻ , arg ₂ ⁻ , hist ₁ ⁻ , gal ₃ ⁻		
109 urcyt ₁ ⁻ , tyr ₁ ⁻ , meth ₆ ⁻ , ad ₂ ⁻ , gal ₄ ⁻ , xyl ₂ ⁻		
115 threo ₁ ⁻ , arg ₂ ⁻ , hist ₁ ⁻ , gal ₃ ⁻ , pen ₂ ^r		
116 urcyt ₁ ⁻ , tyr ₁ ⁻ , meth ₆ ⁻ , ad ₂ ⁻ , gal ₄ ⁻ , xyl ₂ ⁻ , pen ₃ ^r		
117 urcyt ₁ ⁻ , tyr ₁ ⁻ , meth ₆ ⁻ , ad ₂ ⁻ , gal ₄ ⁻ , xyl ₂ ⁻ , T ₁₃ ^r		
		syn ⁻ fil ⁻
		MBLCB 92 trypt _h ⁻ , citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , S ₇ ^r
		75 urcyt ₅ ⁻
		87 citrul ₂ ⁻ , leuc ₂ ⁻ , S ₇ ^r , gal ₂ ⁻ , (F gal ⁺)
		OVERIGE GEBRUIKTE MUTANTEN
		afkomstig van het Laboratorium voor Microbiologie der RU te Utrecht.
		1287 (E. coli B) hist _h ⁻ , trypt _h ⁻ , F ⁺
		609 (E. coli B) hist _h ⁻ , trypt _h ⁻ , F ⁻
		5832 (E. coli K 12) meth ⁻ , λ ^r , (F gal ⁺)
		5833 (E. coli K 12) meth ⁻ , T ₈ ^r , (F lac ⁺)

Een cultuur van ca. 10^8 cellen/ml in de stationaire fase wordt met 0,3 M NaCl gewassen en hiermee gedurende 1 uur bij 37° C geïncubeerd. Vervolgens wordt de suspensie 3 x met steriel water gewassen en daarna gedurende 1 uur in 0,1% $MnCl_2$ oplossing geïncubeerd. Het effect van deze behandeling op het aantal kolonievormende cellen in de suspensie blijkt uit Tabel IX.

TABEL IX
HET EFFECT VAN INCUBATIE MET 0,1% $MnCl_2$ OP
E. COLI B.

	stam B _I	stam B _{II}	stam B _{III}
Aantal kolonievormende cellen vóór NaCl behandeling	$2,0 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
Aantal kolonievormende cellen na 3 x wassen met water	$1,0 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
Aantal kolonievormende cellen na behandeling met 0,1% $MnCl_2$	$6,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$

Het letale effect van $MnCl_2$ is dus inderdaad gering. Met succes werden op deze manier ook van de B_{III} stam auxotrofe mutanten geïsoleerd. Alle in tabel VIII vermelde mutanten met een hoger nummer dan MBLCB 50 werden na een $MnCl_2$ behandeling volgens Holloway, gevolgd door de gewijzigde selectiemethode van Gorini & Kaufman, geïsoleerd.

3. De conjugatie.

De conjugatie wordt uitgevoerd met logaritmisch groeiende, goed geaëreerde peptonculturen. De te kruisen F^+ en F^- stammen worden daartoe afzonderlijk onder schudden bij 37° C gekweekt tot elk ca. 5×10^8 cellen/ml bevat. Dan worden 5 ml van elk van deze culturen in een Rouxfles (afmeting 12 x 20 cm) samengebracht en gedurende 30 minuten in de stoof bij 37° C geïncubeerd. Voor het conjugatieproces is energie nodig, dientengevolge is een goede zuurstofvoorziening noodzakelijk. De conjugerende cultuur kan evenwel niet door schudden geaëreerd worden omdat hierdoor het conjugatieproces langs mechanische weg voortijdig dreigt te worden onderbroken. Daarom is het noodzakelijk de cultuur in een dunne laag te incuberen.

Na 30 minuten worden de cellen afgecentrifugeerd, gewassen en opgenomen in 1 ml M_9 . Om de recombinanten te isoleren wordt uit geschikte verdunningen van deze suspensie, op zg. selectieplaten geënt. De samenstelling van deze selectieplaten is zo gekozen dat noch de F^+ stam, noch de F^- stam zelf, hierop kunnen groeien. Om tevens het optreden van ongewenste, spontane terugmutaties te controleren, worden bij elk conjugatieproces ook de daarbij betrokken F^+ en F^- stam afzonderlijk op de selectieplaten uitgestreken. Vanzelfsprekend zijn uitsluitend die recombinatie-experimenten waardevol waarbij op deze platen geen groei waargenomen wordt.

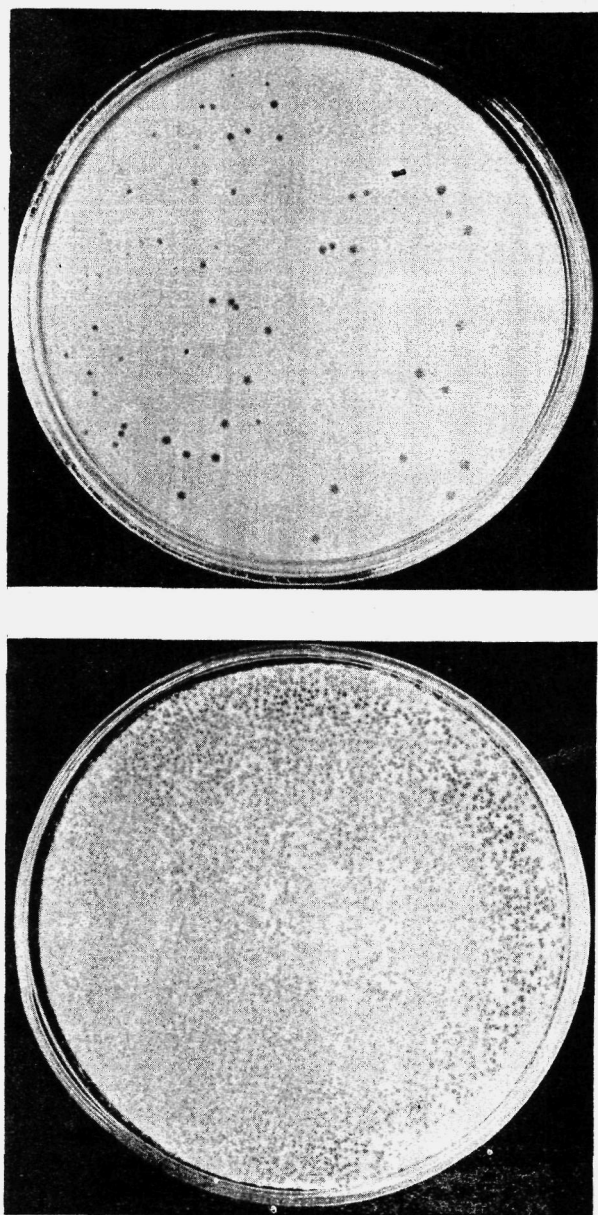
Vaak treedt op een plaat met conjugerende bacteriën een zg. syntrofe groei op. Metabolieten die door de ene stam worden uitgescheiden, kunnen

door de andere voor groei gebruikt worden. Indien de F^+ en de F^- stam elkaar op de selectieplaten op deze wijze kunnen voeden, vormen zij een bacteriediek dat kolonies van recombinanten geheel overschaduwet. In de meeste conjugatie-experimenten kunnen de selectie-kenmerken evenwel zo gekozen worden dat syntrofe groei voorkomen wordt. De ervaring leert dat syntrofe groei niet optreedt wanneer de resistentie tegen een antibioticum of een suikervergiftiging als selectiekenmerk gebruikt wordt.

Ongeveer 36 uur na de conjugatie zijn kolonies van recombinanten op de selectieplaten waar te nemen. De verdeling van de ongeselecteerde biochemische kenmerken over deze recombinanten werd met behulp van de replicatechniek van Lederberg & Lederberg (1952) bepaald.

Om grote aantallen recombinanten op het voorkomen van het fil^- kenmerk te onderzoeken, werd de volgende methode ontwikkeld. De recombinanten werden in M_9 medium met 0,025% glucose geënt en geflubeerd tot de stationaire fase was bereikt. Dit medium bevatte bovendien steeds 50 $\mu\text{g/ml}$ van de stoffen waarvoor de recombinanten een groei-behoefte vertoonden. Culturen in de stationaire fase werden overgeënt in 1 ml M_9 met 0,1% glucose en 2 $\mu\text{g/ml}$ kristalviolet. Na enige uren werden de culturen microscopisch onderzocht op het voorkomen van filamenten. In dit stadium wordt de deling van fil^+ stammen wel, van fil^- stammen niet geremd, terwijl noch in syn^+ noch in syn^- stammen een remming van de groei waargenomen wordt (zie Hoofdstuk II).

Om de verdeling van het syn^- kenmerk over de recombinanten te bepalen, werden twee methoden ontwikkeld. Aanvankelijk werd gebruik gemaakt van het feit dat na bestraling met 200 erg/mm^2 UV de groei van syn^+ stammen weinig en van syn^- stammen sterk, geremd is. Om een behoorlijk aantal stammen gelijktijdig te kunnen bestralen werden perspex platen vervaardigd waarin zich 25 uithollingen van 3 cm doorsnede, met vlak geslepen bodem, bevonden. In de uithollingen werd 0,3 ml van elke cultuur van de recombinanten in de stationaire fase gepipeteerd. Na bestraling werd van elk monster 0,2 ml in 2 ml vers M_9 medium met 0,1% glucose en 0,1% caseïnehydrolysaat overgeënt. Na 2 uur incuberen werd de groei van elke cultuur nefelometrisch bepaald en vergeleken met de groei van een bestraalde B_{1syn}^+ en $B_{1111syn}^-$ stam. Deze methode is evenwel slechts bruikbaar indien de recombinanten alle dezelfde groeisnelheid bezitten. Dit is niet het geval indien het kenmerk streptomycine-resistentie verdeeld over de recombinanten voorkomt. In het algemeen vertonen streptomycine-resistente stammen een langere generatietijd dan streptomycine-gevoelige. Daarom werd in de loop van het onderzoek deze "syn-test" vervangen door een andere, waarbij gebruik gemaakt wordt van het verschil in vermogen van syn^+ en syn^- stammen om de met UV geïnactiveerde bacteriofaag T_1 te vermenigvuldigen (zie Hoofdstuk III, paragraaf 6). 0,1 ml van een T_1 faagsuspensie met 4×10^6 infectieve deeltjes/ml geeft na bestraling met 700 erg/mm^2 UV ca. 100 plaques op een plaat met syn^- bacteriën, terwijl een plaat met syn^+ bacteriën vrijwel volledige lysis vertoont. (Zie PLAAT II). Gebruik makend van dit verschijnsel werd de volgende standaardprocedure voor deze syntest ontwikkeld. Kolonies van recombinanten worden in 1 ml peptonbouillon geënt en geflubeerd tot deze culturen ca. 10^8 cellen/ml bevatten. Dan worden 0,1 ml van de bovengenoemde bestraalde T_1 suspensie en 2 ml $\frac{1}{2}\%$ peptonagar toegevoegd. Dit mengsel wordt op een peptonplaat uitgegoten en



Plaat II.

De syn-test, uitgevoerd met bacteriofaag T_1 . Op beide platen werd een met 700 erg/mm^2 UV bestraalde faagsuspensie, die voor bestraling 4×10^5 infectieve deeltjes bevatte, uitgezaaid. Links: met stam Bjsyn⁺; rechts met stam BIII^{syn}.

tenminste 8 uur bij 37° C gefincubeerd. Daarna wordt het aantal plaques op iedere plaat vergeleken met het aantal plaques op platen met de stammen B₁syn⁺ en B₁₁₁₁syn⁻. Op deze wijze konden per dag ca. 120 recombinanten op het bezit van het syn⁻ kenmerk worden onderzocht.

4. De resultaten van F⁺ x F⁻ conjugaties.

Voor het genetische onderzoek stond ons aanvankelijk als enige F⁺ stam mutant no. 1287 (hist⁻, trypt⁻) ter beschikking. De coli B stam waaruit deze auxotrofe mutant door de Haan (1954) werd geïsoleerd, is dezelfde als die waarvan bij het hier beschreven onderzoek steeds gebruik gemaakt is (zie Hoofdstuk I, paragraaf 1 voor de herkomst van deze stam). Stam No. 1287 bleek evenwel niet meer de stralingsgevoeligheid van het wilde type (stam B₁) te bezitten. De stam vertoonde een stralingsgevoeligheid die overeen komt met die van de stam B₁₁₁, de stam vormde geen filamenten na bestraling en vertoonde een resistentie tegen kristalviolet gelijk aan die van een fil⁻ stam. Omdat de groei van 1287 na UV bestraling even sterk geremd wordt als van de B₁ stam, is 1287 dus van het type syn⁺fil⁻.

Door 1287 aan conjugatie met MBLCB 64 (syn⁻, fil⁺) te onderwerpen, kon gelijktijdig de overdracht van syn⁺ en van het fil⁻ kenmerk bestudeerd worden:

1287 F ⁺	:	citrul ⁺	leuc ⁺	S ^S	hist ⁻	trypt ⁻	syn ⁺	fil ⁻
x								
MBLCB 64 F ⁻	:	citrul ⁻	leuc ⁻	S ^r	hist ⁺	trypt ⁺	syn ⁻	fil ⁺

Na 30 minuten contact werden recombinanten geselecteerd op

- M₉ agar met leucine, histidine, tryptofaan en streptomycine,
- M₉ agar met citrulline, histidine, tryptofaan en streptomycine.

Bij selectie (a) waren alle recombinanten dus noodzakelijk S^r en citrul⁺. De verdeling van de ongeselecteerde kenmerken over de onderzochte recombinanten was:

leuc ⁺	hist ⁺	trypt ⁺	57
leuc ⁻	hist ⁺	trypt ⁺	39
leuc ⁺	hist ⁺	trypt ⁻	1
leuc ⁻	hist ⁺	trypt ⁻	3

Alle recombinanten bleken van het type syn⁻ te zijn. Van de 58 leuc⁺ recombinanten waren 51 fil⁺ en 7 fil⁻. Van de 42 leuc⁻ recombinanten waren 31 fil⁺ en 11 fil⁻.

Van de 100 recombinanten waren dus in totaal 82 van het fil⁺ type en 18 van het fil⁻ type.

De verdeling van ongeselecteerde kenmerken over de recombinanten van selectie (b) was:

citrul ⁺	hist ⁺	trypt ⁺	42
citrul ⁻	hist ⁺	trypt ⁺	56
citrul ⁻	hist ⁺	trypt ⁻	2

Alle recombinanten bleken wederom van het syn⁻ type te zijn. Van de 42 citrul⁺ recombinanten waren 24 fil⁺ en 18 fil⁻, van de 58 citrul⁻ waren 44 fil⁺ en 14 fil⁻.

Van de 100 recombinanten waren dus in totaal 68 van het fil^+ type en 32 van het fil^- type.

Deze resultaten suggereren dat tenminste de fil eigenschap door middel van conjugatie van de ene op de andere bacterie over te dragen is. Bij deze conjugatie heeft geen overdracht van de syn^+ eigenschap van de F^+ stam plaats gehad.

Door de F^+ stam is het $hist^-$ en $trypt^-$ kenmerk niet of slechts in een gering aantal gevallen op de op bovengenoemde wijze geselecteerde recombinanten overgedragen. Dat ook geen enkele recombinant het syn^+ kenmerk bevatte, kan twee oorzaken hebben:

- a) het syn kenmerk is niet een chromosomaal bepaalde factor,
- b) het syn kenmerk is gelocaliseerd in dat gebied van het chromosoom (bv. in de nabijheid van het $hist$ kenmerk), waarin in het voorgaande experiment geen recombinatie werd aangetoond.

Om hierover uitsluitsel te krijgen werd de volgende conjugatie uitgevoerd:

1287 F^+	:	$citrul^+$	$leuc^+$	S^S	$hist^-$	$trypt^-$	gal^+	syn^+
x								
MBLCB 80 F^-	:	$citrul^-$	$leuc^-$	Sr	$hist^+$	$trypt^+$	gal^-	syn^-

Uitgaande van de veronderstelling dat de volgorde van de kenmerken van deze stammen op het chromosoom overeenkomt met het in fig. 37 weergegeven schema, zou door selectie op streptomycine resistentie (F^- kenmerk) en op galactose $^+$ (F^+ kenmerk), recombinanten gevonden moeten worden waarbij recombinatie in de omgeving van het $hist$ kenmerk heeft plaats gehad. De verdeling van de ongeselecteerde kenmerken over 97 recombinanten was bij deze selectie:

25	$hist^+$	$trypt^+$	$citrul^-$	$leuc^-$,	waarvan 20 syn^- en 5 syn^+
58	$hist^+$	$trypt^-$	$citrul^-$	$leuc^-$,	waarvan 50 syn^- en 8 syn^+
4	$hist^-$	$trypt^-$	$citrul^-$	$leuc^-$,	waarvan 1 syn^- en 3 syn^+
10	overige combinaties			,	waarvan 7 syn^- en 3 syn^+

Het blijkt dus dat de syn^+ eigenschap wel degelijk door middel van conjugatie kan worden overgedragen.

5. De resultaten van ($F gal^+$) gal^- x F^- conjugaties.

Daar bij de in de vorige paragraaf beschreven experimenten gebleken was, dat de fil^- en syn^+ kenmerken van een F^+ stam op een F^- stam konden worden overgedragen, moest ook de reciproke overdracht mogelijk zijn indien althans de syn en fil factor chromosomaal bepaalde erfelijke eigenschappen zijn. Om de overdracht van een fil^+ en syn^- kenmerk uit een F^+ naar een F^- te kunnen bestuderen, was het echter noodzakelijk een F factor in een syn^-fil^+ stam te incorporeren.

Alle pogingen om de F factor van de *E. coli* K 12 stam W 1177 F^+ volgens de door de Haan (1954) beschreven methode op een MBLCB mutant over te dragen, bleven evenwel zonder succes. De oorzaak hiervan is waarschijnlijk gelegen in het feit dat de episoomoverdracht van een K 12 naar een B stam met zeer lage frequentie plaats vindt. Door het ontbreken van een selectiemethode is de overdracht van het F episoom moeilijk aan te tonen. Dat een stam een F episoom bezit kan uitsluitend blijken uit zijn vermogen om met een F^- bacterie te conjugeren. Indien in een cultuur dus slechts

weinig F⁺ bacteriën naast veel F⁻ bacteriën voorkomen, dan kunnen deze slechts gevonden worden door een groot aantal bacteriën afzonderlijk op hun vermogen tot conjugatie te onderzoeken. Door Dr. P.G. de Haan werd evenwel een andere K 12 stam ter beschikking gesteld (No. 5832, meth⁻ λ^r S^S) waarvan de cellen een episoom bezitten waarop zowel een F factor als een gal⁺ kenmerk voorkomt. Van dit gal kenmerk kan men gebruik maken om de overdracht van het episoom en de daarmee gepaard gaande overdracht van de F factor, aan te tonen. Dit blijkt uit het volgende experiment.

Peptonculturen van stam No. 5832 en MBLCB 80 (citrul⁻, leuc⁻, S^r, gal⁻, syn⁻, fil⁺, F⁻) werden gedurende 15 minuten met elkaar in contact gebracht en vervolgens op M₉ agarplaten met citrulline, leucine, streptomycine en galactose (i. p. v. glucose) uitgestreken. Noch de K 12 stam, die streptomycine-gevoelig is, noch de stam MBLCB 80, die galactose niet als koolstofbron kan gebruiken, kunnen op dit medium groeien. Toch werd op een plaat, waarop van elke stam ca. 10⁶ cellen geënt waren, een duizendtal kolonies aangetroffen; 55 van deze recombinanten werden op hun eigenschappen onderzocht; 54 bleken citrul⁻ en leuc⁻ te zijn, 1 was citrul⁺ en leuc⁺. Alle stammen waren van het syn⁻ type; van de 54 citrul⁻, leuc⁻ stammen waren 53 van het fil⁺ type en 1 van het fil⁻ type. Deze fil⁻ stam (MBLCB 87) en één van de fil⁺ stammen (voortaan aangeduid als MBLCB 88) werden op hun vermogen tot conjugatie met MBLCB 97 F⁻ onderzocht:

MBLCB 88 : citrul⁻ leuc⁻ K^S S^S hist⁺ gal⁻ (gal⁺F⁺) prol⁺ syn⁻

x
MBLCB 97 F⁻ : citrul⁺ leuc⁺ K^r S^S hist⁻ gal⁻ prol⁻ syn⁺

Zowel met MBLCB 87 als met MBLCB 88 werden bij selectie op prol⁺ en K^r, recombinanten gevonden. Na twaalf maal overenten bleken deze stammen nog steeds tot conjugatie met een F⁻ stam in staat. Ze kunnen dus inderdaad als stabiele F⁺ stammen beschouwd worden. In het conjugatie experiment met MBLCB 88 en 97 waren alle recombinanten hist⁺, 3 van de 40 citrul⁻, 6 van de 40 leuc⁻ en alle van het syn⁺ type.

Een overdracht van het syn⁻ kenmerk werd echter wel gevonden bij de kruising:

MBLCB 88 F⁺ (gal⁺) : citrul⁻ leuc⁻ S^r hist⁺ trypt⁺ syn⁻ fil⁺

x
609 F⁻ : citrul⁺ leuc⁺ S^S hist⁻ trypt⁻ syn⁺ fil⁻

Bij een selectie van leuc⁺, trypt⁺ recombinanten bleek zowel een overdracht van het syn⁻ als van het fil⁺ kenmerk waar te nemen. Van de 39 onderzochte recombinanten waren:

24	citrul ⁺	S ^S	hist ⁻	trypt ⁺ ,	waarvan	23	syn ⁺	fil ⁻	en	1	syn ⁻	fil ⁺
1	citrul ⁺	S ^S	hist ⁺	trypt ⁺	is		syn ⁺	fil ⁻				
9	citrul ⁺	S ^r	hist ⁺	trypt ⁺ ,	waarvan	3	syn ⁺	fil ⁻	en	3	syn ⁻	fil ⁺
					en	2	syn ⁺	fil ⁺	en	1	syn ⁻	fil ⁻
5	citrul ⁻	S ^r	hist ⁺	trypt ⁺ ,	waarvan					4	syn ⁻	fil ⁺
					en					1	syn ⁻	fil ⁻

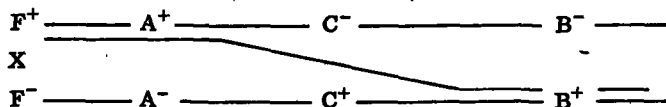
Hiermede is dus bewezen dat zowel het syn⁺ als het syn⁻ kenmerk, evenals het fil⁺ en het fil⁻ kenmerk door conjugatie kan worden overgedragen. Hieruit volgt dat fil en syn chromosomaal bepaalde factoren zijn.

Hoewel uit de experimenten nog niet blijkt waar het syn kenmerk (of het fil kenmerk) op het chromosoom ligt, kan toch reeds gewezen worden op het feit dat, zodra streptomycine resistentie door conjugatie wordt overgedragen, ook de overdrachtsfrequentie van het syn kenmerk stijgt. Er is geen volledige koppeling met het streptomycineresistentie-locus waargenomen. Toch suggereren de resultaten dat het syn kenmerk in de nabijheid van dit resistentie kenmerk gezocht zal moeten worden.

6. De plaats van het syn kenmerk op het chromosoom.

De *E. coli* B mutant MBLCB 84 ($leuc^-$, $citrul^-$, $isoleuc^-$, xyl^- , S^r , gal^- , syn^-) bezit tenminste twee kenmerken (xyl^- en gal^-) die volgens het in fig. 37 weergegeven schema in de nabijheid van het streptomycineresistentie-kenmerk liggen. Van deze stam kan dus gebruik gemaakt worden om recombinaties in dit gebied te bestuderen. Het bleek door conjugatie met de stam 1287 mogelijk de plaats van het syn kenmerk op het chromosoom te bepalen. Hierbij is uitgegaan van de volgende veronderstellingen:

- de volgorde van de bij deze conjugatie betrokken kenmerken $leuc$, $isoleuc$, xyl , S^r , $hist$, $trypt$, gal op het chromosoom van *E. coli* B komt overeen met de voor *E. coli* K 12 in fig. 37 weergegeven volgorde.
- de overdrachtsfrequentie van een kenmerk C^- op het chromosoom van de F^+ , gelegen tussen twee selectie kenmerken A en B,



is evenredig met de afstand tot B en omgekeerd evenredig met de afstand tot A.

Hoewel niet alle hier gebruikte kenmerken bij het door de Haan (1957) verrichte onderzoek betrokken zijn geweest, is de onder (a) genoemde veronderstelling op grond van de experimentele resultaten van deze onderzoeker met *E. coli* B, aanvaardbaar. Bovendien houden de resultaten van het hierna te beschrijven onderzoek op zich een bevestiging van deze veronderstelling in.

De geldigheid van het onder (b) genoemde principe is voor de bacteriegenetica minder evident dan voor de klassieke genetica omdat de frequentie waarmede kenmerken worden overgedragen, niet alleen afhankelijk is van de frequentie waarmede recombinatie tussen de chromosomen plaats vindt, maar ook van de grootte van het door de F^- bacterie opgenomen chromosoom van de F^+ . We kunnen dit het best aan de hand van een model demonstreren. Veronderstel dat bij de bovengenoemde kruising het gehele chromosoom tussen A en B van de B^+ aan de recombinatie deelneemt, dan zal bij selectie op A^+ en B^+ , indien de kans op overdracht van een kenmerk op het chromosoom van de F^+ tussen A en B lineair van 100% (bij A) tot 0% (bij B) afneemt, 50% van de recombinanten het C^- kenmerk bezitten. Als slechts een klein gedeelte van het chromosoom van de F^+ aan de recombinatie deelneemt:

$F^+ \text{ --- } A^+ \text{ ---}$
 $\times$
 $F^- \text{ --- } A^- \text{ --- } C^+ \text{ --- } B^+ \text{ ---}$

wordt het kenmerk C^- in het geheel niet overgedragen, terwijl toch een even groot aantal recombinanten als in het vorige geval gevonden kan worden.

Indien dus bij een conjugatie slechts in een aantal gevallen een stukje chromosoom van de F^+ groter dan het tussen A en B gelegen gedeelte de F^- stam binnendringt, dan zal niet 50% van de recombinanten, maar een veel geringer aantal het C^- kenmerk bezitten. Te verwachten is dus dat de kans waarmede overdracht van een ongeselecteerd kenmerk plaats vindt, sterker afneemt met de afstand tot een voor selectie gebruikt kenmerk, dan men op grond van de kans op het optreden van "crossings-over" zou verwachten. De toepassing van het onder (b) genoemde principe om de volgorde van kenmerken op een chromosoom te bepalen is hierdoor beperkt tot die gevallen waarbij de voor selectie van recombinanten gebruikt kenmerk niet te ver uiteen liggen.

Bij de kruising:

1287 F^+ : leuc⁺ citrul⁺ isoleuc⁺ xyl⁺ S^S hist⁻ trypt⁻ gal⁺ syn⁺

$\times$

MBLCB 84 F^- : leuc⁻ citrul⁻ isoleuc⁻ xyl⁻ S^R hist⁺ trypt⁺ gal⁻ syn⁻

bleek bij selectie voor xyl⁺ en trypt⁺ van de 79 recombinanten 42 S^S , 25 hist⁻ en 77 syn⁺ te zijn. Het S^S is dus met hogere efficiëntie overgedragen dan het hist⁻ kenmerk, waaruit volgt dat de afstand xyl - S^S kleiner is dan de afstand xyl - hist. Dit resultaat is in overeenstemming met de voor deze kenmerken in fig. 37 gegeven volgorde:

xyl - S^S - hist - trypt.

Het syn kenmerk vertoont een nog sterkere koppeling met het xyl kenmerk dan het S^R kenmerk. Het syn kenmerk kan dus liggen rechts van het xyl, tussen xyl en S^R in, of links van xyl op een niet nader te bepalen afstand. Bij selectie van recombinanten op xyl⁺ en S^R bleken van de 79 onderzochte recombinanten, 5 hist⁻, 49 trypt⁻ en 8 syn⁺ te zijn. De efficiëntie waarmede het syn⁺ kenmerk nu wordt overgedragen is veel kleiner dan in het vorige geval en van de grootte orde van die van het hist⁻ kenmerk. De afstand S^S - hist is dus van dezelfde orde van grootte als de afstand S^S - syn. Omdat syn volgens het voorgaande experiment dichter bij xyl moet liggen dan S^S en hist, is de volgorde van deze kenmerken derhalve:

xyl - syn - S^S - hist - trypt.

Deze volgorde werd nog geverifieerd aan de hand van de volgende conjugatie:

1287 F^+ : leuc⁺ citrul⁺ isoleuc⁺ xyl⁺ S^S hist⁻ trypt⁻ gal⁺ syn⁺ K^S

$\times$

MBLCB 112 F^- : leuc⁻ citrul⁻ isoleuc⁻ xyl⁻ S^R hist⁺ trypt⁺ gal⁻ syn⁻ K^R

Deze F^- stam bezit dus behalve de kenmerken van mutant MBLCB 84, bovendien het kenmerk kanamycine-resistentie, waarvan de ligging ook op

het E. coli K 12 chromosoom onbekend is.

De resultaten van een drietal conjugatie-experimenten met deze stammen zijn in tabel X verzameld.

TABEL X
1287 F⁺ x MBLCB 112 F⁻

Selectie kenmerken	totaal	isoleuc ⁺	xyl ⁺	syn ⁺	K ^S	S ^S	hist ⁻	trypt ⁻
xyl ⁺ trypt ⁺	200	200	200	175	143	33	6	0
isoleuc ⁺ trypt ⁺	200	200	200	88	53	37	17	0
xyl ⁺ S ^R	200	200	200	49	31	0	5	43

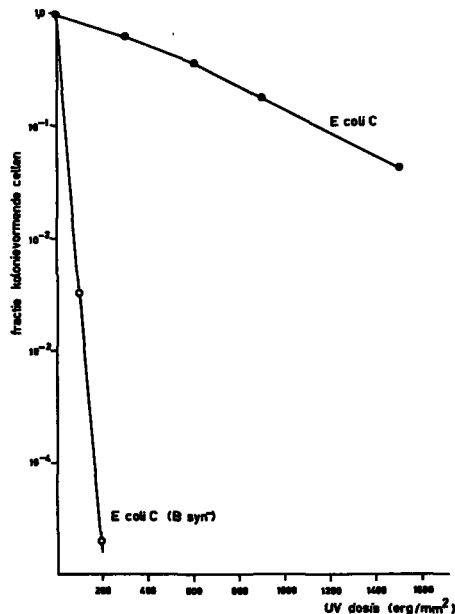
Aan de hand van dezelfde redenering als in het bovenstaande gegeven is, komen we hier tot de conclusie dat het syn kenmerk tussen de kenmerken xyl en S^S moet liggen. Ook voor het K^S kenmerk komen we tot dezelfde conclusie. Dit kenmerk vertoont echter een sterkere koppeling dan het syn kenmerk met S^S en een minder sterke met het xyl kenmerk, zodat het kenmerk K^S waarschijnlijk tussen de kenmerken syn en S^S ligt.

7. De overdracht van het syn⁻ kenmerk naar E. coli C.

Gebruik makend van de sterke koppeling tussen het syn⁻ kenmerk en het S^R kenmerk bleek het mogelijk deze stralingsgevoelige eigenschap naar een andere E. coli stam over te dragen. Een cultuur van de syn⁻ F⁺ stam MBLCB 88 (citrul⁻, leuc⁻, S^R) werd gedurende 30 minuten in contact gebracht met een cultuur van E. coli C onder voor conjugatie gunstige condities. Tien ml van deze gemengde cultuur werd vervolgens in 200 ml verse peptonbouillon verdund en gedurende 18 uur bij 37° C onder schudden geïncubeerd. 10 ml van deze laatste cultuur werd afgecentrifugeerd, opgenomen in M₉ en toegevoegd aan 1 l M₉ medium met 0,025% glucose en 100 µg/ml streptomycine. De in deze cultuur aanwezige cellen van het wilde type van E. coli C kunnen in dit medium door de aanwezigheid van streptomycine niet groeien. Cellen van de stam MBLCB 88 kunnen zich niet vermeerderen omdat citrul-line en leucine aan het medium ontbreken. Toch werd na 18 uur incuberen groei aangetroffen, veroorzaakt door tussen E. coli B en E. coli C gevormde hybriden. Een monster van deze cultuur werd op peptonplaten uitgestreken. Na incubatie werden 20 losliggende kolonies nogmaals op peptonplaten overgeënt en daarna op hun eigenschappen onderzocht. Alle 20 "stammen" bleken streptomycine-resistent te zijn. Een met 700 erg/mm² UV bestraalde suspensie van bacteriofaag T₁ bleek op alle twintig stammen ca. 1000 x minder plaques te geven dan op E. coli B of E. coli C. Volgens dit criterium zijn alle stammen dus van het syn⁻ type. E. coli B cellen zijn op grond van hun uiterlijk gemakkelijk van E. coli C cellen te onderscheiden. E. coli B is een lang en dun staafje, E. coli C een kort en breed staafje. Van de 20 geïsoleerde S^R syn⁻ hybriden bleken 10 het uiterlijk van E. coli C te vertonen. Twee van deze 10 stammen bleken, in tegenstelling tot E. coli B, evenals E. coli C in staat om de bacteriofagen ØX 174 en λ te vermenigvuldigen. Op grond van deze criteria werden deze stammen beschouwd als E. coli C stammen, waarin het syn⁻ kenmerk van E. coli B_{III} door conju-

gatie was overgebracht. Eén van deze stammen *E. coli* C (*B syn*⁻) werd gevriesdood en op peptonagar aangehouden.

Het verschil in gevoeligheid voor bestraling met ultraviolet licht tussen *E. coli* C en *E. coli* C (*B syn*⁻) wordt door fig. 38 geïllustreerd. Het verschil in gevoeligheid tussen deze stammen is dus minstens even groot als

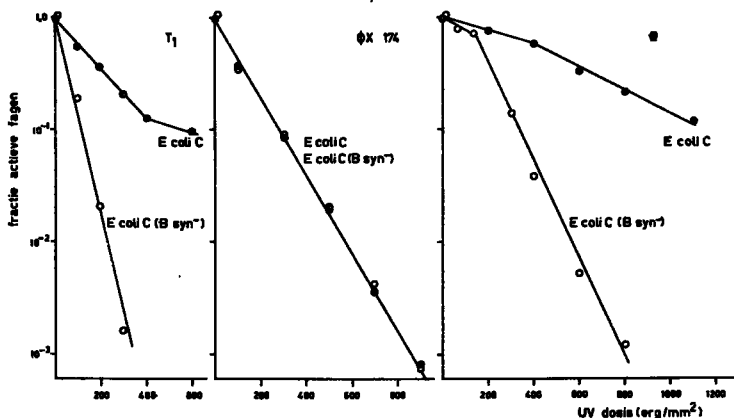


Figuur 38.

Het effect van UV-bestraling op *E. coli* C en *E. coli* C (*B syn*⁻) (logaritmisch groeiende culturen in pepton-bouillon).

tussen *E. coli* B *syn*⁺ en *E. coli* B *syn*⁻. We moeten misschien nog rekening houden met de mogelijkheid dat ook het *fil*⁺ kenmerk van mutant MBLCB 88 op de *E. coli* C stam is overgedragen. Dit kon evenwel niet worden nagegaan door het morfologisch gedrag van *E. coli* C (*B syn*⁻) te vergelijken met het morfologisch gedrag van *E. coli* C na bestraling met ultraviolet licht, omdat ook laatstgenoemde stam na bestraling filamenten vormt. De gevoeligheid van *E. coli* C en *E. coli* C (*B syn*⁻) voor kristalviolet is echter even groot en bovendien gelijk aan de gevoeligheid van de stam *E. coli* B *fil*⁺ hiervoor.

Zowel *E. coli* C als *E. coli* C (*B syn*⁻) is gevoelig voor de bacteriofagen ØX 174 en λ. Hierdoor was het ook voor deze fagen mogelijk het verschil in stralingsgevoeligheid bij uitzaaien op *syn*⁺ en *syn*⁻ stammen, na te gaan (zie ook Hoofdstuk III, paragraaf 6). De resultaten zijn weergegeven in fig. 39. Het blijkt dat bacteriofaag λ zich in dit opzicht als bacteriofaag T₁ gedraagt. Een bestraalde suspensie van de bacteriofaag ØX 174 vormt evenwel op een *syn*⁻ stam evenveel plaques als op een *syn*⁺ stam.



Figuur 39.
Overlevingscurven voor de bacteriofagen T₁, ØX 174,
en λ voor UV bestraling bij uitzaaien op E.coli B
en E.coli C (B syn⁻).

8. Samenvatting en conclusies.

Door conjugatie-experimenten werd bewezen dat de erfelijke eigenschappen syn en fil, chromosomaal bepaald zijn. Bovendien werd vastgesteld dat het syn kenmerk op het bacteriechromosoom tussen de kenmerken xyl en S^s ligt. Gebruik makend van de sterke koppeling van het syn kenmerk met het S^s kenmerk, kon het syn⁻ kenmerk van een stralingsgevoelige mutant van E.coli B op een andere coli stam (E.coli C) worden overgedragen.

Uit onderzoekingen met door UV bestraling geïnactiveerde bacteriofagen (faag T₁ en λ) blijkt dat de oorzaak van het verschil in stralingsgevoeligheid tussen syn⁺ en syn⁻ stammen waarschijnlijk gelegen is in een verschil in reactie op de primair door bestraling aangebrachte beschadiging. Ogen-schijnlijk worden de bacteriofagen T₁ en λ veel sterker door UV geïnacti-veerd, indien een syn⁻ stam i.p.v. een syn⁺ stam als gastheer wordt ge-bruikt. Dit wijst erop dat een syn⁻ stam een component mist, die wel in een syn⁺ stam aanwezig is, en die in staat is om de aan DNA aangebrachte be-schadiging, althans gedeeltelijk, ongedaan te maken. Dit, op het bacterie-chromosoom gelegen, syn kenmerk vertoont overeenkomst met het door Harm beschreven u kenmerk in bacteriofaag T₄. Volgens een door Harm (1961) geopperde veronderstelling is dit u locus verantwoordelijk voor de synthese van een enzym dat de door UV bestraling aan het faag-DNA aangebrachte beschadiging kan herstellen. Bacteriofaag T₂ bezit dit u kenmerk niet en is derhalve gevoeliger voor bestraling met ultraviolet licht. Het experimen-tele bewijs dat in E.coli B syn⁺ een enzymatische herstelreactie optreedt die in een syn⁻ mutant ontbreekt, kon tot op heden nog niet geleverd wor-den. Het onderzoek wordt in deze richting voortgezet.

SAMENVATTING

De genetische constitutie en de fenotypische expressie van twee mutaties, die tot een wijziging van de gevoeligheid voor röntgen- en UV-bestraling van *E. coli* B leiden, werden door de in dit proefschrift weergegeven experimenten nader omschreven.

Eén mutatie, aangeduid als $\text{fil}^+ \rightarrow \text{fil}^-$, leidt tot een verhoogde resistentie, de andere mutatie, aangeduid als $\text{syn}^+ \rightarrow \text{syn}^-$, leidt tot een verhoogde gevoeligheid voor bestraling. De stralingsgevoeligheid van de mutant *E. coli* B fil^- komt overeen met die van de reeds eerder door Witkin (1947) beschreven mutant *E. coli* B/r; de stralingsgevoeligheid van de mutant *E. coli* B syn^- komt overeen met die van de reeds eerder door Hill (1958) beschreven mutant *E. coli* B₈.

Zowel uit conjugatie-experimenten als uit het biochemisch en morfologisch gedrag van syn^+fil^+ , syn^+fil^- , syn^-fil^+ en syn^-fil^- stammen na UV bestraling blijkt dat beide mutaties van verschillende aard zijn en in verschillende loci op het bacteriechromosoom plaats hebben.

De stralingsresistente fil^- mutanten zijn van de gevoeliger fil^+ stammen te onderscheiden op grond van hun morfologisch gedrag na bestraling met 200 erg/mm² UV. Door deze dosis wordt de deling in fil^- stammen niet en in fil^+ stammen wel geremd, hetgeen tot uitdrukking komt doordat cellen van laatstgenoemde type na bestraling zogenaamde filamenten vormen. fil^- mutanten vertonen bovendien een grotere resistentie tegen kristalviolet, penicilline en novobiocine dan fil^+ stammen. Genoemde stoffen bewerkstelligen alle een remming van de deling. In fil^+ stammen wordt ook een sterke filamentvorming waargenomen indien deze geïncubeerd worden in een medium met een hoge specifieke activiteit radioactief fosfaat (15 µc/µg P). Bewezen werd dat dit effect veroorzaakt wordt door de conversie van geïncorporeerd ³²P in ³²S en niet door de met deze conversie gepaard gaande β bestraling van de cellen.

De stralingsgevoelige syn^- mutanten zijn van de meer resistente syn^+ stammen te onderscheiden op grond van hun biochemisch gedrag na bestraling met 200 erg/mm² UV. Door deze dosis wordt in syn^- mutanten de groei, de DNA en RNA synthese en de synthese van het adaptieve enzym β galactosidase sterker geremd dan in syn^+ stammen. Syn^- mutanten onderscheiden zich bovendien van syn^+ stammen door een geringer vermogen om met UV bestraalde bacteriofaag T₁ of λ te vermenigvuldigen. Het effect van UV bestraling op de synthese van bepaalde RNA fracties werd bestudeerd en vergeleken met het effect van het antibioticum chlooramfenicol. Uit proeven, waarbij celvrije extracten aan ultracentrifugatie in een sucrosegrediënt onderworpen werden, bleek dat na bestraling van syn^+ stammen een 4S RNA fractie opgehoopt wordt, terwijl na bestraling van syn^- stammen of chlooramfenicol-behandeling van een syn^+ stam, bovendien een 20S

RNA fractie accumuleert. Hieruit werd de gevolgtrekking gemaakt dat UV bestraling een specifiek effect op de ribosoomsynthese uitoefent.

Zowel van fil^- als van syn^- stammen en het wilde type (syn^+fil^+) werden een groot aantal auxotrofe mutanten geïsoleerd. Enkele van deze, voor het doel geschikte, mutanten werden aan conjugatie met een *E. coli* B F^+ stam onderworpen. Hierbij bleek dat zowel de syn als de fil eigenschap door een op het bacteriechromosoom gelegen locus, gecontroleerd worden. Afhankelijk van de wijze waarop recombinanten werden geselecteerd vertoonde het syn kenmerk een sterke koppeling met het "streptomycine resistentie" of het "xylose vergistings" kenmerk. Uit de recombinatiefrequentie van diverse, in de nabijheid van het syn kenmerk gelegen loci, werd de volgorde daarvan op het bacteriechromosoom bepaald. Deze is:

$\text{xyl} - \text{syn} - \text{S}^{\text{S}} - \text{hist} - \text{trypt.}$

Het F^+ episoom van *E. coli* K 12 werd in een auxotrofe, streptomycine resistente syn^- stam van *E. coli* B geïncorporeerd. Met behulp van deze F stam werd het syn^- kenmerk op *E. coli* C overgedragen. Deze *E. coli* C (B syn^-) stam vertoont ten opzichte van *E. coli* C een overeenkomstig verschil in gevoeligheid voor ultraviolet licht als *E. coli* B syn^- ten opzichte van *E. coli* B syn^+ .

S U M M A R Y

The genetic constitution and the phenotypic expression of two mutations affecting the sensitivity for X rays and ultraviolet irradiation in *Escherichia coli* B have been defined in more detail by the experiments reported here.

One mutation, indicated as $\text{fil}^+ \rightarrow \text{fil}^-$ leads to an increased resistance, the other one, indicated as $\text{syn}^+ \rightarrow \text{syn}^-$ leads to an increased sensitivity towards irradiation.

Ultraviolet survival curves for the newly isolated strains resemble those given by other authors (Witkin, 1947; Hill, 1958) for *E. coli* B/r and *E. coli* B_s respectively.

It was proved by conjugation experiments and by biochemical methods that these mutations are of different nature and occur at different loci on the chromosome.

The resistant fil^- strains may be discerned from the more sensitive fil^+ strains by their morphological behaviour following irradiation with 200 erg/mm² UV. Division is inhibited at this dose in fil^+ strains, whereas it is not in fil^- strains. Fil^+ strains show filament formation under these conditions. Moreover, fil^- mutants are more resistant towards crystalviolet, penicillin and novobiocin. A strong filament formation was observed in fil^+ strains during incubation in a medium with radioactive phosphate of high specific activity (15 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$ P). It was proved that this effect is caused by the conversion of incorporated ³²P in ³²S and not by the concurrent β irradiation.

The radiation sensitive syn^- mutants may be discerned from the more resistant syn^+ strains by their biochemical behaviour following irradiation with 200 erg/mm² UV. Growth, DNA and RNA synthesis and synthesis of the adaptive enzyme β galactosidase, are at this dose more strongly inhibited in syn^- mutants than in syn^+ strains. The effect of UV irradiation on the RNA synthesis was studied and compared with the effect of the antibiotic chloramphenicol by subjecting cellfree extracts to ultracentrifugation in a sucrose gradient. Following irradiation in a syn^+ strain an accumulation of a 4S RNA fraction is observed; following irradiation of syn^- strains or after treatment of a syn^+ strain with chloramphenicol in addition to a 4S, a 20S RNA fraction accumulates. From these results it was concluded that UV irradiation has a specific inhibitory effect on ribosome synthesis.

A great number of auxotrophic mutants were isolated from the radiation resistant and sensitive strains described. Some of these mutants were subjected to conjugation with an *Escherichia coli* B F⁺ strain. It was proved that both properties, syn and fil , are chromosomally determined. Depending on the recombinant selection employed the syn marker exhibits a strong linkage with the streptomycin resistance marker or with the xylose fermentation marker. From a quantitative estimation of the recombination frequencies of several loci belonging to the $\text{xyl} - \text{S}^{\text{S}}$ linkage group, the sequence on the bacterial chromosome of the latter was determined. This sequence is:

xyl - syn - S^s - hist - trypt.

From E.coli K 12 (strain 5832) the F episome was transferred to an auxotrophic and streptomycin resistant syn⁻ strain. This syn⁻ F⁺ E.coli B strain was able to transfer the syn⁻ marker to E.coli C. The E.coli C (B syn⁻) strain thus obtained exhibited an increased radiation sensitivity with respect to E.coli C, corresponding to the difference between E.coli B syn⁻ and E.coli B syn⁺.

LITERATUUR

- Adelberg, E.A. and Wyers, J.M., *J. Bacteriol.*, 65, 348, 1953.
 Adelberg, E.A., *Papers on Bacterial Genetics*, Little, Brown and Co., Boston, 1960.
 Adler, H.I. and Haskins, S.D., *Nature*, 188, 249, 1960.
 Alper, T. and Gillies, N.E., *J. Gen. Microbiol.*, 22, 113, 1960.
 Anderson, E.H., *J. Bacteriol.*, 61, 389, 1951.
 Anderson, P.A. and Pettijohn, D.E., *Science*, 131, 1098, 1960.
 Aronson, A.E. and MacCarthy, B.J., *Biophys. J.*, 1, 215, 227, 1961.
 Avery, O.T., McLeod, C.M. and McCarty, M., *J. Exp. Med.*, 79, 137, 1944.
 Barner, H.D. and Cohen, S.S., *J. Bacteriol.*, 71, 149, 1956.
 Bartlett, G.R., *J. Bioch. Chem.*, 234, 466, 1959.
 Bowen, E.J., *The Chemical Aspects of Light*, Oxford, Clarendon Press 1946.
 B cker, H., Pauly, H. and Rajewesky, B., *Strahlentherapie*, 111, 330, 1960.
 Burton, K., *Biochem. J.*, 62, 315, 1956.
 Clark, L.C. Jr., *Transact. Am. Soc. Artificial Organs*, 2, 41, 1956.
 Davis, B.D., *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 4267, 1948.
 Deering, R., *J. Bacteriol.*, 76, 123, 1958.
 Deering, R., *Bioch. Biophys. Acta*, 31, 11, 1959.
 Demerec, M. and Latarjet, R., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 11, 38, 1946.
 Dische, Z., in *the Nucleic Acids*, ed. Chargaff and Davidson, Academic Press, N.Y., 1955.
 Downes, A. and Blunt, T.P., *Proc. Royal Soc. London*, 26, 488, 1877.
 Drakulic, M., *Bioch. Biophys. Acta.*, 36, 172, 1959.
 Ellison, S.A., Erlanger, B.F. and Allen, P., *J. Bacteriol.*, 69, 536, 1955.
 Ellison, S.A., Feiner, R.R. and Hill, R.F., *Virology*, 11, 294, 1960.
 Errera, M., *persoonlijke mededeling*, 1958.
 Fano, U., in *Radiation Biology I*, pag. 132 e.v., ed. A. Hollaender, Mc.Graw, Hill Books Inc. 1954.
 Fuerst, C.R. and Stent, G.S., *J. Gen. Physiol.*, 40, 73, 1956.
 Gates, F.L., *Science*, 68, 479, 1928.
 Giese, A.C., *Physiol. Rev.*, 30, 431, 1950.
 Gorini, L. and Kaufman, H., *Science*, 131, 604, 1960.
 Green, A.B., *Proc. Royal Soc. London*, B73, 375, 1904.
 Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C.G., Resibrough, R.W. and Watson, D., *Nature*, 190, 581, 1961.
 Haan, P.G.de, *Genetica*, 27, 293, 1954.
 Haan, P.G.de, *Ant. v. Leeuwenhoek*, 23, 322, 1957.
 Hanawalt, P. and Buehler, J., *Bioch. Biophys. Acta*, 37, 141, 1960.
 Harm, W., *J. Cell. and Comp. Physiol.*, 58, 69, 1961.

- Harold, F.M. and Ziporin, Z. Z., *Bioch. Biophys. Acta*, 28, 482, 492, 1958.
- Hartman, G. E., in *The Chemical Basis of Heredity*, pag. 408, John Hopkins Press, Baltimore, 1957.
- Hershey, A. D., Kamen, A. D., Kennedy, J. D. and Gest, H., *J. Gen. Physiol.*, 34, 305, 1951.
- Hill, R. F., *Bioch. Biophys. Acta*, 30, 636, 1958.
- Hill, R. F., *Nature*, 188, 412, 1960.
- Hill, R. F. and Simson, E., *J. Gen. Microbiol.*, 24, 1, 1961.
- Holloway, B. W., 1961, persoonlijke mededeling.
- Iverson, R. M. and Giese, A. C., *Bioch. Biophys. Acta*, 25, 62, 1957.
- Jacob, F. and Wollman, E., in *Recent Progress in Microbiology*, VII Intern. Congress Microbiol., Stockholm, Almquist and Weksell 1958.
- Kanazir, D. and Errera, M., *Bioch. Biophys. Acta*, 14, 62, 1954.
- Kaplan, H. S., Smith, K. C., Tomlin, P., *Nature*, 190, 794, 1961.
- Kaplan, R. W., *Ann. Rev. Microbiol.*, 6, 49, 1952.
- Kaplan, S., Rosenblum, D. E. and Bryson, V. J., *Cell. and Comp. Physiol.*, 41, 153, 1953.
- Kelner, A., *J. Bacteriol.*, 65, 252, 1953.
- Kimball, R. F., *Ann. Rev. Microbiol.*, 11, 199, 1957.
- Lederberg, J. and Zinder, N. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 4267, 1948.
- Lederberg, J. and Lederberg, E. M., *J. Bacteriol.*, 63, 399, 1952.
- Lea, D. E., *Action of Radiation on Living Cells*, Cambridge University Press, 1955, sec. ed.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Rindell, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- Morse, M. L. and Carter, C. E., *J. Bacteriol.*, 58, 317, 1949.
- Mortimer, R. H. and Beam, C. A., *Ann. Rev. Nucl. Science.*, 5, 327, 1955.
- Mudson, R. J. and Mclean, F. I., *J. Gen. Microbiol.*, 25, 17, 1961.
- Niven, A., *Ann. Rev. Microbiol.*, 12, 507, 1958.
- Nomura, M. and Watson, J., *J. Mol. Biol.*, 1, 204, 1959.
- Nomura, M., Hall, B. D. and Spiegelman, S., *J. Mol. Biol.*, 2, 306, 1960.
- Ogg, J. E. and Zelle, M. R., *J. Bacteriol.*, 74, 477, 485, 1957.
- Okagaki, H., *J. Bacteriol.*, 79, 277, 1960.
- Powells, E. L., *Ann. Rev. Nucl. Science*, 7, 62, 1957.
- Roberts, R. B., Abelson, P. H., Cowie, D. B., Bolton, E. T. and Britten, R. J., *Studies of Biosynthesis in E. coli*. Carn. Inst. of Washington Publication 607, Washington, 1957.
- Rörsch, A. and Kamp, C. v. d., *Bioch. Biophys. Acta*, 46, 401, 1961.
- Rotman, B., *J. Bacteriol.*, 76, 1, 1958.
- Rupert, C. S., *J. Cell. and Comp. Physiol.*, 58, 57, 1961.
- Rushizky, G. W., Riley, M., Prestidge, L. S. and Pardee, A. B., *Bioch. Biophys. Acta*, 45, 70, 1960.
- Sneath, P. H. A., *Brit. Med. Bull.*, 18, 41, 1962.
- Sonneborn, T. M., *Adv. Virus Res.*, VI, 231, 1959.
- Sparrow, A. H. and Forro, F., *Ann. Rev. Nucl. Science*, 3, 339, 1953.
- Spiegelman, S. and Landman, O. E., *Ann. Rev. Microbiol.*, 8, 181, 1954.
- Spoerl, E., Loveless, L. E., Weisman, T. H. and Balske, R. J., *J. Bacteriol.*, 67, 394, 1954.
- Stapleton, G. E., in *Radiation Biology II*, pag. 374 e. v., ed. A. Hollaender, McGraw Hill Books Company Inc., 1955.

- Stent, G.S. and Fuerst, C.R., J.Gen.Physiol., 38, 441, 1955.
 Stent, G.S. and Fuerst, C.R., Adv.Biol.Med.Phys., 7, 1, 1960.
 Strominger, J.L., Physiol.Rev., 40, 78, 1960.
 Susuki, K. and Ono, J., Nature, 183, 396, 1959.
 Swenson, P.A., Proc.Nat.Acad.Science US, 36, 699, 1950.
 Swenson, P.A. and Giese, A.C., J.Cell. and Comp. Physiol., 36, 369, 1950.
 Tatum, E.L. and Lederberg, J., J.Bacteriol., 53, 673, 1947.
 Tatum, E.L. and Perkins, D.P., Ann.Rev.Microbiol., 4, 129, 1950.
 Torriani, A.M., Bioch.Biophys.Acta, 19, 224, 1956.
 Witkin, E., Genetics, 32, 221, 1947.
 Woodside, E.E., Goucher, C.R. and Kocholaty, W., J. Bacteriol., 80, 252, 1960.
 Wyss, O. and Haas, F.L., Ann.Rev.Microbiol., 7, 47, 1953.
 Zelle, M.R., Ann.Rev.Microbiol., 9, 45, 1955.

Op verzoek van de faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen volgt hier een overzicht van mijn academische studie.

Na het Rotterdamsch Lyceum, afdeling HBS-B te hebben doorlopen, werd ik in 1950 in de afdeling der Scheikundige Technologie aan de Technische Hogeschool te Delft als student ingeschreven. In 1956 legde ik het candidaatsexamen voor de technisch-organisch chemische richting af. Tijdens het verrichten van het afstudeerwerk onder leiding van Prof. W. Berends en Ir. J. IJlstra op het laboratorium voor Biochemie te Delft, werd mij door het Delfts Hogeschool Fonds een stipendium verleend ten behoeve van een onderzoek over de fotochemische omzettingen van in nucleïnezuuren voorkomende verbindingen. In oktober 1957 werd mijn studie door het afleggen van het ingenieursexamen aan de Hogeschool te Delft, beëindigd. Tijdens de vervulling van de militaire dienstplicht werd ik gedetacheerd op het Medisch Biologisch Laboratorium der Rijksverdedigingsorganisatie TNO te Rijswijk. Onder leiding van Prof. Dr. F. Wensinck, destijds hoofd van de bacteriologische afdeling bewerkte ik in die periode een onderzoek over de transformatie van Haemophilus influenzae. Na mijn dienstplicht werd ik in 1959, mede dank zij een door de Stichting voor Zuiver Wetenschappelijk Onderzoek verleende NATO-beurs, door de Rijksverdedigingsorganisatie in de gelegenheid gesteld acht maanden aan de Universiteit van Cambridge in Engeland te verblijven. Daar werkte ik onder leiding van Dr. E. F. Gale (Medical Research Council Unit for Chemical Microbiology) aan het stimulerende effect van de "Glycine Incorporation Factor" op de synthese van het enzym β galactosidase in Escherichia coli. In januari 1960 keerde ik naar het Medisch Biologisch Laboratorium te Rijswijk terug en werd onder leiding van de directeur van dit laboratorium, Prof. Dr. J. A. Cohen, het in dit proefschrift beschreven onderzoek ter hand genomen.

Gaarne maak ik van de gelegenheid gebruik om een woord van dank te richten tot mijn promotor Prof. Dr. J. A. Cohen en mijn vroegere leermeesters Prof. W. Berends en Prof. Dr. F. Wensinck die zich moeite voor mijn wetenschappelijke vorming hebben getroost. Bovendien ben ik Prof. Dr. K. C. Winkler en Dr. P. G. de Haan erkentelijk voor hun belangrijke adviezen inzake het onderzoek.

Het is ondoenlijk de vele gevallen te memoreren waarin ik steun van de talrijke medewerkers van het Medisch Biologisch Laboratorium heb gevonden. In het bijzonder ben ik dank verschuldigd aan Drs. J. B. Th. Aten voor diens hulp bij het hanteren van grote hoeveelheden radioactiviteit en aan Dr. Joh. Blok voor diens kritische opmerkingen. Ook geef ik uitdrukking aan mijn spijt dat de samenwerking met Ir. A. Edelman, wiens grote belangstelling en daadwerkelijke steun van grote waarde gebleken is, slechts anderhalf jaar geduurd heeft. Gedurende vier jaar werd ik geassisteerd door Mejuffrouw C. van der Kamp, wier belangstelling voor het werk zich over zeven dagen van de week uitstreckte. Zij en Mevrouw N. Douwes-Idema, Mejuffrouw A. M. J. Schepman, Mejuffrouw J. W. M. J. Adema en Mejuffrouw C. Westenbroek en de Heer J. S. van der Linden hebben allen op hun eigen wijze een bijdrage tot het onderzoek geleverd. Tenslotte dank ik de heren J. J. Weber en H. E. Groot Bramel en hun medewerkers voor de verzorging van de figuren.

Het Bestuur van de Rijksverdedigingsorganisatie TNO dank ik voor de toestemming om het onderzoek in de vorm van een proefschrift te publiceren.