

GENETISCHE TRANSFORMATIE VAN DE BACTERIOFAAG T 4

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN AAN
DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN
DE RECTOR MAGNIFICUS DR. J. DANKMEIJER, HOOG-
LERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, TEN
OVERSTAAN VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT TE
VERDEDIGEN OP WOENSDAG 16 MAART 1966 TE
15 UUR

DOOR
GERRIT VELDHUISEN
GEBOREN TE EDE IN 1935

PROMOTOR: PROF. DR. J.A. COHEN

STELLINGEN

1. Het is aannemelijk dat het enzym DNA-polymerase niet alleen de polymerisatie van desoxyribonucleotiden katalyseert, maar ook betrokken is bij de selectie van de te polymeriseren desoxyribonucleotiden.

J.F. Speyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 6 (1965).

2. Het verhoogde aantal mutanten in een populatie van de bacteriofaag T4, ontstaan na vermeerdering in bacteriën die gemerkt waren met deuterium, is geen bewijs voor de mutagene werking van deuterium.

M. Konrad, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 84, 678 (1960)

3. Ter verkrijging van enkelstreng DNA moleculen uit dubbelstreng moleculen verdient de methode van de alkalische denaturatie de voorkeur boven hitte-denaturatie of behandeling met formaldehyde.

4. Het begrip cistron kan niet afdoende op grond van complementatie worden gedefiniëerd.

5. De waargenomen incorporatie van ^3H -thymidine na UV bestraling van in vitro gekweekte zoogdiercellen behoeft niet te wijzen op een herstel van de UV schade.

D.E. Rasmussen en R.B. Painter, *Nature* 203, 1360 (1964).

6. De conclusie van Freifelder dat na röntgenbestraling van de bacteriofaag T7 in een anorganische buffer de afname van het plagevormend vermogen veroorzaakt wordt door dubbelstreng breuken in het DNA, is aan bedenkingen onderhevig.

D. Freifelder, *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 54, 128 (1965).

7. Het werkingsmechanisme van gibberellinezuur kan berusten op een centrale werking.

L.G. Paleg, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 16, 291 (1965)

8. Bij het maken van schattingen omtrent de door ioniserende straling teweeg gebrachte genetische schade dient men zich meer dan tot dusver te realiseren dat er bij lage doseringen geen evenredigheid bestaat tussen de stralingsdoses en de aantallen daardoor geïnduceerde puntmutaties.

W.L. Russell en E.M. Kelly, *Genetics* 52, 471 (1965).

9. Bij het aangeven van bacterieconcentraties in eenheden van optische dichtheid dient ook de geometrie van de meetopstelling beschreven te worden.
10. Het verdient aanbeveling om een onderzoek in te stellen naar de eerste sexuele cycli van het kind indien het kort na de geboorte behandeld is geweest met zogenaamde anabole steroïden, of indien de moeder gebruik heeft gemaakt van anticonceptionele steroïden of tijdens de graviditeit met steroïden behandeld is geweest.
11. Toepassing van de mogelijkheden, die aangegeven zijn in het besluit van 1 november 1965 tot wijziging van het academisch statuut, voor wat betreft de studierichting der biologie, zal er toe kunnen leiden dat meer biologen betrokken zullen worden in de studie van de "moleculaire biologie".

Aan mijn ouders

Aan Els

INHOUD

	Blz.
INLEIDING.	9
1. Algemeen.	9
2. Probleemstelling.	9
 HOOFDSTUK I LITERATUUR.	 12
1. Eigenschappen van DNA.	12
2. Levenscyclus van de T-even bacteriofagen.	14
3. Biologische activiteit van geïsoleerd bacteriofaag DNA.	15
 HOOFDSTUK II STAMMEN, MEDIA EN TECHNIEKEN.	 21
1. Bacteriën.	21
2. Bacteriofagen.	21
3. Media.	21
4. Isolatie van rII-mutanten.	21
5. Kruising van rII-mutanten.	25
6. Vermeerdering en zuivering van de bacteriofaag T4B.	27
7. Kweken en zuiveren van de faag T4B gemerkt met ^{32}P .	29
8. Isolatie van DNA uit faag.	29
9. Het breken van DNA moleculen.	30
10. Behandeling van DNA en bacteriofaag met salpeterigzuur.	30
11. Bestraling van DNA en bacteriofaag met ultraviolet licht.	31
12. Bereiding van sferoplasten.	31
13. Bereiding van π -deeltjes.	32
14. Uitvoering van een faagtransformatie experiment.	32
 HOOFDSTUK III ONTWIKKELING VAN HET FAAGTRANSFORMATIE SYSTEEM.	 33
1. Voorgeschiedenis.	33

2. Veranderingen in de bereiding van π -deeltjes.	35
3. Veranderingen in de bereiding van sferoplasten en in de praktische uitvoering van het testsysteem.	36

HOOFDSTUK IV ENKELE EIGENSCHAPPEN VAN HET FAAGTRANSFORMATIE SYSTEEM.	45
---	-----------

1. Inleiding.	45
2. De invloed van variaties in de omstandigheden.	45
2.1 De invloed van de concentratie van de π -deeltjes.	45
2.2 De invloed van de concentratie van de sferoplasten.	48
2.3 De invloed van variaties in de sucrose concentratie.	49
2.4 De invloed van de DNA concentratie op de opbrengst aan transformanten.	50
2.5 De invloed van de tijd van toevoeging van DNA en π -deeltjes aan de sferoplasten.	51
3. Enkele eigenschappen van het sferoplasten systeem.	53
3.1 Kinetiek.	53
3.2 Infectieve centra en worpgrootte.	56
3.3 Secundaire vermeerdering van intacte fagen.	59
3.4 Aanwijzingen dat uitsluitend DNA verantwoordelijk is voor het ontstaan van transformanten.	60
4. Bespreking van de resultaten.	61

HOOFDSTUK V TRANSFORMATIE VAN DE BACTERIOFAAG T4 DOOR DE OVERDRACHT VAN EEN AANTAL VERSCHILLENDE KENMERKEN.	66
--	-----------

1. Inleiding.	66
2. Transformatie van enkele rII-mutanten.	66
3. Transformatie van een amber mutant.	69
4. Bespreking van de resultaten.	76

Blz.

HOOFDSTUK VI	INVLOED VAN HET BREKEN VAN DNA MOLECULEN OP DE BIOLOGISCHE ACTIVITEIT.	78
1.	Inleiding.	78
2.	Het breken van DNA.	78
3.	Invloed van het breken op de overdracht van één kenmerk.	79
4.	Invloed van het breken op de overdracht van twee kenmerken.	81
5.	Bespreking van de resultaten.	83
HOOFDSTUK VII	INVLOED VAN HITTE-DENATURATIE OP DE BIOLOGISCHE ACTIVITEIT VAN T4-DNA.	86
1.	Inleiding.	86
2.	Faagtransformatie met gedenatureerd DNA.	88
3.	Bespreking van de resultaten.	93
HOOFDSTUK VIII	INVLOED VAN MUTAGENE AGENTIA OP DE BIOLOGISCHE ACTIVITEIT VAN T4-DNA.	95
1.	Invloed van UV bestraling.	95
2.	Invloed van salpeterigzuur.	100
3.	Bespreking van de resultaten.	102
HOOFDSTUK IX	NABESCHOUWING.	104
	SAMENVATTING.	108
	SUMMARY.	111
	LITERATUURVERWIJZINGEN	114

AFKORTINGEN

ac	"acriflavin"
am	"amber"
5BU	5-broomuracil
DFP	diisopropyl fosforofluoridaat
DNA	desoxyribonucleïnezuur
DNA-ase	desoxyribonuclease
E ₂₆₀	extinctie bij 260 mμ
EDTA	ethyleendiaminotetraäzijnsuur
faag	bacteriofaag
M. B. L.	Medisch Biologisch Laboratorium der Rijks- verdedigingsorganisatie TNO
MLD	37% dosis
r	"rapid lysis"
RNA	ribonucleïnezuur
T.I.	transformatie index
TRIS	trihydroxymethylaminomethaan
UV	ultraviolet licht

INLEIDING

1. Algemeen.

Om de kwaadaardige effecten, die ioniserende straling in het menselijk organisme kan teweegbrengen, op rationele wijze te kunnen bestrijden, is het in de eerste plaats van belang inzicht te verkrijgen in het mechanisme van de beschadigende werking van ioniserende straling op het genetisch materiaal van de cel.

In verband hiermee werd op het Medisch Biologisch Laboratorium van de Rijksverdedigingsorganisatie T.N.O. (M.B.L.) een aantal jaren geleden een aanvang gemaakt met een onderzoek dat tot doel heeft inzicht te krijgen in de structuur, fysisch-chemische en biologische eigenschappen van het materiaal dat de erfelijke eigenschappen van een organisme bepaalt.

Het is thans algemeen aanvaard dat dit materiaal desoxyribonucleïnezuur (DNA) is (hoewel in enkele gevallen ook ribonucleïnezuur (RNA) in aanmerking komt) en de bewijzen hiervoor zijn in de laatste twee decennia geleverd.

In 1944 ontdekten Avery c.s.(1) dat het zogenaamde "transforming principle" van Griffith bestond uit DNA. Hiermede was de chemische substantie aangewezen, die in staat is erfelijke eigenschappen van het ene organisme naar het andere over te brengen. Hershey en Chase(2) publiceerden in 1952 hun experimenten waarin zij aantoonde dat tijdens de infectie van de bacterie *Escherichia coli* door de bacteriofaag T2 slechts het DNA naar binnendringt, dat de vorming van genetisch identieke fagen induceert.

Bovengenoemde twee publikaties zijn de schoolvoorbeelden geworden van de belangrijke rol van het DNA als drager van de erfelijke eigenschappen en ze zijn een belangrijke stimulans geweest tot een nader onderzoek van deze stof.

2. Probleemstelling.

Het op het M.B.L. verrichte onderzoek is er op gericht een moge-

lijk verband te vinden tussen de fysisch-chemische eigenschappen van het DNA met eventueel hierin aangebrachte veranderingen en zijn (veranderde) biologische activiteit.

In het vervolg zullen we dit onderzoek kortweg aanduiden met: DNA onderzoek. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de bacteriofagen T2 en T4 op grond van de volgende overwegingen:

- a) Van de bacteriofagen T2 en T4 zijn veel mutanten bekend en de ligging van de mutaties op het chromosoom is door middel van kruisingen vastgesteld.
- b) De bacteriofagen T2 en T4 zijn vrij eenvoudig in voldoende hoeveelheden zuiver in handen te krijgen.
- c) Bovengenoemde bacteriofagen bevatten één DNA molecule van het dubbelstreng type.
- d) De isolatie van het DNA uit de faag is eenvoudig en levert, als men de nodige voorzichtigheid in acht neemt, homogene preparaten.

Bij de aanvang van het onderzoek was een systeem waarin de biologische activiteit van gezuiverd T2- of T4-DNA bepaald kon worden, niet bekend. In dit proefschrift wordt onder de biologische activiteit verstaan het vermogen van DNA om in een cellulair of subcellulair systeem aanleiding te geven tot het ontstaan van organismen die één of meer genetische kenmerken bezitten, die oorspronkelijk in het toegevoegde DNA aanwezig waren. Mijn voorgangers op het M.B.L., Ir. J.H. van de Pol en Dr. G.A. van Arkel, hebben de grondslag voor dit onderzoek gelegd (3,4). Uit publikaties van Spizizen(5) en van Fraser c.s.(6) was het bekend dat er bij de inactivering van de bacteriofaag T2 door ureum of door middel van een osmotische schok een structuur ontstaat, die niet meer infectieus is voor bacteriën, maar nog wel voor sferoplasten (bacteriën, die geheel of gedeeltelijk hun celwand missen en daardoor gevoelig geworden zijn voor een osmotische schok). Een dergelijke structuur wordt π -deeltje genoemd. Op grond van enkele eigenschappen die de π -deeltjes bezaten had men het vermoeden, dat deze deeltjes zouden bestaan uit het infectieuze DNA van de faag, al of niet gebonden met eiwitcomponenten. Elke behandeling van π -deeltjes ter zuivering van het DNA leidde echter tot verlies van het vermogen om na incubatie met sferoplasten nakomelingen te produceren(7,8). Daarom werd getracht gebruik te maken van de werking van één enkel gen als criterium voor de biologische activiteit. Hiertoe werden sferoplasten gelijktijdig geïnfecteerd met π -deeltjes van een faagmutant en met DNA geïsoleerd uit het standaardtype; na enige uren incuberen werden de nakomelingen onderzocht op het voorkomen van bacteriofagen van het standaardtype.

Inderdaad is het van de Pol, Veldhuisen en Cohen gelukt op deze

wijze de biologische activiteit van T4-DNA aan te tonen en zij noemden dit proces faagtransformatie, in analogie met het verschijnsel bij bacteriën.

In de beginperiode gaf het systeem een zeer lage opbrengst aan fagen en was slecht reproduceerbaar. Het in dit proefschrift beschreven werk had voornamelijk tot doel zodanige veranderingen aan te brengen dat het een betrouwbaar en bruikbaar hulpmiddel zou worden bij ons DNA onderzoek.

De aan en met het faagtransformatie systeem verrichte werkzaamheden zijn in dit proefschrift in negen hoofdstukken weergegeven. Na de bespreking van enkele eigenschappen van DNA en van de levenscyclus van de T-even bacteriofagen (T2, T4 en T6) wordt in hoofdstuk I een overzicht gegeven van de literatuur die betrekking heeft op het door ons verrichte onderzoek. Tevens worden daarbij enkele andere systemen beschreven waarmee de biologische eigenschappen van DNA, geïsoleerd uit andere bacteriofagen, tot expressie gebracht kunnen worden.

Na een beschrijving van de gebruikte stammen, media en technieken in hoofdstuk II, wordt in hoofdstuk III een aantal experimenten beschreven, welke een beeld vormen van de pogingen die ondernomen zijn om tot het huidige faagtransformatie systeem te komen. In hoofdstuk IV worden enkele eigenschappen van het systeem beschreven, zoals de kinetiek waarmee de nakomelingen ontstaan, de invloed van de tijd van toevoeging van π -deeltjes en DNA aan de sferoplasten, en de relatie tussen de concentratie van het toegevoegde DNA en de opbrengst aan getransformeerde fagen. In hoofdstuk V wordt de overdracht van enkele andere genetische eigenschappen dan de tevoren gebruikte rII-eigenschap beschreven. Hiermede eindigt de beschrijving van het systeem; in de volgende hoofdstukken worden enkele toepassingen van dit systeem in het DNA onderzoek beschreven.

In hoofdstuk VI wordt de invloed van het breken van DNA moleculen op hun biologische activiteit nagegaan en in hoofdstuk VII de invloed van verhitting van DNA preparaten op de biologische activiteit. In hoofdstuk VIII worden experimenten vermeld waarin het effect van bestraling met ultraviolet licht of van een behandeling met salpeterig-zuur op de biologische activiteit van DNA werd onderzocht.

In hoofdstuk IX wordt een nabeschouwing over de faagtransformatie gegeven.

HOOFDSTUK I

LITERATUUR

1. Eigenschappen van DNA.

Het "slechts structureel belangrijke"(9) polymeer uit de dertiger jaren is inmiddels belangrijk genoeg gebleken om het onderwerp te worden van een stroom van publikaties. Deze behandelen over het algemeen één of meer van de volgende eigenschappen die in verband staan met de centrale rol die het DNA in een organisme speelt.

1.1 De structuur van het DNA molecule.

DNA is een lineair macromolecule dat samengesteld is uit twee polynucleotide strengen, die zodanig om elkaar gewikkeld zijn dat er een schroeflijnstructuur ontstaat (de zogenaamde dubbelhelix).

Door Watson en Crick(10) werd voor het DNA molecule een ruimtelijke structuur voorgesteld, waarbij twee polynucleotide strengen met tegengestelde polariteit (veroorzaakt door het feit dat, in eenzelfde richting gaande, de nucleotiden in de ene streng met elkaar verbonden zijn door 3-5-bindingen, en in de andere streng door 5-3-bindingen) om elkaar gewikkeld zijn, waarbij de purine basen in de ene streng waterstofbruggen vormen met de pyrimidine basen in de andere streng.

Praktisch al het in de natuur voorkomende DNA bezit bovengenoemde dubbelstreng structuur, welke aan een DNA molecule een zekere stijfheid verleent. DNA moleculen in oplossing zijn wel eens beschreven als "wormachtige ketens"(11,12). In een enkel geval, zoals bij de bacteriofaag ØX174, komt het DNA als enkelstreng structuur in de natuur voor.

In het DNA van de T-even bacteriofagen (T2, T4 en T6), waarvan in dit proefschrift sprake is, komt in plaats van de base cytosine de base hydroxymethylcytosine (5-HMC) voor, waarbij aan de hydroxymethylgroep al of niet glucose gebonden kan zijn. Het glucosegehalte en de verdeling van de glucose moleculen verschilt in de drie faagttypen

T2, T4 en T6. In T4 is aan alle 5-HMC groepen één glucose molecule gebonden, 70% in een α - en 30% in een β -glucosidische binding.

De basensamenstelling van T4-DNA is complementair: adenine 32%, thymine 33%, guanine 18% en 5-HMC 16% (110). Het molecuulgewicht van T4-DNA bedraagt ongeveer $1,3 \times 10^8$ hetgeen overeenkomt met de aanwezigheid van 2×10^5 nucleotidenparen per molecule.

1.2 De wijze waarop het DNA molecule wordt gerepliceerd.

De genetische functie van DNA is er op gericht om door middel van replicatie de informatie, die in het DNA molecule besloten ligt, over te dragen aan de nakomelingen. De replicatie verloopt semiconservatief (13), dat wil zeggen dat elke streng van het DNA molecule als een matris fungeert waarop een nieuwe streng gevormd wordt. De complementaire desoxyribonucleotiden die door middel van basenparing op hun plaats komen, worden door het enzym DNA-polymerase aaneengekoppeld via 3-5-bindingen tot een complementaire streng. Op deze manier worden dus uit één DNA molecule twee kopieën gevormd.

1.3 De wijze waarop de erfelijke informatie door de cel wordt overgenomen.

De erfelijke informatie, die in het DNA molecule aanwezig is, dient tot expressie te kunnen komen. Hiervoor is de synthese van eiwitten (enzymen) van primair belang. Het is vastgesteld dat eerst een RNA molecule wordt gevormd, waarvan de basenvolgorde door het DNA molecule wordt gecodeerd. De basenvolgorde van dit RNA (het zogenaamde boodschapper RNA) bevat weer een code die door de cel kan worden vertaald in een bepaalde aminozuurvolgorde van een eiwit molecule.

1.4 De eigenschap dat mutaties kunnen ontstaan in het DNA molecule.

Daar de genetische informatie in de basenvolgorde besloten ligt zullen veranderingen in deze volgorde in het algemeen een mutatie ten gevolge hebben. Zulke veranderingen kunnen daaruit bestaan dat één of meer nucleotiden ergens in de DNA keten worden toegevoegd, weggenomen of door andere nucleotiden worden vervangen. Dit kan spontaan gebeuren of een gevolg zijn van de inwerking van zogenaamde mutagene stoffen of diverse soorten straling.

1.5 De eigenschap dat DNA moleculen met elkaar kunnen recombineren.

Bij recombinatie tussen verschillende DNA moleculen ontstaat een nieuwe nucleotidenvolgorde die gedeeltelijk overeenkomt met die van een DNA molecule van de ene ouder en gedeeltelijk met die van een DNA molecule van een andere ouder. De moleculaire basis van dit proces is nog niet opgehelderd. Alle waargenomen recombinatieverschijnselen kunnen echter verklaard worden indien men uitgaat van één van de volgende twee veronderstellingen:

- a) twee DNA moleculen van verschillende ouders kunnen beide breken, waarna complementaire stukken zich tot een nieuwe eenheid kunnen verenigen. Dit duidt men aan als recombinatie door middel van breuken-hereniging (Eng.: breakage and reunion).
- b) er wordt een molecule uit geheel nieuw materiaal gevormd, waarbij tijdens de synthese de beide ouderlijke moleculen afwisselend als matrijs fungeren. Dit noemt men recombinatie door middel van matrijskeuze (Eng.: copy choice).

2. Levenscyclus van de T-even bacteriofagen.

Door Delbrück werd omstreeks 1940 een school van onderzoekers gevormd, die zich concentreerden op het onderzoek van de T-even bacteriofagen; dit heeft geleid tot de grondige kennis van deze virussen en hun reproductie in de bacterie.

Aan de T-even bacteriofagen kan men een kop en een staart onderscheiden. De kop heeft ongeveer de vorm van een bipiramidaal hexagonaal prisma; de staart is samengesteld uit een buis (Eng.: core) die aan de kop bevestigd is en om deze buis bevindt zich een cilinder van dezelfde lengte, de zogenaamde schede (Eng.: sheath) welke contractiel is. Aan het distale einde van de buis is een zeshoekige basisplaat bevestigd waaraan 6 fibrillen zijn verbonden.

Kort samengevat bestaat de levenscyclus van een T-even bacteriofaag uit de volgende fasen: (de getallen gelden voor optimale kweekomstandigheden)

- 1) De fagen hechten zich met behulp van hun staartfibrillen aan de celwand van de gastheer.
- 2) Door een nog niet opgehelderd injectiemechanisme wordt het faag DNA via de staartbuis in de bacterie gebracht.
- 3) Het hierop volgende stadium, dat ongeveer 12 minuten duurt, wordt de eclips genoemd: als men namelijk in deze periode de cel kunstmatig

openbreekt, vindt men geen infectieuze faagdeeltjes. Het faag DNA induceert de vorming van een groot aantal enzymen die nodig zijn voor de synthese van nieuw faag DNA en nieuw faag eiwit. Tijdens deze periode wordt het DNA van de gastheer afgebroken.

4) Na de eclips ontstaan de eerste intacte fagen en in de nu volgende rijpingsperiode worden er uit de gevormde DNA moleculen en faag eiwitten ongeveer 100-200 fagen geassembleerd.

5) Ongeveer 20-25 minuten na het begin van de infectie barst de bacterie en komen de fagen vrij. De tijd die verloopt tussen infectie en het barsten van de bacterie wordt de latente periode genoemd. De vrijgekomen fagen kunnen, indien groeiende bacteriën aanwezig zijn, een volgende cyclus beginnen. Vindt een dergelijk proces plaats op een vaste voedingsbodem, dan zullen er door het lyseren van de bacteriën op den duur zichtbare ophelderingen ontstaan in het bacteriedek; deze worden plages genoemd. Daar één faag een plage kan vormen, is het tellen van plages de meest gebruikte methode om het aantal fagen per ml suspensie (titer) te bepalen. Vindt vermeerdering plaats in een vloeibare cultuur, dan zullen op den duur alle daarvoor in aanmerking komende bacteriën lyseren en men krijgt een zogenaamd faag-lysaat, bestaande uit fagen, bacterieresten en niet-gelyseerde ("dode" en resistente) bacteriën.

3. Biologische activiteit van geïsoleerd bacteriofaag DNA.

Er zijn de laatste jaren vrij veel systemen beschreven waarmee het mogelijk is de biologische activiteit van gezuiverd bacteriofaag DNA aan te tonen. In deze systemen worden normale bacteriën en protoplasten als gastheer gebruikt; hieraan wordt soms DNA zonder meer toegevoegd, soms is de aanwezigheid van een hulpfaag vereist. Men kan de bovengenoemde systemen in vier groepen indelen:

A) *Protoplasten zonder hulpfaag.* Hiermede is de biologische activiteit aangetoond van het DNA van de bacteriofaag ϕ X174, dat een enkelstreng structuur bezit(14-17) en van het DNA van dezelfde faag in de dubbelstreng structuur (het zogenaamde "replicative form"(RF)-DNA)(18). Verder kon met dit systeem de biologische activiteit worden aangetoond van DNA van de faag λ (19,20), van T1-DNA(20) en van T7-DNA(21).

B) *Protoplasten met hulpfaag.* Dit systeem is toegepast om de biologische activiteit van T4-DNA aan te tonen(22,23) en zal in dit proef-

schrift nader beschreven worden. De hulpfaag wordt hier toegevoegd als π -deeltje.

C) *Bacteriën zonder hulpfaag.* Hiervoor worden cellen gebruikt die tot een transformeerbare soort behoren en in een competente toestand verkeren. Hiermede is de biologische activiteit aangetoond van het DNA van de fagen HP1 en S2, die *Haemophilus influenzae* als gastheer hebben (24,25) en van de fagen SP8(26), SP50(27), SP82(28), Ø1, Ø25, Ø29(29) en 2C(30), met *Bacillus subtilis* als gastheer.

D) *Bacteriën met hulpfaag.* Met dit systeem werd de biologische activiteit aangetoond van λ -DNA(31-35) en van het DNA van de faag SP8(28). Hier berust de activiteit niet op de faagvorming door het DNA, maar op de transformatie van de hulpfaag. De transformatie van T4, zoals deze door van de Pol en van Arkel op het M.B.L. is ontwikkeld, heeft dus de meeste gelijkenis met deze groep.

Het door Kaiser ontwikkelde systeem(31-35), waarmede de biologische activiteit van λ -DNA bepaald kan worden, verdient een nadere beschrijving. Hierbij worden cellen van de bacteriestam *E.coli* K12 geïnfecteerd met de bacteriofaag λ en daarna wordt DNA toegevoegd van een genetisch verschillende mutant van λ . De functie van de hulpfaag is tweeledig: hij is op de één of andere wijze behulpzaam bij de penetratie van het toegevoegde DNA en kan door recombinatie van zijn ingebrachte genoom met bijvoorbeeld halve DNA moleculen de genetische kenmerken van deze halve moleculen tot uiting brengen. Het is echter niet duidelijk of de biologische activiteit van ongebroken moleculen ook recombinatie met de hulpfaag vereist. Wel blijken alle kenmerken, die op het toegevoegde DNA molecule liggen, in de nakomelingen aanwezig te zijn. Uit de resultaten van Kaiser blijkt dat halve moleculen een biologische activiteit bezitten die ongeveer 1% bedraagt van die van ongebroken moleculen. Hoewel Kaiser een andere verklaring geeft, zou dit ons inziens een aanwijzing kunnen zijn dat bij het tot uiting komen van de biologische activiteit van halve en ongebroken moleculen verschillende mechanismen betrokken zijn. In het systeem van Kaiser zit dus een element dat een zekere overeenkomst vertoont met het T4-faagtransformatie systeem, namelijk recombinatie van het toegevoegde DNA met het genoom van de aanwezige hulpfaag.

Tenslotte dient vermeld te worden de vorming van λ -fagen na toevoeging van λ -DNA aan een geconcentreerd subcellulair systeem (36), hoewel de efficiëntie hiervan bijzonder laag is.

De met deze systemen bereikte efficiënties, dat wil zeggen het aantal transformanten of nieuw gevormde fagen dat per toegevoegd faag-equivalent ontstaat, zijn weergegeven in tabel I.

TABEL I

Vergelijking van de efficiënties van een aantal systemen waarin de biologische activiteit van geïsoleerd bacteriofaag DNA werd bepaald.

DNA preparaat	aantal infectieve centra per toegevoegd faagequivalent	lit.ref.
1. ØX174-DNA	$10^{-3}-10^{-4}$	67
2. λ-DNA	10^{-6}	20
3. T1-DNA	10^{-7}	20
4. SP82-DNA	$6 \times 10^{-5}^*$	28
5. SP50-DNA	10^{-7}	27
6. HP1-DNA	$6 \times 10^{-3}-10^{-4}$	24
7. λ-DNA	$1-5 \times 10^{-3}$	35
8. SP82-DNA	$1,8 \times 10^{-4}$	28

In de nummers 1 tot en met 6 berust de biologische activiteit op faagvorming door DNA in sferoplasten (1 t/m 3) of in cellen (4 t/m 6). In geval 7 en 8 berust de biologische activiteit op transformatie van een gelijktijdig toegevoegde hulpfaag.

* Geldt voor 2 µg DNA (uit de helling van de concentratiewerkingscurve blijkt namelijk dat het aantal infectieve centra ongeveer evenredig is met de vierde macht van de DNA concentratie).

Met het in dit proefschrift beschreven systeem werd een efficiëntie bereikt van $6 \times 10^{-5}/W$, waarbij W de (onbekende) worpgrootte van de transformant voorstelt (zie hoofdstuk IV). Ten opzichte van de systemen waarin ook van een hulpfaag gebruik wordt gemaakt steekt ons faagtransformatie systeem vrij ongunstig af. De verschillende systemen laten zich echter moeilijk met elkaar vergelijken vanwege de verschillen in typen van de organismen die er bij betrokken zijn en in de specifieke experimentele omstandigheden waaronder de experimenten uitgevoerd worden.

Infectie van E.coli cellen met DNA geïsoleerd uit de T-even fagen is niet waargenomen. Waarschijnlijk is het passeren van de celwand door DNA moleculen niet mogelijk. Een enkele maal is over de transformatie van E.coli gerapporteerd(37-39) doch de experimenten moeten met een zekere reserve bezien worden, te meer daar pogingen in andere laboratoria zonder succes bleven. Een uitzondering moet gemaakt worden voor het werk van Kaiser(31) en van Taylor en Yanofsky(40), die in staat waren E.coli K12 te transformeren met DNA, geïsoleerd uit transducerende fagen (resp. λ_{dg} en $\phi 80$).

Verwijdering van de celwand leek daarom de aangewezen weg om de cel beter toegankelijk te maken voor DNA moleculen. Er zijn verschillende methoden beschreven om "protoplasten" van E.coli te bereiden; de meest gebruikte zijn een behandeling van de cellen met lysozym in combinatie met ethyleendiaminetetraäyzijnzuur (EDTA)(41-44) en het kweken van cellen in aanwezigheid van penicilline(45-47). In een isotonisch medium ontstaan dan bolvormige structuren, die gevoelig zijn voor osmotische veranderingen. Op aanbeveling van Brenner c.s.(48) wordt de term protoplast alleen gebruikt voor dat gedeelte van de bacterie, dat binnen de celwand ligt, dus voor een structuur waarvan de celwand geheel afwezig is. De osmotisch gevoelige structuren die ontstaan na behandeling van Gram-negatieve bacteriën met lysozym-EDTA of met penicilline bevatten waarschijnlijk nog celwand materiaal en worden sferoplasten genoemd(49).

Als men E.coli eerst infecteert met faag en daarna de cellen omzet in sferoplasten met behulp van lysozym-EDTA verkrijgt men niettemin normale faagopbrengsten; dit is een aanwijzing dat de faag zich normaal vermeerdert in sferoplasten (43, 44, 50).

Over de vraag of sferoplasten van E.coli geïnfecteerd kunnen worden door intacte fagen, zijn de meningen verdeeld. Voor een overzicht zij verwezen naar McQuillen(51).

Wel is het mogelijk sferoplasten te infecteren met een voorbehandelde faag die niet meer infectieus is voor cellen. Dergelijke experimenten werden uitgevoerd door Spizizen(5) en Fraser c.s.(6). Hun werk vormt dan ook een belangrijk uitgangspunt voor het in dit proefschrift beschreven systeem.

Spizizen bereidde sferoplasten van E.coli door behandeling van de cellen met lysozym bij pH 9,0 en infecteerde deze vervolgens met verhitte (15 min. bij 71°) en daarna aan een osmotische schok onderworpen T2 fagen. De titer van een dergelijk preparaat, dat 2×10^{11} faagequivalenten bevatte, was $< 10^2$ /ml, maar na 60 min. incubatie met sferoplasten van E.coli B of B/2 bedroeg de titer 10^8 - 10^9 /ml. Voorbehandeling

van het faagpreparaat met trypsine reduceerde de activiteit tot minder dan 0,1%, terwijl na een behandeling met DNA-ase de activiteit tot 2,5% van de oorspronkelijke waarde was afgenomen. De oorzaak van deze daling tot 2,5% is niet bekend; wel kon worden aangetoond dat dit niet werd veroorzaakt door afbraak van DNA. Werd namelijk de incubatie met DNA-ase in aanwezigheid van citraat (een remmer voor DNA-ase) uitgevoerd, dan bedroeg de activiteit ook 2,5% van de oorspronkelijke waarde. Spizizen wijst op de mogelijkheid van contaminatie van het DNA-ase preparaat met een proteolytisch enzym en concludeert uit zijn experimenten dat het voor sferoplasten infectieuze deeltje waarschijnlijk bestaat uit DNA brokstukken, die bijeen gehouden worden door een eiwitlaag, in overeenstemming met het feit dat geïsoleerd DNA geen activiteit meer vertoont.

Fraser c.s. (6) en Mahler en Fraser (8) bereidden hun sferoplasten met behulp van de lysozym-EDTA methode en infecteerden deze met een preparaat van T2-fagen, dat behandeld was met 8 M ureum. Door deze behandeling daalde de titer van 5×10^{10} /ml tot 5×10^2 /ml, maar na incubatie met sferoplasten waren er 6×10^7 fagen/ml aanwezig. De sferoplast infecterende structuur noemden zij π -deeltje. Incubatie van een suspensie van π -deeltjes met DNA-ase en trypsine leidde tot respectievelijk 80% en 95% inactivering.

Uit een vergelijking tussen de verschillende eigenschappen van het π -deeltje, T2-faag en het transformerende DNA van *Pneumococcus* concludeerden zij, dat een π -deeltje een georganiseerde structuur heeft, die naast DNA nog andere bestanddelen bevat (8).

De situatie is echter gecompliceerd, daar Dénes en Polgár (47) aantoonde dat intacte T2-faag zowel bacteriën als sferoplasten infecteert en doet lyseren, terwijl Hofschneider (52) aantoonde dat intacte T2-deeltjes adsorberen aan sferoplasten. Bovendien toonde Hofschneider aan (53) dat π -deeltjes van T2 zich kunnen vermeerderen in bacteriën die gewassen zijn in een TRIS-sucrose oplossing.

Hofschneider c.s. (54) en Müller-Jensen c.s. (55) concluderen uit hun onderzoekingen dat het π -deeltje van T2 een faag is met een gecontraheerde schede.

Van Arkel en van de Pol hebben onderzocht welke omstandigheden het gunstigst waren voor de vermeerdering van π -deeltjes van T4-faag in sferoplasten (7). Het bleek dat de penicilline-sferoplasten een aanzienlijk betere opbrengst gaven dan op andere wijze bereide sferoplasten (bijvoorbeeld 1000 maal groter dan met sferoplasten bereid volgens Fraser c.s.) (6). Verder hebben van Arkel c.s. (3, 4) aangetoond dat in een sferoplast genetische recombinatie kan plaats vinden tussen

π -deeltjes van twee verschillende mutanten van T4, waarbij de mogelijkheid uitgesloten was dat dit proces toe te schrijven zou zijn aan infectie van nog aanwezige intacte cellen door normale fagen. Ook het verschijnsel dat men aanduidt met de term "marker rescue" kon door hen worden aangetoond bij de infectie van sferoplasten door π -deeltjes.

HOOFDSTUK II

STAMMEN, MEDIA EN TECHNIEKEN

1) *Bacteriën*. De volgende stammen werden gebruikt: *E.coli* B, *E.coli* K112-12(λ h)no.3 (in het vervolg *E.coli* K genoemd) en *E.coli* S (een niet-lysogene *E.coli* K-12), welke werden verkregen van Dr.A.H.Doermann. *E.coli* BB (B Berkeley) werd verkregen via Dr.S.Brenner en *E.coli* CR63 werd ter beschikking gesteld door Dr.R.H.Epstein.

2) *Bacteriofagen*. Gebruikt werd de bacteriofaag T4B, afkomstig van het laboratorium van Dr.S.Brenner. Met dit standaardtype heeft Benzer zijn beroemde werk over de fijnstructuur van het rII-gen verricht (56-58). Er is echter nog een ander standaardtype in omloop, namelijk T4D, waarmede Dr.A.H.Doermann en medewerkers recombinatie experimenten verrichten. Weliswaar verschilt dit type in minstens drie eigenschappen van T4B(59), maar we zijn er in ons onderzoek van uitgegaan, dat beide stammen voldoende homoloog zijn om in één experiment te worden gebruikt. In enkele experimenten werd namelijk DNA van T4B gebruikt om een T4D-mutant te transformeren.

Van Dr.S.Benzer werden verkregen de rII-mutanten: r_{1272} , r_{H88} en r_{221} ; van Dr.R.S.Edgar de rI-mutant r_{48} , en van Dr.R.H.Epstein de amber-mutant amN135amB256 (een dubbelmutant), die in het vervolg am5 genoemd wordt, omdat de loci in gen nummer 5 liggen(60). Van Dr.C.Bresch uit Keulen werden verkregen de mutanten r_{147} , r_{227} , r_{205} , r_{320} , r_{271} , r_{114} , r_{287} en de vijfvoudige mutant $r_{147}r_{320}r_{271}r_{114}r_{287}$ (in het vervolg r_{5x} genoemd).

3) *Media*. De samenstelling van de gebruikte media is in Tabel II weergegeven.

4) *Isolatie van rII-mutanten*. De plage die door het standaardtype faag T4B gevormd wordt in een bacteriedek van *E.coli* B heeft een diameter van 1 à 2 mm; de opheldering is niet scherp begrensd, maar loopt geleidelijk in het bacteriedek over. Met een frequentie van ongeveer

TABEL II

Samenstelling van gebruikte media.

Medium no.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
Agar g/l					20	10	6			
CaCl ₂ 0,1M ml/l				1						
Cas. $\frac{x}{2}$ g/l			15							
Gelatine mg/l				10						
Gistextract g/l									1,5	15
Glucose g/l						1	1		1	10
Glycerol g/l			24	4						
KCl g/l				2						
K ₂ HPO ₄ g/l									3,68	
KH ₂ PO ₄ g/l	75		4,5						1,32	
MgSO ₄ ·7H ₂ O g/l		20	0,3	1						20
Melkzuur 90% g/l				7						
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O g/l	378		26		2					
NaCl g/l		50		5	3	8	8	5	3,5	
NaOH g/l				2,8						
Na-citraat g/l						2	2			
NH ₄ Cl g/l		100	0,6	1						
Pepton g/l					10				5	50
Trypton g/l						10	10	10		
Vleesextract g/l					5				1,5	15
pH			7,0 -7,3	7,0	7,4	6,8 -7,0	6,8 -7,0		7,0	

1= Oplossing A

2= Oplossing B

Minimaal medium bevat per liter 40 ml A en 10 ml B. Hieraan werd de vereiste hoeveelheid glucose toegevoegd uit een 50%-ige oplossing.

3= 3XD-medium, een modificatie van Brenner (persoonlijke mededeling aan van de Pol) van het glycerol medium van Fraser en Jerrel(61).

MgSO₄.7H₂O werd afzonderlijk gesteriliseerd.

4= glycerol-lactaat medium volgens Hershey en Chase(2). Aan dit medium werd nog Na₂HPO₄.12H₂O (5 µg P/ml) toegevoegd.

5= bouillonagar, gebruikt voor schuine-buis-cultures.

6= tryptonagar volgens Hershey en Rotman(62), gebruikt als onderlaag agar bij faagtitraties.

7= bovenlaag agar voor faagtitraties.

8= tryptonwater.

9= "penassay"-bouillon

10= geconcentreerde "penassay"-bouillon. Dit medium werd gesteriliseerd door middel van filtratie.

Glucose werd afzonderlijk gesteriliseerd als een 50%-ige oplossing gedurende 15 min. bij 110°. De media werden zo nodig met HCl of NaOH op de vereiste pH gebracht.

Agar, gistextract, pepton, trypton en vleesextract waren producten van Difco.

Cas.^x is een afkorting voor een caseïnehydrolysaat dat vrij van vitamines is.

Gedefosforyleerd caseïnehydrolysaat werd als volgt bereid: Na toevoeging van 15 g MgSO₄.7H₂O aan één liter van een 10%-ige oplossing van technisch caseïnehydrolysaat werd de oplossing met geconcentreerde ammonia op pH 8 gebracht. Na twee uur bewaren bij kamertemperatuur werd gecentrifugeerd en werd de bovenstaande vloeistof na toevoeging van 6,05 g TRIS op pH 7,2 gebracht met 2 N zoutzuur.

TABEL III

Het fenotype (plage morfologie) van r-mutanten van T4 bij titratie op enkele E.coli stammen*.

faagstam	plage morfologie bij uitzaaien op		
	E.coli B	E.coli S	E.coli K
T4 standaard	standaard	standaard	standaard
T4 rI	r	r	r
T4 rII	r	standaard	geen plages
T4 rIII	r	standaard	standaard

r is de vorm van een plage die een r-mutant op E.coli B geeft.

* Overgenomen uit Benzer (57).

5×10^{-4} komen er plages voor, die iets groter zijn en duidelijk opvallen door het feit, dat de rand wel scherp begrensd is. Dit zijn de zogenaamde r-mutanten (afgekort van het Engelse "rapid lysis"); het standaardtype wordt dan als r^+ aangeduid.

Na het rein kweken van verscheidene onafhankelijk van elkaar geïsoleerde r-mutanten blijkt dat deze in drie groepen te verdelen zijn op grond van hun gedrag bij titratie op verschillende stammen van E.coli. In Tabel III wordt hiervan een overzicht gegeven.

De groep die op E.coli K geen plages vormt noemt men rII-mutanten. Deze eigenschap maakt ze bijzonder geschikt als proefmateriaal, omdat hierdoor selectie mogelijk is van rII^+ -fagen uit een groot aantal rII-fagen. Het "oplossend vermogen" van deze selectie wordt onder meer bepaald door de terugmutatiefrequentie waarmee rII naar rII^+ terugmu-teert en door de mate waarin toch nog enige vermeerdering van rII-mu-tanten in K cellen plaats vindt (de zogenaamde transmissie-coëfficiënt).

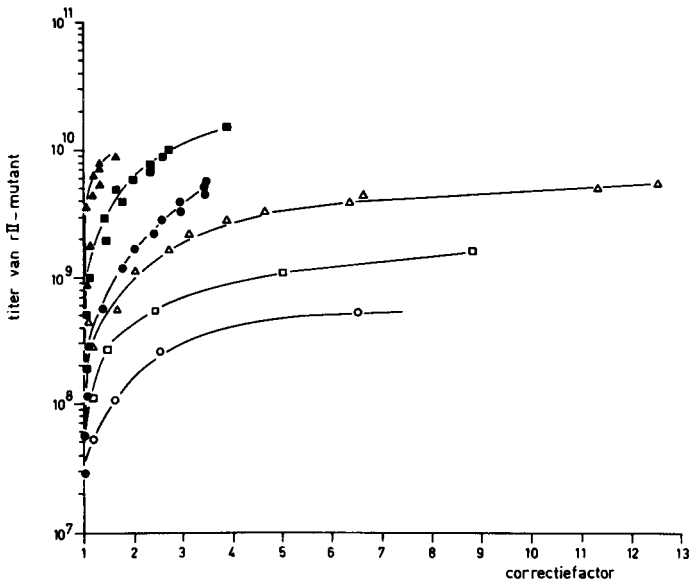
We hebben dan ook gebruik gemaakt van mutanten met een lage terugmutatiefrequentie en een lage transmissie-coëfficiënt. De in ons werk veel gebruikte mutanten r_{51} en r_{24} , die aan bovengestelde criteria voldoen, zijn beide door ons geïsoleerd en wel uit plages van het standaardtype, die tevoren behandeld waren met salpeterigzuur, ter verhoging van de mutatiefrequentie. De getallen 24 en 51 zijn eigen isolatienummers en deze dienen dus niet verward te worden met de isolatienummers van Doermann.

Vermeerdering en zuivering van rII-mutanten geschiedde op dezelfde wijze als beschreven zal worden voor het standaardtype, alleen werd als gastheer nu E.coli BB gebruikt, daar deze stam aan eventueel aanwezige rII^+ -fagen geen selectief voordeel biedt, hetgeen E.coli B wel doet.

De bepaling van de titer van de rII^+ -fagen temidden van een grote overmaat rII-mutanten vereiste soms de toepassing van een correctie. In figuur 1 zijn een aantal experimenten weergegeven waarin werd nagegaan hoe de rII^+ -titer wordt beïnvloed door de aanwezigheid van een overmaat rII-mutanten en door de concentratie aan indicator cellen (in dit geval E.coli K).

Als de titer van de indicator bacteriën maar voldoende hoog is heeft de aanwezigheid van 10^9 rII-mutanten per ml in een mengsel van rII^+ en rII weinig of geen invloed op de rII^+ -titer, wanneer 0,1 ml van dit mengsel wordt uitgezaaid. Daar de titer van de indicator cellen meestal varieerde tussen 6×10^9 en $1,5 \times 10^{10}$ cellen per ml, behoefde alleen dan deze correctiefactor gebruikt te worden wanneer het incuba-

tiemengsel onverdund werd uitgezaaid en er een hoge opbrengst aan rII-mutanten was.



Figuur 1

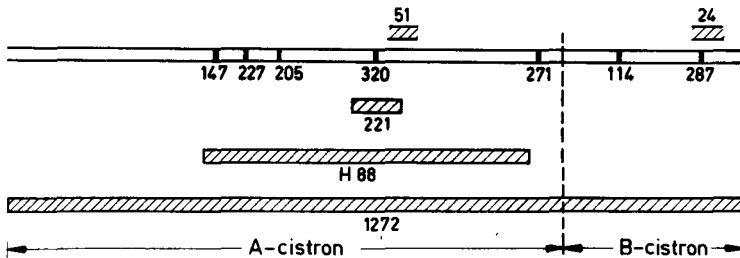
De invloed van de titer van E.coli K en van de hoeveelheid rII-mutanten in een mengsel van rII⁺- en rII-fagen op de rII⁺-titer. Er werden mengsels bereid, die steeds 2×10^3 rII⁺-fagen/ml bevatten en variërende hoeveelheden rII-mutanten. Hiervan werd 0,1 ml in de bovenlaag agar gemengd met 0,1 ml van een cultuur van E.coli K als indicator bacteriën waarvan de titer ook gevarieerd werd. De correctiefactor op de horizontale as is het getal waarmee de verkregen rII⁺-titer moet worden vermenigvuldigd om de ware rII⁺-titer in het mengsel te verkrijgen. E.coli K met de volgende titers werd gebruikt: ○ 2×10^8 /ml; □ 5×10^8 /ml; △ 9×10^8 /ml; • 10^9 /ml; ■ 6×10^9 /ml; ▲ $1,8 \times 10^{10}$ /ml.

5) *Kruising van rII-mutanten.* Om enig idee te krijgen omtrent de ligging van de loci in het rII-gen van de door ons geïsoleerde rII-mutanten werden ze gekruist met een aantal mutanten die in de literatuur beschreven zijn. Daar kruisingsresultaten van bacteriofagen nogal beïnvloed worden door de omstandigheden waaronder de kruisingen worden uitgevoerd, volgt hieronder de procedure.

Een gedurende de nacht bij 37° gekweekte cultuur van E.coli B in

tryptonwater werd honderd maal verdund met vers tryptonwater en na 80 min. aereren bij 30° gecentrifugeerd. Het sediment werd opgenomen in tryptonwater tot een concentratie van 2×10^8 bacteriën/ml en L-tryptofaan werd toegevoegd tot een concentratie van 20 $\mu\text{g/ml}$. Van de te kruisen mutanten werden suspensies gemaakt die 3×10^9 fagen/ml bevatten. Gelijke volumina van de twee faagsuspensies werden gemengd en 0,5 ml van dit mengsel werd gevoegd bij 0,5 ml van de bacteriesuspensie. Na 5 min. incuberen bij 37° werd het mengsel 10^4 maal verdund met tryptonwater, waarna de incubatie nog 40 min. werd voortgezet. Daarna werd geschud met chloroform en in het verkregen lysaat werd het aantal rII- en rII⁺-fagen bepaald door titratie op respectievelijk E.coli B en E.coli K. De recombinatiefrequentie werd berekend door twee maal de rII⁺-titer (om ook de ontstane dubbelmutanten in rekening te brengen) uit te drukken als percentage van het totaal aantal nakomelingen.

Op deze wijze werd de recombinatiefrequentie bepaald tussen de door ons geïsoleerde r₅₁- en r₂₄-mutanten enerzijds en enkele door Benzer(58) beschreven mutanten anderzijds. Uit de verkregen gegevens werd ruwweg de ligging bepaald van de r₅₁- en r₂₄-loci ten opzichte van de andere mutaties, en dit is schematisch weergegeven in figuur 2.



Figuur 2

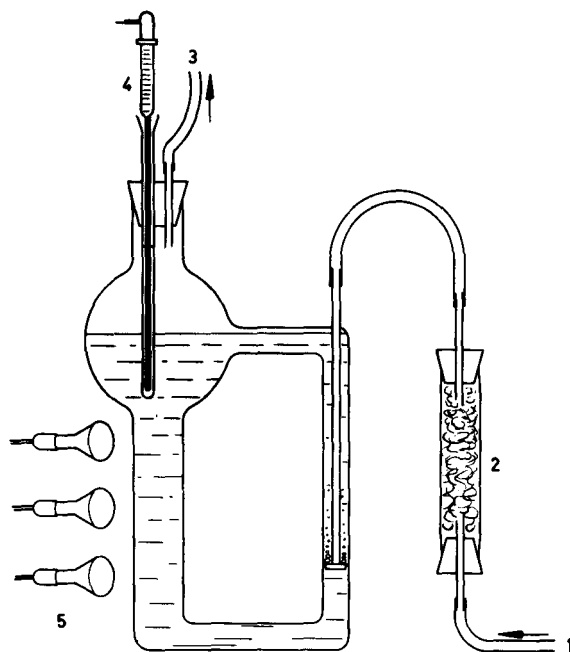
Schematische weergave van de ligging van enkele kenmerken. Op de open balk is de ligging van enkele kenmerken in het rII-gen van de bacteriofaag T4 aangegeven. De gearceerde balken illustreren naast de vermoedelijke plaats van de r₅₁- en r₂₄-kenmerken ook de plaats en de grootte van de deleties in de mutanten r₂₂₁, r_{H88} en r₁₂₇₂.

De ligging van de loci van de door Benzer geïsoleerde mutanten is overgenomen uit Benzer(58), die de plaatsbepaling verricht heeft met behulp van de druppeltest in combinatie met deletiemutant. Met deze methode wordt wel de juiste volgorde van de loci van de mutanten verkregen, maar de onderlinge afstand tussen de loci is op deze wijze niet

nauwkeurig te bepalen. Uit de door ons verkregen kruisingsresultaten bleek dat r_{51} en r_{24} ongeveer op de aangegeven plaatsen moesten liggen.

Het feit dat terugmutanten van r_{51} en r_{24} niet zijn waargenomen doet vermoeden dat dit deletiemutanten zijn. Uit de kruisingsresultaten met r_{51} bleek, dat hier de mutatie geen uitgebreide deletie kan zijn; bij r_{24} bleek het niet mogelijk een dergelijke conclusie te trekken door de ongunstige ligging van de mutatie in het rII-gen.

6) *Vermeerdering en zuivering van de bacteriofaag T4B.* Voor de bereiding van een T4-lysaat met een hoge titer werd gebruik gemaakt van een opstelling zoals in figuur 3 is weergegeven. Dit is een vereenvou-



Figuur 3

Kweekapparaat voor de bereiding van faaglysaten. 1. Luchttoevoer. 2. Met watten gevuld luchtfilter. 3. Afvoer van de luchtstroom. 4. Contactthermometer, in een met water gevulde buis, die het in- en uitschakelen regelt van 5. Verwarmingslampen (Infraphil 150 W; Philips). Voor een apparaat met een capaciteit van 5 l zijn vijf lampen voldoende om de temperatuur op 37° te handhaven.

digde uitvoering van een door Fraser beschreven apparaat(64). In de glasblazerij van het M.B.L. werden enkele van deze apparaten gemaakt met capaciteiten van 5 l, 2 l, 1,2 l en 0,5 l. Het belangrijkste voordeel van deze apparaten ligt in de zeer doeltreffende beluchting; dit wordt veroorzaakt doordat de opstijgende luchtstroom een snelle circulatie van het medium te weeg brengt hetgeen een effectieve gasuitwisseling mogelijk maakt. Dit is belangrijk voor een goede faagproductie.

Het kweekapparaat werd gevuld met 3XD-medium en geënt met een gedurende de nacht gekweekte cultuur van E.coli B in hetzelfde medium (50 ml ent op 5 l medium). Als na enkele uren incuberen bij 37° een concentratie van ongeveer 5×10^8 tot 10^9 bacteriën/ml bereikt was, werd een zodanige hoeveelheid T4B-faag toegevoegd, dat de multipliciteit van infectie 0,01 bedroeg. Gelijktijdig werd L-tryptofaan toegevoegd tot een concentratie van 20 µg/ml. Daarna werd de incubatie nog 4 uur voortgezet, waarbij buitensporig schuimen werd onderdrukt door een antischuimmiddel (Dow Corning Antifoam A Spray) in de hals van het apparaat te spuiten. Na afloop werd chloroform toegevoegd (300 ml per 5 l) en de aeratie nog enkele minuten voortgezet. Als het lysaat erg viskeus bleek te zijn, werd een kleine hoeveelheid (ongeveer 10 mg per 5 l lysaat) DNA-ase toegevoegd (Worthington Biochemical Corp., niet gekristalliseerd).

Uit dit lysaat werd de faag gezuiverd door middel van gefractioneerd centrifugeren. Eerst werd in de International PR2 centrifuge gecentrifugeerd bij 4.000 omwentelingen per min. gedurende 20 min.; uit het bovenstaande werd de faag afgescheiden door centrifugeren in een preparatieve Spinco-ultracentrifuge (Model L) bij 15.000 omwentelingen per min. gedurende 45 min. in rotor no. 21. Van het ontstane neerslag werd een suspensie verkregen door het met 5 ml minimaal medium gedurende een nacht te laten staan. Opgemerkt dient te worden dat het sediment niet mag worden opgeroerd, omdat dan de fagen beschadigd worden en de oplossing viskeus wordt.

Vervolgens werd het gefractioneerd centrifugeren herhaald en het faagsediment gesuspenseerd in 10-15 ml minimaal medium. Na een derde cyclus was het faagsediment helder en de hieruit verkregen faagsuspensie werd als zuiver beschouwd. Uit een cultuur van 5 l werd op deze wijze 0,5-1,5 g faag verkregen.

Suspensies van bacteriofagen werden bewaard bij een temperatuur van 4°-8° in concentraties variërend van 5×10^{12} - $1,5 \times 10^{13}$ fagen per ml. Tijdens langdurig bewaren nam de titer langzaam af; in een jaar daalde de titer tot ongeveer de helft.

7) *Kweken en zuiveren van de faag T4B gemerkt met ^{32}P .* Voor de productie van met ^{32}P gemerkte faag werd een groei-apparaat met een capaciteit van 500 ml gebruikt. Het hiervoor gebruikte glycerol-lactaat medium werd geënt met 10 ml van een gedurende de nacht gekweekte cultuur van *E. coli* B in hetzelfde medium; tegelijk werd 5 mC ^{32}P toegevoegd (geleverd als dragervrij fosforzuur door The Radiochemical Centre, Amersham, Engeland). Dit radioactieve fosforzuur werd van te voren in ongeveer 30 ml medium gebracht en enkele minuten bij 37° geïncubeerd in aanwezigheid van 1 mg katalase (Nutritional Biochemical Corporation) om de aanwezige peroxyden af te breken. De bacteriegroei werd gestimuleerd door toevoegen van gedefosforyleerd caseïnehydrolysaat tot een eindconcentratie van 0,2%.

Als een bacterieconcentratie van $2\text{--}5 \times 10^8$ per ml was bereikt, werd T4B-faag toegevoegd met een multipliciteit van infectie van 0,01 en L-tryptofaan tot een concentratie van $20 \mu\text{g/ml}$. Verder werd dezelfde procedure gevolgd als bij de bereiding van niet-gemerkt faag, behalve dat volstaan werd met twee cycli van gefractioneerd centrifugeren in plaats van drie*.

Op deze manier werd een opbrengst verkregen van ongeveer 10^{13} fagen, die bij de gebruikte specifieke radioactiviteit van het ^{32}P drie tot vier atomen ^{32}P per faag bevatten.

8) *Isolatie van DNA uit faag.* Bij de isolatie van DNA uit faag werd het voorschrift van Mandell en Hershey gevolgd (64). De faagsuspensie werd verdund tot 2×10^{12} fagen per ml in een oplossing van 0,1 M fosfaatbuffer van pH 7,1 en 0,1 M NaCl. Aan een volume van deze suspensie in een centrifugebuis werd een gelijk volume van gedestilleerde en met water verzadigde fenol van 0° toegevoegd. Dit mengsel werd zo krachtig mogelijk gedurende twee minuten met de hand geschud. Het schudden geschiedde bij kamertemperatuur. Daarna werd gedurende 10 min. bij 4.000 omwentelingen per min. gecentrifugeerd bij 0° om de fenol- en de waterlaag van elkaar te scheiden. Na het verwijderen van de fenol laag (de onderste laag) met een uitgetrokken pipet werd de procedure herhaald.

Na drie extracties werd de waterlaag, die het DNA bevatte, zevenmaal geschud met een half volume peroxyde-vrije ether om de fenol te verwijderen. Na de laatste ether extractie werd het laatste restje

* De heer F. J. A. Kouwenberg van het M.B.L. ontdekte dat een hogere opbrengst aan faag werd verkregen, als het toevoegen van chloroform uitgesteld werd tot de volgende dag. Het lysaat werd dus gedurende de nacht bewaard bij 4° en de volgende dag werd geschud met chloroform alvorens met de zuivering te beginnen.

ether bij 37° afgeblazen. Na de DNA oplossing gemengd te hebben met een gelijk volume 0,01 M fosfaatbuffer pH 7,1 werd gedurende 48 uur gedialyseerd tegen 4 l van dezelfde buffer, waarbij éénmaal werd ververst.

Uitgaande van 2×10^{12} fagen per ml verkrijgt men een viskeuze DNA oplossing met een concentratie van circa 0,6 mg/ml; deze concentratie biedt volgens bovengenoemde auteurs bescherming tegen breuk van DNA moleculen door schuifspanningen die kunnen optreden tijdens de isolatie. Een dergelijk DNA preparaat zou, eveneens volgens Mandell en Hershey, nog 0,1-1% van de oorspronkelijke hoeveelheid faag eiwit bevatten.

Het is ook mogelijk om DNA te isoleren uit een faagsuspensie die maar 2×10^{11} deeltjes per ml bevat zonder dat breuk optreedt in de DNA moleculen (Goldberg, persoonlijke mededeling). Hierbij wordt de buis met het fenol-faag mengsel onder een zodanige hoek op een horizontale as bevestigd dat bij rotatie van deze as de aanwezige luchtbel oscilleert. Deze extractie wordt uitgevoerd door de as gedurende 15 min. met een snelheid van circa 60 omwentelingen per min. te laten draaien. Dit proces wordt tweemaal herhaald met verse fenol. Daarna wordt direct gedialyseerd tegen 0,01 M fosfaatbuffer pH 7,1. Deze methode hebben wij ook enige malen gebruikt.

De DNA concentratie in een oplossing werd altijd spectrofotometrisch bepaald, gebruik makend van de relatie: aantal μg DNA per ml = $50 \times$ absorptie bij 260 $m\mu$ (1 cm lichtweg). Deze waarde is gebaseerd op het Na-zout van thymus-DNA.

Een DNA oplossing werd altijd gecontroleerd op het voorkomen van intacte fagen door middel van titratie op indicator bacteriën.

9) *Het breken van DNA moleculen.* Gebroken DNA moleculen werden op de volgende wijze verkregen. Een injectiespuit van 10 ml werd gevuld met een DNA oplossing en met behulp van een schroefpers in een tijd van 12-14 sec. leeg gespoten door een injectienaald no. 20 (Acufirm). Een DNA oplossing werd altijd tweemaal op deze wijze behandeld. Het verkregen materiaal sedimenteerde bij centrifugeren in een sucrosegradiënt in een nauwe band, hetgeen een aanwijzing is dat het materiaal tamelijk homogeen is.

10) *Behandeling van DNA en bacteriofaag met salpeterigzuur.* Een DNA oplossing van 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ werd vijfmaal verdund met 0,1 M acetaat buffer van pH 4,2. Deze oplossing werd op 37° gebracht en daarna werd van een oplossing van 5 M NaNO_2 zoveel toegevoegd tot de eindconcentratie 0,1

M NaNO_2 was. Na diverse tijden werden monsters genomen; deze werden viermaal verdund met 0,5 M TRIS-buffer van pH 8,0 en gedurende de nacht gedialyseerd tegen 0,01 M fosfaatbuffer van pH 7,1 bij 4°.

De behandeling van faag met salpeterigzuur geschiedde op dezelfde wijze, met dien verstande dat de dialyse achterwege werd gelaten, doch de faagmonsters direct werden getitreerd om het aantal plaguevormende deeltjes te bepalen.

11) *Bestraling van DNA en bacteriofaag met ultraviolet licht.* De bestraling met ultraviolet licht (UV) werd uitgevoerd met behulp van een lagedruk kwiklamp (Philips 30 Watt TUV), die 90% van zijn stralings-energie uitzendt bij een golflengte van 254 m μ . De intensiteit van de straling bedroeg op een afstand van 59 cm van de lamp 9 erg/mm²/sec. Oplossingen van DNA en suspensies van faag in 0,01 M fosfaatbuffer pH 7,1 werden in hoeveelheden van 2 ml op een horlogeglas bestraald terwijl de oplossing geroerd werd met behulp van een magnetische roerder.

12) *Bereiding van sferoplasten.* Sferoplasten werden bereid uit E.coli B98, een stam die beter voldoet in het transformatie systeem dan E.coli B (zie Hoofdstuk III). De procedure verliep als volgt: E.coli B98 werd gekweekt op schuine-buis-cultures van bouillonagar en bewaard bij 4°. Vanaf deze cultuur werd overgeënt in minimaal medium waaraan 0,05% glucose was toegevoegd. Na een nacht incuberen bij 30° als stilstaande cultuur was de bacterie concentratie ongeveer 4 à 5x10⁸ cellen per ml. Hiervan werd 25 ml gefiltreerd door een Millipore filter (poriediameter 0,45 μ) en de verzamelde cellen werden opgenomen in 20 ml van bovengenoemd medium. Na 20 min. incuberen bij 37° werd 15,6 ml van deze celsuspensie gepipetteerd in een 200 ml erlenmeyer, die 2,8 g vaste, steriele sucrose bevatte. Hieraan werd toegevoegd 2 ml geconcentreerde "penassay"-bouillon en 1 ml van een penicilline oplossing die 14.000 eenheden per ml bevatte. Deze cultuur werd gedurende 60 min. geschud in een Warburg bij 30° met een frequentie van ongeveer 60 per min.

Bij waarnemen door de fasecontrast microscoop bleek dat de meeste staafvormige cellen omgezet waren in bolletjes en na tellen met een telkamer bleken er ongeveer 3x10⁸ bolletjes per ml aanwezig te zijn. De gevormde sferoplasten werden vervolgens "gewassen" op een Sephadex-kolom. Hiertoe lieten we 3 g Sephadex G200 (Pharmacia) zwellen in 151 ml gedestilleerd water waaraan 8 ml oplossing "A" was toegevoegd. Na sterilisatie gedurende 20 min. bij 110° werd 41 ml 2 M sucrose toegevoegd en deze oplossing werd in een kolom gegoten van 3 x 30 cm.

Twintig ml van de sferoplastsuspensie werd op de kolom gebracht

en vervolgens geëluëerd met dezelfde oplossing als waarin Sephadex was gesuspenderd. Het ogenblik waarop de sferoplasten in het eluaat verschijnen is duidelijk waarneembaar aan het troebel worden.

Al naar behoefte werd 10-20 ml sferoplastsuspensie opgevangen en hieraan werd per 20 ml toegevoegd 2 ml geconcentreerde "penassay"-bouillon en 1 ml penicilline oplossing (14.000 E/ml). Uit tellingen met de telkamer bleek dat dan nog ongeveer $1,5 \times 10^8$ sferoplasten per ml aanwezig waren. De sferoplasten werden daarna direct gebruikt voor de proeven. Het enige uren laten staan van een sferoplastpreparaat vermindert in sterke mate de opbrengst aan faag in het testsysteem.

13) *Bereiding van π -deeltjes*. De desbetreffende faagmutant werd verdund in 0,1 M fosfaatbuffer pH 7,1 tot 4×10^{11} fagen per ml. Van deze faagsuspensie werd 0,37 ml onder voortdurend schudden toegevoegd aan 0,63 ml van een 9 M ureumoplossing in 0,1 M fosfaatbuffer pH 7,1 met 2% albumine (bovine albumin, Poviet, Amsterdam). Er werd voor gezorgd dat alle faagdeeltjes in contact met de ureumoplossing kwamen. Na 10 min. incuberen bij 37° werd dit mengsel 10 maal verdund met bovengenoemde oplossing zonder ureum.

Suspensies van π -deeltjes werden bewaard bij 4°.

14) *Uitvoering van een faagtransformatie experiment*. In een buisje van 17 x 60 mm werden achtereenvolgens 0,5 ml sferoplast- en 0,1 ml π -deeltjessuspensie gepipetteerd. Na 9-15 min. incuberen bij 37°, waarbij geschud werd in een waterbad, werd 0,5 ml van de te testen DNA oplossing toegevoegd. Na 3 uur incuberen bij 37° werd het lysaat uitgezaaid op de geschikte indicator bacteriën. De biologische activiteit van een bepaald DNA preparaat werd dan uitgedrukt in de verhouding: aantal transformanten/totaal aantal nakomelingen. Dit getal werd aangeduid als de transformatie-index (T.I.).

Gebleken is dat de opbrengst van getransformeerde fagen ongeveer parallel loopt met de totale faagopbrengst. Nu is deze faagopbrengst nogal gevoelig voor kleine veranderingen in experimentele omstandigheden en derhalve zou ook de opbrengst aan transformanten variëren. Door de transformatie-index te gebruiken als maat voor de biologische activiteit in plaats van de absolute opbrengst worden deze schommelingen enigszins genivelleerd.

De twee controle-experimenten bestonden uit een incubatie van sferoplasten met DNA (dus geen π -deeltjes) en een incubatie van sferoplasten met π -deeltjes en buffer in plaats van de DNA oplossing.

HOOFDSTUK III

ONTWIKKELING VAN HET FAAGTRANSFORMATIE SYSTEEM

I. Voorgeschiedenis.

Zoals in de inleiding reeds werd medegedeeld is het aan van de Pol, Veldhuisen en Cohen als eersten gelukt door middel van faagtransformatie biologische activiteit van gezuiverd T4-DNA aan te tonen(22). Het destijds gebruikte testsysteem wordt hieronder in het kort weergegeven.

Sferoplasten: Van een gedurende de nacht bij 37° in "penassay"-bouillon gekweekte cultuur van *E.coli* B werden 3 delen gemengd met 7 delen "penassay"-bouillon, die 20% sucrose, 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1.000 E penicilline per ml bevatte. Na drie uur schudden bij kamertemperatuur werden de gevormde sferoplasten gecentrifugeerd en opgenomen in 1/4 van het oorspronkelijke volume "penassay"-bouillon, die nu 20% sucrose en 2% albumine bevatte.

π -deeltjes: Aan een lysaat van T4rII in 0,5% glucose bevattend minimaal medium met een titer van tenminste 10^{10} fagen per ml werd ureum toegevoegd tot een eindconcentratie van 6 M. De oplossing werd met NaOH op pH 8,0 gebracht en gedurende 60 min. bij 37° geïncubeerd. De ureum werd verwijderd door dialyse tegen een oplossing van 0,1 M NaCl en 0,02 M Na-citraat, waarbij de vloeistof zowel binnen als buiten de dialyse huls in beweging werd gehouden.

DNA: DNA werd geïsoleerd uit fagen van het standaardtype zoals is beschreven in Hoofdstuk I, 8.

Gelijke volumina DNA en π -deeltjes werden gemengd en 0,5 ml van dit mengsel werd gevoegd bij 0,5 ml van de sferoplastsuspensie; na 3 uur incuberen bij 37° in buisjes van 8x100 mm werden de nakomelingen uitgezaaid op *E.coli* B en *E.coli* K. Tabel IV, welke gedeeltelijk is overgenomen uit de desbetreffende publikatie, geeft een indruk van de opbrengst.

TABEL IV

Resultaten van het faagtransformatie systeem in de beginperiode.*

π -preparaat	DNA-preparaat	rII-titer	rII ⁺ -titer
r ₅₁	controle	10 ⁹	< 5
	T4rII ⁺ -DNA (25 μ g/ml)	5x10 ⁸	300
	id. 8 min. 78°	7x10 ⁸	180
	id. 8 min. 100°	6x10 ⁸	260
	id. +DNA-ase 1)	5x10 ⁸	< 5
	id. +trypsine 2)	3x10 ⁸	75
	T4r ₃₅ -DNA	10 ⁹	25
	T4rII ⁺ -DNA	7x10 ⁸	160
r ₃₅	T4r ₃₅ -DNA	5x10 ⁸	< 5

1) Behandeld met 0,1 μ g DNA-ase per ml gedurende 60 min. bij 37° in aanwezigheid van 10⁻³ M MgSO₄; de enzymwerking werd beëindigd door verhitting gedurende 8 min. bij 78°.

2) Behandeld met 10 μ g trypsine gedurende 60 min. bij 37°; hierna werd het enzym onwerkzaam gemaakt door toevoeging van diisopropyl fosforofluoridaat tot 10⁻³ M.

* Gedeeltelijk overgenomen uit van de Pol c.s. (22).

Hoewel het aantal transformanten laag was en de reproduceerbaarheid van de experimenten nogal te wensen overliet, bleek toch dat de DNA preparaten biologische activiteit vertoonden in die zin dat zij de vorming van rII⁺-fagen induceerden.

De verhittings experimenten wezen er op dat de biologische activiteit niet werd veroorzaakt door intacte fagen. Verder bleek dat het materiaal na de behandeling met trypsine nog actief was, hetgeen een argument is tegen de noodzaak van de aanwezigheid van een eiwitcomponent.

De experimenten met homoloog DNA (r₃₅-DNA met π -deeltjes van T4r₃₅) wezen er op dat de biologische activiteit niet toegeschreven kon worden aan een aspecifiek effect van DNA.

Uit bovengenoemde resultaten bleek duidelijk dat het noodzakelijk was om rII-mutanten te gebruiken met een zeer lage terugmutatiefrequentie, daar anders het DNA effect overheerst zou worden door het optreden van spontane terugmutaties.

Toen eenmaal was vastgesteld dat op deze wijze de biologische activiteit van DNA preparaten kon worden aangetoond, konden de resultaten als maatstaf dienen voor de beoordeling van de invloed die het aanbrengen van veranderingen in het systeem heeft op het aantal transformanten.

Het bleek al spoedig dat een hoge opbrengst aan rII-fagen (10^8 - 10^9 fagen per ml) een noodzakelijke voorwaarde was voor het optreden van rII⁺-transformanten.

Nu bevat het testsysteem twee componenten waarvan de structuur en de eigenschappen nog verre van opgehelderd zijn, namelijk sferoplasten en π -deeltjes. Getracht werd een testsysteem te verkrijgen met een hogere efficiëntie, door variaties aan te brengen in de bereiding van deze twee componenten.

2. Veranderingen in de bereiding van π -deeltjes.

Door Dr. W. Th. Daems van het Laboratorium voor Electronenmicroscopie der Rijksuniversiteit te Leiden werden met het electronenmicroscop opnamen gemaakt van een met ureum behandeld faaglysaat. Deze opnamen vertoonden veel faagdeeltjes waarvan de schede gecontraheerd was en de kop meestal geen DNA meer bevatte; deze structuren vormden rosetten van ongeveer 4-10 faagdeeltjes, waarbij de staarteinden aan elkaar kleefden(65). Deze vormen zijn ook waargenomen door Müller-Jensen en Hofschneider(55).

Hoewel directe aanwijzingen hiervoor niet bestonden, werd door ons aangenomen dat DNA bevattende fagen met een gecontraheerde schede in staat zijn sferoplasten te infecteren. Getracht werd de faagkop tegen het verlies van DNA te beschermen door bij de behandeling met ureum een stabiliserende stof toe te voegen. Het bleek dat de opbrengst aan fagen na incubatie van sferoplasten met π -deeltjes meestal groter was wanneer de ureumbehandeling was uitgevoerd in aanwezigheid van 2% albumine. Bovendien waren de albumine bevattende preparaten veel langer houdbaar.

Vervolgens werd een aanzienlijke verbetering bereikt door de π -deeltjes te bereiden uit gezuiverde faagpreparaten in plaats van uit faaglysaten; van π -deeltjes bereid uit een gezuiverd faagpreparaat liep de activiteit bij bewaren langzamer terug dan die van π -deeltjes bereid uit een faaglysaat. Het bleek mogelijk te zijn om een preparaat van π -deeltjes in bevroren toestand bij -20° te bewaren, maar ook onder deze omstandigheden liep de activiteit langzaam terug en moest maandelijks een nieuw preparaat gemaakt worden.

Tenslotte werd voor de bereiding van π -deeltjes de methode gebruikt zoals reeds eerder werd beschreven in Hoofdstuk I,13. Met deze methode werden veel betere opbrengsten aan sferoplast infecterende deeltjes verkregen, zodat van faagsuspensies met een lagere titer kon worden uitgegaan.

3. Veranderingen in de bereiding van sferoplasten en in de praktische uitvoering van het testsysteem.

Het slagen van bacterietransformaties is afhankelijk van het al dan niet competent zijn van de cellen. Alleen wanneer bacteriën in een competente fase zijn wordt DNA opgenomen. Daar waarschijnlijk ook in ons systeem het opnemen van DNA een voorwaarde is voor faagtransformatie, werden media en omstandigheden op verschillende manieren gewijzigd om competente sferoplasten te verkrijgen. Ook hier werd weer een verhoogde opbrengst aan getransformeerde fagen als criterium gebruikt.

Er zullen nu een aantal methoden worden beschreven die in de loop van dit onderzoek gedurende kortere of langere tijd gevolgd zijn bij de bereiding van sferoplasten en bij de uitvoering van de test. De aangebrachte variaties in deze methoden hadden doorgaans betrekking op één of meer van de volgende details: 1e variaties in de wijze waarop de voorcultuur gekweekt werd; 2e variaties in de wijze waarop de sferoplasten werden behandeld; 3e variaties in de wijze waarop de uitvoering van de test plaats vond. Deze drie onderdelen zullen in het hiernavolgende kort aangeduid worden als respectievelijk *voorcultuur*, *sferoplasten* en *test*.

De uitgangssituatie was dus zoals beschreven in het eerste punt van dit hoofdstuk, en we zullen dit aanduiden als methode 1.

Methode 2.

Voorcultuur : ongewijzigd.

Sferoplasten: als methode 1, maar na het centrifugeren werd het neerslag opgenomen in het sferoplastmedium volgens Fraser c.s. (44) met de volgende samenstelling: 17% sucrose, 0,03 M TRIS, met HCl op pH 8,0 gebracht.

Test: ongewijzigd.

Methode 3.

Voorcultuur : ongewijzigd.

Sferoplasten: als methode 1, maar na het centrifugeren werden de sfero-

plasten opgenomen in een medium met de volgende samenstelling: 27% sucrose, 10^{-3} M MgSO_4 , 0,03 M TRIS, met HCl op pH 8,0 gebracht.

Test: ongewijzigd.

Methode 4.

Voorcultuur : ongewijzigd.

Sferoplasten: als methode 1, maar het centrifugeren werd nu achterwege gelaten en de sferoplasten werden zonder meer gebruikt. Deze verandering werd aangebracht omdat het resuspenderen van het neerslag vaak moeilijkheden gaf. Het hiervoor noodzakelijke op en neer pipetteren van het neerslag leidde bovendien tot beschadiging van een gedeelte der sferoplasten.

Test: ongewijzigd.

Methode 5.

Voorcultuur: E.coli B werd gekweekt in minimaal medium met 0,5% glucose gedurende 6-8 uur bij 37° met aeratie; daarna werden de cellen bewaard bij 4° . De ent voor deze kweek bestond uit een vijftigvoudige verdunning van een dergelijke cultuur in bovengenoemd medium.

Sferoplasten: Drie delen van deze voorcultuur werden gemengd met 7 delen "penassay"-bouillon, die 20% sucrose, 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1.000 E penicilline per ml bevatte. Na 2-3 uur schudden bij 34° in een Warburg apparaat werden de sferoplasten gebruikt.

Test: ongewijzigd.

Methode 6.

Voorcultuur : als methode 5.

Sferoplasten: Om het verdunnen van de celsuspensie te voorkomen werden de ingrediënten van de "penassay"-bouillon in geconcentreerde vorm toegevoegd. Daartoe werd in een 200 ml-erlenmeyer 2,8 g vaste sucrose gesteriliseerd (5 min. bij 120° in een autoclaaf). Daarna werden 15,6 ml van de bacteriecultuur, 2 ml geconcentreerde "penassay"-bouillon (zie Tabel II, 10) en één ml van een penicilline oplossing, die 14.000 E per ml bevatte, toegevoegd. Dit mengsel werd 2 uur geschud bij 34° , waarna de sferoplasten gebruikt werden.

Test: ongewijzigd.

Methode 7.

Voorcultuur : als methode 5.

Sferoplasten: als methode 6.

Test: 0,5 ml van de te testen DNA-oplossing werd toegevoegd aan 0,5 ml

sferoplasten en dit mengsel werd gedurende 30 min. bij 37° geïncubeerd; hierna werd 0,1 ml van het π -deeltjes preparaat toegevoegd en de incubatie gedurende 3 uur voortgezet.

Methode 8.

Voorcultuur: E.coli B werd gedurende 5 uur gekweekt in minimaal medium met 0,05% glucose bij 37°, waarbij doorborreling met lucht plaats vond. Deze cultuur werd gedurende de nacht bewaard bij 4°. De ent voor deze kweek bestond uit een twintigvoudige verdunning van een identieke celcultuur in bovengenoemd medium.

Sferoplasten: als methode 6.

Test: als methode 7.

Methode 9.

Voorcultuur: E.coli B werd gekweekt gedurende 7 uur in minimaal medium met 0,05% glucose bij 37° als stilstaande cultuur (100 ml medium in een 200 ml erlenmeyer). De ent bestond weer uit een twintigvoudige verdunning van deze cultuur in vers medium.

Sferoplasten: als methode 6.

Test: als methode 7.

Methode 10.

Voorcultuur: E.coli B werd gekweekt gedurende 16-18 uur bij 30° in minimaal medium met 0,05% glucose als stilstaande cultuur. Voor een volgende kweek werd deze cultuur vijftigmaal verdund met vers medium.

Sferoplasten: als methode 6.

Test: als methode 7.

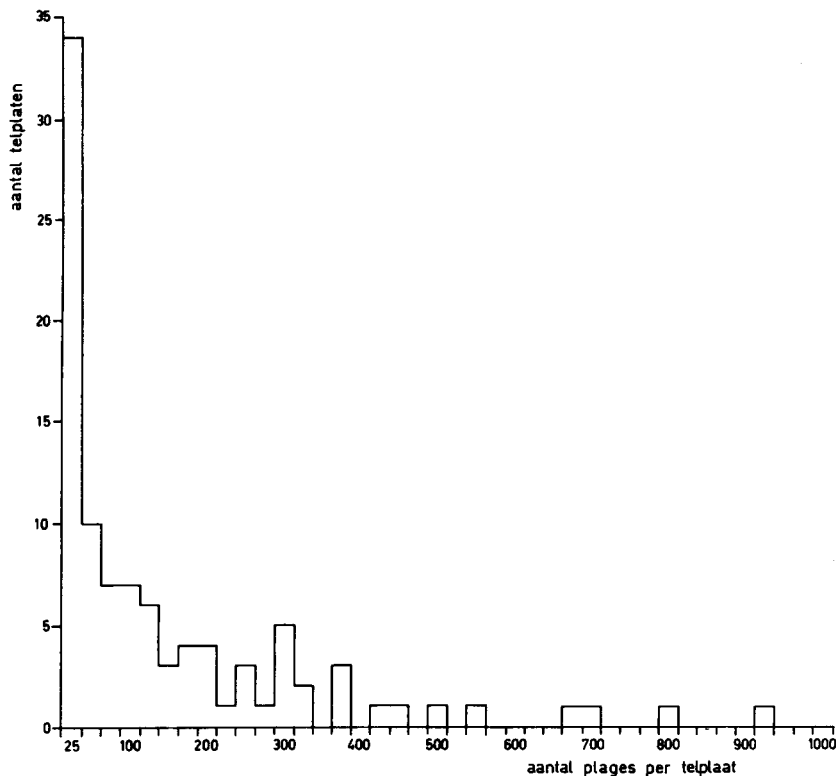
Methode 11.

Voorcultuur: Het kweken van de voorcultuur geschiedde als beschreven in methode 10, maar nu werden varianten van E.coli B gebruikt. Het is bekend dat bij bacterietransformatie competente culturen gebruikt moeten worden en dat het vermogen tot competentie een erfelijke eigenschap is (66,29). Dit bracht ons er toe ook in een populatie van E.coli B te gaan zoeken naar varianten die als sferoplast beter geschikt zouden zijn als gastheer voor de faagtransformatie. Daartoe werd E.coli B, na bestraling met ultraviolet licht ter verhoging van de mutatiefrequentie, verder gekweekt om eventuele mutaties gelegenheid te geven tot fenotypische expressie te komen. De aldus verkregen kweek werd uitgestreken op minimaal agar met 0,05% glucose.

Een honderdtal kolonies werd geïsoleerd en gekweekt volgens me-

thode 10 in buizen bevattende 10 ml minimaal medium met 0,05% glucose. Van elke cultuur werden sferoplasten bereid door bij elkaar te voegen: 0,57 ml bacteriesuspensie, 0,1 ml geconcentreerde "penassay"-bouillon, 0,05 ml van een penicilline oplossing die 14.000 E per ml bevatte en 0,28 ml van een 50%-ige sucrose oplossing.

Na 2 uur schudden bij 37° werd aan elke buis toegevoegd 1 ml van een DNA oplossing en 0,2 ml van de π -deeltjes suspensie. Na incuberen



Figuur 4

Opbrengst aan rII^+ -fagen na incubatie van 98 verschillende sferoplast-preparaten met rII^+ -DNA en π -deeltjes van r_{51} . Op de horizontale as is uitgezet het aantal plages. Deze aantallen werden ingedeeld in klassen van 25 plages. De eerste klasse bestaat uit telplaten met 0 t/m 25 plages, de tweede klasse uit telplaten met 26 t/m 50 plages, enzovoorts. Op de verticale as is voor elke klasse uitgezet het aantal tot die klasse behorende telplaten.

bij 37° werd in elke buis het aantal transformanten bepaald door 0,1 ml van een vijfvoudige verdunning van het lysaat uit te zaaien op E.coli K. Het resultaat is weergegeven in figuur 4.

Uit deze figuur blijkt, dat door een vrij groot aantal van deze geïsoleerde kolonies slechts weinig getransformeerde fagen werden geproduceerd, terwijl er ook enkele waren die veel transformanten produceerden en dus als geschikte gastheren voor het faagtransformatie proces beschouwd moesten worden.

De mogelijkheid bestond, dat de cellen van de eerstgenoemde groep niet geschikt waren òf omdat zij geen sferoplasten zouden vormen, òf omdat de normale faagvermeerdering geremd zou zijn. Door de fasecontrast microscoop werden echter normale sferoplasten waargenomen, terwijl in dergelijke gastheren een normale vermeerdering van rII-fagen bleek plaats te vinden. (zie Tabel V, E.coli B(3) en B(4)).

TABEL V

Faagopbrengst van sferoplasten van "geschikte" en "niet-geschikte" gastheren na incubatie met rII⁺-DNA en π -deeltjes van r₅₁.

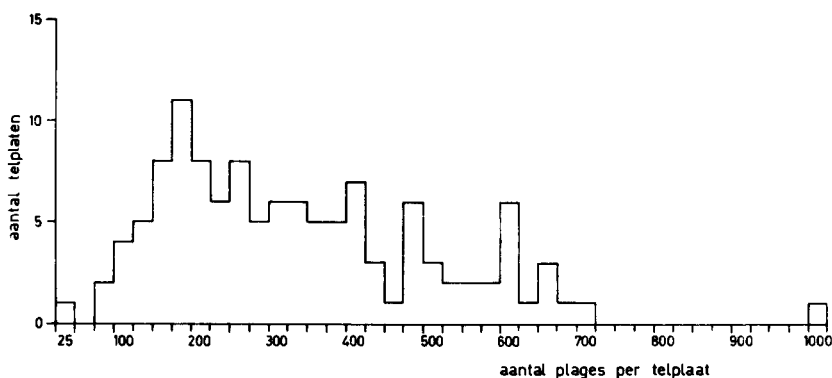
gastheer	rII ⁺ -titer	rII-titer	transformatie index x 10 ⁶
E.coli B(1)	3,4x10 ⁴	5,7x10 ⁹	6,0
" B(2)	1,8x10 ⁴	2,7x10 ⁹	6,7
" B(3)	130	2,2x10 ⁹	0,06
" B(4)	120	4,9x10 ⁹	0,02

B(1) en B(2) waren "geschikte" gastheren uit de klasse van resp. 900 en 700 plages van figuur 4; B(3) en B(4) waren "niet-geschikte" gastheren uit de klasse met 0 plages.

Uit deze resultaten werd de conclusie getrokken dat een populatie van E.coli B bacteriën varianten bevat die aan het transformatie proces weinig bijdragen en dat het wenselijk is om uit te gaan van een populatie "geschikte" gastheren.

Het bovenbeschreven experiment werd herhaald, uitgaande van de "geschikte" gastheer B(1), in de hoop bacteriën te isoleren die nog meer transformanten zouden produceren. Het resultaat hiervan is weer-

gegeven in figuur 5. Uit deze figuur blijkt dat het percentage bacteriën dat geen of een zeer geringe bijdrage leverde in het faagtransformatie proces sterk was verminderd. Evenwel bleken er toch aanzienlijke variaties te zijn in het vermogen tot de produktie van transformanten. Het was niet mogelijk door deze herhaling van het experiment een gastheer te isoleren die nog beter "geschikt" was.



Figuur 5

Opbrengst aan rII^+ -fagen na incubatie van sferoplasten van *E.coli* B(1) met rII^+ -DNA en π -deeltjes van r_{51} . Van *E.coli* B(1), een "geschikte" gastheer, werden 119 kolonies geïsoleerd en afzonderlijk getest op hun vermogen om faagtransformanten te produceren. Het resultaat is op dezelfde wijze weergegeven als beschreven bij figuur 4.

Uit een vergelijking tussen de oorspronkelijke *E.coli* B en B(1) bleek dat laatstgenoemde ongeveer vijfmaal meer transformanten produceerde dan *E.coli* B.

De situatie werd echter gecompliceerd toen bleek dat na enkele weken aanhouden van een dergelijke "competente" stam in minimaal medium, de "competentie" verloren was gegaan en er geen verschil meer was tussen de oorspronkelijke *E.coli* B en *E.coli* B(1). Later werd ontdekt dat het voortdurend doorkweken in minimaal medium waarschijnlijk de "competente" varianten onderdrukt. In volgende experimenten werd een "competente" stam geïsoleerd, naar zijn isolatienummer B98 genoemd, die werd aangehouden op bouillonagar als schuine-buis-culture; hieruit werd dagelijks geënt in minimaal medium. Op deze wijze bleef deze stam ongeveer drie- tot vijfmaal meer faagtransformanten leveren dan de normale *E.coli* B.

In methode 11 werd dus als verandering geïntroduceerd het gebruik van een speciale stam, namelijk E.coli B98, en een verandering in de voorbehandeling van de bacteriën, d.w.z. niet overenten uit een cultuur van minimaal medium, maar vanaf bouillonagar.

Sferoplasten: als methode 6.

Test: als methode 7.

Methode 12.

Voorcultuur: als methode 11.

Sferoplasten: Er werd een techniek ontwikkeld om de gevormde sferoplasten enigszins te wassen. Zoals reeds is vermeld werden de sferoplasten beschadigd door ze te centrifugeren en weer te suspenderen. Deze moeilijkheid werd ondervangen door de sferoplasten, welke zich in 14% sucrose bevinden, in een centrifugebuis op een oplossing van 18% sucrose te brengen en dan zo te centrifugeren dat de sferoplasten juist in de onderlaag terecht komen, maar nog geen neerslag vormen. Door de bovenlaag te verwijderen werd een vrij schoon sferoplast-preparaat verkregen, dat na toevoeging van geconcentreerde "penassay"-bouillon in het testsysteem betere resultaten gaf dan een niet gecentrifugeerd preparaat. Betere resultaten werden echter verkregen door de sferoplasten te "zeven" door Sephadex G 200. Hiervoor werd de procedure gevolgd zoals beschreven in Hoofdstuk I, 12.

Test: Als methode 7, maar de uitvoering geschiedde nu in buisjes van 17x60 mm, die geschud werden in een bad van 37°.

Methode 13.

Voorcultuur: E.coli B98 werd gekweekt zoals beschreven in methode 11, maar alvorens deze in sferoplasten om te zetten, werden de bacteriën van 25 ml van de cultuur eerst verzameld op een Millipore filter (poriegrootte 0,45 μ) en gesuspendeerd in 20 ml minimaal medium met 0,05% glucose en hierin gedurende 20 min. bij 37° geïncubeerd. Het verversen van het medium door middel van filtratie bleek beter te voldoen dan door middel van centrifugeren. Het gebruik van hogere celconcentraties door de cellen in een kleiner volume op te nemen had alleen maar een negatieve invloed op de opbrengst.

Sferoplasten: als methode 12.

Test: als methode 12.

Methode 14.

Voorcultuur : als methode 13.

Sferoplasten: als methode 12.

Test: De sferoplasten werden eerst geïnfecteerd met π -deeltjes en ongeveer 9-15 min. na de infectie werd DNA toegevoegd. Op de invloed van de volgorde en de tijd van bijeenbrengen van de drie componenten zal in Hoofdstuk IV nog nader worden ingegaan.

In dit Hoofdstuk zijn een aantal veranderingen in het faagtransformatie systeem beschreven die zijn aangebracht sinds het tijdstip dat door van de Pol de eerste faagtransformaties werden verricht. Het verlaten van een methode was meestal noodzakelijk omdat om één of andere, doorgaans niet aanwijsbare, oorzaak na verloop van tijd de opbrengst aan transformanten afnam, of omdat de reproduceerbaarheid te wensen overliet.

Want behalve het criterium van een verhoogde opbrengst aan getransformeerde fagen was het nog belangrijker dat deze opbrengsten voldoende reproduceerbaar waren.

Een verandering van methode kwam steeds na enig geëxperimenteer tot stand en niet sprongsgewijze, zoals de beschrijving zou doen vermoeden, en het geheel van deze veranderingen strekt zich uit over een periode van ongeveer vier jaar.

In tabel VI is een aantal waarnemingen verzameld die een indruk geven van de invloed die de diverse veranderingen op de faagopbrengsten uitgeoefend hebben.

De veranderingen, die gehandhaafd werden en deel uit maken van de huidige procedure kunnen in het kort als volgt worden weergegeven: het gebruik van een celsuspensie, die was gekweekt als stilstaande cultuur in minimaal medium met 0,05% glucose, vanaf methode 9; het gebruik van de variant E.coli B98, vanaf methode 11; het wassen van de sferoplasten met behulp van Sephadex G 200, vanaf methode 12; het wassen van de bacteriën alvorens deze om te zetten in sferoplasten, vanaf methode 13; preïncubatie van sferoplasten en π -deeltjes gedurende 9-15 min. alvorens DNA toe te voegen, vanaf methode 14.

Bacterietransformatie is afhankelijk van het competent zijn van de bacterie. Over deze toestand van competentie is weinig bekend; alleen door het nauwkeurig volgen van kweekvoorschriften, die gegrond zijn op praktische ervaringen, is het mogelijk reproduceerbare transformatiepercentages te verkrijgen. Mogelijk speelt ook in het faagtransformatie systeem de competentie van de cellen een rol.

TABEL VI

Gemiddelde faagopbrengsten, verkregen bij
toepassing van de beschreven methoden.

Methode	Aantal exp.	rII ⁺ -titer	rII-titer	T.I. x 10 ⁶
1	37	1,7x10 ²	4,7x10 ⁸	0,4
2	11	2 x10 ²	9,7x10 ⁷	2,1
3	19	3,4x10 ²	3,6x10 ⁸	1,0
4	11	4,4x10 ²	2,5x10 ⁸	1,8
5	14	4,9x10 ²	3,4x10 ⁸	1,4
6	22	8,9x10 ²	2,0x10 ⁸	4,4
7	59	1,1x10 ³	2,6x10 ⁹	0,4
8	36	2,2x10 ³	2,9x10 ⁹	0,7
9	11	1,8x10 ⁴	9,0x10 ⁸	20
10	8	2,3x10 ⁴	1,6x10 ⁹	14
11	12	3,1x10 ⁴	2,1x10 ⁹	15
12	44	5,9x10 ⁴	2,5x10 ⁹	24
13	15	1,6x10 ⁵	2,9x10 ⁹	55
14	63	3,3x10 ⁵	3,3x10 ⁹	100

Van elke methode werden die experimenten verzameld die verricht waren met oplossingen die 5 μ g DNA per ml bevatten. Alleen methode 1 en 2 bevatten experimenten die verricht werden met 10-40 μ g DNA per ml. Van het in de tabel weergegeven aantal experimenten werden de gemiddelde faagopbrengsten berekend en hieruit werd de transformatie index (T.I.) bepaald.

Het gebruik van π -deeltjes, bereid uit gezuiverde faagsuspensies, werd ingevoerd tijdens methode 6.

HOOFDSTUK IV

ENKELE EIGENSCHAPPEN VAN HET FAAGTRANSFORMATIE SYSTEEM

1. Inleiding.

In dit hoofdstuk zullen enige experimenten worden beschreven die tot doel hadden meer gegevens te verkrijgen over de eigenschappen van het faagtransformatie systeem.

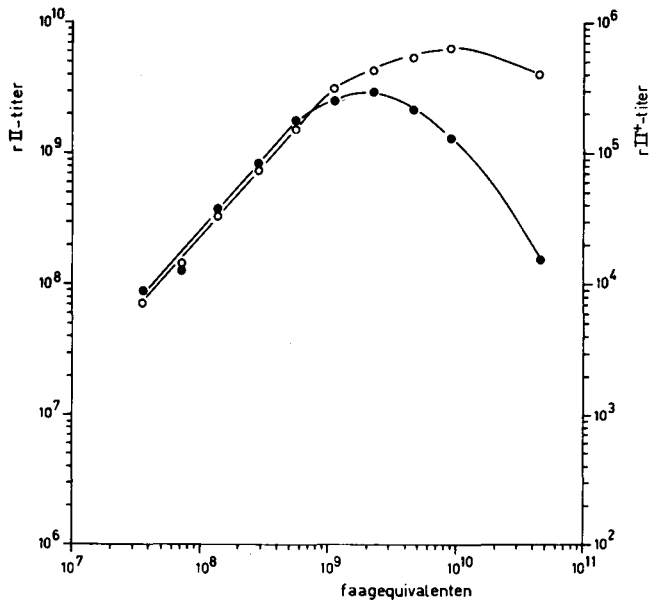
Allereerst werd nagegaan welke invloed veranderingen in de concentraties van π -deeltjes, sferoplasten en DNA hebben op de opbrengst aan fagen en transformanten. Vervolgens werd bestudeerd op welke wijze de produktie van fagen en transformanten tot stand komt. Er werd hierbij uitgegaan van de gedachte dat de infectie van sferoplasten met π -deeltjes en de daaropvolgende produktie van fagen op ongeveer dezelfde wijze zou verlopen als bij intacte fagen en bacteriën. Dit impliceert dus de aanwezigheid van een latente periode, gevolgd door een plotselinge toename van het aantal fagen.

2. De invloed van variaties in de omstandigheden.

2.1 De invloed van de concentratie van de π -deeltjes.

Zoals reeds in Hoofdstuk III,2 is uiteengezet, is de structuur van het π -deeltje nog niet met zekerheid bekend. Het aantal voor sferoplasten infectieuze deeltjes is waarschijnlijk niet gelijk aan het aantal aanwezige faagequivalenten, maar slechts een fractie daarvan. Om een indruk te krijgen van de optimale concentratie van π -deeltjes in het testsysteem, werden bacteriofagen in toenemende concentraties omgezet in π -deeltjes en geïncubeerd met sferoplasten. De resultaten hiervan zijn weergegeven in figuur 6. Uit deze figuur blijkt dat de opbrengst aan fagen en transformanten aanvankelijk toeneemt met het aantal toegevoegde π -deeltjes, een maximum bereikt en bij nog hogere concentraties van π -deeltjes weer afneemt. Het rechtlijnige verloop van

het linker gedeelte van de curve met een richtingscoëfficiënt= 1 wijst er op dat bij de lagere concentraties de faagtiter evenredig toenemen met de concentratie van de π -deeltjes.



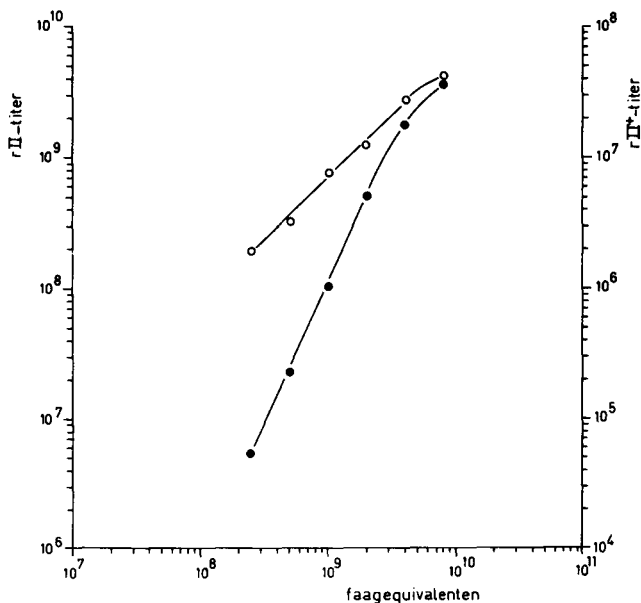
Figuur 6

Relatie tussen de hoeveelheid toegevoegde π -deeltjes en de opbrengst aan rII- en rII⁺-fagen. Van een suspensie van r₅₁-fagen werd een aantal verdunningen gemaakt; vervolgens werden de fagen omgezet in π -deeltjes. Met elk preparaat werd een transformatie experiment uitgevoerd (0,5 ml sferoplasten + 0,1 ml π -deeltjes + 0,5 ml DNA (5 μ g/ml)). Op de horizontale as is het aantal faagequivalenten uitgezet dat in de test aanwezig was, op de verticale assen de opbrengst aan rII- en rII⁺-fagen. •—• rII⁺-titer; o—o rII-titer.

Voor de bepaling van de biologische activiteit van DNA preparaten werd steeds het equivalent van ongeveer $1,5 \times 10^9$ fagen als π -deeltjes aan het testsysteem toegevoegd. Bij deze concentratie wordt een maximale opbrengst bereikt, hetgeen we kunnen beschouwen als een aanwijzing dat alle daarvoor in aanmerking komende sferoplasten geïnfecteerd

worden met één of meer rII-genomen, zodat eventueel opgenomen DNA moleculen die het rII⁺-kenmerk (Eng.: marker) bevatten de gelegenheid hebben om te recombineren met het rII-genoom.

In figuur 7 wordt op een iets andere wijze aangetoond dat de opbrengst aan fagen recht evenredig is met de concentratie π -deeltjes waarmee de sferoplasten worden geïncubeerd. In dit experiment werden de sferoplasten geïnfecteerd met een mengsel van gelijke hoeveelheden van twee rII-mutanten. Uit het verloop van de curven blijkt dat beneden een incubatieconcentratie van ca. 4×10^9 faagequivalenten per ml het aantal rII-nakomelingen in een vaste verhouding staat tot de con-



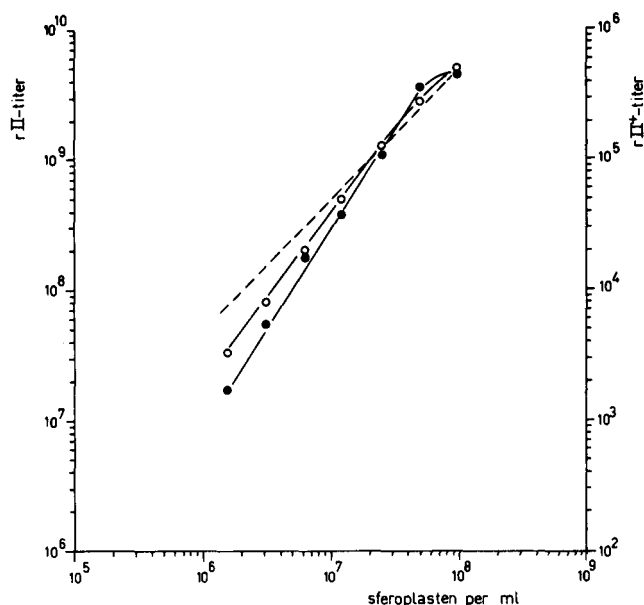
Figuur 7

Relatie tussen de hoeveelheid π -deeltjes van twee verschillende rII-mutanten en de opbrengst aan rII⁺-recombinanten. Van een mengsel met gelijke hoeveelheden r₅₁- en r₂₄-faag werd een aantal verdunningen gemaakt; vervolgens werden de fagen omgezet in π -deeltjes en geïncubeerd met sferoplasten als aangegeven bij figuur 6; in plaats van een DNA oplossing werd 0,5 ml fosfaatbuffer toegevoegd. Op de horizontale as is uitgezet het aantal faagequivalenten dat van elke mutant werd toegevoegd, op de verticale assen de opbrengst aan rII(r₅₁ + r₂₄)- en rII⁺-fagen. ○—○ rII(r₅₁ + r₂₄)-titer; ●—● rII⁺-titer.

concentratie en dat het aantal door recombinatie gevormde rII^+ -nakomelingen evenredig is met het kwadraat hiervan (rechte lijnen met richtingscoëfficiënt 1 resp. 2). Dit stemt overeen met de verwachting, daar het voor de vorming van een rII^+ -faag nodig is dat één sferoplast door een π -deeltje van beide mutanten geïnfecteerd wordt; de kans hierop is evenredig met het produkt van de twee concentraties.

2.2 De invloed van de concentratie van de sferoplasten.

Het is niet bekend of alle structuren, die door de fasecontrast microscoop gezien, als sferoplast beschouwd worden, geïnfecteerd kun-



Figuur 8

Relatie tussen de sferoplast concentratie en de opbrengst aan fagen na incubatie met π -deeltjes en DNA. Van een preparaat, dat ongeveer 2×10^8 sferoplasten per ml bevatte, werden verdunningen gemaakt en deze werden geïncubeerd met π -deeltjes van r_{51} en rII^+ -DNA ($5 \mu\text{g/ml}$). Op de horizontale as is de incubatie-concentratie van sferoplasten uitgezet. Op de verticale assen zijn de titers van de rII -fagen en de rII^+ -transformatanten uitgezet. ○—○ rII -titer; ●—● rII^+ -titer; - - - theoretisch te verwachten curve voor een evenredige toename.

nen worden met π -deeltjes, of dat slechts een fractie van de sferoplasten hiervoor geschikt is. Een bepaling van het aantal infectieve centra na infectie met π -deeltjes zou hierover uitsluitsel kunnen geven, ware het niet dat deze bepaling op praktische moeilijkheden stuit, zoals onder punt 3.2 van dit hoofdstuk beschreven wordt.

In figuur 8 is een experiment weergegeven waarbij de invloed nagegaan werd van de sferoplast concentratie op de opbrengst aan rII- en rII⁺-fagen. Uit deze figuur blijkt dat de opbrengst aan fagen niet helemaal evenredig is met de concentratie van de sferoplasten. De oorzaak hiervan is ons niet bekend, maar men kan zich voorstellen dat de sferoplasten beschadigd worden door het noodzakelijke verdunnen.

2.3 De invloed van variaties in de sucrose concentratie.

Bij de uitvoering van de test worden de sferoplasten gemengd met een gelijk volume DNA, waardoor de sucrose concentratie daalt van 14%

TABEL VII

Invloed op de faagopbrengst van de verandering van de sucrose concentratie in het sferoplasten milieu.

eindconcentratie van de sucrose	rII ⁺ -titer	rII-titer	T. I. x 10 ⁶
11,5%	1,8x10 ³	9 x10 ⁷	20
10,2%	9 x10 ³	1,9x10 ⁸	47
8,9%	3,2x10 ⁴	4,1x10 ⁸	68
7,6%	3,5x10 ⁴	6,3x10 ⁸	55
6,4%	3,2x10 ⁴	9,4x10 ⁸	34
5,1%	2,3x10 ⁴	6 x10 ⁸	38
3,8%	7,8x10 ³	4,9x10 ⁸	16
2,5%	5,8x10 ³	5,3x10 ⁸	11
1,3%	5,7x10 ²	1,3x10 ⁸	4,4

Sferoplasten (waaraan steeds 0,1 ml π -r₅₁ was toegevoegd) en DNA werden in zodanige verdunningen met elkaar gemengd, dat bij de aangegeven eindconcentraties van de sucrose de eindconcentraties van elk van de twee componenten steeds dezelfde was. De aanvangsconcentratie van de sucrose was 14%.

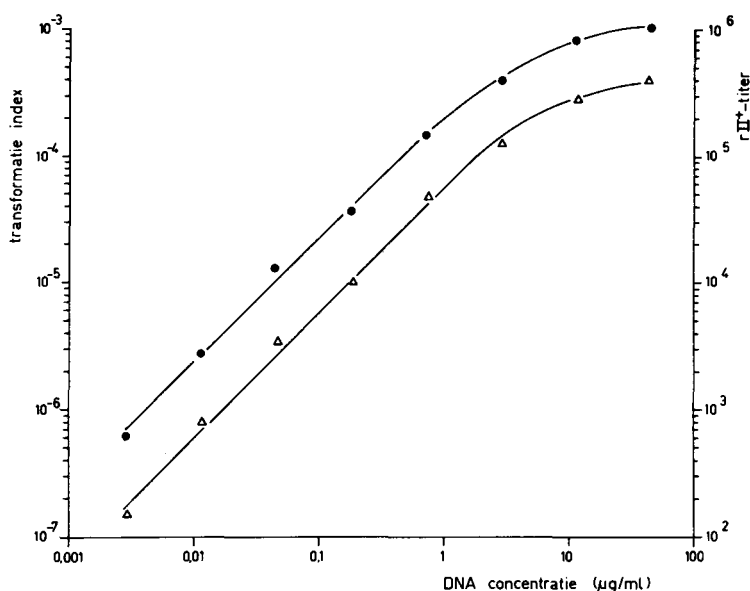
naar 7%. Onderzocht werd welke invloed deze verandering van de osmotische waarde heeft op de opbrengst.

In tabel VII zijn de resultaten weergegeven van een experiment waarin de osmotische waarde van het medium werd gevarieerd.

Uit deze tabel blijkt dat de door ons toegepaste mengverhouding, waarbij de eindconcentratie van de sucrose op 6,4% komt, gunstig is voor een optimale opbrengst aan transformanten.

2.4 Invloed van de DNA concentratie op de opbrengst aan transformanten.

In een aantal experimenten werd nagegaan welke relatie er bestaat



Figuur 9

Verband tussen de DNA concentratie en de opbrengst aan transformanten in het faagtransformatie systeem. DNA geïsoleerd uit rII⁺-fagen werd in oplopende concentraties toegevoegd aan een mengsel van sferoplasten en π -deeltjes van r₅₁; na 3 uur incuberen bij 37° werd het aantal rII- en rII⁺-fagen bepaald. Op de horizontale as is uitgezet de DNA concentratie in het incubatiemengsel, op de verticale assen de opbrengst aan rII⁺-fagen en de transformatie index. ●—● rII⁺-titer; Δ—Δ transformatie index.

tussen de concentratie van het toegevoegde DNA en het aantal gevormde transformanten. Hiertoe werden concentratiewerkingscurven gemaakt, waarvan er één is weergegeven in figuur 9. Uit de helling van de curven in deze figuur blijkt dat voor DNA concentraties tot 10 $\mu\text{g/ml}$ het aantal transformanten evenredig toeneemt met de verhoging van de DNA concentratie. Bij DNA concentraties groter dan 20 $\mu\text{g/ml}$ begint de curve af te wijken. Het is echter moeilijk aan te tonen of er een plateau is, daar DNA in hoge concentraties ($>100 \mu\text{g/ml}$) een remmende invloed heeft op het testsysteem; dit is merkbaar aan de verlaagde opbrengst aan rII-fagen.

Voor experimenten waarin de invloed van fysische en chemische ingrepen op de biologische activiteit van het DNA werd nagegaan, bedroeg de concentratie van de te testen preparaten nooit meer dan 5 μg DNA per ml teneinde in het lineaire gedeelte van de activiteitscurve te blijven.

2.5 Invloed van de tijd van toevoeging van DNA en π -deeltjes aan de sferoplasten.

Zoals in Hoofdstuk III onder methode 13 reeds beschreven is, bleken de faagopbrengsten in het transformatie systeem goed reproduceerbaar wanneer de DNA oplossing werd toegevoegd 9-15 min. na infectie van de sferoplasten met π -deeltjes.

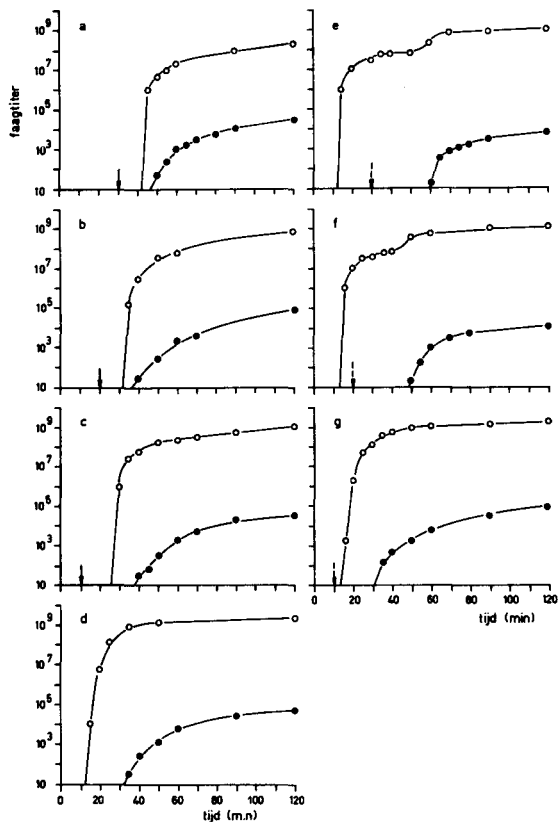
In figuur 10 is een aantal experimenten verzameld waarin de bovengenoemde volgorde en de daar tussen gelegen tijd gevarieerd werd. Uit deze figuur blijkt het volgende:

a) Na toevoeging van π -deeltjes volgt steeds een eclips die ongeveer 12-15 min. duurt, zowel in sferoplasten die van te voren geïncubeerd zijn met DNA (en zich dus in 7% sucrose bevinden) als in sferoplasten waaraan nog geen DNA is toegevoegd (en zich dus in 14% sucrose bevinden).

b) De tijd, gemeten vanaf het moment dat π -deeltjes toegevoegd worden, waarop de eerste transformanten verschijnen varieert enigszins; in sferoplasten, die 30 min. met DNA geïncubeerd zijn geweest, verschijnen ze eerder dan in sferoplasten die 10 min. met DNA geïncubeerd zijn geweest.

c) Toevoegen van DNA, 30 min. na het toevoegen van de π -deeltjes, leidt nog steeds tot de vorming van transformanten, hoewel op dat moment de faagproduktie al volop gaande is. In andere experimenten bleek dat zelfs 60 min. na het toevoegen van π -deeltjes aan de sferoplasten

DNA nog in staat was het ontstaan van transformanten te induceren, zij het met een opbrengst die ongeveer 10% bedroeg van de opbrengst onder normale omstandigheden.



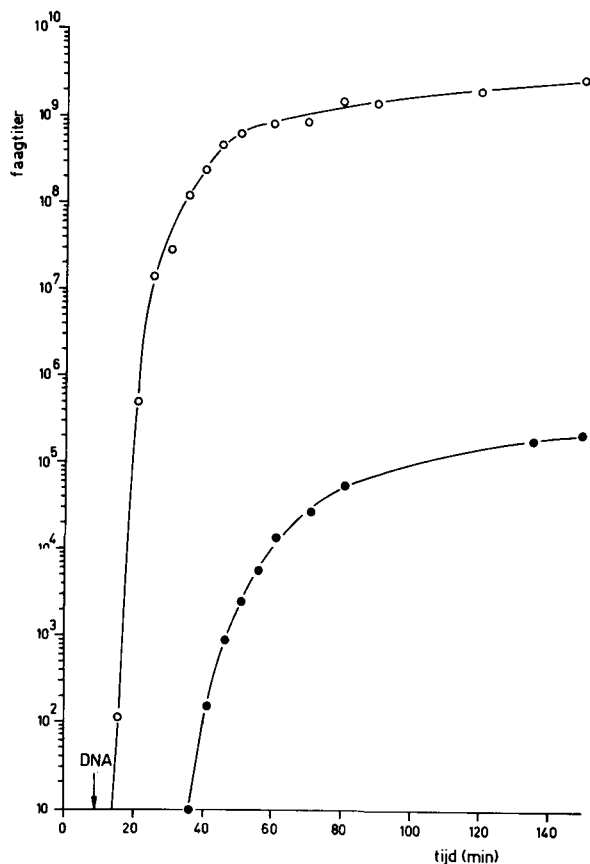
Figuur 10

Invloed van de tijd van toevoegen van π -deeltjes respectievelijk DNA op het ontstaan van ouderfagen en transformanten. a, b, c: sferoplasten en DNA ($5 \mu\text{g/ml}$) werden in gelijke volumina met elkaar gemengd en geïncubeerd bij 37° . Na 10 min. (c), 20 min. (b) of 30 min. (a) werden de π -deeltjes toegevoegd (aangegeven met $\downarrow$). e, f, g: sferoplasten en π -deeltjes werden gemengd in de verhouding 5 : 1 en geïncubeerd bij 37° . Na 10 min. (g), 20 min. (f) of 30 min. (e) werd DNA ($5 \mu\text{g/ml}$) toegevoegd (aangegeven met $\downarrow$). d: sferoplasten, π -deeltjes en DNA werden gelijktijdig bij elkaar gevoegd. $\circ$ — $\circ$ rII-fagen; $\bullet$ — $\bullet$ rII⁺-fagen (transformanten).

3. Enkele eigenschappen van het sferoplasten systeem.

3.1 Kinetiek.

In figuur 11 is weergegeven het ontstaan van rII- en rII⁺-fagen als functie van de duur van de incubatie bij 37°. De uitvoering van dit experiment geschiedde door na verschillende tijden uit het incuba-

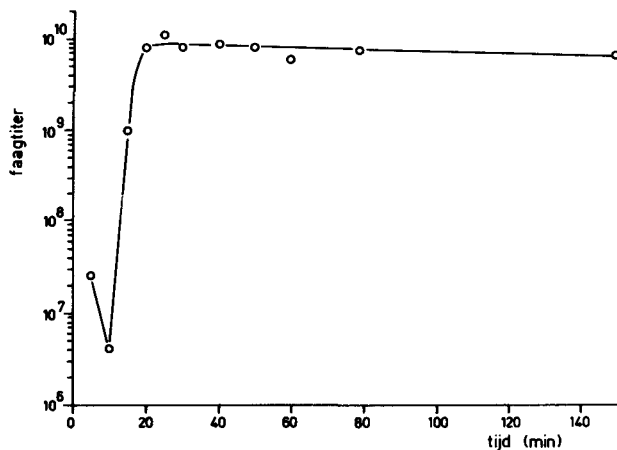


Figuur 11

Relatie tussen het aantal gevormde fagen en de incubatietijd. Tien ml sferoplasten werden gemengd met 2 ml π -deeltjes van r_{51} ; na 9 min. werd 10 ml rII⁺-DNA (5 μ g/ml) toegevoegd. Op de aangegeven tijden werden monsters geschud met chloroform. Van de ontstane lysaten werden de rII- en de rII⁺-titer bepaald. •—• rII⁺-titer; ○—○ rII-titer.

tiemengsel monsters te nemen en deze na schudden met chloroform te titreren. Hierbij worden dus alleen intacte fagen gemeten en geen infectieve centra (zie 3.2).

Na een eclips van 14 min. verschijnen de eerste rII-fagen, terwijl de eerste transformanten na 30-35 min. verschijnen. Zowel de rII-titer als de rII⁺-titer bereiken pas na ongeveer 3 uur een constante waarde. Dit in tegenstelling tot de normale faag-bacterie infectie waarbij, indien de faag wordt toegevoegd met een multipliciteit van 3-6, de faagtiter na ongeveer 30 min. een constante waarde bereikt (zie figuur 12).



Figuur 12

Relatie tussen het aantal gevormde fagen en de incubatietijd. Een cultuur van E.coli B98 in tryptonwater werd verdund tot 2×10^8 cellen/ml en geïnfecteerd met r₅₁-faag met een multipliciteit van 5 fagen per bacterie. Op de aangegeven tijden werden monsters geschud en getitreerd. o—o r₅₁-titer.

Dat de faagtiter pas na een lange tijd een constante waarde bereikt, wordt misschien veroorzaakt door het feit dat de infectie van sferoplasten door π -deeltjes niet zo snel verloopt, zodat na 30 min. of zelfs na 60 min. na toevoeging van de π -deeltjes nog steeds infecties plaats vinden. Een aanwijzing voor een dergelijk vertraagd infectie proces kon worden verkregen naar aanleiding van het verschijnsel dat na infectie van een bacterie door een faag er een reactie optreedt die tot gevolg heeft dat een tweede faag, die enige tijd later de bac-

terie infecteert, uitgesloten wordt van de vermeerderingscyclus; genetische kenmerken van deze tweede faag zijn niet of in sterk verminderde mate aanwezig in de nakomelingen. Onderzocht werd in hoeverre dit uitsluitingsmechanisme ook werkzaam is bij de infectie van sferoplasten door π -deeltjes.

In tabel VIII is het resultaat van een dergelijk experiment weergegeven.

TABEL VIII

Invloed op het percentage gevormde rII^+ -fagen van de tijd verlopen tussen het toevoegen aan de gastheer van r_{51} en r_{24} .

Tijdsverloop	Percentage gevormde rII^+ -fagen in		
	sferoplasten	"s-cellen" ¹⁾	bacteriën
0 min.	1,5 %	3,2 %	3,5 %
5 min.	1,5 %	0,97%	0,25%
10 min.	1,5 %	0,95%	0,022%
20 min.	1,5 %	1,1 %	0,012%
30 min.	1,5 %	0,83%	0,004%
40 min.	1,45%	0,82%	0,005%
50 min.	-	0,49%	0,004%
60 min.	1,15%	0,54%	0,004%

De gastheer (bacteriën of "s-cellen" resp. sferoplasten), in een concentratie van 2×10^8 cellen per ml, werd geïnfecteerd met r_{51} respectievelijk π - r_{51} en na verschillende tijden werd een even grote hoeveelheid r_{24} respectievelijk π - r_{24} toegevoegd. Na 2 uur incuberen werd in het lysaat het aantal rII - en rII^+ -fagen bepaald.

1) "S-cellen" zijn bacteriën die op dezelfde wijze behandeld zijn als de cellen die werden omgezet in sferoplasten, doch waarbij de penicilline is weggelaten.

Uit tabel VIII blijkt dat gelijktijdige infectie van bacteriën met r_{51} en r_{24} tot gevolg heeft, dat 3,5% van de nakomelingen zowel het r_{51}^+ - als het r_{24}^+ -kenmerk bezitten. Wordt echter de r_{24} -mutant op latere tijdstippen toegevoegd, dan daalt dit percentage recombinanten zeer snel. Bij gebruik van sferoplasten als gastheer blijkt dit tijds-

verschil nauwelijks enige invloed uit te oefenen op het percentage nakomelingen dat beide kenmerken bezit.

Uit tabel VIII blijkt echter dat ook de omstandigheden van invloed zijn; wanneer bacteriën op dezelfde wijze behandeld worden als sferoplasten, met weglaten van de penicilline (in de tabel "s-cellen" genoemd) dan is de invloed van het tijdsverschil op het percentage rII⁺-fagen in de nakomelingen veel geringer dan bij gebruik van normale bacteriën. Waarschijnlijk heeft de aanwezigheid van sucrose een vertragende invloed op het infectieproces.

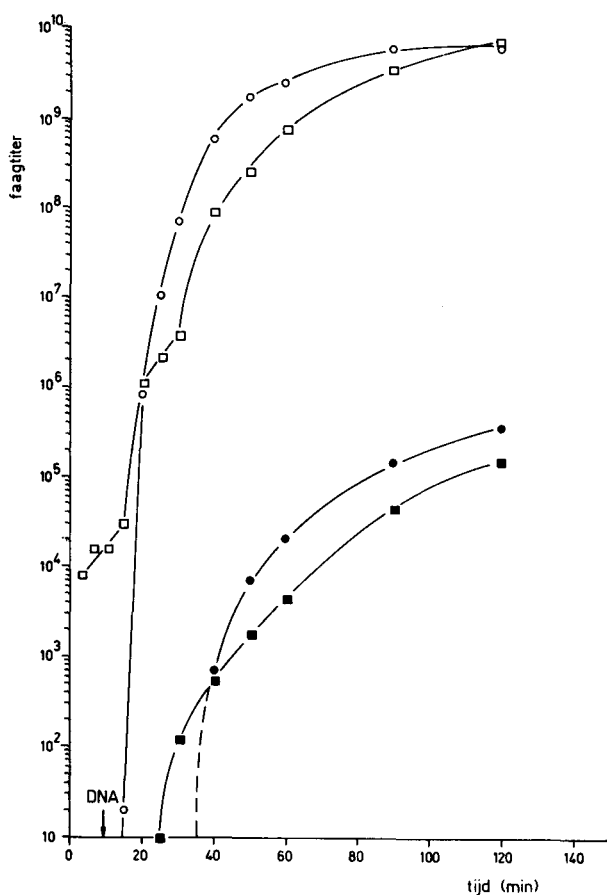
3.2 Infectieve centra en worpgrootte.

Het verschijnen van intacte fagen na een eclipsperiode van ongeveer 14 min. wijst er op dat er infectieve centra aanwezig zijn tijdens de eerste 14 min. na infectie. Deze moet men zich voorstellen als sferoplasten waarin na infectie met π -deeltjes het faaggenoom in vegetatieve toestand aanwezig is. Als men een dergelijke sferoplast uitzaait op een agarplaat (er voor zorgend hetzelfde osmotische milieu te handhaven) dan zal ter plaatse de vegetatieve faag zich verder ontwikkelen en aanleiding geven tot het ontstaan van een aantal fagen die bij verdere groei één plage zullen vormen.

In figuur 13 is een dergelijk experiment weergegeven, waarbij in hetzelfde incubatiemengsel het ontstaan van infectieve centra en het ontstaan van intacte fagen zijn gevolgd. (Het schudden met chloroform vernietigt de vegetatieve faag.)

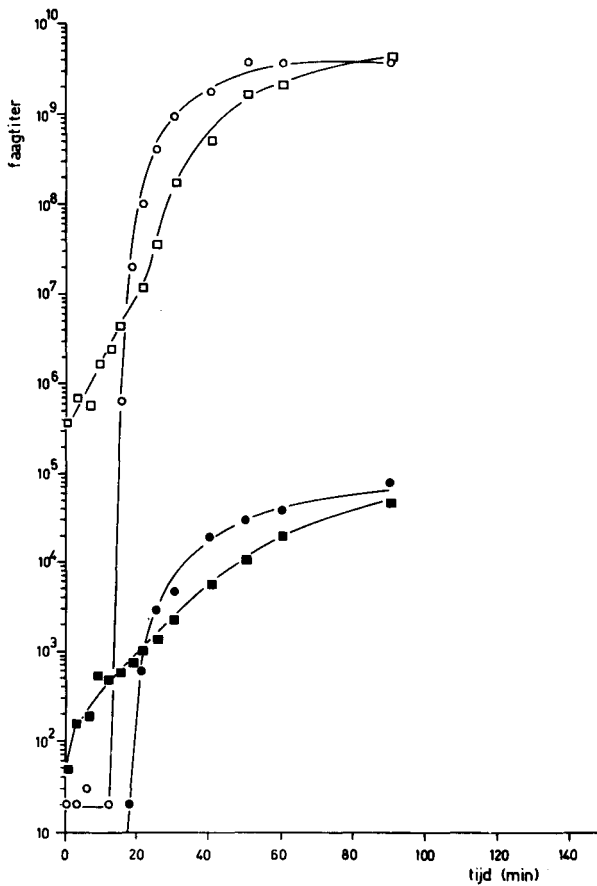
Opvallend was in dit soort experimenten dat gedurende de eerste 15 min. slechts een gering aantal infectieve centra gevonden werd. De plages die men vindt na 20 min. behoeven niet afkomstig te zijn van uitgezaaide infectieve centra, maar kunnen gevormd zijn door vrije fagen die ontstaan zijn uit spontaan gelyseerde sferoplasten.

Eerder uitgevoerde experimenten, die nog verliepen volgens methode 13 van Hoofdstuk III (waarbij dus de sferoplasten eerst gedurende 30 min. werden geïncubeerd met DNA alvorens π -deeltjes werden toegevoegd) gaven betere opbrengsten aan infectieve centra te zien. In figuur 14 is een dergelijk experiment weergegeven. Het aantal infectieve centra dat in de eerste 10 min. gevonden werd, was te klein om de totale faagopbrengst te kunnen verklaren. Men zou dan namelijk een worpgrootte van 1.000-2.000 fagen per sferoplast moeten aannemen. Diverse variaties in de titratie methode brachten hierin geen verbetering.



Figuur 13

De vorming van infectieve centra en van intacte fagen als functie van de incubatietijd. Tien ml sferoplasten werden geïnfecteerd met 2 ml π -deeltjes van r_{51} en na 9 min. werd 10 ml DNA ($5 \mu\text{g/ml}$) toegevoegd. Op de aangegeven tijden werden monsters genomen; een deel van elk monster werd direct getitreerd en een ander gedeelte na schudden met chloroform. •—• rII⁺-titer in chloroformlysaat; ○—○ rII-titer in chloroformlysaat; ■—■ rII⁺-titer na directe titratie; □—□ rII-titer na directe titratie.



Figuur 14

De vorming van infectieve centra en van intacte fagen als functie van de incubatietijd. Tien ml sferoplasten werden gemengd met 10 ml DNA (5 $\mu\text{g/ml}$) en na 30 min. incuberen bij 37° werden 2 ml π -deeltjes van r_{51} toegevoegd. Op de aangegeven tijden werden monsters genomen; een gedeelte van elk monster werd direct getitreerd en een ander gedeelte na schudden met chloroform. ●—● $r\text{II}^+$ -titer in chloroformlysaat; ○—○ $r\text{II}$ -titer in chloroformlysaat; ■—■ $r\text{II}^+$ -titer na directe titratie; □—□ $r\text{II}$ -titer na directe titratie.

Een van de moeilijkheden is dat de gevormde infectieve centra zeer gevoelig zijn voor de manipulaties die nodig zijn om ze op een telplaat te brengen, zoals uit het volgende moge blijken. In een aantal experimenten werd 5 min. na infectie van sferoplasten met π -deeltjes het mengsel gedurende 5 min. geïncubeerd met een anti-T4-serum om de nog vrije π -deeltjes weg te vangen, en daarna zover verdund dat er 10-20 infectieve centra per buisje aanwezig waren (althans volgens de titratie). Na 2 uur incuberen bij 37° werd dan het totaal aantal vrije fagen bepaald. Door dit aantal te delen door het aantal infectieve centra werd de worpgrootte bepaald: bij deze methode was de kans op latere infecties niet meer aanwezig. Op deze wijze werden gemiddelde worpgrootten gevonden, die varieerden van 500-6.000 per sferoplast. (In vijf experimenten bedroeg de gemiddelde worpgrootte respectievelijk 1.100, 500, 640, 6.000 en 5.000). Vooral de hoge waarden geven waarschijnlijk niet de werkelijke toestand weer, maar moeten daaraan toegeschreven worden dat bij het uitzaaien veel infectieve centra beschadigd of anderszins geïnactiveerd worden, zodat ze geen aanleiding geven tot het ontstaan van een plaque. Dientengevolge waren er in de incubatie buisjes meer infectieve centra aanwezig, dan volgens de titratie werd vastgesteld.

Een ons inziens betrouwbare bepaling van de worpgrootte werd als volgt verricht: een preparaat van π -deeltjes werd zover verdund, dat 50 van de 128 buisjes, waarin een hoeveelheid van deze verdunning werd geïncubeerd met sferoplasten, fagen bevatte. Aangenomen mag worden dat in de meeste van deze 50 buisjes de fagen van één geïnfecteerde sferoplast afkomstig waren. (Volgens de Poisson-formule zullen 8 buisjes twee geïnfecteerde sferoplasten bevatten.) Het aantal fagen per buisje is dus een directe maat voor de worpgrootte. De op deze wijze bepaalde grootte bedroeg gemiddeld 240; met als uiterste grenzen 10 en 580 en een standaarddeviatie van 65%.

3.3 Secundaire vermeerdering van intacte fagen.

Hoewel het microscopische beeld van een sferoplastpreparaat weinig normale bacteriën vertoont, zou toch de mogelijkheid kunnen bestaan, dat de in sferoplasten gevormde fagen zich zouden vermeerderen in de nog aanwezige bacteriën. Tabel IX geeft de resultaten weer van een experiment waarin dit werd nagegaan.

TABEL IX

Eventuele vermeerdering van fagen in sferoplastpreparaten.

Incubatiemengsel bevat:	rII ⁺ -titer	rII-titer
0,5 ml sferoplasten + 0,1 ml π -r ₅₁ + 0,5 ml buffer	< 10	2,0x10 ⁹
0,5 ml sferoplasten + 0,1 ml π -r ₅₁ + 0,5 ml rII ⁺ -DNA (5 μ g/ml)	4,7x10 ⁴	8,4x10 ⁸
0,5 ml sferoplasten + 0,1 ml r ₅₁ (10 ⁹ r ₅₁ /ml) + 0,5 ml rII ⁺ -DNA (5 μ g/ml)	< 10	4,0x10 ⁷
0,5 ml sferoplasten + 0,1 ml π -r ₅₁ + 0,4 ml buffer + 0,1 ml T4rII ⁺ (10 ⁶ rII ⁺ /ml)	7,6x10 ⁴	7,7x10 ⁸

Uit deze tabel blijkt dat de toegevoegde intacte fagen zich niet hebben vermeerderd in de sferoplasten, maar enigszins geïnactiveerd worden door de incubatie gedurende enige uren in dit medium.

Ook blijkt dat transformatie van normale r₅₁-fagen door rII⁺-DNA niet optreedt.

3.4 Aanwijzingen dat uitsluitend DNA verantwoordelijk is voor het ontstaan van transformanten.

Zoals beschreven is in Hoofdstuk III werden door van de Pol c.s. (22) reeds experimenten verricht die ten doel hadden aan te tonen dat de biologische activiteit, gemeten aan de vorming van transformanten, veroorzaakt wordt door gezuiverd DNA. In het thans gebruikte systeem werden dit soort experimenten nog eens herhaald, en de resultaten hiervan zijn samengevat in tabel X.

Bij de uitvoering van deze experimenten werd vooral gedacht aan de mogelijkheid dat de biologische activiteit veroorzaakt zou worden door DNA moleculen waaraan nog eiwit componenten gebonden zouden zijn. Incubatie van bacteriën of sferoplasten met DNA preparaten leverde nooit fagen op. Dit is een aanwijzing dat er geen intacte fagen of voor sferoplasten infectieuze structuren meer aanwezig zijn. Uit de tabel blijkt verder dat de biologische activiteit te niet gedaan wordt door een voorafgaande incubatie van DNA met DNA-ase; behandeling met een protease (subtilisine) en anti-T4-serum heeft echter geen invloed op de vorming van transformanten. Uit deze resultaten volgt dat het on-

waarschijnlijk is dat het eventueel aanwezige eiwit in een DNA-preparaat een rol speelt en dat de biologische activiteit uitsluitend gelegen is in het al dan niet geheel intacte DNA molecule.

TABEL X

Invloed van enkele behandelingen van het DNA
op de biologische activiteit

Behandeling	Percentage overblijvende biologische activiteit
onbehandeld	100
30 min. 60°	100
10 min. 100°	5-10
subtilisine ¹⁾	100
anti-T4-serum ²⁾	100
DNA-ase ³⁾	<10 ⁻²

1) Behandeld met subtilopeptidase A (bacterial proteinase NOVO, NOVO Industri A/S, Denemarken) in een concentratie van 10 µg/ml gedurende 30 min. bij 37°. Daarna werd het enzym onwerkzaam gemaakt door het toevoegen van DFP tot 10⁻³ M.

2) DNA (100 µg/ml) werd gedurende 30 min. bij 37° geïncubeerd met anti-T4-serum 1:1.000. Daarna werd het mengsel 100 maal verdund en werd de biologische activiteit bepaald. De gebruikte anti-serumconcentratie was voldoende om bij intacte T4-fagen in 10 min. bij 37° een inactivering tot < 10⁻³% teweeg te brengen.

3) DNA werd gedurende 30 min. bij 37° geïncubeerd met 0,1 µg DNA-ase per ml in aanwezigheid van 10⁻³ M MgSO₄. Vervolgens werd de enzymwerking geremd door toevoegen van Na-citraat tot 10⁻² M.

4. Bespreking van de resultaten.

Met het beschreven systematische onderzoek werd in de eerste plaats getracht de optimale omstandigheden voor faagtransformatie te leren kennen.

De opbrengst aan fagen in het transformatie systeem als functie van het aantal toegevoegde π -deeltjes begint bij een concentratie van ongeveer 2×10^9 faagequivalenten per ml een verzadigingsniveau te be-

reiken (zie figuur 6). Aangenomen dat alle sferoplasten bijdragen aan de faagopbrengst, betekent dit, bij een concentratie van ongeveer 8×10^7 sferoplasten per ml, dat ongeveer 4% van de faagequivalenten uit π -deeltjes bestaat. Hierbij nemen we aan dat π -deeltjes met een efficiëntie = 1 sferoplasten infecteren.

Een tweede schatting van het aantal π -deeltjes volgt uit de bepaling van de worpgrootte zoals beschreven in 2.2 van dit hoofdstuk. Uit de fractie buisjes die geen fagen bevatten kan met behulp van de Poisson-formule het gemiddelde aantal π -deeltjes berekend worden dat per buis werd toegevoegd. Uit deze berekening volgt dat een π -deeltjes preparaat ongeveer 6×10^7 π -deeltjes per ml moest bevatten, dat wil zeggen, ongeveer 4% van het aantal faagequivalenten.

Een derde schatting kan verkregen worden uit de worpgrootte: uit extrapolatie van het lineaire gedeelte van de curve in figuur 6 volgt dat één faagequivalent ongeveer twee fagen produceert. Daar echter de fagen alleen in worpen van gemiddeld 240 per sferoplast vrij komen, moet $2/240$ dat wil zeggen circa 1% van de faagequivalenten uit π -deeltjes bestaan.

De schattingen van het percentage π -deeltjes in een faagpreparaat dat behandeld is geweest met ureum variëren dus van 1 - 4 %. Het is echter de vraag of inderdaad alle sferoplasten bijdragen aan de faagopbrengst. Bij een gemiddelde worpgrootte van 240 fagen per sferoplast zou men dan een opbrengst van ongeveer 2×10^{10} fagen per ml mogen verwachten, terwijl de maximale opbrengsten die verkregen zijn varieerden van $6-8 \times 10^9$ fagen per ml. Het is dus heel goed mogelijk dat maar 30 - 40% van de sferoplasten een bijdrage leveren aan de faagopbrengst; hierdoor zou dus de eerste schatting verlaagd worden tot ook circa 1%.

De waargenomen invloed van de concentratie van sferoplasten op de faagopbrengst, weergegeven in figuur 8, zou doen vermoeden dat er sprake is van een zeker verzadigingsniveau dat wordt bereikt bij $1-2 \times 10^8$ sferoplasten/ml. Als evenwel sferoplasten bereid werden uit meer geconcentreerde bacteriesuspensies ter verkrijging van hogere sferoplast concentraties, dan was bij gebruik van deze preparaten de opbrengst aan rII- en in sterkere mate die aan rII⁺-fagen verlaagd ten opzichte van niet-geconcentreerde preparaten. Dit wijst er op dat de gebruikte sferoplast concentratie optimaal is bij de toegepaste concentratie π -deeltjes; incubatie van geconcentreerde sferoplastsuspensies met hogere concentraties π -deeltjes leidde ook niet tot een verhoging van de opbrengst.

Een optimale opbrengst aan transformanten wordt verkregen als tijdens het infectieproces een verandering van de osmotische waarde

plaats vindt. Ook bij enkele andere in de literatuur beschreven sferoplasten systemen wordt dit toegepast. Zowel Guthrie en Sinsheimer(67) als Strauss(68) mengen hun protoplasten, die zich in 10% sucrose bevinden, met een gelijk volume DNA respectievelijk RNA, waardoor dus de sucrose concentratie daalt tot 5%. Na enige tijd verhogen zij dan de concentratie weer tot 10%. Ook in het hier beschreven faagtransformatie systeem blijkt een verandering van de sucrose concentratie tijdens de infectie een gunstige invloed uit te oefenen op de opbrengst van zowel rII- als de rII⁺-fagen. In andere experimenten, waarbij het toegevoegde DNA 14% sucrose bevatte, was de faagopbrengst verlaagd tot ongeveer 25% van de waarde verkregen bij gebruik van DNA zonder sucrose.

Het verband tussen de DNA concentratie en het aantal gevormde transformanten is lineair tot een DNA concentratie van ongeveer 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. De efficiëntie waarmee transformanten gevormd worden is laag, vergeleken met de aanwezige hoeveelheid DNA. 1 μg DNA vertegenwoordigt het equivalent van 3×10^9 fagen. Bij gebruik van deze concentratie zijn dus in het incubatiemengsel aanwezig: 8×10^7 sferoplasten en 3×10^9 DNA moleculen die het rII⁺-gen bevatten, dat wil zeggen, ongeveer 40 rII⁺-bevattende moleculen per sferoplast. Toch worden er bij deze DNA concentratie slechts 2×10^5 rII⁺-fagen gevormd. Als er één transformant per sferoplast ontstaat, betekent dit een efficiëntie van ongeveer 6×10^{-5} . Als er bovendien vermeerdering plaats vindt van de transformanten in de sferoplasten, dan is de efficiëntie nog lager, namelijk $6 \times 10^{-5}/W$, waarbij W de worpgrootte van de transformanten voorstelt.

De wijze waarop de rII-fagen verschijnen na infectie van sferoplasten door π -deeltjes wijkt in sommige opzichten af van wat men waarneemt bij infectie van bacteriën door intacte fagen. Zo bereikt bijvoorbeeld de kinetiek curve pas laat een plateau; een verklaring hiervoor is misschien, dat de infectie van sferoplasten door π -deeltjes veel langzamer verloopt dan infectie van bacteriën door fagen.

Immers, wanneer bacteriën met een overmaat faag worden gemengd zijn na 5 min. nagenoeg alle bacteriën geïnfecteerd. Na 5-10 min. is dus in de meeste bacteriën de vermeerderingscyclus gaande en na afloop van de latente periode zullen de bacteriën ongeveer gelijktijdig lyseren, zodat de kinetiek curve vrij snel een plateau bereikt (zie figuur 12).

De experimenten, die weergegeven zijn in tabel VIII, laten zien dat lange tijd na het toevoegen van π -deeltjes aan sferoplasten nog nieuwe π -deeltjes toegevoegd kunnen worden zonder dat er iets van een uitsluitingsmechanisme merkbaar is. Dit resultaat is te verklaren door

aan te nemen dat het infectieproces van sferoplasten door π -deeltjes zeer langzaam verloopt zodat bijvoorbeeld 60 min. na het toevoegen nog steeds genoeg sferoplasten geïnfecteerd worden, om de dan toegevoegde tweede faag voldoende gelegenheid te bieden tot recombinatie. Hierbij moet echter opgemerkt worden dat het niet bekend is of het uitsluitingsmechanisme ook in sferoplasten functioneert.

Het traag verlopen van de infectie van sferoplasten door π -deeltjes verklaart ook waarom het variëren van de tijd en de volgorde waarin DNA en π -deeltjes aan de sferoplasten worden toegevoegd weinig invloed heeft op de opbrengst aan rII- en rII⁺-fagen.

Gedurende een vrij lange periode in de ontwikkeling van het faag-transformatie systeem werden de sferoplasten eerst gedurende 30 min. geïncubeerd met DNA alvorens π -deeltjes toe te voegen. We stelden ons hierbij voor dat penetratie van een sferoplast door een DNA molecule langzaam zou verlopen en dat voor dit proces voldoende tijd gegeven moest worden, zodat bij infectie van een sferoplast door een π -deeltje het transformerende DNA reeds aanwezig was. Het is echter de vraag wat er met dit DNA molecule gebeurt als het een sferoplast binnendringt. Ook is nog niet onderzocht welke veranderingen de DNA moleculen ondergaan tijdens 30 min. incubatie met sferoplasten. Gezien de grote hoeveelheid en verscheidenheid aan DNA-splitsende enzymen, die aanwezig zijn in E.coli, is het niet onwaarschijnlijk dat DNA zowel in als buiten de cel (door lysis van de sferoplast) aan afbraak onderhevig kan zijn voor het aan de transformatie reactie deelneemt.

Het toevoegen van DNA 10 min. na infectie van sferoplasten door π -deeltjes is geen garantie tegen bovengenoemd bezwaar, maar men kan zich voorstellen dat de kans dat het DNA molecule wordt afgebroken voordat het aan het transformatieproces deelneemt, kleiner is geworden.

Het langzame verloop van het infectieproces zou ook een mogelijke verklaring zijn voor de lage opbrengst aan infectieve centra in die experimenten, waarin het ontstaan van de fagen in het sferoplasten systeem met de tijd gevolgd werd. Immers, alleen de infectieve centra bepaald in de eerste 15 min. na infectie komen als zodanig in aanmerking, hierna zal de bepaling gestoord worden door de aanwezige vrije fagen. De eindopbrengst van vrije fagen is echter afkomstig van alle tijdens de incubatie gevormde infectieve centra, en dit verklaart waarschijnlijk de berekende hoge worpgrootte.

Het lage aantal infectieve centra zoals dat in de figuren 13 en 14 tot uiting komt, kan dus twee oorzaken hebben, namelijk het vertraagde infectieproces, en de gevoeligheid van de infectieve centra voor het uitzaaien.

De berekening van de worpgrootte, waarbij gebruik gemaakt werd van een bepaling van het aantal infectieve centra, bleek dan ook steeds onwaarschijnlijk hoge waarden op te leveren. Een worpgrootte van 240, zoals deze met behulp van een andere methode werd bepaald, is waarschijnlijk beter met de werkelijkheid in overeenstemming.

Nog belangrijker dan de bovenvermelde worpgrootte is het aantal transformanten dat per geïnfecteerde sferoplast gevormd wordt. Het is immers van belang om te weten of het totale aantal transformanten ontstaan is in enkele sferoplasten waarin de transformanten zich sterk vermeerderd hebben, of in veel sferoplasten die slechts één of enkele transformanten produceren. In het laatste geval zal de efficiëntie waarmee DNA aan de eigenlijke transformatie deelneemt groter geweest zijn dan in het eerstgenoemde geval.

De resultaten van de experimenten die hiervoor verricht werden, waren echter dermate slecht reproduceerbaar, dat we geen betrouwbare opgave kunnen doen van het gemiddelde aantal transformanten dat per sferoplast ontstaat.

De mogelijkheid werd nagegaan of er faagvermeerdering optreedt tijdens incubatie van intacte fagen met sferoplasten. Indien dit het geval is zouden immers de verkregen opbrengsten aan fagen en transformanten ten dele toegeschreven moeten worden aan een secundaire vermeerdering van de primair gevormde fagen, hetgeeneen juiste waardering van de resultaten bemoeilijkt. Uit de experimenten die weergegeven zijn in tabel IX, en waarbij een bekende hoeveelheid intacte fagen aan de sferoplasten werd toegevoegd, kon geconcludeerd worden, dat de faagopbrengst in het normale testsysteem ontstaat in sferoplasten en dat daarna een secundaire vermeerderingscyclus in eventueel nog aanwezige cellen niet optreedt.

HOOFDSTUK V

TRANSFORMATIE VAN DE BACTERIOFAAG T4 DOOR DE OVERDRACHT VAN EEN AANTAL VERSCHILLENDE KENMERKEN

1. Inleiding.

Bij de tot nu toe beschreven experimenten werd hoofdzakelijk gebruik gemaakt van de genetische eigenschap r_{51} , een kenmerk dat in het A-cistron van het rII-gen van de T4-faag ligt.

Het was van belang om in het faagtransformatie systeem ook andere kenmerken te betrekken, enerzijds om na te gaan of de verkregen resultaten niet te wijten zijn aan een anomalie van het r_{51} -kenmerk, anderzijds om na te gaan of gelijktijdige overdracht van twee kenmerken mogelijk is. Daarom werden enkele andere rII-mutanten, een amber-mutant en een rI-mutant in het onderzoek betrokken.

2. Transformatie van enkele rII-mutanten.

Door Benzer en andere onderzoekers zijn een groot aantal rII-mutanten geïsoleerd. Afgezien van de verschillende ligging van hun loci op het chromosoom kunnen deze mutanten ook verschillen in de uitgebreidheid van de mutatie; deze kan variëren van puntmutaties, waarbij waarschijnlijk meestal slechts één nucleotidenpaar is veranderd, tot deleties die zich over het gehele rII-gen uitstrekken.

In tabel XI zijn de resultaten weergegeven van een experiment waarin de transformatie van een aantal verschillende rII-mutanten met elkaar is vergeleken. Voor de ligging en grootte van deze mutaties zij verwezen naar figuur 2.

Uit tabel XI blijkt dat de grootte van de mutatie weinig invloed uitoefent op het aantal rII^+ -fagen dat door de overdracht van het desbetreffende rII^+ -kenmerk is ontstaan.

Daar de mutanten r_{51} , r_{24} en r_{1272} (die het gehele rII-gen mist) met ongeveer gelijke efficiëntie getransformeerd worden, is het

niet verwonderlijk dat de dubbelmutant $r_{51}r_{24}$ evenzo met dezelfde efficiëntie getransformeerd wordt. De beide kenmerken worden waarschijnlijk door één DNA molecule in één reactie getransformeerd, zodat we hier kunnen spreken van cotransformatie van de mutant $r_{51}r_{24}$.

TABEL XI

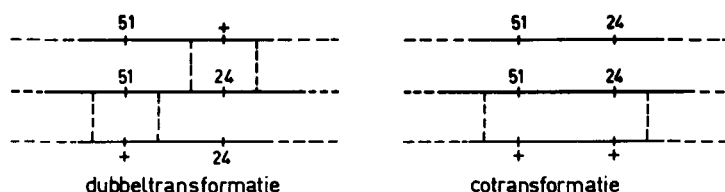
Vergelijking van het aantal rII^+ -fagen dat gevormd werd bij de transformatie van enkele verschillende rII -mutanten.

π -deeltjes van rII -mutant	rII^+ -titer	rII -titer	T.I. $\times 10^6$
r_{51}	$8,8 \times 10^4$	$3,6 \times 10^9$	24
r_{24}	$8,4 \times 10^4$	$3,1 \times 10^9$	27
$r_{51}r_{24}$	$8,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^9$	24
r_{320}	$5,2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^9$	40
r_{H88}	$7,2 \times 10^4$	$5,0 \times 10^9$	14
r_{1272}	$6,7 \times 10^4$	$3,0 \times 10^9$	22
r_{5x}	$4,9 \times 10^4$	$2,0 \times 10^9$	24
r_{320} (controle)	$1,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^9$	0,08

Bovenstaand experiment werd verricht volgens methode 11 (zie Hoofdstuk II). Sferoplasten werden gemengd met rII^+ -DNA ($5 \mu\text{g/ml}$) en na 30 min. incuberen bij 37° werden de π -deeltjes toegevoegd. In het controle-experiment voor r_{320} werd in plaats van DNA 0,01 M fosfaatbuffer van pH 7,1 toegevoegd.

Het gebruik van de dubbelmutant $r_{51}r_{24}$ schept de mogelijkheid na te gaan hoeveel dubbeltransformanten er gevormd worden. Door namelijk sferoplasten te infecteren met π -deeltjes van de mutant $r_{51}r_{24}$ en hieraan een mengsel toe te voegen van DNA moleculen die of het r_{51}^+ -kenmerk of het r_{24}^+ -kenmerk bevatten (dus DNA geïsoleerd uit respectievelijk r_{24} en r_{51}), kunnen slechts dan rII^+ -transformanten ontstaan als er recombinatie optreedt met beide DNA moleculen (zie figuur 15). In tabel XII zijn de resultaten weergegeven van een dergelijk experiment.

Als de kenmerken r_{51}^+ en r_{24}^+ zich op verschillende moleculen bevinden, dan bedraagt het aantal gevormde transformanten nog maar ongeveer 3% van het aantal dat gevormd wordt onder invloed van DNA moleculen die beide kenmerken bevatten. (Berekend op basis van de transformatie index is dit getal 2,2%.)



Figuur 15

Schematische weergave van het ontstaan van dubbeltransformanten en co-transformanten. De dik getrokken lijn stelt een gedeelte van het ge-
noom van het π -deeltje voor, de dunne lijnen stellen gedeelten van de
toegevoegde DNA moleculen voor. De verticale stippellijntjes duiden de
plaats van een recombinatie aan.

TABEL XII

Vergelijking tussen het aantal rII^+ -fagen dat ontstaat
ten gevolge van cotransformatie en ten gevolge van
dubbeltransformatie van de mutant $r_{51}r_{24}$.

DNA	rII^+ -titer	rII -titer	T. I. $\times 10^6$
rII^+ -DNA	$2,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^9$	190
r_{51} -DNA	< 10	$1,3 \times 10^9$	-
r_{24} -DNA	< 10	$1,4 \times 10^9$	-
r_{51} -DNA + r_{24} -DNA	$6,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^9$	4,1

Het incubatiemengsel bevatte sferoplasten die geïnfecteerd wer-
den met π -deeltjes van $r_{51}r_{24}$. Hieraan werden de aangegeven DNA pre-
paraten ($5 \mu g/ml$) toegevoegd.

Toch blijkt hieruit dat twee kenmerken, die vrij dicht bij elkaar
liggen op het chromosoom (4% recombinatie in de normale faagkruising),
onafhankelijk overgedragen kunnen worden aan één transformant door
twee verschillende DNA moleculen.

3. Transformatie van een amber-mutant.

Behalve rII-mutanten is er in het hier beschreven faag-transformatie systeem nog een andere groep T4-mutanten gebruikt, namelijk de zogenaamde amber-mutanten (afgekort: am-mutanten). Deze mutanten zijn ontdekt en beschreven door Epstein c.s. (60). De amber-mutanten worden gekarakteriseerd door de eigenschap dat ze geen plages vormen op E.coli B (hoewel deze bacterie wel geïnfecteerd wordt door deze mutanten), maar wel op E.coli CR63 (afgeleid van E.coli K). E.coli B wordt in dit geval de beperkende (Eng.: non permissive) gastheer genoemd en E.coli CR63 de niet-beperkende (Eng.: permissive) gastheer.

Door Epstein c.s. (60) is een groot aantal van deze amber-mutanten geïsoleerd en door middel van complementatie proeven was hij in staat de mutaties in 47 verschillende genen te groeperen. Elk van deze genen heeft een functie bij de ontwikkeling van de faag en het is nu gebleken dat de volgorde van deze genen op het chromosoom ongeveer overeenkomt met de volgorde waarin de verschillende functies verricht worden. Zo heeft men onderscheid kunnen maken tussen vroeg en laat functionerende genen. De eerstgenoemde groep is verantwoordelijk voor de afbraak van het DNA van de gastheer, voor de synthese van faag DNA en voor nog vele andere taken die verricht moeten worden in de eerste minuten na infectie. De laat functionerende genen zijn verantwoordelijk voor de synthese van faageiwitten en hun assemblage tot complete deeltjes. Tevens bleek dat het op de juiste wijze functioneren van de "vroeg" genen een voorwaarde is voor het doen functioneren van de "late" genen.

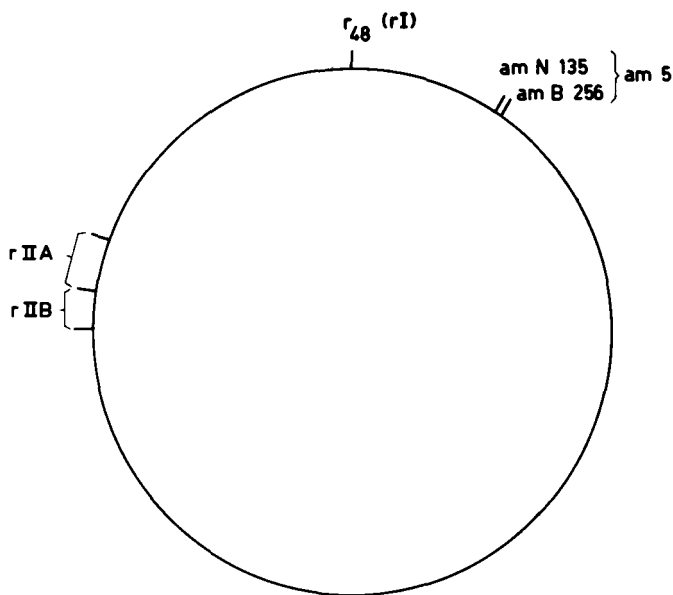
Het onvermogen van een mutant om op E.coli B plages te vormen, maakt het mogelijk met behulp van deze bacteriestam uit een overmaat am-fagen de am⁺-fagen te selecteren. Dit was de reden om ook fagen met het am-kenmerk in het faagtransformatie systeem te betrekken.

Evenals in het geval van de transformatie van de rII-mutanten verdient het de voorkeur mutanten met een lage terugmutatiefrequentie te gebruiken om ten opzichte van de controle een duidelijk effect van DNA te kunnen demonstreren.

Nu is de amber-mutatie waarschijnlijk een puntmutatie, zodat men terugmutanten kan verwachten. Men stelt zich namelijk voor dat CR63-bacteriën een "suppressor" bevatten die de amber-mutatie onderdrukt, en in de voorstelling die men heeft over het mechanisme van deze vorm van suppressie, neemt men aan dat de amber-mutatie een puntmutatie is (69, 70).

Preparaten van amber-mutanten bevatten dan ook een bepaald per-

centage terugmutanten, dat zo hoog is dat het storend werkt in het transformatie systeem. Deze moeilijkheid werd ondervangen door gebruik te maken van een dubbelmutant, waarin de twee amber-kenmerken dicht bij elkaar liggen. Dit is de mutant amN135amB256, waarvan de beide loci in gen no. 5 liggen (zie Epstein c.s. (60)) die in het vervolg am5 genoemd zal worden. In de beperkende gastheer *E. coli* B is deze mutant geblokkeerd in het proces dat de synthese van de faagstaart verzorgt. Er vindt wel normale DNA synthese plaats en er worden ook faagkoppen gevormd. De ligging van de kenmerken van deze dubbelmutant op het chromosoom van T4 ten opzichte van die van enkele andere mutanten is in figuur 16 weergegeven.



Figuur 16

Schematische weergave van de ligging van enkele kenmerken op het chromosoom van de bacteriofaag T4.

Voor de transformatie van een am5-mutant geldt dezelfde procedure als voor een rII-mutant. Sferoplasten van *E. coli* B worden geïnfecteerd met π -deeltjes van am5 en vervolgens wordt DNA met het am5⁺-kenmerk toegevoegd. Na 3 uur incuberen bij 37° worden de nakomelingen uitge-

zaaid op E.coli B en E.coli CR63. In tabel XIII zijn de resultaten van enkele experimenten weergegeven.

TABEL XIII

Transformatie van de am5-mutant door DNA van het standaardtype.

Experiment nummer	Titer na het uitzaaien op:	
	E.coli B	E.coli CR63
1	$1,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
2	$5,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
3	$3,5 \times 10^5$	$9,6 \times 10^5$
controle	< 10	< 10

Sferoplasten van E.coli B werden geïncubeerd met π -deeltjes van am5 en na 10 min. werd DNA ($5 \mu\text{g/ml}$) toegevoegd. In de controle experimenten werd in plaats van DNA 0,01 M fosfaatbuffer van pH 7,1 toegevoegd.

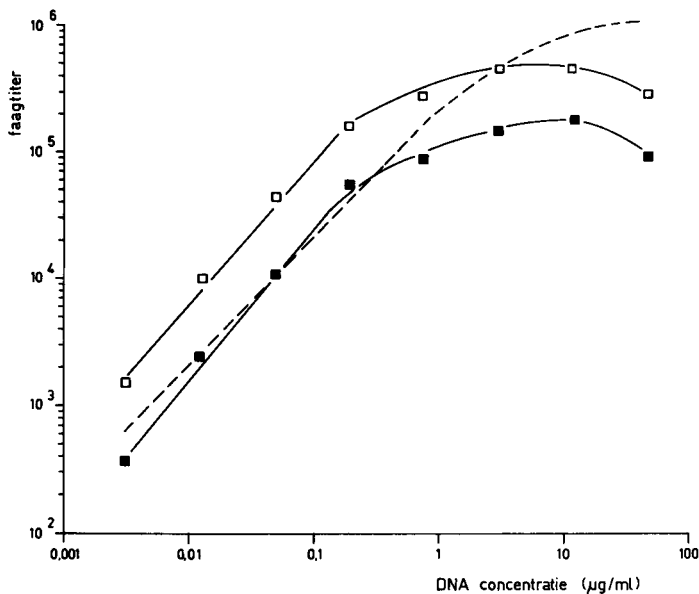
De zeer lage titers in het controle experiment bij uitzaaien op E.coli CR63 weerspiegelen het onvermogen van de E.coli B sferoplast om am5-fagen te produceren. Bij uitzaaien op E.coli B kan men uiteraard geen vorming van plagues verwachten. Uit deze tabel blijkt tevens, dat onder invloed van DNA van het standaardtype (met het am5⁺-kenmerk) de vorming van am5⁺-fagen plaats vindt, waaruit dus volgt dat ook de am5-mutant getransformeerd kan worden.

Er is echter een verschil met het rII-systeem: daar kan de r₅₁-mutant zich onbelemmerd in de sferoplast vermeerderen en een groot aantal nakomelingen leveren, waarvan er enkele eventueel getransformeerd worden door het aanwezige DNA; in het amber systeem echter kan de am-mutant in de sferoplast geen nakomelingen vormen; er treedt alleen DNA synthese op en daarna stopt de vegetatieve ontwikkeling. In het controle experiment wordt dan ook geen enkele intacte faag gevonden. Het toegevoegde am5⁺-DNA moet dus ook nog een extra functie vervullen alvorens het aanleiding kan geven tot de vorming van transformatanten, namelijk de functie die in de am5 geblokkeerd is en die waarschijnlijk de synthese van de faagstaart regelt.

Er zijn twee mogelijkheden: 1) het binnenkomende, toegevoegde DNA van het standaardtype verzorgt eerst de synthese van de faagstaart en

wordt dan betrokken bij het proces dat leidt tot de vorming van een genetisch $am5^+$ -genoom; 2) het binnenkomende DNA recombineert eerst met het $am5$ -chromosoom, zodat een $am5^+$ -genoom ontstaat en daarna wordt de functie van staartsynthese verzorgd.

De biologische activiteit van een DNA preparaat kan in dit geval dus niet uitgedrukt worden als transformatie index, maar het aantal gevormde $am5^+$ -fagen is een maat voor de biologische activiteit. Daar $am5^+$ -fagen met gelijke efficiëntie plagues vormen op *E.coli* B en op *E.coli* CR63 zou men gelijke titers verwachten op deze twee stammen. Uit tabel XIII blijkt echter dat de titer op CR63 ongeveer driemaal zo hoog is als de titer op B. Er ontstaat dus kennelijk bij de transformatie naast fagen van het standaardtype een nog groter aantal $am5$ -fa-



Figuur 17

Invloed van de DNA concentratie op de transformatie van de mutant $am5$. Sferoplasten van *E.coli* B98 werden gedurende 10 min. bij 37° geïncubeerd met π -deeltjes van $am5$, waarna $am5^+$ -DNA werd toegevoegd tot de aangegeven concentraties. Na 3 uur incuberen bij 37° werden de nakomelingen uitgezaaid op *E.coli* B en op *E.coli* CR63. ■—■ titer op *E.coli* B; □—□ titer op *E.coli* CR63; - - - - rII^+ -titer overgenomen uit figuur 9.

gen die niet op E.coli B maar wel op E.coli CR63 plages vormen. Men kan zich voorstellen dat deze zijn ontstaan als gevolg van fenotypische menging van de aanwezige faagbestanddelen in de sferoplast van E.coli B. Immers, het toevoegen van het complementerende $am5^+$ -DNA heeft tot gevolg dat alle faagcomponenten normaal gesynthetiseerd zullen worden. Tijdens het rijpingsproces, waarbij de DNA moleculen omgeven worden door een eiwithuid, zal het echter heel goed mogelijk zijn dat DNA moleculen met het $am5$ -kenmerk worden ingebouwd, waardoor naast $am5^+$ - ook een $am5$ -faag zal worden gevormd.

In figuur 17 is weergegeven de relatie tussen de DNA concentratie en het aantal gevormde $am5^+$ -fagen. Tevens is in deze figuur weergegeven het aantal r_{51}^+ -fagen dat onder invloed van gelijke concentraties r_{51}^+ -DNA gevormd werd. Hieruit blijkt dat het aantal $am5^+$ -transformanten eerder een verzadigingsniveau bereikt dan het aantal r_{51}^+ -transformanten. In de figuur is ook nog de titer op E.coli CR63 weergegeven ($am5$ - en $am5^+$ -fagen); deze is steeds ongeveer driemaal zo hoog als de titer op E.coli B ($am5^+$ -fagen).

In de hierna te beschrijven experimenten werd nog een ander kenmerk gebruikt, namelijk de rI-eigenschap. De ligging van dit kenmerk op het chromosoom van T4 is in figuur 16 weergegeven. Mutanten van het rI-type vormen plages zowel op E.coli B als op E.coli K, en op beide stammen zijn de plages groot en scherp begrensd; dientengevolge zijn ze duidelijk te onderscheiden van de plages van het standaardtype. Het rI-kenmerk is dus niet bruikbaar om selectieve vermeerdering toe te passen, maar fagen, die dit kenmerk bezitten, zijn direct op de telplaat te herkennen.

DNA, geïsoleerd uit een gezuiverd preparaat van een rI-mutant (r_{48}), werd gebruikt voor de transformatie van r_{51} - en van $am5$ -mutanten. r_{51}^+ -transformanten, die tevens het r_{48} -kenmerk bezitten, zijn dus op E.coli K aan hun plaguevorm te herkennen en evenzo zijn $am5^+$ -transformanten, die het r_{48} -kenmerk bezitten, op E.coli B en E.coli CR63 te herkennen. In tabel XIV zijn de resultaten van een dergelijk experiment weergegeven.

Uit deze waarnemingen blijkt dat er zowel onder de r_{51}^+ -transformanten als onder de $am5^+$ -transformanten een bepaald percentage aanwezig is dat tevens het r_{48} -kenmerk bevat. Dit rI-percentage bleek echter nogal te variëren in de diverse experimenten; voor de r_{51}^+ -transformanten varieerde het van 4-8%, en voor de $am5^+$ -transformanten van 20-40%.

Er zijn twee mogelijkheden waardoor de transformanten die het r_{48} -kenmerk bevatten kunnen ontstaan: 1) met het r_{51}^+ - respectievelijk

TABEL XIV

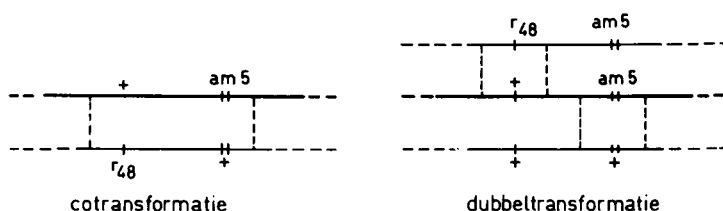
Transformatie van r_{51} - en $am5$ -mutanten door r_{48} -DNA.

Incubatiemengsel	r_{51}^{+} -titer	$am5^{+}$ -titer	%rI
sfer. + π - r_{51} + r_{48} -DNA	$2,1 \times 10^5$		8
sfer. + π - $am5$ + r_{48} -DNA		$2,9 \times 10^5$	33

Sferoplasten van *E.coli* B werden gedurende 10 min. bij 37° geïncubeerd met π -deeltjes van r_{51} respectievelijk $am5$, waarna r_{48} -DNA ($5 \mu\text{g/ml}$) werd toegevoegd. Na 3 uur incuberen bij 37° werden de nakomelingen getitreerd op *E.coli* K (r_{51}^{+} -titer) respectievelijk op *E.coli* B ($am5^{+}$ -titer). Op de telplaten werden de plagues van het standaardtype en van het rI-type afzonderlijk geteld. De laatste kolom vermeldt het percentage rI-plagues ten opzichte van het totaal aantal plagues.

$am5^{+}$ -kenmerk wordt tegelijk het r_{48} -kenmerk van het transformerende DNA molecule opgenomen in het genoom van de r_{51} - respectievelijk $am5$ -mutant;

2) na de opname van het r_{51}^{+} - respectievelijk $am5^{+}$ -kenmerk van het transformerende DNA molecule wordt door recombinatie met een ander DNA molecule het r_{48} -kenmerk opgenomen. In het eerste geval zou men weer van cotransformanten kunnen spreken, in het tweede geval van dubbeltransformanten. De situatie is te vergelijken met de transformatie van de mutant $r_{51}r_{24}$, maar de afstand tussen de kenmerken is veel groter. De opzet van het experiment kan zodanig gewijzigd worden dat deze twee kenmerken van twee verschillende DNA moleculen moeten worden opgenomen. Dit werd als volgt bereikt: de mutant $r_{48}am5$ werd geïsoleerd en gekweekt; vervolgens werd hieruit het DNA geïsoleerd. Met een mengsel



Figuur 18

Voor verklaring zie figuur 15.

van r_{48} am5-DNA en standaardtype DNA werd de mutant am5 getransformeerd.

Zoals in figuur 18 is weergegeven, kunnen nu alleen maar r_{48} am5⁺-transformanten ontstaan na dubbeltransformatie. In tabel XV zijn de resultaten van dit experiment weergegeven.

TABEL XV

Resultaten van de transformatie van de mutant am5 volgens de twee opstellingen zoals aangegeven in figuur 18.

DNA	am5 ⁺ -titer	%rI
r_{48} -DNA	$6,4 \times 10^4$	27
am5 r_{48} -DNA + standaardtype DNA	$5,1 \times 10^4$	2,2

Sferoplasten van E.coli B werden geïnfecteerd met π -deeltjes van am5 en na 10 min. incuberen bij 37° werden de aangegeven DNA preparaten toegevoegd. Na 3 uur incuberen bij 37° werden de nakomelingen getitreerd op E.coli B en onderzocht op het voorkomen van rI-mutanten.

Uit tabel XV blijkt dat het percentage dubbeltransformanten 2,2% bedraagt, een waarde die vergelijkbaar is met die van de dubbeltransformatie van de nauw-gekoppelde kenmerken r_{51} en r_{24} .

TABEL XVI

Transformatie van de mutant am5, waarbij het rI-kenmerk of op het transformerende DNA molecule ligt, of op het genoom van het π -deeltje.

Incubatiemengsel	am5 ⁺ -titer	%rI	%rI ⁺
sfer. + π -am5 + r_{48} -DNA	$1,6 \times 10^5$	24	
sfer. + π -am5 r_{48} + standaardtype DNA	$2,5 \times 10^5$		27

Sferoplasten van E.coli B werden geïnfecteerd met π -deeltjes van am5 respectievelijk am5 r_{48} en na 10 min. incuberen bij 37° werden de aangegeven DNA preparaten toegevoegd.

Nagegaan werd of het verschil maakte of een kenmerk overgedragen werd in de mutant vorm of in de standaard vorm. De resultaten van een dergelijk experiment, waarin de ligging van de kenmerken r_{48} en r_{48}^+ verwisseld is, zijn weergegeven in tabel XVI. In het eerste experiment werd de mutant $am5r_{48}^+$ getransformeerd met $am5^+r_{48}$ -DNA en in de nakomelingen het percentage r_{48} -fagen bepaald. In het tweede experiment werd de mutant $am5r_{48}$ getransformeerd met $am5^+r_{48}^+$ -DNA en in de nakomelingen het percentage r_{48}^+ -fagen bepaald.

Transformatie van de mutant $am5r_{48}$ door standaardtype DNA zal in de meeste gevallen leiden tot de vorming van $am5^+r_{48}$ -fagen, die op E.coli B grote plages vormen, terwijl nu de kleine plages cotransformanten representeren. Uit tabel XVI blijkt dat in beide gevallen het percentage cotransformanten ongeveer gelijk is.

4. Bespreking van de resultaten.

De in dit hoofdstuk beschreven experimenten hadden tot doel verschillende kenmerken in het faagtransformatie systeem te betrekken. Daarvoor komen in aanmerking die eigenschappen, waarvoor selectiemogelijkheden bestaan en waarvan de mutatie dermate stabiel is, dat het effect van het toevoegen van DNA niet door een hoge terugmutatiefrequentie overheerst wordt. Aan deze eisen voldoen dus een groot aantal rII-mutanten. De hier gebruikte rII-mutanten vormen een reeks, waarin de grootte van de mutatie toeneemt en eindigt bij een deletie die het gehele rII-gen omvat (r_{1272}). Door Nomura en Benzer (71) en Bode (72) is aangetoond dat deletie mutanten inderdaad een stuk DNA missen, en dat een deletie niet toe te schrijven is aan een aantal veranderde nucleotiden. De lengte van de r_{1272} deletie wordt geschat op ongeveer 2.000 nucleotiden. Het is daarom enigszins onverwacht dat al deze mutanten met gelijke efficiëntie getransformeerd worden door hetzelfde DNA preparaat. Hierbij moet direct worden opgemerkt dat het moeilijk is voorstellingen te doen, zolang het mechanisme van de recombinatie, waardoor waarschijnlijk de transformanten ontstaan, nog onvoldoende bekend is. Het zou evenwel een aanwijzing kunnen zijn dat voornamelijk grote DNA fragmenten kunnen recombineren.

Een andere klasse van mutanten die voor ons doel geschikt is, wordt gevormd door de amber-mutanten, alhoewel een dubbelmutant gebruikt moest worden om de storende invloed van spontane terugmutaties te onderdrukken. Door het transformerende DNA molecule te voorzien van een kenmerk dat de plagemorfologie beïnvloedt, bleek het mogelijk na

te gaan welk gedeelte van de transformanten ook dit kenmerk had opgenomen, en of dit geschied was als cotransformatie of door middel van dubbeltransformatie.

Transformatie van de mutant $r_{51}r_{24}$ door DNA van het standaardtype levert ongeveer evenveel transformanten van het standaardtype op als transformatie van de mutanten r_{51} of r_{24} . Het is dus redelijk te veronderstellen, dat deze nauw-gekoppelde kenmerken gelijktijdig getransformeerd worden, dat wil zeggen dat het cotransformatie percentage ongeveer 100% bedraagt. Als de twee kenmerken verder van elkaar verwijderd liggen, zoals r_{48} en $am5$, dan bedraagt dit percentage 20-40% en bij nog grotere afstand tussen de kenmerken, zoals bij- r_{51} en r_{48} , bedraagt dit percentage 4-8%. Deze percentages gelden voor een DNA concentratie van 5 $\mu\text{g/ml}$. Wordt in al deze gevallen de opstelling zo gekozen dat de kenmerken op twee afzonderlijke DNA moleculen liggen, dan bedraagt het percentage dubbeltransformanten steeds ca. 2%, onafhankelijk of de kenmerken nauw-gekoppeld of niet-gekoppeld zijn. De vermelde percentages voor cotransformaties zijn dus in feite samengesteld uit cotransformaties en dubbeltransformaties.

Van de bacteriofaag T4 zijn nog meer mutanten bekend die waarschijnlijk in dit faagtransformatie systeem gebruikt kunnen worden, zoals bijvoorbeeld de temperatuurgevoelige mutanten die door Edgar beschreven zijn(73) en mutanten die zich kunnen vermeerderen op gastheren die resistent zijn tegen het standaardtype ("host range" mutanten). Door geschikte keuzen te maken uit deze mutanten moet het in principe mogelijk zijn om elk gebied van het T4-chromosoom met behulp van faagtransformatie te onderzoeken.

HOOFDSTUK VI

INVLOED VAN HET BREKEN VAN DNA MOLECULEN OP DE BIOLOGISCHE ACTIVITEIT

1. Inleiding.

Wanneer bij de isolatie van DNA uit de bacteriofaag T4 de nodige voorzichtigheid betracht wordt is het mogelijk om het totale chromosoom als één molecule te isoleren(64). Een dergelijk molecule heeft een lengte van ongeveer 50μ (74) en een molecuulgewicht dat ca. 130×10^6 bedraagt(75). Daar een faagdeeltje gemiddeld 4×10^5 nucleotiden bevat, stemt de gevonden waarde van 130×10^6 redelijk overeen met de totale hoeveelheid genetisch materiaal die in een faagdeeltje aanwezig is.

Deze grote moleculen zijn zeer gevoelig voor breuk door hydrodynamische krachten zoals die bijvoorbeeld optreden bij het roeren van verdunde DNA oplossingen. Daar in het faagtransformatie systeem met verdunde DNA oplossingen gewerkt wordt, die bovendien nog met behulp van een pipet aan het testsysteem worden toegevoegd, is het zeer waarschijnlijk dat de DNA moleculen al enige malen gebroken zijn voor zij een sferoplast kunnen penetreren. Het is niet alleen van praktisch belang om te weten in hoeverre deze breuken invloed uitoefenen op de biologische activiteit, het is tevens interessant om na te gaan bij welke molecuulgrootte van het DNA het transformerend vermogen verloren gaat.

Het voorhanden zijn van faagmutanten met verschillende kenmerken die al of niet ver uiteen liggen op het chromosoom schiep de mogelijkheid ook de invloed van het breken van DNA op de transformatie van die faagmutanten te onderzoeken.

2. Het breken van DNA.

De hier beschreven experimenten werden verricht met DNA preparaten die door een naald van een injectiespuit waren geperst, zoals beschreven in Hoofdstuk II, 9.

Deze wijze van breken werd verkozen boven andere beschikbare methoden (ultra-sonore trillingen, vernevelen, enzymatische afbraak) omdat met de spuitmethode ervaring was opgedaan door Dr. J. B. T. Aten voor wat betreft de invloed op het molecuulgewicht van het aldus behandelde materiaal (76). Bovendien is de spreiding in de grootte van de DNA fragmenten kleiner dan bij toepassing van de andere genoemde methoden.

Ter nadere karakterisering van de op deze wijze gebroken DNA moleculen werd de techniek van zone-centrifugeren in een sucrose-gradiënt toegepast.* Hieruit bleek dat deze preparaten een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht hadden van $4 \text{ à } 5 \times 10^6$. Een voorbeeld van een sedimentatie patroon is weergegeven in figuur 19a.

3. Invloed van het breken van DNA op de overdracht van één kenmerk.

Nagegaan werd hoe groot de invloed van breuk is op het vermogen van DNA om de faagmutanten r_{51} , r_{1272} en $am5$ te transformeren tot faag van het standaardtype. Voor dit experiment werd DNA gebruikt dat geïsoleerd was uit het standaardtype faag en volgens de onder 2 beschreven methode gedegradieerd was tot een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht van $4 \text{ à } 5 \times 10^6$. Uit tabel XVII blijkt dat de biologische activiteit wisselvallig was.

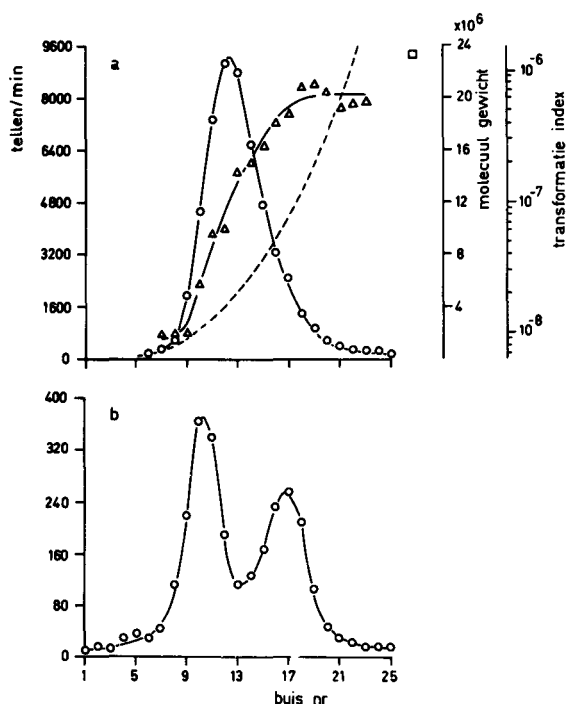
TABEL XVII

Afname van de biologische activiteit ten gevolge van
het breken van DNA moleculen

kenmerk	overblijvende biologische activiteit
r_{51}^+	100% - 60%
r_{1272}^+	40% - 5%
$am5^+$	30% - 10%

Oplossingen van DNA van het standaardtype ($5 \mu\text{g/ml}$) werden door een injectienaald geperst. De biologische activiteit van dit materiaal werd vergeleken met die van onbehandelde preparaten.

*(Veel dank ben ik verschuldigd aan Drs. G.P. van der Schans, van wiens ervaring en kennis ik mocht profiteren.)



Figuur 19

a. Het centrifugeren in een sucrose-gradiënt van gebroken en met ^{32}P gemerkt DNA van het standaardtype gedurende 16 uur bij 19.000 omwentelingen per min. en bij een temperatuur van 5° . Er werd 0,5 ml van de DNA oplossing (80 $\mu\text{g/ml}$) op de gradiënt gebracht. De radioactiviteit van de afzonderlijke fracties werd bepaald en daarna werdende fracties gedialyseerd en werd de biologische activiteit bepaald. $\circ\text{---}\circ$ ^{32}P (tellen/min./0,1 ml); $\triangle\text{---}\triangle$ transformatie index; - - - verdeling van de molecuulgewichten over de fracties (deze werden berekend door Drs.G.P. van der Schans); $\square$ waarde van de biologische activiteit van een niet-gebroken maar verder op identieke wijze behandeld DNA preparaat. (Het centrifugeren geschiedde in de SW25 rotor van de Spinco L.)

b. Het centrifugeren in een sucrose-gradiënt van de fracties 9 en 17 uit figuur 19a gedurende 15 uur bij 20.000 omwentelingen per min. en bij 5° . $\circ\text{---}\circ$ ^{32}P (tellen/min./0,1 ml).

Het bleek echter steeds dat de biologische activiteit ten aanzien van het r_{1272}^{+} -kenmerk gevoeliger was voor deze behandeling dan in het geval van het r_{51}^{+} -kenmerk. Dit is begrijpelijk gezien het verschil in grootte tussen het r_{51}^{+} - en het r_{1272}^{+} -kenmerk. Verder blijkt uit de tabel dat bij transformaties, uitgevoerd met behulp van de mutant r_{51} , de biologische activiteit van een DNA preparaat vrij ongevoelig is voor het uiteenvallen in brokstukken tijdens de manipulaties.

Getracht werd een relatie aan te tonen tussen het molecuulgewicht en de biologische activiteit van gebroken DNA. Het op de boven beschreven wijze gedegradeerde materiaal is echter nogal heterogeen van samenstelling. Daarom werd het volgende experiment uitgevoerd. Een met ^{32}P gemerkt preparaat van DNA van het standaardtype ($80\text{ }\mu\text{g/ml}$) werd door de spuit geperst en daarna gecentrifugeerd in een sucrose-gradiënt. Na afloop werd de inhoud van de centrifugebuis in bovenwaartse richting uit de buis gestuwd waarbij fracties van 0,5 ml werden opgevangen; fractienumero 1 is dus afkomstig uit het gebied van de meniscus. De fracties die DNA bevatten, zoals werd geconstateerd op grond van de ^{32}P -activiteit, werden gedialyseerd tegen 0,01 M fosfaatbuffer van pH 7,1. Hierna werd door verdunnen de DNA concentratie (berekend op basis van het ^{32}P -gehalte) in de fracties gelijk gemaakt. Vervolgens werd de biologische activiteit van het DNA in de diverse fracties bepaald door middel van de transformatie van de faagmutant r_{51} . De resultaten zijn weergegeven in figuur 19a. Uit deze figuur blijkt dat de biologische activiteit begint af te nemen als het gewichtsgemiddeld molecuulgewicht van het DNA molecule kleiner wordt dan 8×10^6 . Deze afname gaat vrij snel, zodat bijvoorbeeld de biologische activiteit van DNA met een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht van $3 \text{ à } 4 \times 10^6$ ongeveer 10 maal kleiner is.

Om aan te tonen dat er tijdens het centrifugeren in de gradiënt inderdaad fractionering had plaats gevonden werden twee fracties (no.9 en 17) gemengd en opnieuw gecentrifugeerd. Het resultaat is weergegeven in figuur 19b, waaruit blijkt dat de moleculen in deze fracties duidelijk verschillen in het gewichtsgemiddeld molecuulgewicht.

4. Invloed van het breken van DNA op de overdracht van twee kenmerken.

De invloed van het breken van DNA moleculen komt duidelijk tot uiting bij de cotransformatie. Onderzocht werd wat de invloed is van degradatie van DNA, geïsoleerd uit de mutant r_{48} , op de transformatie van de mutant r_{51} tot de cotransformant $r_{51}^{+}r_{48}$.

TABEL XVIII

Invloed van het breken van DNA op het percentage cotransformanten.

Exp.	DNA	rII ⁺ -titer	%rI	rII-titer
1	onbehandeld	2,1x10 ⁵	8	3,0x10 ⁹
	gebroken	7,0x10 ⁴	1,1	3,5x10 ⁹
2	onbehandeld	1,2x10 ⁵	3,1	2,5x10 ⁹
	gebroken	8,0x10 ⁴	0,9	3,0x10 ⁹
3	onbehandeld	1,2x10 ⁵	4	2,7x10 ⁹
	gebroken	1,5x10 ⁵	1,1	3,8x10 ⁹

r₄₈-DNA (5 µg/ml) werd gefragmenteerd en daarna toegevoegd aan sferoplasten van E.coli B98, die geïnfecteerd waren met π-deeltjes van r₅₁. Na 3 uur incuberen bij 37° werd het lysaat uitgezaaid op E.coli B (om de totale faagopbrengst te bepalen) en op E.coli K. Alle plagues op K zijn afkomstig van r₅₁⁺-transformatanten. De zich hieronder bevindende grote plagues zijn van het type r₅₁⁺r₄₈.

TABEL XIX

Invloed van het breken van DNA op het percentage cotransformanten.

Exp.	DNA	am5 ⁺ -titer	%rI
1	onbehandeld	1,0x10 ⁵	43
	gebroken	2,8x10 ⁴	1,9
2	onbehandeld	3,3x10 ⁵	47
	gebroken	4,5x10 ⁴	1,2
3	onbehandeld	5,9x10 ⁵	30
	gebroken	8,5x10 ⁴	2

Gebroken r₄₈-DNA (5 µg/ml) werd toegevoegd aan sferoplasten van E.coli B98, die geïnfecteerd waren met π-deeltjes van am5. Na 3 uur incuberen bij 37° werd het lysaat uitgezaaid op E.coli CR63 en op E.coli B. Alle plagues op B zijn afkomstig van am5⁺-transformatanten. De zich hieronder bevindende grote plagues zijn van het type am5⁺r₄₈.

Uit tabel XVIII blijkt dat degradatie het percentage cotransformanten doet dalen van gemiddeld 5% tot gemiddeld 1%. Deze 1% moet waarschijnlijk worden toegeschreven aan de gevormde dubbeltransformatanten (zie Hoofdstuk V).

In een soortgelijk experiment werd de invloed nagegaan van het breken van DNA, geïsoleerd uit de faagmutant r_{48} , op de transformatie van de mutant $am5$ tot de cotransformant $am5^+r_{48}$. De kenmerken $am5^+$ en r_{48} liggen dicht bij elkaar op het chromosoom dan de kenmerken r_{51}^+ en r_{48} .

Uit tabel XIX blijkt dat de biologische activiteit van DNA ten aanzien van de transformatie van de faag $am5$ tot de faag $am5^+$ door het fragmenteren afneemt tot 10-30% van de oorspronkelijke waarde en dat het percentage cotransformatanten ($am5^+r_{48}$) afneemt van gemiddeld 40% tot 1,7%. Zoals in Hoofdstuk V is uiteengezet, is deze 1,7% te verklaren uit het optreden van dubbeltransformaties.

5. Bespreking van de resultaten.

Eén van de doelstellingen die geleid hebben tot de ontwikkeling van het faagtransformatie systeem was de noodzaak bij het onderzoek naar het verband tussen de chemische structuur en de biologische activiteit van DNA over een methode te beschikken waarmee de laatstgenoemde grootte bepaald zou kunnen worden. Nu is het wenselijk en waarschijnlijk zelfs noodzakelijk om dit chemische onderzoek te verichten met zo klein mogelijke DNA moleculen. Met behulp van transformatie van fagen met puntmutaties of kleine deleties zou het in principe mogelijk moeten zijn om de biologische activiteit van kleine DNA moleculen, met een lengte van enkele nucleotiden, aan te tonen.

Uit de voorgaande experimenten blijkt echter dat dit vooralsnog onmogelijk is, en de situatie ziet er in deze nogal somber uit, daar zelfs fragmenten met een molecuulgewicht van ongeveer 10^6 (dat wil zeggen ongeveer 1.500 nucleotidenparen) nog slechts een zeer geringe biologische activiteit vertonen.

De verlaging van de biologische activiteit ten gevolge van breuk kan onder andere de volgende oorzaken hebben:

- 1) kleine DNA brokstukken zijn niet in staat een sferoplast binnen te dringen;
- 2) kleine DNA brokstukken kunnen niet recombineren met het chromosoom van de met ureum behandelde mutant.

Bij bacterietransformatie, waar het transformerend vermogen van DNA moleculen ook verloren gaat ten gevolge van breuk, wordt dit door de onderzoekers toegeschreven aan het onvermogen van de fragmenten om te adsorberen aan receptoren in de celwand van de bacterie(77,78).

Er zijn met het faagtransformatie systeem nog geen experimenten verricht die tot doel hadden de opname van faag DNA door sferoplasten te bestuderen, zodat op dit moment nog niet vastgesteld kan worden of het niet waarnemen van biologische activiteit van kleine brokstukken toe te schrijven is aan het onvermogen tot penetratie, of dat de mogelijkheid tot recombinatie niet meer bestaat.

Uit de weergegeven experimenten blijkt dat het r_{1272}^{+} -kenmerk gevoeliger is voor de breuk veroorzakende schuifspanningen dan het r_{51}^{+} -kenmerk, terwijl het $am5^{+}$ -kenmerk een intermediaire positie inneemt. Voor deze grotere gevoeligheid van het r_{1272}^{+} -kenmerk zijn onder meer de volgende oorzaken aan te wijzen. De grootte van het r_{1272}^{+} -kenmerk, dat het gehele rII-gen omvat, bedraagt naar schatting 1% van het totale chromosoom, dat wil zeggen overeenkomend met een molecuulgewicht van circa $1,3 \times 10^6$. Voor de transformatie van de mutant r_{1272} is het dus noodzakelijk dat een DNA fragment met een molecuulgewicht van minstens $1,3 \times 10^6$ opgenomen wordt. Van de brokstukken met een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht van 4 à 5×10^6 die afkomstig zijn uit dat gebied van het chromosoom dat het rII-gen bevat, zal circa 30% slechts een gedeelte van het r_{1272}^{+} -kenmerk bevatten en dientengevolge de mutant r_{1272} niet kunnen transformeren. Bovendien lijkt het aannemelijk dat voor de reactie waarbij een transformant ontstaat uit een deletie-mutant een veel groter DNA fragment nodig is dan overeenkomt met de grootte van het kenmerk, zodat deze 30% slechts het minimum aangeeft.

Het experiment dat weergegeven is in figuur 19a doet de vraag rijzen of aan de molecuulgrootte van biologisch actieve DNA moleculen een ondergrens gesteld is van bijvoorbeeld 8×10^6 . De biologische activiteit van materiaal in fracties met een nominaal lager molecuulgewicht zou dan toegeschreven moeten worden aan de aanwezigheid van grote moleculen. Deze aanwezigheid blijkt uit de verdeling die verkregen wordt na opnieuw centrifugeren van de fracties 9 en 17; de pieken zijn breder dan men op grond van de aanwezigheid van homogeen materiaal zou mogen verwachten. De verdeling over de fracties van moleculen met een bepaald molecuulgewicht is complex in bovengenoemd experiment; het is dan ook met de beschikbare gegevens niet mogelijk een eventuele ondergrens te berekenen.

Het is echter ons inziens niet onredelijk om te veronderstellen dat moleculen met een molecuulgewicht van circa $2-8 \times 10^6$ toch een, zij

het ook lagere, specifieke biologische activiteit bezitten. Uit reeds eerder gepubliceerde(23) en andere, hier niet vermelde, experimenten bleek dat preparaten van DNA fragmenten met een molecuulgewicht variërend van $0,5-3 \times 10^6$, die als "tamelijk homogeen" beschouwd konden worden, een duidelijk aantoonbaar transformerend vermogen bezaten.

Dat het percentage cotransformanten sterk verlaagd is bij gebruik van DNA fragmenten is geheel volgens de verwachting. Als bijvoorbeeld de beide kenmerken r_{48} en $am5^+$ zich in één fragment zouden bevinden impliceert dit op grond van de chromosoomkaart een molecuulgewicht van $15-20 \times 10^6$. Moleculen van deze grootte zijn waarschijnlijk niet of nauwelijks aanwezig in de preparaten met gebroken moleculen. De kans, dat een molecule van deze grootte beide kenmerken bevat, is klein. Transformanten die de beide kenmerken bevatten zijn dan ook waarschijnlijk ontstaan uit dubbeltransformaties van de mutant door DNA fragmenten.

Niettemin is bovenstaande waarneming nog eens een demonstratie van het feit dat genetische eigenschappen in gekoppelde toestand kunnen voorkomen en dat deze koppeling door mechanische breuk teniet gedaan kan worden.

HOOFDSTUK VII

INVLOED VAN HITTE-DENATURATIE OP DE BIOLOGISCHE ACTIVITEIT VAN T4-DNA

1. Inleiding.

Indien een DNA oplossing tot boven een bepaalde temperatuur wordt verhit, worden de waterstofbindingen, die de complementaire basen in de beide strengen met elkaar verbinden, verbroken. Bij deze vorm van denaturatie worden de dubbelstreng moleculen, die zich in oplossing gedragen als enigszins stijve, wormachtige ketens, veranderd in enkele strengen, die de vorm aannemen van losse kluwens. Vooral door het onderzoek van Doty en Marmur is een dieper inzicht verkregen in het mechanisme van deze denaturatie. Voor een overzicht van dit werk zij verwezen naar Marmur c.s. (79). Het optreden van deze denaturatie kan op eenvoudige wijze geconstateerd worden doordat met het wegvallen van de waterstofbruggen het ultraviolet-absorptiespectrum van de basen verandert. Dit leidt tot een toename van de absorptie bij 260 m μ . Deze toename noemt men het hyperchrome effect. De temperatuur waarbij 50% van het maximale hyperchrome effect bereikt wordt noemt men de smelttemperatuur en wordt aangeduid als T_m . De T_m is onder meer afhankelijk van de basensamenstelling van de moleculen en van de ionensterkte van de oplossing.

Het gevolg van denaturatie voor de biologische activiteit van DNA in het bacterietransformatie systeem was reeds eerder onderzocht. Het bleek dat het transformerend vermogen van gedenatureerd DNA nog enkele procenten bedroeg van dat van natief DNA.

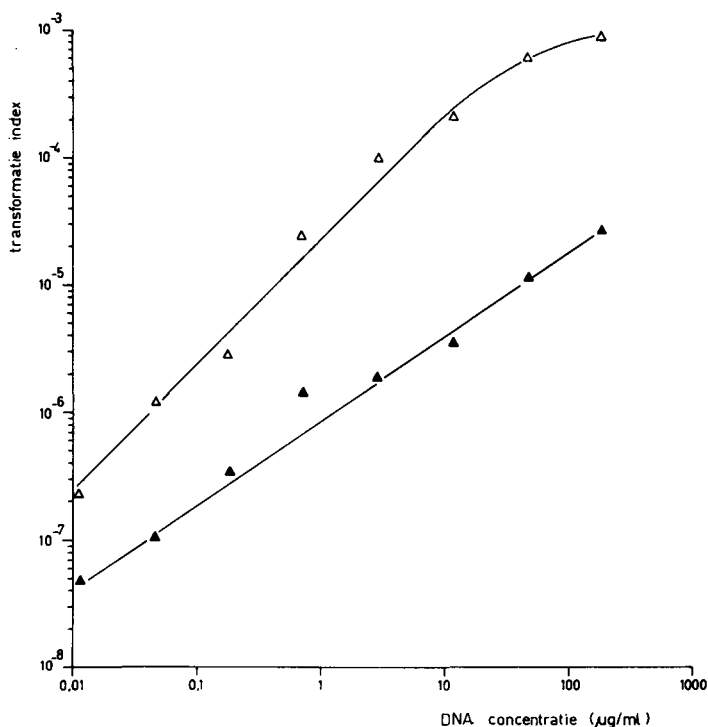
Als een oplossing, die gedenatureerde DNA moleculen bevat, enkele uren bij een temperatuur gehouden wordt die ongeveer 25° lager is dan de smelttemperatuur, en wanneer tevens de zoutconcentratie voldoende hoog is (0,3-0,5 M NaCl), dan neemt men een geleidelijke daling waar van de absorptie bij 260 m μ ; kennelijk worden er weer waterstofbruggen gevormd. Dit proces noemt men renaturatie.

Men stelt zich hierbij voor dat de enkelstreng moleculen met el-

kaar in interactie treden, waarbij kernen met een dubbelstreng structuur ontstaan, die zich geleidelijk uitbreiden, door een soort ritsluiting reactie, tot vrijwel het gehele molecuule weer een dubbelstreng structuur heeft aangenomen.

Bij gebruik van bacterie-transformerend DNA gaat dit tevens gepaard met een terugkeer van de biologische activiteit tot ongeveer 40% van de oorspronkelijke waarde(80).

Daar in het hier beschreven faagtransformatie systeem ook met dubbelstreng DNA gewerkt wordt, is het interessant om na te gaan op welke wijze hier de biologische activiteit beïnvloed wordt door denaturatie en renaturatie van het DNA.



Figuur 20

Relatie tussen de biologische activiteit en de concentratie van DNA in natieve en gedenatureerde toestand. Sferoplasten werden geïncubeerd met π -deeltjes van r_{51} en daarna werd rII^+ -DNA toegevoegd tot de aangegeven concentraties. Δ — Δ natief DNA; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ gedenatureerd DNA.

2. Faagtransformatie met gedenatureerd DNA.

De denaturatie werd als volgt uitgevoerd: een buisje, bevattende 3 ml van een DNA oplossing ($5 \mu\text{g/ml}$) in 0,01 M fosfaatbuffer van pH 7,1 werd gedurende 10 min. in kokend water gehouden, waarna de inhoud uitgegoten werd in een bekeerglas dat in ijswater stond. Een lage zoutconcentratie van de DNA oplossing en een snelle afkoeling zijn vereist om de renaturatie van DNA moleculen tot een minimum te beperken.

In figuur 20 is weergegeven de relatie tussen de biologische activiteit en de concentratie van DNA in de natieve zowel als in de gedenatureerde toestand. Uit deze figuur blijkt het volgende:

- 1) gedenatureerd DNA heeft een lagere biologische activiteit dan niet-gedenatureerd DNA;
- 2) de concentratiewerkingscurve van gedenatureerd DNA verloopt minder steil dan die van natief DNA; voor het lineaire gedeelte van deze curve geldt dat de daling van de biologische activiteit als gevolg van verhitting sterker wordt bij toename van de DNA concentratie.

In tabel XX zijn de resultaten vermeld van een aantal experimenten waarin de invloed werd nagegaan van denaturatie op de transformatie van de mutant r_{51} en op die van de mutant $am5$. Daarbij werd tevens bestudeerd of de grootte van het DNA molecule nog een rol speelt bij het door de denaturatie veroorzaakte effect.

TABEL XX

Biologische activiteit van DNA na denaturatie ten opzichte van die van niet-gedenatureerd DNA.

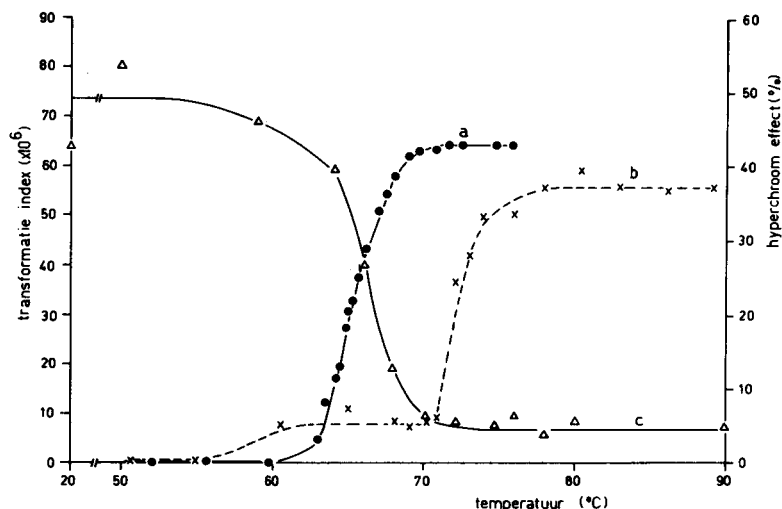
DNA	r_{51}^+ -kenmerk	$am5^+$ -kenmerk
niet-gebroken	3-12%	6-11%
gebroken	20-40% *	10-30% *

De DNA concentratie bedroeg steeds $5 \mu\text{g/ml}$. Het gewichtsgemiddeld molecuulgewicht van het gebroken DNA bedroeg $4 \text{ à } 5 \times 10^6$. *Deze percentages zijn berekend ten opzichte van de biologische activiteit van gebroken, niet gedenatureerde DNA moleculen.

Uit deze gegevens blijkt, dat de afname van de biologische activiteit ten gevolge van denaturatie voor het r_{51}^+ - en het $am5^+$ -kenmerk

even groot is; de spreiding in de resultaten is echter aanzienlijk. De afname van de biologische activiteit ten gevolge van denaturatie blijkt voor DNA fragmenten geringer te zijn dan voor niet-gebroken DNA.

De grote invloed van verhitting op de biologische activiteit van DNA was aanleiding om te onderzoeken of er een verband bestond tussen de afname van de biologische activiteit en de mate waarin het DNA op grond van het vertoonde hyperchrome effect als gedenuatureerd beschouwd kon worden.



Figuur 21

Relatie tussen de temperatuur waarbij het DNA verhit is geweest en de biologische activiteit. Monsters van 3 ml bevattende 5 $\mu\text{g/ml}$ in 0,01 M fosfaatbuffer van pH 7,1 werden gedurende 15 min. bij de aangegeven temperatuur verhit en daarna snel afgekoeld. Van deze preparaten werd de biologische activiteit voor het r_{51}^+ -kenmerk bepaald. Δ — Δ transformatie index (c); $\bullet$ — $\bullet$ hyperchroom effect, gemeten bij de desbetreffende temperatuur (a); x—x hyperchroom effect, gemeten na afkoeling van de monsters (b).

In figuur 21 zijn twee smeltcurven afgebeeld, a en b, die de relatie weergeven tussen het hyperchrome effect en de temperatuur. Curve a is een normale smeltcurve, waarbij het hyperchrome effect werd gemeten bij de aangegeven temperatuur, terwijl curve b het hyperchrome effect weergeeft na snel afkoelen van monsters die verhit waren ge-

weest tot de op de horizontale as aangegeven temperatuur. Van de laatstgenoemde monsters werd tevens de biologische activiteit bepaald (curve c).

Uit het verloop van de curven b en c blijkt dat gedeeltelijk gedenateerde DNA moleculen, die na afkoeling weinig hyperchroom effect meer vertonen, toch een sterk verlaagde biologische activiteit bezitten. Er blijkt echter wel een nauwe samenhang te bestaan tussen de afname in biologische activiteit en de toename in hyperchroom effect, gemeten bij de desbetreffende temperatuur.

Verder werd nagegaan welke invloed denaturatie had op het vermogen van r_{48} -DNA om de fagen $am5$ en r_{51} te transformeren tot de cotransformanten $am5^+r_{48}$ en $r_{51}^+r_{48}$.

TABEL XXI

Invloed van denaturatie op het percentage cotransformanten.

Exp.	DNA	% $am5^+r_{48}$	% $r_{51}^+r_{48}$
1	r_{48} -DNA	29	3,3
	idem-gedenateerd	2	< 0,16
2	r_{48} -DNA		3
	idem-gedenateerd		< 0,27
3	r_{48} -DNA	30	
	idem-gedenateerd	1,4	

r_{48} -DNA (5 $\mu g/ml$) werd gedurende 10 min. bij 100° verhit en daarna snel gekoeld; vervolgens werd dit DNA toegevoegd aan sferoplasten die geïnfecteerd waren met π -deeltjes van de mutant $am5$ respectievelijk r_{51} . Na incubatie werd in de nakomelingen het aantal $am5^+r_{48}$ - respectievelijk $r_{51}^+r_{48}$ -fagen bepaald.

Tengevolge van de denaturatie was het totaal aantal transformanten verlaagd tot 5 à 10% van het aantal dat verkregen was met natief DNA (overeenkomend met de gegevens uit tabel XX). Uit tabel XXI blijkt dat het percentage cotransformanten dat zich onder deze nakomelingen bevond sterk verminderd was. Als de denaturatie alleen het transformerend vermogen van het DNA zou beïnvloeden, zou men voor de cotransformanten de oorspronkelijke percentages mogen verwachten.

Uit bovenstaande experimenten komt duidelijk tot uiting dat door

verhitting de biologische activiteit van DNA aanzienlijk verlaagd wordt. Omdat in het bacterietransformatie systeem het door denaturatie verloren gegane transformerend vermogen van DNA voor een groot deel hersteld kan worden door renaturatie van het DNA, werd een dergelijk experiment uitgevoerd met het faagtransformatie systeem.

Gedenatureerd DNA van het standaardtype werd onderworpen aan renaturatie omstandigheden; nagegaan werd wat de invloed hiervan was op de biologische activiteit. De resultaten van enkele experimenten zijn weergegeven in tabel XXII.

TABEL XXII

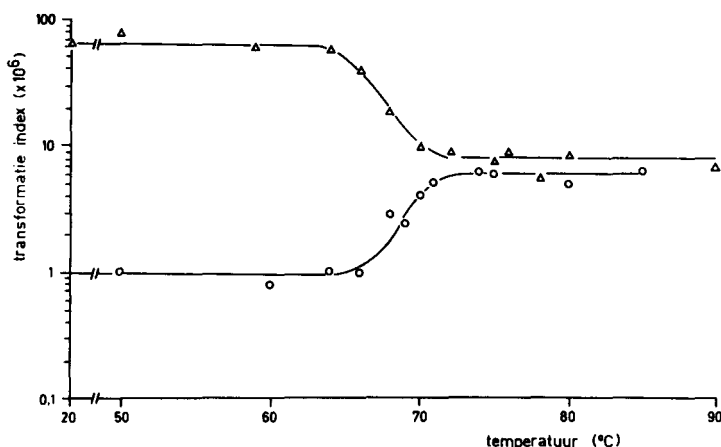
Invloed van renaturatie op de biologische activiteit.

DNA	Exp. 1 T. I. ($\times 10^6$)	%	Exp. 2 T. I. ($\times 10^6$)	%
natief	113	100	286	100
gedenatureerd	15	13	34	12
gerenatureerd	10,6	9,4(5,4)	30	10,5(7)
controle (4 uur 58°)	198	170	425	150

DNA ($5 \mu\text{g/ml}$) in $0,3 \text{ M NaCl}$ - $0,03 \text{ M Na-citraat}$ werd gedurende 10 min. bij 100° verhit en daarna snel afgekoeld. Een gedeelte werd langzaam afgekoeld tot 58° en 4 uur bij deze temperatuur gehouden. De controle werd niet gedenatureerd, maar wel 4 uur bij 58° gehouden. Na dialyse tegen $0,01 \text{ M}$ fosfaatbuffer van pH 7,1 werd de biologische activiteit ten aanzien van het r_{51}^+ -kenmerk bepaald. De tussen haakjes weergegeven percentages zijn berekend op de transformatie index (T.I.) van de controle.

Uit deze resultaten blijkt dat renaturatie geen of slechts een verlagende invloed uitoefent op de biologische activiteit. Het is opvallend dat de transformatie index van een DNA preparaat dat 4 uur bij een temperatuur van 58° is geweest hoger is dan die van een onbehandeld preparaat. Een zelfde effect werd waargenomen door Brody c.s. (20) voor de infectiviteit van λ -DNA. Men dient echter te bedenken dat het niet geheel gerechtvaardigd is de overige resultaten op deze controle te betrekken, aangezien in het experiment de invloed van het verblijven bij 58° zich ook tot gedenatureerde moleculen uitstrekt, terwijl in de controle alleen natieve moleculen aanwezig zijn.

Zoals reeds is vermeld zijn alle in dit proefschrift beschreven experimenten uitgevoerd volgens methode 14 van Hoofdstuk III. Hiernaast is tijdens de ontwikkeling van dit testsysteem een groot aantal experimenten, die betrekking hadden op de invloed van denaturatie op de biologische activiteit, verricht volgens methode 8; daarmee werden geheel andere resultaten verkregen. Uit deze experimenten bleek namelijk, dat gedensureerd DNA een 5 à 10 maal hogere biologische activiteit vertoonde dan natief DNA en dat deze stijging gecorreleerd was met een toename in de absorptie van licht met een golflengte van 260 m μ (81).



Figuur 22

Relatie tussen de biologische activiteit van rII⁺-DNA en de temperatuur waarbij het DNA verhit is geweest, bepaald volgens twee verschillende testmethoden. o—o transformatie index bepaald volgens methode 8 van Hoofdstuk III; Δ — Δ transformatie index overgenomen uit figuur 21.

In figuur 22 is een dergelijk experiment weergegeven, waarin tevens de curve van de biologische activiteit uit figuur 21 is opgenomen. De oorzaak van het tegengestelde effect van verhitten op de biologische activiteit, gemeten volgens deze twee testsystemen, is niet opgehelderd. Nadat de volgens methode 8 verrichte experimenten over de invloed van denaturatie op de biologische activiteit van DNA waren afgesloten, werd de aandacht geconcentreerd op andere problemen. Toen later in een veranderd testsysteem het verschil in biologische activiteit van natief en gedensureerd DNA weer onderzocht werd, kwam de bovengenoemde

verandering aan het licht. Uit figuur 22 blijkt dat de hoogste waarde voor de biologische activiteit, verkregen volgens methode 8, nog altijd kleiner is dan de laagste waarde bepaald volgens de nieuwere methode. Het testsysteem volgens methode 8 was veel minder efficiënt dan het nieuwe systeem, en misschien heeft deze lage efficiëntie zich juist doen gelden ten aanzien van het natieve DNA. Hoe dan ook, dit is een duidelijke demonstratie van het feit dat uitspraken over de biologische activiteit van T4-DNA zeer afhankelijk kunnen zijn van het gebruikte testsysteem.

3. Bespreking van de resultaten.

In de beschreven experimenten wordt aangetoond dat denaturatie van DNA moleculen leidt tot een verlaging van de biologische activiteit tot ongeveer 10% van de oorspronkelijke waarde.

De vraag is of deze overblijvende 10% het gevolg is van moleculen die niet gedenatureerd zijn (hitte-resistent) of dat ook enkelstreng moleculen biologisch actief zijn, zij het in mindere mate. Dezelfde situatie doet zich voor bij transformerend bacterie DNA, dat na denaturatie nog 1-5% van zijn transformerend vermogen behoudt. Hierbij bestaat nog onzekerheid of deze overblijvende activiteit toegeschreven moet worden aan gedenatureerde moleculen, of dat gedeeltelijk gere-natureerde moleculen hiervoor verantwoordelijk zijn.

Bij de hier beschreven methode van denatureren is het niet erg waarschijnlijk dat de DNA moleculen in hun natieve toestand blijven, of na afkoeling renatureren, en het is dan ook onwaarschijnlijk dat de overblijvende 10% biologische activiteit aan natieve moleculen toe te schrijven zou zijn.

Uit figuur 21 blijkt dat er een duidelijke correlatie is tussen het optreden van denaturatie, gemeten als extinctietoename bij de aan-gegeven temperatuur, en de afname van de biologische activiteit. Bovendien blijkt dat gedeeltelijk gedenatureerde DNA moleculen, die na afkoeling nog slechts een gering hyperchroom effect vertonen, toch een verlaagde biologische activiteit bezitten.

Blijkbaar hebben deze moleculen niet hun oorspronkelijke vorm teruggekregen, maar bezitten zij een structuur die ongunstig is voor het optreden van transformatie. Men zou hier kunnen denken aan moleculen waarin een zekere mate van intrastreng renaturatie heeft plaats gevonden.

Bij gebruik van gedenatureerd DNA in het transformatie proces blijkt het aantal cotransformanten sterk verlaagd te zijn. Men zou zich kunnen voorstellen dat tijdens de denaturatie het DNA molecule in kleine stukken uiteenvalt, waardoor de kenmerken gescheiden kunnen worden; de kans hierop is des te groter naarmate zij op grotere afstand van elkaar gelegen zijn. Davison c.s. (82) postuleert dater op verschillende plaatsen in het DNA molecule enkelstreng breuken voorkomen in beide strengen. Deze breuken zullen weinig invloed hebben op de koppeling van twee kenmerken, zolang het molecule door waterstofbruggen intact gehouden wordt. Na denaturatie zullen er echter gebroken enkelstrengen ontstaan, met het gevolg dat twee kenmerken, die op één molecule liggen, gescheiden kunnen worden.

De meeste onderzoekers (83-85) komen echter tot de conclusie, dat het mogelijk is na denaturatie complete enkelstreng DNA moleculen te verkrijgen, hetgeen dus betekent dat enkelstreng breuken in het DNA molecule van T2 of T4 niet voorkomen. In dit geval blijft de mogelijkheid dat in het sferoplastpreparaat zoveel DNA-ase activiteit aanwezig is, dat enkelstreng moleculen al diverse malen doorgeknipt zijn alvorens zij op de juiste plaats zijn om te kunnen recombineren.

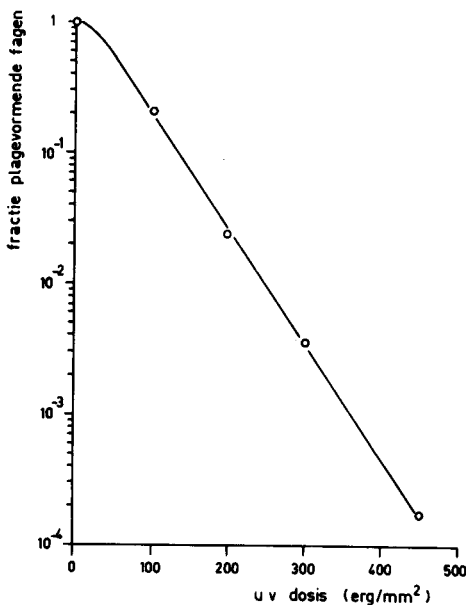
Het onderwerpen van gedenatureerd DNA aan renaturerende omstandigheden heeft geen enkele invloed op de biologische activiteit. Dit is in tegenstelling met de renaturatie van transformerend bacterie DNA, waar renaturatie juist een terugkeer van de biologische activiteit tot gevolg heeft. Voor deze discrepantie is op dit ogenblik moeilijk een verklaring te geven; mogelijk worden voor bacterietransformatie geheel andere eisen aan het DNA gesteld dan voor faagtransformatie.

HOOFDSTUK VIII

INVLOED VAN MUTAGENE AGENTIA OP DE BIOLOGISCHE ACTIVITEIT

1. Invloed van UV bestraling.

Het is een bekend verschijnsel dat bacteriën en virussen geïnactiveerd worden door UV bestraling. Daar het absorptiespectrum van nucleïnezuren voor het ultraviolette gebied ongeveer samenvalt met het actiespectrum van dit licht voor wat betreft de inactivering van micro-organismen, is het waarschijnlijk dat beschadiging van DNA (en/of RNA)



Figuur 23

Overlevingscurve van de bacteriofaag T4 van het standaardtype na UV bestraling.

de oorzaak is van deze inactivering. Men heeft ontdekt dat in een waterige oplossing van thymine in bevroren toestand onder invloed van UV bestraling thyminedimeren gevormd worden(86,87). Bestraling van DNA leidt ook tot de vorming van thyminedimeren in het DNA molecule(88). Dimerisatie van thymine is echter niet de enige verandering die door UV bestraling in DNA wordt geïnduceerd. Bekend zijn onder andere nog de dimerisatie van cytosine en hydrateringsreacties bij uracil en cytosine.

In dit hoofdstuk zullen enkele experimenten beschreven worden waarin de invloed van UV bestraling op de biologische activiteit van T4-DNA, zoals deze bepaald wordt in het faagtransformatie systeem, vergeleken werd met de invloed van UV bestraling op het plagevormend vermogen van de bacteriofaag T4. De UV bestraling werd uitgevoerd zoals is beschreven in Hoofdstuk II. Na bestraling van een suspensie van T4-faag met toenemende doses UV werd de titer van de bestraalde suspensie bepaald.

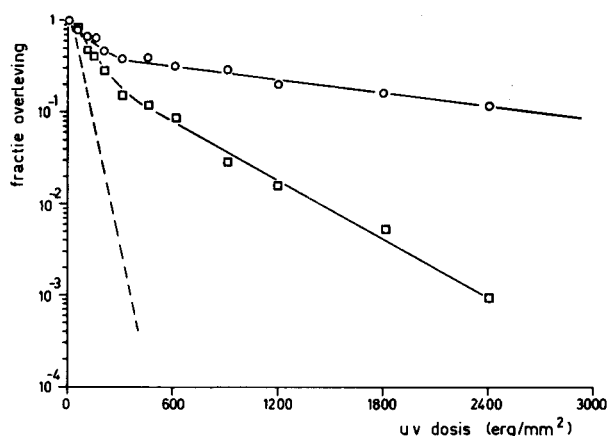
In figuur 23 is de relatie tussen de UV dosis en de overleving van T4-fagen weergegeven. De uit deze experimenten berekende dosis van bestraling waarbij 37% overleving wordt verkregen (de zogenaamde "mean lethal dose", MLD, de dosis waarbij de fagen gemiddeld één letale treffer hebben ontvangen) bedraagt 50 erg/mm^2 . Deze waarde is redelijk in overeenstemming met de door Cavilla en Johns(89) gepubliceerde waarde van $51,8 \text{ erg/mm}^2$. *

Vervolgens werd de invloed van UV bestraling op de biologische activiteit van T4-DNA bestudeerd. In figuur 24 is het resultaat weergegeven van een experiment, waarin de overleving van het r_{51}^+ - en het r_{1272}^+ -kenmerk bepaald werd als functie van de UV dosis die het DNA ontvangen heeft. Tevens is, ter vergelijking, de inactiveringscurve van de bacteriofaag T4 voor hetzelfde dosisgebied in deze figuur opgenomen.

De op DNA betrekking hebbende inactiveringscurven vertonen een samengestelde vorm. Bovendien blijkt dat de grootte van het kenmerk zich weerspiegelt in de gevoeligheid voor UV inactivering; het grotere r_{1272}^+ -kenmerk is gevoeliger voor UV bestraling dan het kleinere r_{51}^+ -kenmerk.

* De in de literatuur gepubliceerde waarden voor de MLD van T4 voor UV lopen nogal uiteen. Adams(90) geeft voor T2 een waarde van 50 erg/mm^2 op en aangezien T2 ongeveer tweemaal gevoeliger is voor UV dan T4 zou dit voor T4 een MLD van circa 100 erg/mm^2 opleveren. Andere gepubliceerde waarden zijn $28,3 \text{ erg}(91)$, $40 \text{ erg}(92,93)$ en $45 \text{ erg}(94)$. Deze verschillen kunnen waarschijnlijk toegeschreven worden aan het gebruik van verschillende stralingsbronnen.

De vorm van deze inactiveringscurven is waarschijnlijk als volgt te verklaren (95,96). Het verschijnen van de kenmerken r_{51}^+ en r_{1272}^+ in de nakomelingen is eigenlijk een vorm van "marker rescue". Met deze term wordt het verschijnsel aangeduid dat onder de fagen geproduceerd door bacteriën, die geïnfecteerd werden met een mengsel van fagen van twee genetisch verschillende typen, en waarbij het éne type geïnactiveerd is, terwijl het andere type actief is, faagdeeltjes voorkomen die de genetische kenmerken van het geïnactiveerde type vertonen. Ook bij de door ons uitgevoerde inactiveringsexperimenten worden kenmerken "gered" die zich op DNA moleculen bevinden die door UV bestraling beschadigd zijn. Zelfs faagtransformatie met niet-bestraald DNA is als een vorm van "marker rescue" te beschouwen, omdat geïsoleerd DNA alléén niet in staat is in een sferoplast nakomelingen te vormen, maar wel om één of meer van zijn kenmerken over te dragen aan het chromosoom van een π -deeltje.



Figuur 24

Invloed van UV bestraling op de biologische activiteit van DNA voor wat betreft de kenmerken r_{51}^+ en r_{1272}^+ . DNA werd bestraald in een concentratie van 5 $\mu\text{g/ml}$. ○—○ overleving van het r_{51}^+ -kenmerk; □—□ overleving van het r_{1272}^+ -kenmerk; - - - overleving van het plaquevormend vermogen van T4-fagen.

Als de veronderstelling, dat "marker rescue" tot stand komt door genetische recombinatie, juist is, dan geschiedt waarschijnlijk ook de faagtransformatie door middel van recombinatie.

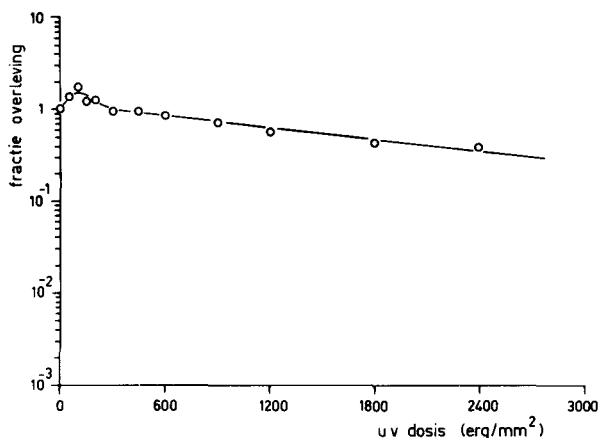
Als een DNA oplossing bestraald wordt, zullen de letale treffers (Eng.: hits) over willekeurige plaatsen van het DNA molecule verdeeld zijn. Treffers in het kenmerk zullen leiden tot een directe inactivering van dit kenmerk zelf; treffers in de nabijheid van dit kenmerk kunnen een indirecte inactivering veroorzaken indien namelijk de recombinitie met het chromosoom van de niet-bestraalde rII-mutant hierdoor verhinderd wordt. Ook wanneer buiten het kenmerk, doch in het voor recombinitie gebruikte stuk van het DNA molecule, letale treffers voorkomen zal inactivering het gevolg zijn. De kans op een letale treffer in een gebied van een DNA molecule neemt toe met de lengte ervan; derhalve zal de kans op indirecte inactivering van het kenmerk groter zijn naarmate bij de recombinitie een groter stuk DNA wordt opgenomen. De kans dat bij de recombinitie een lang stuk wordt opgenomen is groter dan de kans voor een kort stuk. Met andere woorden, in de meeste gevallen is het doelwit (Eng.: target) voor de treffers groot. In de minderheid van de gevallen zal bij recombinitie een klein stuk van het DNA molecule worden opgenomen, waarvoor de trefkans klein is. We mogen voor de inactiveringscurve dus het volgende verloop verwachten: aanvankelijk een snelle inactivering van een aanzienlijke fractie (de frequent voorkomende recombinities, waarbij lange stukken, die een groter doelwit vormen, betrokken zijn), vervolgens een geleidelijk minder steil worden (de recombinities waarbij steeds kleiner doelwit vormende stukken betrokken zijn) en tenslotte (misschien) een rechtlijnig stuk met een flauwe helling waarin de inactivering wordt weergegeven van recombinities waarbij een stuk DNA betrokken is met een lengte gelijk aan of slechts weinig langer dan die van het kenmerk. Indien deze verklaring juist is, weerspiegelt het laatste deel van de inactiveringscurve de gevoeligheid voor UV bestraling van dat gedeelte van het DNA dat het kenmerk omvat en is de helling hiervan een maat voor de grootte van het kenmerk.

Het verband tussen de mate van inactivering en de grootte van het kenmerk is evenwel niet zo eenvoudig; uit figuur 24 kan men afleiden dat het r_{1272}^{+} -kenmerk ongeveer viermaal gevoeliger is voor UV bestraling dan het r_{51}^{+} -kenmerk. De verhouding van de grootte van deze beide kenmerken is onbekend, maar bedraagt naar schatting 10 à 100. In enkele experimenten waarin de inactivering van het r_{H88}^{+} -kenmerk werd nagegaan, bleek dat de gevoeligheid van dit kenmerk de helft bedroeg van die van het r_{1272}^{+} -kenmerk. Deze waarde is wel redelijk in overeenstemming met de verhouding van de grootten.

De hier geschetste verklaring van de inactiveringscurven is gebaseerd op "marker rescue" experimenten met bacteriofagen(95,96). Ook

daarbij verkreeg men samengestelde curven als de UV inactivering van één bepaald kenmerk bestudeerd werd.

In bovengenoemde verklaring ligt min of meer de voorspelling besloten dat UV inactivering van sterk gebroken moleculen een curve zou moeten geven waarin het eerste steile gedeelte afwezig is, omdat de transformanten uitsluitend door middel van recombinatie met kleine brokstukken kunnen ontstaan. In figuur 25 is een dergelijk experiment weergegeven, waarbij alleen naar de inactivering van het r_{51}^{+} -kenmerk is gekeken. Het verloop van het eerste gedeelte van de curve wijst er op dat, als een gevolg van het breken van de DNA moleculen, een geringe stimulering van de biologische activiteit wordt waargenomen bij



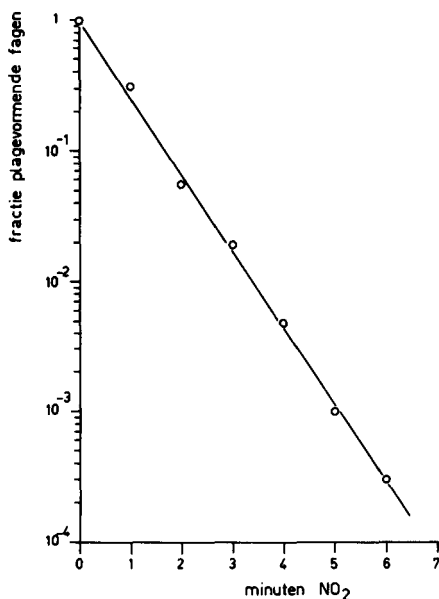
Figuur 25

De invloed van UV bestraling op de biologische activiteit van gebroken DNA moleculen voor wat betreft het r_{51}^{+} -kenmerk. Het DNA werd bestraald in een oplossing met een concentratie van 5 $\mu\text{g/ml}$. $\circ$ — $\circ$ overleving van het r_{51}^{+} -kenmerk.

lage bestralingsdoses, in plaats van een snelle inactivering. Deze stimulering is echter zo gering dat op eventuele verklaringen van dit effect hier niet nader ingegaan zal worden. De helling van het tweede gedeelte van de curve is dezelfde als bij gebruik van niet-gebroken moleculen.

2. Invloed van salpeterigzuur op de biologische activiteit.

Natriumnitriet is bij lage pH (4-4,5) een sterk mutageen agens. Als men populaties van rII-mutanten van de bacteriofaag T2 inactieveert met salpeterigzuur tot een overleving van 10^{-4} , dan is het percentage rII⁺-fagen in de overlevenden ongeveer 100 maal zo groot als in de



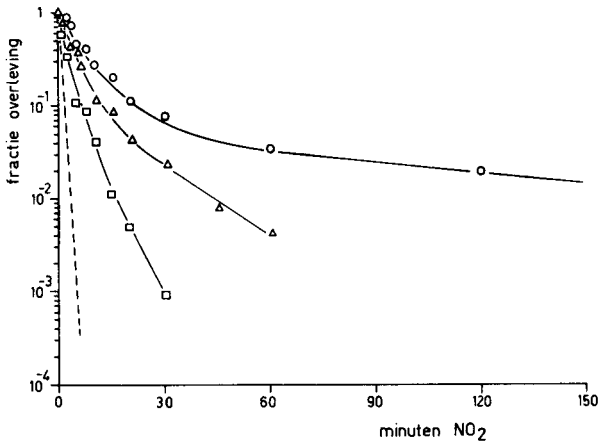
Figuur 26

Inactivering van de bacteriofaag T4 van het standaardtype door salpeterigzuur. Een suspensie van T4-faag met een titer van 5×10^{10} /ml in 0,1 M acetaat buffer van pH 4,2 werd geïncubeerd met 0,1 M NaNO₂ bij 37°. Op de aangegeven tijden werden monsters genomen en direct vijfmaal verdund met 0,5 M TRIS buffer van pH 8,0; vervolgens werd de overleving bepaald.

oorspronkelijke populatie(97). De mutagene werking is toe te schrijven aan chemische reacties van salpeterigzuur met DNA. Men heeft kunnen vaststellen dat deze reacties leiden tot deaminering van de basen.

Na deaminering van adenine ontstaat hypoxanthine, dat bij replicatie van dit DNA zal paren met cytosine; bij een volgende DNA replicatie zal cytosine paren met guanine, waardoor het oorspronkelijke

adenine-thymine paar vervangen is door een guanine-cytosine paar. Op analoge wijze zal na deaminering van cytosine uracil ontstaan, dat bij DNA replicatie zal paren met adenine; bij een daaropvolgende replicatie zal adenine paren met thymine waardoor het oorspronkelijke guanine-cytosine paar vervangen is door een adenine-thymine paar. Deaminering van guanine heeft waarschijnlijk geen gevolgen, omdat het ontstane xanthine ook met cytosine zal paren. Of bovengenoemde reacties muta-



Figuur 27

Invloed van behandeling met salpeterigzuur op de biologische activiteit van DNA voor wat betreft de kenmerken r_{51}^+ , r_{H88}^+ en r_{1272}^+ . DNA werd behandeld met NaNO_2 zoals beschreven in Hoofdstuk II, 10. ○—○ inactivering van het r_{51}^+ -kenmerk; Δ—Δ inactivering van het r_{H88}^+ -kenmerk; □—□ inactivering van het r_{1272}^+ -kenmerk; - - - inactiveringscurve van T4 overgenomen van figuur 26.

ties dan wel letaliteit tengevolge zullen hebben is afhankelijk van de plaats in het chromosoom waar de veranderde base zich bevindt en de omstandigheden waaronder het organisme groeit. Een andere reactie van salpeterigzuur met DNA die waarschijnlijk wel letaliteit tengevolge zal hebben is de vorming van covalente bindingen tussen de beide polynucleotide strengen (zogenaamde "cross-links") (98). De invloed van salpeterigzuur op de biologische activiteit van faag DNA werd bestudeerd om na te gaan of die vergelijkbaar was met de invloed van UV bestraling.

Behandeling van de bacteriofaag T4 en T4-DNA met salpeterigzuur werd uitgevoerd zoals beschreven in Hoofdstuk II. In figuur 26 is een representatief experiment weergegeven van de inactivering van de bacteriofaag T4 door salpeterigzuur. De overlevingscurve verloopt exponentieel; in enkele experimenten echter vertoonde de curve een verloop als gevonden bij inactivering met UV (zie figuur 23).

Uit figuur 27 blijkt de invloed van salpeterigzuur op de biologische activiteit van DNA. Bij dit experiment werd de inactivering bestudeerd van de kenmerken r_{51}^+ , r_{H88}^+ en r_{1272}^+ . Evenals bij UV bestraling hebben ook deze inactiveringscurven een samengestelde vorm. Bovendien bestaat er ook nu een verband tussen de grootte van het kenmerk en zijn gevoeligheid voor salpeterigzuur: r_{1272}^+ is groter dan r_{H88}^+ en dit is groter dan r_{51}^+ ; in deze volgorde neemt de gevoeligheid af.

3. Bespreking van de resultaten.

In onze denkbeelden over de faagtransformatie hebben we in het voorafgaande steeds aangenomen dat een transformant gevormd wordt door middel van genetische recombinatie tussen het chromosoom van het π -deeltje en het toegevoegde DNA. De in dit hoofdstuk beschreven experimenten ondersteunen deze zienswijze.

Algemeen aanvaardt men dat "marker rescue" van geïnactiveerde faag berust op genetische recombinatie. Het vergelijkbare gedrag van de overleving na UV bestraling van kenmerken van geïnactiveerde fagen in een "marker rescue" experiment en de overleving van een kenmerk in geïsoleerd DNA bij faagtransformatie is een aanwijzing dat ook daarbij genetische recombinatie optreedt. De vorm van de inactiveringscurven kan verklaard worden door aan te nemen dat treffers in het DNA de kans op recombinatie zullen verkleinen. Ook de overleving van bepaalde kenmerken van transformerend bacterie DNA na UV bestraling vertoont een dergelijk beeld, hetgeen eveneens op de bovengenoemde wijze verklaard wordt.

We dienen er echter rekening mee te houden dat er waarschijnlijk nog meer factoren zijn die de vorm bepalen van de inactiveringscurven van transformerend faag DNA. Zo zou men het eerste (steile) gedeelte van de curve kunnen verklaren uit de afname van de kloongrootte van de r_{II}^+ -fagen in de worp van een sferoplast. In de beschreven experimenten werd steeds het aantal transformanten bepaald na enkele uren incuberen bij 37° , dus nadat de sferoplasten gelyseerd zijn en hun fagen

in het medium zijn vrijgekomen. Het is niet bekend hoeveel transformanten er per worp aanwezig zijn, en of dit aantal verandert als getransformeerd wordt met bestraald of anderszins behandeld DNA.

Een aanwijzing omtrent de kloongrootte van de gevormde faagtransformanten kan misschien verkregen worden uit de door andere auteurs gepubliceerde resultaten met "marker rescue" experimenten. Hierbij worden steeds geïnfecteerde cellen uitgezaaid (infectieve centra), die een plaque zullen vormen, onafhankelijk of er één of verscheidene kopieën van het "geredde" kenmerk aanwezig zijn. Door Doermann(95) werd aangetoond, dat het aantal kopieën van het "geredde" kenmerk, dat in een worp aanwezig was, snel verminderde met toenemende UV dosis, totdat een constante waarde bereikt werd van circa 1,5 kopie per worp. Uit "marker rescue" experimenten zijn aanwijzingen verkregen dat bestraalde faaggenomen niet vermeerderd worden in de gastheer(99). Als we aannemen dat ook het aan de sferoplasten toegevoegde DNA zich niet autonoom vermeerdert na penetratie, dan mogen we niet verwachten dat de gemiddelde kloongrootte van getransformeerde fagen in een worp veel groter zal zijn dan 1 à 2. Dit zou dus betekenen dat de vorm van de inactiveringscurve niet verklaard kan worden uit de afname van de kloongrootte van de transformant. Deze conclusie is echter zeer voorlopig en zal door experimenten geverifiëerd moeten worden. Zoals echter in Hoofdstuk IV reeds is uiteengezet, zijn de uitkomsten van de bepalingen van de worpgrootte van de transformanten nog te onbetrouwbaar om er verantwoorde conclusies uit te trekken.

HOOFDSTUK IX

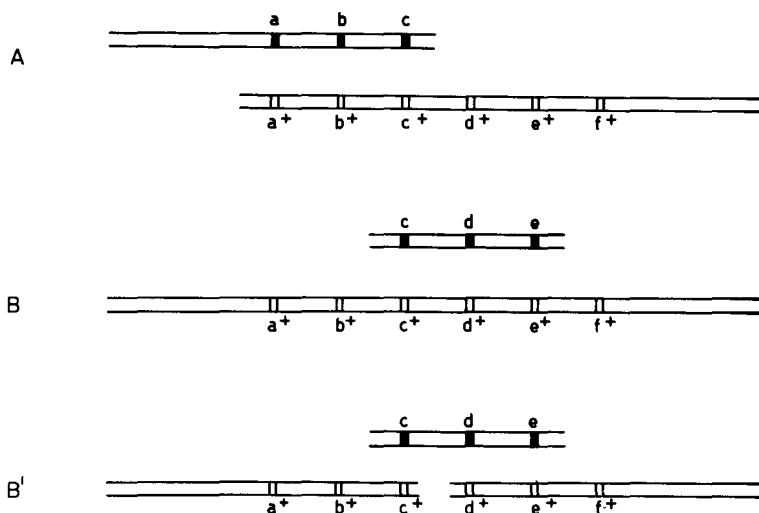
NABESCHOUWING

Met het in dit proefschrift beschreven faagtransformatie systeem hebben we bereikt dat in sferoplasten van *E.coli* B de bacteriofaag T4 getransformeerd kan worden met behulp van geïsoleerd DNA.

In Hoofdstuk VIII werd er op gewezen dat het faagtransformatie systeem te beschouwen is als een vorm van "marker rescue". Het mechanisme van "marker rescue" berust op genetische recombinatie en hiermede geraken we aan die eigenschap van DNA waarvan nog het minste bekend is. Het probleem van de genetische recombinatie bij de T-even bacteriofagen is zowel fysisch-chemisch(92-94, 81) als genetisch(95) bestudeerd. Voor het fysisch-chemisch onderzoek werd gebruik gemaakt van twee fagen waarvan de ene gemerkt was met radioactief fosfor en de andere met 5-broomuracil(5BU). De incorporatie in DNA van de base 5BU verleent aan het DNA een hoger soortelijk gewicht zodat deze moleculen in een dichtheidsgradiënt te onderscheiden zijn van normale DNA moleculen. Na infectie van bacteriën met deze twee fagen onder omstandigheden waarin geen meetbare DNA-synthese optrad werd uit deze geïnfecteerde cellen het DNA geïsoleerd en de associatie van de met ^{32}P - en 5BU-gemerkte moleculen onderzocht. Het bleek dat kort na de infectie de ^{32}P - en 5BU-bevattende moleculen aan elkaar gekoppeld waren door middel van waterstofbindingen. Aan het einde van de latente periode waren de twee verschillend gemerkte moleculen met elkaar gekoppeld door middel van covalente bindingen. De auteurs stellen het volgende model voor: genetische recombinatie tussen twee dubbelstreng DNA moleculen verloopt in twee stappen: eerst samenvoeging van gedeelten van twee ouderlijke DNA moleculen tot een zogenaamd "joint" molecule. Een "joint" molecule bestaat uit één enkele lineaire structuur, doordat elkaar overlappende homologe uiteinden van de ouderlijke componenten met elkaar verbonden zijn door middel van waterstofbindingen. De auteurs zijn van mening dat breuken eerst dan ontstaan nadat er paring is opgetreden tussen twee homologe gebieden van twee intacte moleculen: met andere woorden, door deze paring worden breuken geïnduceerd. Enige

tijd later in de latente periode worden door bepaalde reacties de beide ouderlijke componenten covalent met elkaar verbonden.

Op grond van genetische experimenten komt men tot dezelfde conclusies. Hier heeft het onderzoek zich gericht op de structuur van de partiële heterozygoot omdat men aanneemt dat deze heterozygoot een tussenstadium is in het recombinatie proces. De resultaten van het onderzoek van de segregatieprodukten van een partiële heterozygoot hebben geleid tot de veronderstelling dat de partiële heterozygotie berust op de aanwezigheid van een overlappend diploïd segment in het genetische materiaal. In figuur 28 zijn enkele mogelijkheden getekend zoals deze voorgesteld zijn door Doermann(95).



Figuur 28

Schematische voorstelling van de structuur van enkele partiële heterozygoten. a t/m f zijn r-kenmerken; a⁺ t/m f⁺ zijn hun r⁺-allelen.

In model A heeft het diploïde segment één eindpunt in een genetisch gemarkeerd gedeelte van het genoom; dat wil zeggen in dat gedeelte waar r-kenmerken aanwezig zijn (alle r-kenmerken in een nakomeling kunnen geïdentificeerd worden in tegenstelling tot de r⁺-kenmerken). In model B liggen twee eindpunten van het diploïde segment in het genetisch gemarkeerde gebied. Om de segregatieprodukten van model B te kunnen verklaren stelt Doermann model B' voor, waarin een stukje DNA van de ene ouder gebruikt is om een discontinuïteit in het genoom van

de andere ouder te overlappen. De modellen B en B' zijn voor ons werk interessant, omdat hiermede een mechanisme aangegeven wordt waarmede de biologische activiteit van DNA brokstukken tot uiting kan komen. In Hoofdstuk VI is beschreven dat DNA fragmenten biologisch actief zijn. Volgens Doermann is de gemiddelde lengte van een diploïd segment bij een normale kruising ongeveer 1.500 nucleotiden lang, dat wil zeggen de lengte van een brokstuk met een molecuulgewicht van circa 1×10^6 . Hoewel dit zeer speculatief is zouden we ons voor kunnen stellen, dat nog kleinere brokstukken niet biologisch actief zijn, omdat ze vanwege hun geringe afmetingen geen stabiel diploïd segment kunnen vormen. We zouden ons kunnen voorstellen dat voor het tot uiting komen van de biologische activiteit van grotere brokstukken de vorming van een diploïd segment met het DNA molecule van het π -deeltje een tussenstadium is. Hoe uit een dergelijke structuur recombinanten (of in ons geval transformanten) ontstaan is het centrale probleem in het mechanisme van de genetische recombinatie. Verschillende onderzoekers zijn de mening toegedaan dat bij dit proces enzymen een rol spelen en dat dit dezelfde enzymen zijn die ook bij herstel processen van beschadigd DNA betrokken zijn (104-108). Hopelijk is het hier beschreven faagtransformatie systeem zodanig te verbeteren en uit te breiden dat het ook zal kunnen bijdragen tot het ophelderen van de bovengenoemde problemen.

In Hoofdstuk V werd ook het ontstaan van cotransformanten beschreven en het verschijnsel dat door het breken van DNA moleculen de genetische koppeling tussen de kenmerken te niet gedaan wordt. Dit is door Goldberg (109) toegepast om een vergelijking te kunnen maken tussen de genetische afstand en de fysische afstand (interval) die er is tussen de kenmerken. Goldberg maakte hiervoor gebruik van twee kenmerken die in het rII-gen liggen (r_{77} en r_{73}) en van het kenmerk ac_{41} , dat grenst aan het rII-gen. De volgorde van deze kenmerken is: r_{77} - r_{73} - ac_{41} . Transformatie van bijvoorbeeld de mutant $r_{73}ac^+$ met r_{73}^+ac -DNA levert een aantal rII⁺-fagen waarvan een bepaald percentage (ongeveer 50%) tevens het ac-kenmerk bevat (cotransformanten). In zijn experimenten gebruikt Goldberg DNA moleculen die gedenateerd zijn en vervolgens gedurende kortere of langere tijd met DNA-ase zijn afgebroken; het gevolg is dat het totaal aantal transformanten niet of nauwelijks vermindert maar het percentage cotransformanten neemt exponentieel af. Uit de helling van de curve die het verband weergeeft tussen het aantal breuken per DNA molecule en het percentage cotransformanten kon Goldberg berekenen dat het interval tussen r_{73} en ac_{41} ongeveer 0,5% van de totale lengte van het chromosoom bedroeg. Werde dezelfde proef

uitgevoerd met DNA moleculen die gedenateerd waren en vervolgens mechanisch gebroken werden (homogenisator) dan bleek de helling van de verkregen curve overeen te stemmen met een interval van 1,5% tussen de kenmerken r_{73} en ac_{41} .

Tevens kon Goldberg aantonen dat de som van de intervallen $r_{77} - r_{73}$ en $r_{73} - ac_{41}$ gelijk is aan het totale interval $r_{77} - ac_{41}$. Deze experimenten zullen uitgebreid worden met andere kenmerken die verspreid liggen over het chromosoom, om zodoende een chromosoomkaart van T4 te maken die gebaseerd is op fysische afstanden.

SAMENVATTING

Bij de aanvang van het hier beschreven onderzoek was reeds vrij veel bekend over de bacteriofaag T4, zowel wat zijn genetische eigenschappen betreft, als wat betreft de fysisch-chemische eigenschappen van het DNA van dit organisme. Men was er echter nog niet in geslaagd biologische activiteit aan te tonen van geïsoleerd T4-DNA. In verband met nadere onderzoekingen was het wenselijk dat een verband gelegd kon worden tussen de fysische en chemische eigenschappen van geïsoleerd T4-DNA enerzijds en de biologische activiteit ervan anderzijds. Derhalve werd een onderzoek opgezet dat tot doel had een methode te ontwikkelen waarmee de biologische activiteit van geïsoleerd T4-DNA bepaald kon worden. De resultaten hiervan zijn in dit proefschrift beschreven. Bij dit onderzoek, waarvan de grondslag werd gelegd door J.H. van de Pol, G. Veldhuisen en J.A. Cohen, werd als criterium voor biologische activiteit van T4-DNA gebruikt het vermogen om aanleiding te geven tot faag transformatie; dat wil zeggen dat bij infectie van een gastheer door een gemuteerde faag, die een bepaald kenmerk mist, tesamen met geïsoleerd DNA van de standaard faag, die dit kenmerk wel bezit, er nakomelingen ontstaan met de eigenschappen van het standaardtype. Voor de uitvoering van deze transformatie bleek het nodig de celwand van de gastheer te verwijderen; dit geschiedde door bacteriën met behulp van de penicilline methode om te zetten in sferoplasten. De te transformeren faagmutant werd door een behandeling met ureum omgezet in een sferoplast-infecterende structuur, het zogenaamde π -deeltje. Enkele uren incuberen van sferoplasten met π -deeltjes en met DNA geïsoleerd uit het standaardtype had tot gevolg dat een gedeelte van de nakomelingen, die bij dit proces gevormd worden één of meer kenmerken bevatten die in het geïsoleerde DNA aanwezig waren, dus getransformeerd waren.

Het bleek mogelijk het faagtransformatie systeem te verbeteren door veranderingen aan te brengen in de bereidingswijze van π -deeltjes en sferoplasten. Hierbij werd tenslotte een testsysteem verkregen dat er in zijn standaarduitvoering als volgt uitziet:

Aan 0,5 ml van een sferoplastsuspensie van E.coli B98 - een variant die ongeveer 3-5 maal meer transformanten oplevert dan de oorspronke-

lijke E.coli B- (8×10^7 sferoplasten/ml) wordt 0,1 ml van een π -deeltjes preparaat van T4r₅₁ (2×10^{10} faagequivalenten/ml) toegevoegd. Na 10-15 min. incuberen bij 37° wordt 0,5 ml T4rII⁺-DNA (5 μ g/ml) toegevoegd en na 2-3 uur incuberen bij 37° worden de ontstane fagen in de voor de titratie benodigde verdunningen uitgezaaid op verschillende gastheren, waarop de r₅₁- en r₅₁⁺-nakomelingen onderscheiden kunnen worden. In een representatief experiment werd gevonden dat van de circa 2×10^9 r₅₁-nakomelingen er circa 2×10^5 getransformeerd waren tot T4rII⁺. De efficiëntie, dat wil zeggen het aantal transformanten per toegevoegd DNA molecule, bedraagt $6 \times 10^{-5}/W$, waarbij W de (onbekende) worpgrootte van de transformant voorstelt.

Aan de hand van een aantal experimenten waarin de invloed werd nagegaan van de omstandigheden waaronder de faagtransformatie werd uitgevoerd, benevens van de gebruikte concentraties aan π -deeltjes en sferoplasten, werd vastgesteld dat bovenstaande condities optimaal waren voor het transformatie proces.

De opbrengst aan transformanten is evenredig met de DNA concentratie tot een waarde van ongeveer 10-20 μ g/ml; boven deze concentratie wordt een verzadigingsniveau bereikt.

De produktie van fagen na het mengen van π -deeltjes en sferoplasten is in veel opzichten te vergelijken met het vermeerderingsproces van intacte faag in normale bacteriën (een latente periode van 15-20 min. en een worpgrootte van gemiddeld 240 per sferoplast). Het adsorptie proces verloopt echter anders. De adsorptie van intacte fagen aan bacteriën is een proces van korte duur (na 5 min. is 95-99% van de fagen geadsorbeerd), terwijl de adsorptie van π -deeltjes aan sferoplasten een proces is dat langzaam verloopt (60 min. na het toevoegen van π -deeltjes aan sferoplasten vinden waarschijnlijk nog evenveel infecties plaats als in het begin); het lijkt echter twijfelachtig of hier nog van een adsorptie proces gesproken kan worden.

Omdat het transformatie proces weinig efficiënt is, moest het onderzoek beperkt blijven tot de overdracht van genetische eigenschappen, die een lage terugmutatiefrequentie bezitten en bovendien de mogelijkheid bieden de gevormde transformanten te selecteren uit een grote overmaat niet-getransformeerde nakomelingen.

Als zodanig kwamen in aanmerking rII-mutanten en amber-mutanten. Door transformerend DNA te gebruiken dat een kenmerk bevatte dat de plagemorfologie bepaalt (DNA geïsoleerd uit een rI-mutant) was het mogelijk de gelijktijdige overdracht van twee kenmerken te bestuderen. Hierbij kon onderscheid gemaakt worden tussen dubbeltransformanten (transformanten waarbij de twee kenmerken van verschillende DNA mole-

culen afkomstig zijn) en cotransformanten (transformanten waarbij de twee kenmerken in één DNA molecule aanwezig waren en samen worden overgedragen).

Nadat aldus een systeem ontwikkeld was waarin de biologische activiteit van geïsoleerd T4-DNA bepaald kon worden, werd de invloed op de biologische activiteit nagegaan van het aanbrengen van veranderingen in enkele fysische en chemische eigenschappen van het faag DNA.

De biologische activiteit veranderde niet als de DNA moleculen gebroken werden tot brokstukken van ongeveer 10% van hun oorspronkelijke grootte. De biologische activiteit van nog kleinere brokstukken was sterk verlaagd; brokstukken van ongeveer 1% van hun oorspronkelijke grootte bezaten slechts een zeer geringe biologische activiteit. Tevens kon worden aangetoond dat het breken leidde tot de ontkoppeling van de genetische kenmerken.

Denaturatie door middel van verhitting leidde tot een inactivering van de biologische activiteit tot ongeveer 5 à 10% van de oorspronkelijke waarde. Het verhitten leidde ook tot het ontkoppelen van kenmerken.

Renaturatie van gedenatureerd DNA leidde niet tot een herstel van de biologische activiteit in tegenstelling tot de resultaten verkregen met bacterie-transformerend DNA.

Bestraling met ultraviolet licht en behandelen met salpeterigzuur deden de biologische activiteit afnemen. In beide gevallen werd een dosis-effect curve verkregen die zeer steil begon, doch bij hogere doses een vlakker verloop kreeg; hierbij bleek er een relatie te bestaan tussen de helling van het tweede gedeelte van de curve en de grootte van het overgedragen kenmerk. De vorm van deze inactiveringscurven kon worden verklaard door aan te nemen dat faagtransformatie een vorm is van "marker rescue", een proces dat berust op genetische recombinatie. Ook de resultaten van de andere bovengenoemde experimenten kunnen verklaard worden door aan te nemen dat faagtransformatie een vorm is van "marker rescue", dat wil zeggen dat er genetische recombinatie plaats vindt tussen het genoom van het π -deeltje en de toegevoegde gebroken of niet-gebroken DNA moleculen.

SUMMARY

The study of the bacteriophage T4 has greatly contributed to our knowledge of the physico-chemical and genetical properties of the DNA of this organism. However, no method was available to show the biological activity of the isolated DNA of this phage. It seemed desirable to try to correlate the physico-chemical properties of this DNA with its biological activity. To this purpose a study was initiated in order to develop a method to test the biological activity of isolated T4-DNA; the results of this study are described in this thesis.

The work of VAN DE POL, VELDHUISEN and COHEN (22) led to a test system in which phage transformation was applied as a test for the biological activity of T4-DNA. This involved infection of a host with a mutant phage, missing a particular character, along with DNA isolated from a wild type phage possessing this character resulting in the appearance of progeny phages with wild type characters. To this end it was necessary to remove the cell wall of the bacteria; this was done by converting the cells into spheroplasts by means of the penicillin method. The phage mutant to be transformed was converted, by treatment with urea, into a form that is able to infect spheroplasts (the so-called π -particles).

A fraction of the progeny produced after 2 to 3 hours incubation of spheroplasts with π -particles and wild type DNA was composed of transformed (wild type) phages, i.e. the particles possessed one or more markers originally present in the isolated DNA.

Improvements in this system were obtained by introducing modifications in the preparation of π -particles and spheroplasts. Eventually the following system was adopted:

E.coli B98, a variant that produced about 3-5 times more transformants than the original E.coli B, was used as a host. To 0.5 ml of a suspension of spheroplasts of E.coli B98 (containing about 8×10^7 spheroplasts/ml) was added 0.1 ml of a suspension of π -particles of the rII-mutant r_{51} (containing 2×10^{10} phage aequivalents/ml). After incubation for 10 - 15 min. at 37° , 0.5 ml T4rII⁺-DNA ($5 \mu\text{g/ml}$) was added and the mixture was incubated at 37° during 2 - 3 hours; this resulted in the

production of about 2×10^9 rII-mutants per ml and about 2×10^5 rII⁺-phages (transformants) per ml. The efficiency (the number of transformants per DNA molecule) was $6 \times 10^{-5}/W$, in which W represents the mean burst size of the transformants.

In a number of experiments it was shown that the conditions that prevailed in the test system and the concentrations of π -particles and spheroplasts were optimal for the phage transformation process.

The yield of the transformants is linear with the DNA concentration up to 10 - 20 $\mu\text{g/ml}$. At higher concentrations a saturation level is attained.

In many aspects the production of phages initiated by mixing π -particles with spheroplasts can be compared with the phage formation observed with intact phages and bacteria (a latent period of about 15 - 20 min. and a burst size on the average of 240). The adsorption of π -particles on spheroplasts is slow compared with the adsorption of phages on bacteria. (60 min. after the addition of π -particles to spheroplasts as many infections will take place as shortly after the addition.)

The low efficiency of the transformation experiments restricted the study to the transfer of genetic markers with low reversion frequencies and to those cases in which the transformants could be selected from a great excess of progeny. rII-mutants and amber mutants proved satisfactory. By providing the transforming DNA with a marker affecting the plaque morphology (DNA isolated from an rI-mutant) it was possible to study the simultaneous transfer of two markers. In this case we had to distinguish between double transformants (transformants, resulting from the independent transfer of two markers from two different DNA molecules) and cotransformants (transformants resulting from the simultaneous transfer of two markers from one DNA molecule).

After developing the above-mentioned system, a study of the influence of some physico-chemical treatments on the biological properties of phage DNA was made; this is described in the last three chapters.

The biological activity was not influenced by shearing the molecules to fragments of about 10% of the original length. Smaller fragments of about 1% of the original length showed a much reduced biological activity, if any. It was shown that shearing uncoupled the linkage between markers.

Heat-denaturation resulted in a decrease of the biological activity to 5 to 10% of the unheated samples. This kind of denaturation also caused the uncoupling of linked markers.

Renaturation did not result in an increase of the biological activity, in contrast with transforming bacterial DNA.

The biological activity of isolated T4-DNA was inactivated by UV irradiation and by nitrous acid treatment. The inactivation curves were compound; there was a relation between the slope of the second part of the curve and the length of the transferred marker. The shape of the inactivation curves could be explained by assuming phage transformation as a special form of "marker rescue", a process based on genetic recombination. Moreover the results of other above-mentioned experiments can be explained by assuming phage transformation as a special form of "marker rescue", i.e. genetic recombination between the genome of the π -particle and the intact or broken DNA molecules added.

LITERATUURVERWIJZINGEN

- 1 O.T. Avery, C.M. Macleod en M. McCarty, J. Exp. Med. 79, 137 (1944)
- 2 A.D. Hershey en M.C. Chase, J. Gen. Physiol. 36, 39 (1952)
- 3 G.A. van Arkel, J.H. van de Pol en J.A. Cohen, Arch. intern. physiol. et biochem. 68, 702 (1960)
- 4 G.A. van Arkel, J.H. van de Pol en J.A. Cohen, Virology 13, 547 (1961)
- 5 J. Spizizen, Proc. Nat. Acad. Sci. US 43, 694 (1957)
- 6 D. Fraser, H.R. Mahler, A.L. Shug, C.A. Thomas Jr., Proc. Nat. Acad. Sci. US 43, 939 (1957)
- 7 G.A. van Arkel en J.H. van de Pol, MBL rapport 1960/8
- 8 H.R. Mahler en D. Fraser, Virology 8, 401 (1959)
- 9 Uit een brief van Avery aan zijn broer, geciteerd door C. Bresch in: "Klassische und molekulare Genetik", blz. 130, (Springer Verlag)
- 10 J.D. Watson en F.H.C. Crick, Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 18, 123 (1953)
- 11 P. Doty, J. Cell Comp. Physiol. 49, suppl. 1, 27 (1957)
- 12 J.E. Hearst en W.H. Stockmayer, J. Chem. Phys. 37, 1425 (1962)
- 13 M. Meselson en F.W. Stahl, Proc. Nat. Acad. Sci. US 47, 857 (1958)
- 14 G.D. Guthrie en R.L. Sinsheimer, J. Mol. Biol. 2, 297 (1960)
- 15 P.H. Hofschneider, Z. Naturforsch. 156, 441 (1960)
- 16 M. Sekiguchi, A. Taketo en Y. Takagi, Biochim. Biophys. Acta 45, 199 (1960)
- 17 R. Wahl, J. Huppert en L. Emerique-Blum, Compt. rend. 250, 4227 (1960)
- 18 R.L. Sinsheimer, B. Starman, C. Nagler en S. Guthrie, J. Mol. Biol. 4, 142 (1962)
- 19 F. Meyer, R.P. Mackal, M. Tao en E.A. Evans Jr., J. Biol. Chem. 236, 1141 (1961)
- 20 E. Brody, L. Coleman, R.P. Mackal, B. Werninghaus en E.A. Evans Jr., J. Biol. Chem. 239, 285 (1964)
- 21 E. Brody, R.P. Mackal en E.A. Evans Jr., Federation Proc. 23, 318 (1964)
- 22 J.H. van de Pol, G. Veldhuisen en J.A. Cohen, Biochim. Biophys. Acta 48, 417 (1961)

- 23 G. Veldhuisen, H.S. Jansz, J.B.T. Aten, P.H. Pouwels, R.A. Oosterbaan en J.A. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* 61, 630 (1962)
- 24 W. Harm en C.S. Rupert, *Z. Vererbungsl.* 94, 336 (1963)
- 25 S.H. Goodgal, *Federation Proc.* 23, 318 (1964)
- 26 W.R. Romig, *Virology* 16, 452 (1962)
- 27 J. Földes en T.A. Trautner, *Z. Vererbungsl.* 95, 57 (1964)
- 28 D.M. Green, *J. Mol. Biol.* 10, 438 (1964)
- 29 B.E. Reilly en J. Spizizen, *J. Bacteriol.* 89, 782 (1964)
- 30 J.J. Pène en J. Marmur, *Federation Proc.* 23, 318 (1964)
- 31 A.D. Kaiser en D.S. Hogness, *J. Mol. Biol.* 2, 392 (1960)
- 32 A.D. Kaiser, *J. Mol. Biol.* 4, 275 (1962)
- 33 C.M. Radding en A.D. Kaiser, *J. Mol. Biol.* 7, 225 (1963)
- 34 D.S. Hogness en J.R. Simmons, *J. Mol. Biol.* 9, 411 (1964)
- 35 H.B. Strack en A.D. Kaiser, *J. Mol. Biol.* 12, 36 (1965)
- 36 R.P. Mackal, B. Werninghaus en E.A. Evans Jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 51, 1172 (1964)
- 37 A. Boivin, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* 12, 7 (1947)
- 38 J. Sinai en J. Yudkin, *J. gen. Microbiol.* 20, 400 (1959)
- 39 A. Wacker en L. Laschet, *Arzneimittel-Forsch.* 10, 488 (1960)
- 40 M. Taylor en C. Yanofsky, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 17, 798 (1965)
- 41 R. Repaske, *Biochim. Biophys. Acta* 22, 189 (1956)
- 42 R. Repaske, *Biochim. Biophys. Acta* 30, 225 (1958)
- 43 H.R. Mahler, D. Fraser, *Biochim. Biophys. Acta* 22, 197 (1956)
- 44 D. Fraser en H.R. Mahler, *Arch. Biochem. Biophys.* 69, 166 (1957)
- 45 J. Lederberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 42, 574 (1956)
- 46 J. Lederberg en J.St.Clair, *J. Bacteriol.* 75, 143 (1958)
- 47 G. Dénes en L. Polgár, *Nature* 183, 696 (1959)
- 48 S. Brenner, F.A. Dark, P. Gerhardt, M.H. Jeynes, O. Kandler, E. Kellenberger, E. Klieneberger-Nobel, K. McQuillen, M. Rubio-Huertos, M.R.J. Salton, R.E. Strange, J. Tomcsik en C. Weibull, *Nature* 181, 1713 (1958)
- 49 K. McQuillen, in "The Bacteria" (Uitg. Academic Press) deel I, blz. 257
- 50 N.D. Zinder en W.F. Arndt, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 42, 586 (1956)
- 51 K. McQuillen, in "The Bacteria" (Uitg. Academic Press) deel I, blz. 331
- 52 P.H. Hofschneider, *Nature* 186, 568 (1960)
- 53 P.H. Hofschneider, *Nature* 186, 330 (1960)
- 54 P.H. Hofschneider en K. Müller-Jensen, *Z. Naturforsch.* 186, 922 (1963)

- 55 K. Müller-Jensen en P.H. Hofschneider, *Biochim. Biophys. Acta* 80, 422 (1964)
- 56 S. Benzer, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 41, 344 (1955)
- 57 S. Benzer, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 45, 1607 (1959)
- 58 S. Benzer, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 47, 403 (1961)
- 59 R.S. Edgar, *Genetics* 43, 235 (1958)
- 60 R.H. Epstein, A. Bolle, C.M. Steinberg, E. Kellenberger, E. Boy de la Tour, R. Chevalley, R.S. Edgar, M. Susman, G.H. Denhart en A. Lielausis, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* 28, 375 (1964)
- 61 D. Fraser en E.A. Jerrel, *J. Biol. Chem.* 205, 291 (1953)
- 62 A.D. Hershey en R. Rotman, *Genetics* 34, 44 (1949)
- 63 D. Fraser, *J. Bacteriol.* 61, 115 (1951)
- 64 J.D. Mandell en A.D. Hershey, *Anal. Biochem.* 1, 66 (1960)
- 65 W.Th. Daems, J.H. van de Pol en J.A. Cohen, *J. Mol. Biol.* 3, 225 (1961)
- 66 F.E. Young en J. Spizizen, *J. Bacteriol.* 81, 823 (1961)
- 67 G.D. Guthrie en R.L. Sinsheimer, *Biochim. Biophys. Acta* 72, 290 (1963)
- 68 J.H. Strauss Jr., *J. Mol. Biol.* 10, 422 (1964)
- 69 S. Brenner en A.O.W. Stretton, *J. Cell. and Comp. Physiol.* 64, Suppl. 1, 43 (1964)
- 70 A.O.W. Stretton en S. Brenner, *J. Mol. Biol.* 12, 456 (1965)
- 71 M. Nomura en S. Benzer, *J. Mol. Biol.* 3, 684 (1961)
- 72 W. Bode, *Z. Vererbungsl.* 94, 190 (1963)
- 73 R.S. Edgar en I. Lielausis, *Genetics* 49, 649 (1964)
- 74 A.K. Kleinschmidt, D. Lang, D. Jacherts en R.K. Zahn, *Biochim. Biophys. Acta* 61, 857 (1962)
- 75 I. Rubinstein, C.A. Thomas en A.D. Hershey, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 47, 1113 (1961)
- 76 J.B.T. Aten, *Dissertatie*, Leiden (1965)
- 77 M. Litt, J. Marmur, H. Ephrussi-Taylor en P. Doty, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 44, 144 (1958)
- 78 L.F. Cavalieri en B.H. Rosenberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 44, 853 (1958)
- 79 J. Marmur, R. Rownd en C.L. Schildkraut, in: "Progress in Nucleic Acid Research", (Uitg. Academic Press) deel I, blz. 231
- 80 J. Marmur en D. Lane, *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 46, 453 (1960)
- 81 G. Veldhuisen, R.A. Oosterbaan, P.H. Pouwels, H.S. Jansz en J.A. Cohen, *Proc. XI Intern. Congress of Genetics I*, 28 (1963)
- 82 P.F. Davison, D. Freifelder en B.W. Holloway, *J. Mol. Biol.* 8, 1 (1964)

- 83 K.T. Berns en C.A. Thomas, J. Mol. Biol. 3, 289 (1961)
- 84 D.J. Cummings, Biochim. Biophys. Acta 72, 475 (1963)
- 85 J. Tomizawa en N. Anraku, J. Mol. Biol. 11, 509 (1965)
- 86 R. Beukers en W. Berends, Biochim. Biophys. Acta 41, 550 (1960)
- 87 R. Beukers en W. Berends, Biochim. Biophys. Acta 49, 181 (1961)
- 88 A. Wacker, in "Progress in Nucleic Acid Research" (Uitg. Academic Press) deel I, blz. 369
- 89 C.A. Cavilla en H.E. Johns, Virology 24, 349 (1964)
- 90 M.H. Adams, "Bacteriophages" (Interscience Publishers, New York) blz. 513
- 91 W. Sauerbier, Biochim. Biophys. Acta 87, 356 (1964)
- 92 S.E. Luria en R. Dulbecco, Genetics 34, 93 (1949)
- 93 M. Winkler, H.E. Johns en E. Kellenberger, Virology 18, 343 (1962)
- 94 R. Setlow en R. Boyce, Biochim. Biophys. Acta 68, 455 (1963)
- 95 A.H. Doermann, J. Cell. and Comp. Physiol. 58, 79 (1961)
- 96 D. Krieg, Virology 8, 80 (1959)
- 97 W. Vielmetter en C.M. Wieder, Z. Naturforsch. 146, 312 (1959)
- 98 P. Geiduschek, Proc. Nat. Acad. Sci. US 47, 950 (1961)
- 99 E. Kölsch, Z. Vererbungsl. 96, 175 (1965)
- 100 J. Tomizawa en N. Anraku, J. Mol. Biol. 8, 508 (1964)
- 101 J. Tomizawa en N. Anraku, J. Mol. Biol. 8, 516 (1964)
- 102 N. Anraku en J. Tomizawa, J. Mol. Biol. 11, 501 (1965)
- 103 A.H. Doermann en L. Boehner, Virology 21, 551 (1963)
- 104 R. Hotchkiss, Proc. XI Intern. Congress of Genetics II (1963)
- 105 W. Harm, Mutation Research 1, 344 (1964)
- 106 P. Howard-Flanders en R.P. Boyce, Genetics 50, 256 (1964)
- 107 A.J. Clark en A.D. Margulies, Proc. Nat. Acad. Sci. US 53, 451 (1965)
- 108 M.C. Frey en N.E. Melechen, Virology 25, 620 (1965)
- 109 E. Goldberg en G. Veldhuisen, nog te verschijnen publikatie in:
"Methods in Enzymology - Nucleic Acids" (Uitg. Academic Press)
- 110 R.L. Sinsheimer, in "The Nucleic Acids" (Uitg. Academic Press) deel III, blz. 187.

Op verzoek van de Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen volgt hier een kort overzicht van het verloop van mijn studie.

Na het afleggen van het eindexamen H.B.S.-B aan het Marnix College te Ede in 1953 werd in dat zelfde jaar begonnen met de studie in de biologie aan de Rijksuniversiteit te Utrecht. Het kandidaatsexamen K werd in 1956 afgelegd; het doctoraal examen met als hoofdvak microbiologie en als bijvakken erfelijkheidsleer en chemische dierfysiologie werd afgelegd in 1959. De studie hiervoor stond onder leiding van de hoogleraren Dr.P.G. de Haan, wijlen Dr.C.L. Rümke en Dr.H.J. Vonk. Tijdens mijn militaire dienstdiensttijd werd ik gedetacheerd op het Medisch Biologisch Laboratorium van de Rijksverdedigingsorganisatie TNO te Rijswijk, waar ik na het vervullen van de dienstplicht werkzaam bleef en waar het hier beschreven onderzoek uitgevoerd werd.

Graag wil ik van deze gelegenheid gebruik maken om mijn dank te betuigen aan allen, die hebben bijgedragen aan het tot stand komen van dit proefschrift. Met name mijn promotor Prof.Dr.J.A. Cohen voor zijn grote belangstelling en de vele stimulerende, van ideeën overvloeiende, discussies; Dr.R.A. Oosterbaan en Dr.H.S. Jansz, die steeds bereid waren deze ideeën te helpen kanaliseren; Ir.J.H. van de Pol dank ik voor de prettige wijze waarop hij mij in de problematiek van dit onderzoek heeft ingewijd. Voor het uitvoeren van de experimenten heb ik de medewerking gehad van Mevrouw H. Koster-Pufkus, Mevrouw D. v.d. Meulen-Brons en Mejuffrouw M.C. Poelman; veel dank ben ik verschuldigd voor hun kundigheid en hun vele geduld dat meermalen opgebracht moest worden. Ik dank Dr.R.A. Oosterbaan en Dr.F. Berends voor het kritisch doorlezen van het manuscript en de heren H.E. Groot Bramel en J.J. Weber en medewerkers voor de verzorging van de figuren. Het bestuur van de Rijksverdedigingsorganisatie TNO dank ik voor de toestemming om dit onderzoek in de vorm van een proefschrift te mogen publiceren.

Tenslotte wil ik haar bedanken, die dit leven met mij deelt, voor het medeleven en het meerdere malen typen van het manuscript en de zoon, die zij mij ondertussen nog wist te schenken. Zeer veel dank ben ik verschuldigd aan mijn ouders voor alles wat zij gedaan hebben om mij de bovengenoemde academische opleiding te kunnen geven. Mijn wens is dat zij nog lang van het resultaat mogen genieten.