

DE 45

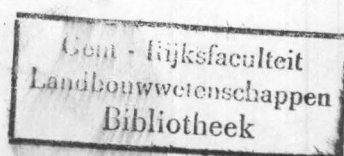
RIJKSLANDBOUWHOGESCHOOL GENT

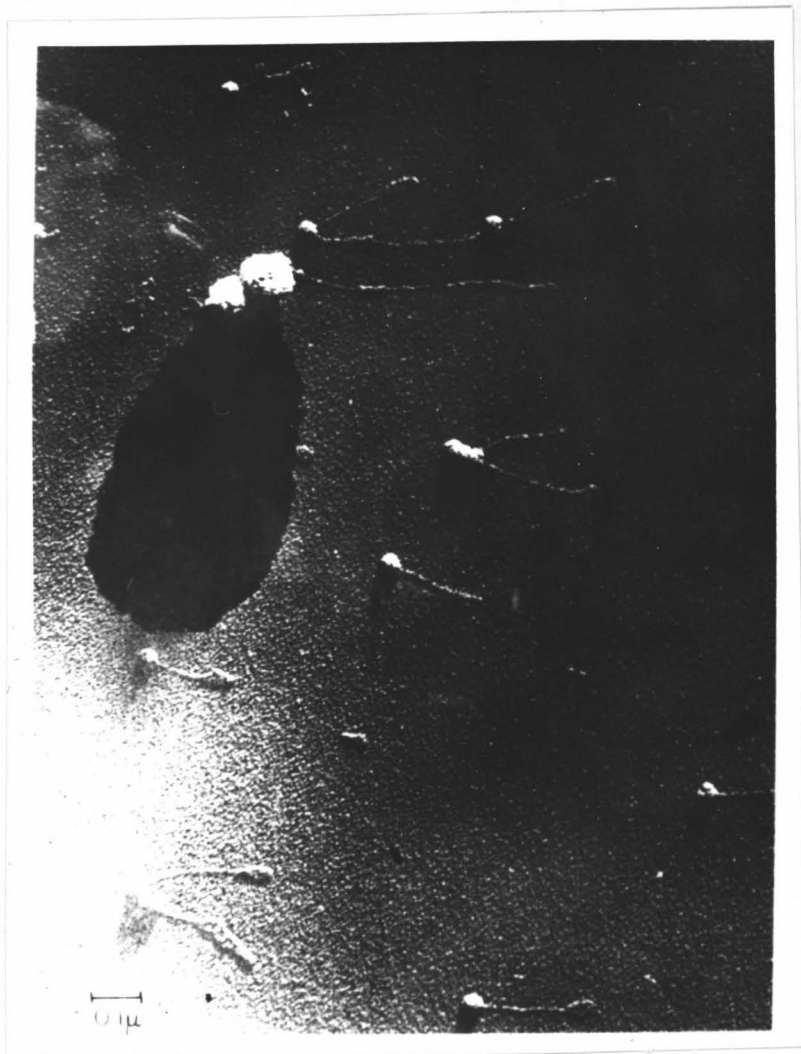
**Studie over het Verband tussen
Chemische Structuur en Biologische Activiteit
van het Bacteriofaag ØX-174 - Nucleïnezuur.**

door WALTER FIERS

Proefschrift voorgelegd tot het behalen van de graad van
Doctor in de Landbouwkundige Wetenschappen.

1963





ØX-174 virus met uitgeworpen kernmateriaal (MACLEAN en HALL, 1962).

De virussen werden gedeeltelijk geopend door verwarming tot 70°C. Hierdoor werd het desoxyribonucleïnezuur grotendeels vrijgesteld (zichtbaar als een streng, rechts van iedere geleedigde virusmantel). Bemerkt de eindstandige lus. De twee grote sferen zijn latex-balletjes, welke als referentie dienen. Vergroting 75°000 x ; schaduwverhouding 10 : 1.

W O O R D V O O R A F.

Bij het voorleggen van dit proefschrift breng ik gaarne in de eerste plaats hulde aan Dr. R.L. Sinsheimer, Professor van Biofysica aan het "California Institute of Technology" te Pasadena, Californië, in wiens laboratorium de onderzoeken werden verricht. Zijn rijpe ervaring, zowel op het gebied van biofysica en biochemie, als op dat van microbiologie, zijn kritische geest, en zijn daadwerkelijke en morele hulp zijn steeds een onmisbare steun en een stimulerende leidraad geweest bij de vordering van dit werk.

Een diepe erkentelijkheid ben ik verschuldigd aan mijn Promotor, Professor Dr. L. Vandendriessche. De wetenschappelijke vorming, die ik onder zijn bevoegde leiding verwierf, was de basis voor deze verdere navorsingen, en heeft mij toegelaten te kwalificeren als "Rockefeller Foundation fellow" en als "Research fellow" aan het California Institute of Technology. Bovendien waren de praktische raadgevingen van Professor Vandendriessche mij zeer nuttig bij het opstellen van dit proefschrift, evenals de opbouwende discussies, waar hij steeds toe bereid was.

Het verheugd mij hier te kunnen mijn dank betuigen aan Professor Ir. K. Petit, Rector der Rijkslandbouwhogeschool te Gent. Gedurende vele jaren reeds heeft hij mij welwillend zijn steun verleend in mijn streven om een wetenschappelijke loopbaan te volgen.

Professor Dr. L. Massart, Voorzitter van de Nationale Raad voor Wetenschapsbeleid, ben ik tenzeerste erkentelijk. Het vertrouwen dat hij stelde in mijn wetenschappelijke waarde, heeft er in belangrijke mate toe bijgedragen dit studieverblijf in de Verenigde Staten mogelijk te maken.

Met dankbaarheid denk ik terug aan de vriendschappelijke sfeer welke heerste in Professor Sinsheimer's laboratorium voor Moleculaire Biologie. Voor stimulerende gedachtenwisselingen en voor bereidwillige hulp bij het aanleren van nieuwe technieken, gevoel ik mij vooral verplicht tegenover Dr. L. Guthrie, Dr. J. Davis, Dr. J.B. Hall en Dr. E. Carusi.

Mijn oprechte erkentelijkheid gaat niet in de minste plaats naar de personeelsleden van het Laboratorium voor Fysiologische Scheikunde, en in het bijzonder naar Mevr. L. Lepoutre, voor de toewijding welke zij besteed hebben aan de verwezenlijking van dit proefschrift.

Financiële steun werd verleend door de "Rockefeller Foundation" te New York, V.S., en door het "Nationaal Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek". Heel veel ben ik dan ook verschuldigd aan deze organismen; niet alleen stelden zij mij in de mogelijkheid deze geringe bijdrage te leveren tot de vooruitgang der moleculaire biologie, maar vooral lieten zij mij toe mijn wetenschappelijke vorming te vervolmaken.

Gent, 15 juli 1963.

LIJST VAN DE GEBRUIKTE AFKORTINGEN.

-
- DNA : desoxyribonucleïnezuur.
 - E. coli : Escherichia coli.
 - EDTA : ethyleendiamine tetraäcetaat.
 - RNA : ribonucleïnezuur.
 - sRNA : "oplosbaar" of transfer-RNA.
 - mRNA : "boodschap" RNA.
 - TMV : tabak mozaïek virus.
 - Tris : tris-(hydroxymethyl)-aminomethaan.
 - Nucleotidecomponenten :
 - A : adenine
 - C : cytosine
 - G : guanine
 - T : thymine
 - U : uracil
-

O. INLEIDING.

O.O. OVER GENEN, EIWITTEN EN

"BOODSCHAP" RIBONUCLEINE -

ZUUR.

De belangrijkste bijdrage van de biochemie tot onze kennis der levende materie is wel het begrip der unitariteit : de drie grote problemen, namelijk winnen en vervoeren van energie, transformatie van de organische stof, en behoud en vertaling van de genetische informatie, worden door iedere cel, zij het nu plantcel, diercel of bacterie, op een in principe gelijkaardige of zeer verwante wijze opgelost. De gevolgtrekkingen op het gebied van de evolutie liggen voor de hand.

Alleen het derde probleem, namelijk dit der genetische informatie, wordt hier nader toegelicht. De klassieke genetica leert dat alle erfelijke karakters bepaald worden door respectievelijke factoren, genen genoemd, welke op een reeks lineaire structuren liggen. In een paar gevallen heeft men deze structuren zelfs kunnen vereenzelvigen met de cytologisch aantoonbare chromosomen.

Waaruit bestaat nu de informatie van een gen en hoe wordt die omgezet in een fenotypisch karakter ? Het is de taak van een nieuwe wetenschap, de moleculaire biologie, om aan deze abstracte en dikwijls vage begrippen een concrete en chemisch betekenisvolle zin te geven. Vooral in de laatste jaren werden aanzienlijke successen geboekt, welke grotendeels te danken zijn aan de invoering van nieuwe technieken en methoden.

Een eerste grote stap werd in 1941 gezet, toen BEADLE en TATUM de hypothese van "één gen, één enzyme" vooropstelden. Hiermee werd bedoeld dat ieder erfelijk kenmerk, zoals bijvoorbeeld het vermogen om een bepaald suiker te vergisten, de kleur van een bloem of de verspreiding van vlekken op de vacht van het konijn, te wijten is aan de aan- of afwezigheid van een specifiek, actief enzyme. Deze onderzoekers hebben bijvoorbeeld hun hypothese gestaafd aan de hand van experimenten zowel met micro-organismen, als met maïs en met katten. Tegenwoordig wordt de "één gen, één enzyme" theorie door zovele experimentele resultaten bevestigd dat zij als bewezen mag worden beschouwd (Wel heeft men in de laatste jaren indirecte, maar overtuigende aanwijzing bekomen voor het bestaan van regulatorische genen, welke rechtstreeks zouden inwerken zonder tussenkomst van eiwitsynthese - JACOB en MONOD, 1961 ; JACOB en WOLLMAN, 1961).

Wat is de natuur der genen ? In 1957 vatte SINSHEIMER de relevante onderzoekingen op dit gebied samen, en besloot aan de hand van onbetwistbaar feitenmateriaal uit zeer verschillende gebieden dat genen segmenten zijn van de lange DNA-ketens. Dit wordt misschien het duidelijkst aangetoond door de transformatie experimenten. Indien zuiver DNA, geïsoleerd uit gekapselde Pneumococci, toegevoegd wordt aan niet-gekapselde Pneumococci, dan verkrijgen deze laatste permanent dit erfelijk karakter (GRIFFITH, 1928 ; AVERY, MACLEOD en MC CARTY, 1944). Tegenwoor-

dig is zelfs transformatie met menselijke cellijnen gekend (SZYBALSKI en JOANNES, 1962 ; SZYBALSKI en SZYBALSKI, 1962 ; SZYBALSKI, persoonlijke mededeling). Dat genen slechts een beperkt deel zijn van de reuzen-DNA-moleculen wordt bijvoorbeeld aangetoond door het feit dat bij het breken van een DNA preparaat door sonicatie, de transformatie-activiteit veel trager daalt dan het gemiddeld moleculair gewicht (GUILD, 1962 ; NESTER e.a., 1963).

Wat verband is er tussen het uit DNA bestaande gen en een overeenkomstig eiwit ? Het eerste is een polymeer opgebouwd uit vier verschillende monomeren (de nucleotiden - zie sectie 0.1) en het tweede bestaat, althans voor wat de primaire structuur betreft, uit één (of meer) polypeptideketen(s), opgebouwd uit 20 verschillende aminozuren als eenheden (zo bijvoorbeeld bestaat het enzyme pancreas ribonuclease uit 124 aminozuren, het hormoon insuline uit twee ketens van respectievelijk 21 en 30 aminozuren en het hemoglobine uit vier ketens welke samen 574 aminozuren bevatten). Er wordt algemeen aangenomen dat de nucleotideopvolging van het DNA de volgorde van de aminozuren in de peptideketen bepaalt ("colinear coding" theorie). De aldus gesynthetiseerde, primaire polypeptideketen neemt dan voor een gedeelte een geordende structuur aan, meestal een rechtswindende α -helix (secondaire structuur), en wordt vervolgens tot een welbepaald driedimensioneel complex omgeplooid (tertiaire structuur), om te komen tot een meestal sfeervormig, biologisch actief eiwit. Het is goed mogelijk dat de primaire structuur, waarvoor dus de informatie door het DNA geleverd wordt, bepaalt welke secondaire en tertiaire structuur de polypeptideketen moet aannemen ("folding is simply a function of the order of the amino acids", CRICK, 1953).

Welke correlatie bestaat er tussen het DNA en de morfologische celstructuren ? Het DNA komt uitsluitend voor in de celkernen of in de overeenkomstige structuren der bacteriën ; vandaar immers komt de naam "nucleïnezuur". (Bij grote uitzondering wordt soms een geringe hoeveelheid DNA in de cytoplasmatische celstructuren gevonden ; IWAMURA, 1960 ; MAHLER en DA SILVA PEREIRA, 1962). Meer bepaald, het DNA is alleen aanwezig in de chromosomen, welke voornamelijk tijdens de mitose aantoonbaar zijn, en dit dank zij een kleuring specifiek voor DNA. MORGAN en navolgers hebben zelfs aangetoond dat de fijnere structuur van de chromosomen kan in verband gebracht worden met de aanwezigheid van bepaalde genetische kenmerken (hun keus van het studieobject, *Drosophila melanogaster*, was zeer gelukkig enerzijds wegens de aanwezigheid van de reuzenchromosomen in de speekselklieren, en anderzijds wegens de buitengewoon hoge spontane mutatiefrequentie) (MORGAN e.a., 1934 ; SCHULTZ, 1947 ; BRIDGES en BRIDGES, 1939 ; LEWIS, 1945).

Hoeveel maal is de informatie voor de synthese van een bepaald eiwit in een cel aanwezig, of in andere woorden hoeveel gelijke DNA-moleculen, ook kopijen genoemd, zijn er voorhanden ? In het geval van de reuzenchromosomen bedraagt dit aantal zeker 1000 of meer (RIS, 1957). In *Lilium longiflorum* zou de chromosoom uit 2 delen bestaan, chromatiden genoemd, welke elk terug in 2 strengen te scheiden zijn, ieder opnieuw tweemaal in twee verdeeld, hetgeen in totaal minstens 16 kopijen geeft (RIS, 1957 ; STEFENSEN, 1959). Recente en zeer mooie studies met celkernen van salamander oöcyten tonen slechts twee symmetrische DNA-ketens aan per chromosoom (GALL en CALLAN, 1961). Bij bacteriën

weet men dat er meerdere identieke chromosomen kunnen aanwezig zijn, afhankelijk van de fysiologische toestand der cel (JACOB en WOLLMAN, 1961). Het is in elk geval onwaarschijnlijk dat het gehalte DNA per cel een maat zou zijn voor het aantal erfelijke kenmerken, want bijvoorbeeld de mens en de rat bevatten ongeveer 3×10^{-12} g DNA per cel, terwijl de kikker $7,5 \times 10^{-12}$ g en de lelie 53×10^{-12} g DNA bezitten.

Aangezien het DNA zich in de chromosomen bevindt, en de eiwitsynthese in veel gevallen voornamelijk plaats grijpt in het cytoplasma - meer bepaald in of op de microsomen, welke aan het endoplasmatisch reticulum gebonden zijn - moet de informatie op één of andere wijze overgebracht worden van de celkern naar het cytoplasma (Fig. 1). Dit is de rol van het "boodschap" of "messenger"-RNA. Reeds 20 jaar geleden werd door CASPERSSON (1941) en door BRACHET (1942) een verband tussen RNA en eiwitsynthese vooropgesteld. Later werd bijvoorbeeld door JEENER en SZAFARZ (1950) een aanwijzing bekomen voor de migratie van kern-RNA naar het cytoplasma (zie ook GOLDSTEIN en PLAUT, 1955; PRESCOTT, 1960). Het is echter slechts in 1961 dat JACOB en MONOD een zeer degelijke bewijsvoering voor het bestaan en de rol van het "boodschap"-RNA publiceerden. Sedertdien is dit één der meest actieve onderzoeksgebieden van de moleculaire biologie geworden. Volgende eigenschappen, welke ook de oorsprong en de functie verklaren, worden aan het "boodschap"-RNA toegeschreven :

- a) zelfde basesamenstelling als het DNA, b) zelfde nucleotideopenvolging als het DNA, c) wordt zeer vlug gemerkt met radioactieve precursoren van RNA (bijvoorbeeld gedurende 30 tot 60 sec. "pulse labeling"), d) het bindt zich op de microsomen, e) het dirigeert de synthese van een specifiek polypeptide, f) het is metabolisch zeer labiel en kan bijgevolg slechts tot synthese van een beperkt aantal - bijvoorbeeld 50 - eiwitmoleculen leiden (hierop maakt het reticulocyten-systeem een uitzondering, MARKS e.a., 1962). Samenvattend kan men besluiten dat "boodschap"-RNA grotendeels een onvoldoende gekarakteriseerde RNA-fractie is, waarvan al naargelang de groep onderzoekers en de gebruikte methoden verschillende facetten bestudeerd worden. De moeilijkheid is vooral de labiliteit en het feit dat "boodschap"-RNA slechts een geringe fractie van het totaal RNA uitmaakt (80 tot 90 % van het totaal cellulair RNA is microsoom-RNA, meestal bestaande uit de 16S en de 23S componenten (nota 1), 4 tot 20 % is "oplosbaar" of "transfer" RNA, en volgens BOLTON en MC CARTHY (1962), is slechts 1 % "boodschap" RNA).

Wij kunnen dan de eiwitsynthese als volgt samenvatten (Fig. 1; zie ook Fig. 3 van een vorige verhandeling, FIERS, 1960). Op een stuk van de DNA-keten, overeenkomstig met de lengte van een gen, wordt een complementair "boodschap"-RNA gesynthetiseerd, welke evenals het overeenkomstig DNA een informatie bevat, vastgelegd door de nucleotideopenvolging. Het "boodschap"-RNA migreert naar het cytoplasma waar het gebonden wordt op de microsomen. Anderzijds zijn er voor de eiwitsynthese aminozuren en energie nodig. Een aminozuur wordt omgezet tot aminoacyl-AMP ten koste van ATP door een activerend enzyme. Ditzelfde activerend enzyme draagt dan de energierijke aminoacyl-groep over op een specifiek "oplosbaar" RNA (sRNA). Dit

Nota 1 : De sedimentatieconstante, uitgedrukt in S-eenheden, is een maat voor het moleculair gewicht, en wordt bepaald door analytische centrifugatie zoals beschreven in sectie 1.1.2.0.

Figuur 1 : Schema van de eiwitsynthese (naar Prof. Dr. C. de Duve, Francqui-leerstoel, 1963).

Specifieke informatie, energie en bouwstenen zijn nodig voor de eiwitsynthese.

Informatie : in de celkern (linker bovenhoek) bevindt zich het DNA. De informatie voor de specifieke aminozuuropeenvolging van ieder eiwit wordt bepaald door de nucleotidesequentie van een gedeelte van dit DNA. Deze informatie wordt overgeschreven door synthese van een "boodschap"-RNA (m RNA), hetwelk dezelfde nucleotideopeenvolging heeft als één van beide DNA-strengen. Deze synthese van m RNA geschiedt door de RNA-polymerase (enzyme 1), ten koste van de vier ribonucleosidetrifosfaten. De regulatie van de m RNA-synthese, en bijgevolg van de eiwitvorming, wordt uitgeoefend door specifieke repressors en inductors, waarvan de natuur nog onzeker is (allosterische eiwitten?).

Energie : in de mitochondriën (links onder) wordt energie bekomen dank zij een reeks oxidatieve fosforylatie-processen. Deze energie wordt als ribonucleosidetrifosfaten (ATP, GTP, UTP, CTP) voor de verschillende celfuncties ter beschikking gesteld.

Bouwstenen : de aminozuren, welke in het cytoplasma voorkomen, worden geactiveerd dank zij ATP en een reeks enzymen, waarvan ieder specifiek is voor een individueel aminozuur (aminozuur activerende enzymen 2). Dezelfde enzymen dragen vervolgens de aminoacylgroepen over op de oplosbare RNA's (sRNA), die eveneens specifiek zijn voor elk, individueel aminozuur. Aldus wordt ieder aminozuur voorzien van een eigen handvat. Het verschil tussen deze sRNA's berust in de nucleotidesequentie ; een beperkt gebied, de anticodon genoemd en waarschijnlijk bestaande uit drie nucleotiden, dient meer speciaal voor identificatie.

De eiwitsynthese : aan het begin van een m RNA, afkomstig van de kern, hecht zich een ribosoom (bestaande uit een grotere en een kleinere component, respectievelijk 50 S en 30 S genoemd). Hierop wordt een bepaald aminoacyl-sRNA gebonden, namelijk dit waarvan de anticodon complementair is met drie overeenkomstige nucleotiden van het m RNA. Deze reactie vereist GTP en overbrengende enzyme(n) (reactie 3). Een tweede aminoacyl sRNA wordt dan gebonden (steeds bepaald door de nucleotidesequentie van het m RNA), en de eerste aminoacylgroep (a) vormt een peptidebinding met het tweede, aminoacyl-sRNA (g) complex. Hierbij wordt het eerste sRNA vrijgesteld, en schuift de ribosoom een plaats op langsheen het m RNA. Door herhaling van dit proces verkrijgt men de synthese van een polypeptideketen. Op ieder ogenblik kunnen verschillende ribosomen (bijvoorbeeld 5) op het m RNA gebonden zijn. Dit complex wordt polysoom genoemd. Het is mogelijk dat tenslotte een enzyme (reactie 4) nodig is om de polypeptide van de ribosoom los te maken of tot een specifiek eiwit om te plooiën.

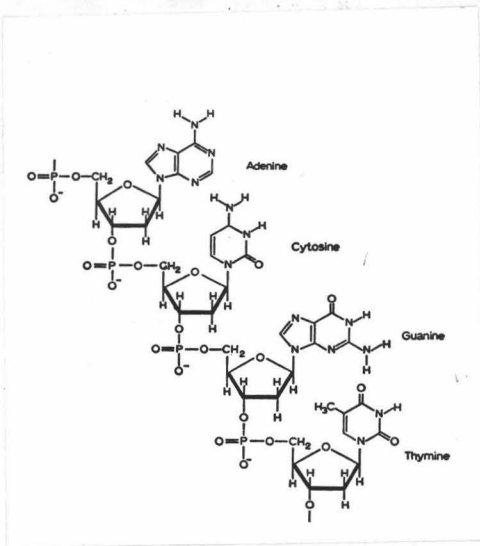
is een ribonucleotideketen van 70 tot 90 eenheden lang, welke als een haarspeld is omgeplooid en een dubbelstrengige spiraalstructuur vertoont (FULLER, 1961 ; SPENCER e.a., 1962 ; LUBORSKY en CANTONI, 1962 ; MCCULLY en CANTONI, 1962). De aminoacylgroep wordt aan de C'₃-OH (of C'₂-OH) van de terminale adenosine gehecht. Wij kunnen hier terloops de merkwaardige specificiteit van dit activerend enzyme onderlijnen : zo bijvoorbeeld herkent het leucine-activerend enzyme leucine uit een mengsel van 20 of meer aminozuren en het herkent leucine sRNA uit een mengsel van minstens evenveel diverse sRNA moleculen (deze verschillen waarschijnlijk alleen in hun nucleotideopvolging). Ieder sRNA nu bevat een "code"woord (bijvoorbeeld de sequentie A-A-A voor fenylalanine) welke complementair is met een "code" woord van het "boodschap" RNA (bijvoorbeeld U-U-U). Op basis van deze nucleotide-complementariteit (zie sectie 0.1.) worden de verschillende aminoacyl-sRNA verbindingen op het "boodschap" RNA in een welbepaalde orde geplaatst (hiervoor zijn nog een overbrengend enzyme en GTP nodig). Er rest nu nog alleen aan de (hypothetische) peptide-polymerase om iedere energierijke aminoacyl-groep te verbinden met de in opbouw zijnde peptideketen. Een niet-dialyseerbare factor (enzyme ?) is vereist om de aldus gesynthetiseerde polypeptide van de microsoom los te maken, en tot een oplosbaar eiwit te leiden.

Wij hebben gepoogd in dit kort overzicht de algemene lijnen van het verband DNA-RNA-eiwit weer te geven. Belangrijke vraagstukken blijven echter op dit gebied nog onopgelost, en andere processen zijn niet altijd zo eenvoudig als ze hier werden voorgesteld. Voor verdere studie verwijzen wij naar enkele recente monografieën en overzichtsartikelen (HOAGLAND, 1960 ; CHANTRENNE, 1961 ; HARRIS, 1961 ; JACOB en WOLLMAN, 1961 ; BERG, 1961 ; JACOB en MONOD, 1961 ; LEVINTHAL en DAVISON, 1961 ; CHANTRENNE, 1962 ; GROS e.a., 1962 ; MONOD e.a., 1962 ; MC QUILLLEN, 1962 ; SIMPSON, 1962 ; VOLKIN, 1963 ; SCHWEET en BISHOP, 1963).

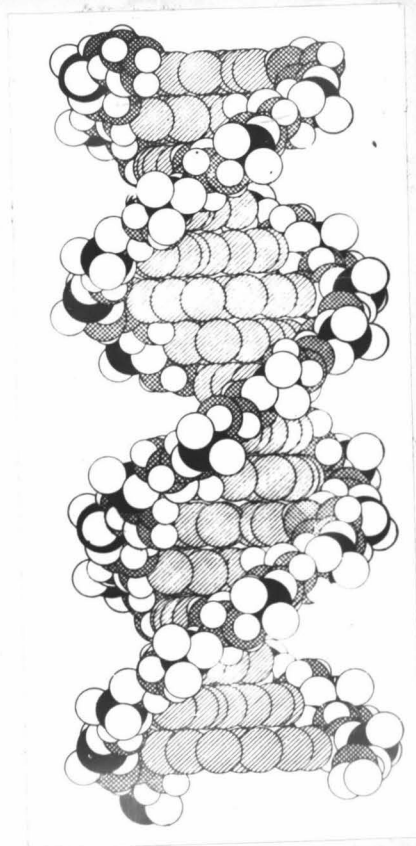
0.1. DE STRUCTUUR DER NUCLEINEZUREN.

DNA bestaat uit vier verschillende desoxyribonucleotiden. Ieder van deze bevat fosfaat, desoxyribose en een base, respectievelijk adenine (A), guanine (G), thymine (T) of cytosine (C) (Fig. 2). De base is β -glycosidisch gebonden op de C'₁ van de pentose ; deze binding is bij de purinen zeer labiel in zuur midden. Volgens de methode van hydrolyse is de fosfaatgroep gebonden op de C'₃ of de C'₅ van de pentose. Dit geeft tevens een goede aanwijzing voor de primaire structuur, namelijk internucleotidebinding door C'₃ \rightarrow C'₅ fosfodiesterbruggen.

De algemeen aangenomen secundaire structuur van DNA is de dubbele helix, zoals die het eerst werd voorgesteld door WATSON en CRICK (1953). Deze bestaat uit twee, antiparallel-lopende schroeflijnen met een complementaire baseopvolging. Deze basen liggen centraal in een vlak loodrecht op de as van de keten, terwijl de desoxyribose-fosfaat ketens de buitenste schroeflijnen vormen (Fig. 2). Iedere A is door twee waterstofbruggen verbonden met een T van de complementaire keten, en iedere G met een C (deze laatste binding is meer stabiel, en het is mogelijk dat er hier drie waterstofbruggen gevormd worden). Deze



Figuur 2 a.

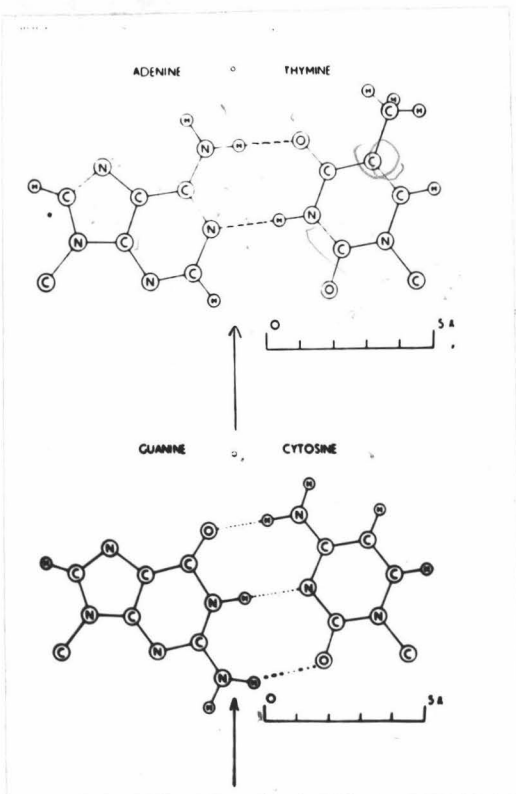


Figuur 2 b.

Figuur 2 : De structuur van DNA.

a) De primaire structuur : de 4 normale basen, adenine, cytosine, guanine en thymine, zijn β -glycosidisch gebonden op 2-desoxyribose. Deze pentosen zijn verbonden door 3'-5' fosfodiësters, met vorming van hoge polymeren. De genetische "informatie" wordt vastgelegd door de karakteristieke opeenvolging der basen.

b) De Watson-Crick helix : DNA, op enkele uitzonderingen na, bestaat uit twee complementaire polynucleotidestrengen, die tot een dubbele antiparallelle schroeflijnstructuur zijn gevlochten. De d-ribose fosfaat ruggengraten liggen langs de buitenkant (fosfor-atomen zijn zwart voorgesteld), terwijl de basen (schuin gearceerd) in het midden liggen, en wel in vlakken loodrecht op de as.



Figuur 2 c.

c) De base-complementariteit : De specifieke base-interactie is het gevolg van de eigenschap enerzijds van adenine om met thymine (of uracil) twee waterstof-bruggen te vormen, en anderzijds van guanine om met cytosine drie waterstof-bruggen te vormen. Aldus bepaalt iedere purine van de ene keten de overeenkomstige pyrimidine van de tweede streng, en vice-versa.

complementariteit heeft voor gevolg dat alle DNA evenveel purinen (A + G) als pyrimidinen (T + C) bevat, en evenveel 6-ketobasen (G + T) als 6-aminobasen (C + A). Opgemerkt dient te worden dat de structuur niet alleen door deze waterstofbruggen wordt gestabiliseerd, maar ook en misschien vooral door de hydrofobe krachten tussen de planaire basen ("stacking forces").

De Watson-Crick structuur, welke door onderzoeken met X-stralen diffractie en met combinaties van diverse fysico-chemische technieken wordt gesteund, biedt eveneens een zeer logische verklaring voor het behoud van de erfelijke informatie. De twee complementaire strengen kunnen door enzymen van elkaar gescheiden worden, en ieder dient om de synthese te dirigeren van een nieuwe complementaire streng (JOSSE e.a., 1961). Aldus treedt verdubbeling van de informatie op, welke noodzakelijkerwijze de celdeling moet voorafgaan. Het behoud van het genetisch materiaal is bijgevolg semi-conservatief: de twee strengen kunnen wel van elkaar gescheiden worden, maar verdere fragmentatie van iedere streng treedt niet op gedurende verschillende generaties (MESELSON en STAHL, 1958; SUEOKA, 1960; SIMON, 1961).

Hoe groot zijn de DNA-moleculen? Tot voor enkele jaren werden lijsten gepubliceerd van het moleculair gewicht van diverse DNA-preparaten (JORDAN, 1955; SADRON e.a., 1957). Er bestond echter grote tegenstrijdigheid tussen de verschillende onderzoekers, tussen de gebruikte methoden en tussen preparaten bereid op verschillende wijzen uitgaande van éénzelfde biologisch materiaal. Voor het veel gebruikte kalfsthymus-DNA benaderden de waarden dikwijls 6×10^6 . Een meer homogene bron is evenwel een bacteriofaag-DNA, zoals het veel bestudeerde T₂-DNA (zie sectie 0.2.). Daarenboven is dit DNA gemakkelijker te zuiveren daar het alleen door een eiwitmantel is omgeven (wel komen in de kop van de bacteriofaag ook nog polyaminen, calciumionen en een residueel eiwit voor). Het DNA-gehalte per faag bedraagt 130×10^6 Daltons (nota 2). (Deze waarde kan nauwkeurig bepaald worden bijvoorbeeld door chemische bepaling van de totale hoeveelheid DNA per volume-eenheid en telling der aanwezige deeltjes met behulp van de elektronenmicroscopie). Tot in 1960 meende men dat er per T₂-bacteriofaagdeeltje verschillende DNA moleculen aanwezig waren, waarvan de grootste een moleculair gewicht van 45×10^6 had (zie SINSHEIMER, 1960). Sedertdien echter is het gebleken dat ieder virusdeeltje slechts één reuzenmolecule met een moleculair gewicht van 130×10^6 bevat (RUBENSTEIN e.a., 1961; DAVISON e.a., 1961; CAIRNS, 1961).

Daarenboven hebben deze onderzoeken tot enkele nieuwe, zeer belangrijke vaststellingen geleid. Vooreerst werd het verschijnsel van het klieven ("shearing") ontdekt. Bij een geringe stroming van oplossing, bijvoorbeeld door te pipetteren, knakken grote DNA-moleculen middendoor (BURGI en HERSHEY, 1961; LEVINTHAL en DAVISON, 1961). Bij een ietwat grotere snelheidsgradiënt worden de deeltjes opnieuw gehalveerd en zo verder (door sonicatie kunnen stukken met een moleculair gewicht van ongeveer 10^7 bekomen worden). Met onze huidige technieken is het dan ook vooralsnog onmogelijk om intact DNA te isoleren bijvoorbeeld uit een plant- of dierencel, waar het goed ingeduffeld ligt tussen histonen. Sommige onderzoekers menen nu zelfs dat er per bacteriënchromosoom slechts één DNA-molecule met een moleculair gewicht van ongeveer 6×10^9 zou aanwezig zijn. De juistheid of onjuistheid van deze hypothese kan vooralsnog niet getest worden.

Nota 2 : Dalton : eenheid van het moleculair-gewichtsstelsel, ook avogram genoemd.

De moeilijkheden beperken zich evenwel niet tot de "shearing". Inderdaad, door onderzoek met het T_2 -DNA is het gebleken dat de gewoonlijk gebruikte fysische bepalingmethoden niet kunnen geëxtrapoleerd worden tot moleculaire gewichten van $2,5 \times 10^6$ en hoger. Deze moeilijkheden zijn zowel technisch (bijvoorbeeld men heeft ontdekt dat de sedimentatieconstante afhankelijk wordt van de rotatiesnelheid) als fysisch (bijvoorbeeld de β -waarde van de Mandelkern-Flory-Scheraga vergelijking blijkt evenmin constant te zijn - zie sectie 1.1.2.0.). Door vergelijking met het T_2 -DNA kan men zich wel empirisch verhelpen tot een moleculair gewicht van 130×10^6 (RUBENSTEIN e.a., 1961).

Wij mogen bijgevolg besluiten dat de huidige methoden niet toelaten om intact cellulair DNA te isoleren, en moest dit toch mogelijk zijn, dan valt het nog te betwijfelen of onze tegenwoordige fysische methoden tot een juiste bepaling van het moleculair gewicht zouden leiden (LEVINTHAL en DAVISON, 1961).

Zoals te verwachten voor zo een ineengesloten dubbele helix structuur is DNA een stijve, ondoordringbare staaf met een grote assymetriefactor. Maar toch is de stijfheid, gemeten bijvoorbeeld door viscositeit of door lichtverstrooiing, niet zo groot als berekend op basis van het hydrodynamisch model. Dit wordt door SADRON (1960) verklaard op basis van knikpunten (bijvoorbeeld een breuk in één van beide strengen). Ook sommige enzymologische en fysiologische onderzoeken wijzen op deze discontinuïteiten (BERNARDI e.a., 1961; MENNIGMANN en SZYBALSKI, 1962). Natuurlijk rijst hier weer de vraag of het gaat om letsels, veroorzaakt tijdens de isolatie, ofwel om een werkelijke, structurele eigenschap van het DNA.

Bij denaturatie gaan de twee strengen uit elkaar, en de secondaire structuur zakt ineen. Dit geschiedt bijvoorbeeld door verwarming, door hoge of lage pH-behandeling, of door toevoegen van sommige organische oplosmiddelen zoals formamide of dimethylsulfoxide. Meestal is deze overgang onomkeerbaar, maar indien het DNA tamelijk homogeen is zoals in het geval van bacterieel en viraal DNA, kan toch door een gepaste behandeling een renaturatie bekomen worden (MARMUR en LANE, 1960; DOTY e.a. 1960; HERRIOTT, 1961).

Het gedenatureerd DNA verschilt in menig opzicht van het natief DNA :

- a) Fysico-chemisch : de structuur is niet langer een stijf staafje, maar wel een statistisch kluwen, dat uitrekt naar mate de ionensterkte daalt of de temperatuur verhoogt.
- b) Chemisch : de basen zijn uit de gesloten ruimte los gekomen, en de aminogroepen kunnen nu bijvoorbeeld reageren met formaldehyde. De hypochromiciteit (daling van de UV-absorptie te wijten aan baseïnteractie) is eveneens veel geringer. Gedenatureerd DNA is chromatografisch te scheiden van natief DNA (BERNARDI, 1962).
- c) Biologisch : door denaturatie kan de biologische activiteit aanzienlijk dalen of stijgen (respectievelijke voorbeelden zijn het transformerend DNA en het polyoma virus-DNA - MARMUR en LANE, 1960; GUILD, 1961; WEIL, 1963).
- d) Enzymatisch : er bestaan zowel DNA-afbrekende enzymen (LEHMAN, 1960) als polymerasen (APOSHIAN en KORNBERG, 1962), welke een uitgesproken voorkeur voor de gedenatureerde vorm vertonen.

- e) Immunologisch : in het bloed van Lupus erythematosus patiënten komen antilichamen voor tegen gedenatureerd DNA (BARBU e.a. 1960 ; STOLLAR e.a., 1962).

Evenwel mag men niet besluiten dat base-interactie niet bestaat in gedenatureerd DNA. Bij verwijdering van de denatureerende voorwaarden (bijvoorbeeld bij afkoeling) vinden stukken van complementaire ketens elkaar terug. Maar ook door zuiver toevallige base-complementariteit kunnen intra- en intermoleculaire associaties optreden. Het resulterend beeld is lange ketens, welke op sommige plaatsen lussen vertonen en op andere gebonden zijn door waterstofbruggen aan een andere keten. Deze interactie is benevens van de concentratie ook in sterke mate afhankelijk van de pH, de temperatuur en de concentratie en natuur der kationen. Bij 0,001 M $MgCl_2$ is een complementariteit tussen twee paar basen reeds voldoende tot interactie (LIPSETT e.a., 1961).

Tenslotte kan hier nog vermeld worden dat de meeste DNA's geringe hoeveelheden buitengewone basen bevatten, zoals 5-methylcytosine. In de T-even bacteriofagen (sectie 0.2.) is zelfs al het cytosine vervangen door geglycosyleerd 5-hydroxymethylcytosine (SINSHEIMER, 1954 ; LEHMAN en PRATT, 1960). De reden van deze uitbreiding of wijziging van het genetisch alfabet is nog een volkomen raadsel.

RNA bevat de base uracil in plaats van thymine, en daarenboven is de suiker geen desoxyribose maar wel ribose. Deze laatste eigenschap verklaart waarom RNA enerzijds meer labiel is in alkalisch milieu of zelfs bij verwarming in neutraal midden, en anderzijds meer stabiel is in licht zure oplossing (een meer uitgebreide uiteenzetting over de chemische eigenschappen werd vroeger gepubliceerd ; FIERS, 1960).

Praktisch al het RNA welke uit een natuurlijke bron werd geïsoleerd is enkelstrengig (een uitzondering is het relatief kleine "oplosbaar" RNA dat een haarspeld structuur heeft (FULLER, 1961 ; SPENCER e.a., 1962 ; LUBORSKY en CANTONI, 1962 ; MC CULLY en CANTONI, 1962). Er is geen enkele sterische reden waardoor RNA verhinderd zou zijn dezelfde dubbele schroefdraad structuur aan te nemen als DNA, want bijvoorbeeld het in vitro gesynthetiseerd, complementair RNA kan onder geschikte voorwaarden tot de stijve, geordende vorm overgaan (GEIDUSCHEK e.a. 1962).

Fysico-chemisch heeft het enkelstrengige RNA veel eigenschappen gemeen met het gedenatureerd DNA. Aangezien er evenwel geen intrinsieke complementariteit van nucleotideopvolging voorkomt, zijn de intra- en interketen interacties nog geringer. Door sommige onderzoekers wordt een schatting gemaakt van het percent basen welke onder fysiologische voorwaarden door waterstofbruggen aan een partner gebonden zijn. Dit percent helicititeit bedraagt bijvoorbeeld 55 - 65 % voor het tabak mozaïek virus-RNA (DOTY e.a., 1959 ; BOEDTKER, 1960 ; HASELKORN en DOTY, 1961). Bij 0,1 M NaCl is RNA een statistisch kluwen ("random coil"). Bij dalende ionensterkte gaan de ketens zich evenwel uitstrekken wegens de toenemende elektrostatische afstoting. Hiermee gaat onder meer gepaard een stijging van de viscositeit, een daling van de sedimentatieconstante en een stijging van de gy-ratieradius (een parameter bepaald door lichtverstrooiing) (SCHUSTER e.a., 1956 ; DOTY e.a., 1959).

0.2. VIRUSSEN.

Ieder landbouwingenieur is zeker vertrouwd met de enorme schade die de landbouw lijdt te wijten aan virusziekten der gewassen. Bedenken wij slechts de economische lasten te wijten aan het aanschaffen van gezond aardappel pootgoed en de gevoeligheid van kostbare teelten zoals suikerbieten aan diverse virosen. Maar benevens de planten, zijn ook de dieren, zowel de geëvolueerde zoogdieren als de unicellulaire protozoa het slachtoffer van diverse virussen. Zelfs de minuscule bacteriën kennen hun eigen virussen, in dit geval bacteriofa-gen genoemd.

Volgens K.M. SMITH (1951) zijn virussen obligaat parasitaire, ziekteverwekkende agentia, met tenminste twee dimensies kleiner dan 200 m μ . Deze definitie, die fundamenteel gezien wat ongelukkig lijkt, geeft een aanneembare afbakening voor de praktische classificatie.

Virussen zijn obligaat parasitair. Dit wil zeggen dat de vermenigvuldiging alleen plaats grijpt na infectie van een gepaste waardcel. Deze eigenschap is eigenlijk zeer arbitrair. Met de vooruitgang der bacteriologie is het mogelijk geworden de meeste parasitaire bacteriën op steriele bodems te kweken, en aldus wordt bewezen dat zij slechts parasitair zijn omdat hun volledige behoeften anders niet kunnen gedekt worden. Maar zelfs tot nu toe is men er niet in geslaagd bepaalde bacteriën in vitro te kweken, bijvoorbeeld Mycobacterium leprae en virulente Treponema pallidum stammen; in andere woorden de ontbrekende factoren (vitaminen, enzymen, coënzymen) heeft men nog niet ontdekt of intact afgezonderd. Een analoge situatie doet zich voor in de virologie. Er is geen enkel bewijs voor de opvatting dat vermenigvuldiging van virussen alleen plaats kan grijpen in een "levende" cel, tzt. wanneer alle cellulaire functies onaangetast zijn. Wel integendeel, er zijn redenen om aan te nemen dat men in de toekomst virussen in vitro zal kunnen kweken. Immers de afzonderlijke processen, welke voor zover bekend hiervoor nodig zijn, werden alle in vitro gerealiseerd:

- a) Vermenigvuldiging van het nucleïnezuur volgens model door een DNA-polymerase of een RNA-polymerase (LEHMAN, 1959; REDDI, 1961; KARASEK en SCHRAMM, 1962).
- b) Synthese van virale "mantel"-eiwitten ("coat proteins") door toevoegen van een viraal nucleïnezuur aan een polypeptide-synthetiserend systeem (TSUGITA e.a., 1962; NATHANS e.a., 1962; RUECKERT e.a., 1962; OFENGAND en HASELKORN, 1962). Het omplooiën tot een specifieke secundaire en tertiaire structuur kan tenminste in sommige gevallen spontaan geschieden, zoals werd aangetoond met pancreas eiwitten (EPSTEIN en ANFINSEN, 1962; ISEMURA, e.a., 1961; LEVINHAL e.a., 1962).
- c) Het inbouwen van een nucleïnezuur in een eiwitmantel met vorming van een ogenschijnlijk volledig en biologisch actief virus werd reeds in 1955 door FRAENKEL-CONRAT verwezenlijkt (FRAENKEL-CONRAT en WILLIAMS, 1955; FRAENKEL-CONRAT 1956; COMMONER e.a., 1956).

De hoofdeigenschap van een levend wezen is het behoud en de vermenigvuldiging van de erfelijke informatie. Dat het virus zelf alle nodige informatie bezit volgt bijvoorbeeld uit het feit dat door chemische of fysische behandeling van het virus gemakkelijk mutanten te verkrijgen zijn (MUNDRY en GIERER, 1958), terwijl verandering van waardcel niet tot wijziging van

het geproduceerde virus leidt (bijvoorbeeld het tabak mozaïek virus (TMV) laten groeien op *Rhoeo discolor*; (GORDON en SMITH, 1961) of UV-bestraling van *Escherichia coli* met vorming van mutanten. Voor de synthese van het virus is benevens de informatie ook materiaal en energie nodig. Maar of dit nu bestaat uit cellulose en afval zoals bij de rottingsbacteriën, of uit geactiveerde aminozuren en nucleosidetrifosfaten zoals bij de virussen maakt niet a priori een fundamenteel onderscheid uit.

Virussen zijn ziekteverwekkers. Inderdaad hoe zou men anders hun aanwezigheid kunnen vaststellen? Iedere cel bevat veel nucleoproteïnen met ongeveer dezelfde dimensies als virussen. Zijn dit alle cellulaire componenten, of zijn sommige parasitaire, niet-ziekteverwekkende agentia? Een gekend probleem is bijvoorbeeld dat van de "King Edward" aardappelvariëteit. De planten zijn ogenschijnlijk zeer gezond, geven een goede opbrengst, en kunnen geen andere variëteit besmetten, zelfs niet door insect-vectoren. Indien echter op de proefhoeve de "King Edward" gegrift wordt op een andere variëteit, gaat deze laatste in veel gevallen uitgesproken ziekteverschijnselen vertonen. Het lijkt dus alsof het hier gaat om een niet-ziekteverwekkende virus, welke normaal vermenigvuldigt in de "King Edward".

Virussen hebben tenminste twee dimensies kleiner dan 200 μ . (200 μ is ongeveer het minimum resolutiebereik van de licht-microscoop). Dit lijkt een zeer arbitraire afbakening, maar niettemin zijn de geringe dimensies van de virussen één hunner voornaamste kenmerken. Zo werd het eerst ontdekte virus, het TMV, door IVANOVSKY in 1892 aangetoond doordat het een bacteriën-filter passeerde. De geringe afmetingen verklaren dat in één cel soms een enorm aantal virussen kunnen gevormd worden, bijvoorbeeld in de kleine *Escherichia coli* kunnen tot 10.000 f2-colifagen gesynthetiseerd worden (LOEB en ZINDER, 1961). Langs de andere kant van de gamma staan de vaccinia (210 μ x 260 μ) en de nog grotere Rickettsiae (475 μ) welke toch nog tot de virussen behoren, al maken zij misschien een overgangsklasse tot de bacteriën uit.

De virussen kunnen ingedeeld worden volgens de aard van het aanwezige nucleïnezuur: DNA of RNA. Er bestaat bijvoorbeeld weinig verschil in structuur en samenstelling tussen het RNA-bevattende, sfeervormige poliomyëlitis virus, het gele mozaïek virus van de raap, en de f2-faag, welke respectievelijk een dier, een plant en een bacterie aantasten.

Nochtans zijn de disciplines van de dierlijke, plantaardige en bacteriële virologie zeer verschillend, en wel wegens de specialisatie der technieken:

Bacteriofagen worden alleen bestudeerd voor hun intrinsiek wetenschappelijk belang. Men heeft sedert lang de hoop opgegeven om deze virussen praktisch te kunnen aanwenden als bacteriëcid agens. De voordelen voor het fundamenteel onderzoek zijn daarentegen aanzienlijk: alle waardcellen van een populatie zijn praktisch identiek en kunnen terzelfdertijd geïnfecteerd worden; in korte tijd kan het verloop over vele generaties gevolgd worden; de incubatietijd duurt hoogstens enkele uren, in plaats van weken, de keus van diverse mutanten en fysiologische condities is praktisch onuitputtelijk.

Dierlijke virussen worden vooral bestudeerd in rechtstreeks verband met hun praktisch belang. Bestrijding gebeurt meestal door immunisatie. Gedurende de laatste tien jaar werd aanzienlijke vooruitgang gemaakt bij het kweken van zuivere cellijnen en het infecteren van homogene celsuspensies met virussen (bijvoorbeeld Hela-cellen met polio ; Hela is een stabiele, kwaadaardige cellijn van menselijke oorsprong). Dit verhoogt natuurlijk in grote mate de mogelijkheden van het wetenschappelijk onderzoek, alhoewel de systemen nog vele nadelen bieden tegenover deze met bacteriofagen.

Plantvirussen kan men relatief gemakkelijk in zeer grote hoeveelheden bereiden. Zij worden dan ook veelvuldig gebruikt voor chemisch en fysisch onderzoek over structuur en samenstelling. Bestrijding geschiedt door selectie van resistente variëteiten en door beletten van overbrenging. Het onderzoek met gesuspendeerde celculturen van hogere planten staat nog in zijn kinderschoenen, maar biedt ons inziens veruit de beste mogelijkheden voor het bestuderen in vivo van de processen betrokken bij de infectie.

In alle virussen is benevens eiwit één soort nucleïnezuur aanwezig, hetzij RNA of hetzij DNA. Sommige bevatten daarenboven (fosfo)lipiden, polysacchariden en niet-constitutionele componenten zoals polyaminen, kationen, adenosine-trifosfaat, en zo meer. Morfologisch kent men sfeervormige virussen, vrijwel het meest algemeen verspreid, verder staafjes zoals het TMV en een paar aardappelvirussen, en dan ook gedifferentieerde structuren zoals bijvoorbeeld de T-bacteriofagen, welke een "kop", een "staart" en een "aanhechtingsplaat" bezitten. Het meest is gekend over de chemische structuur der plantvirussen, en hierover werd vroeger reeds een overzicht gepubliceerd (FIERS, 1956).

Beperken wij ons hier tot de eenvoudige sfeervormige virussen. Het nucleïnezuur ligt centraal, en daarom heen bevindt zich een mantel eiwit. De minimum hoeveelheid nucleïnezuur welke men in verschillende soorten virussen aantreft, bedraagt ongeveer 2×10^6 Daltons (FRISCH-NIGGEMEYER, 1956 ; CHENG, 1957) (Zeer recent echter, heeft men een paar virussen ontdekt welke nog een geringere absolute hoeveelheid nucleïnezuur bevatten ; KASSANIS en NIXON, 1962 ; REICHMANN e.a., 1962). Het relatief gehalte nucleïnezuur varieert van bijvoorbeeld 1 % voor influenza virus tot 40 % voor een klein virus zoals het tabak "ring-spot" virus.

De structuur van de nucleïnezuren werd in voorgaande sectie besproken. Een zeer belangrijke vraag is hoeveel nucleïnezuur-moleculen aanwezig zijn per virusdeeltje. Door grondig fysico-chemisch onderzoek werd aangetoond dat slechts één keten aanwezig is per virus voor TMV (GIERER, 1958 ; FRIESEN en SINSHEIMER, 1959 ; GIERER, 1960), T₂-bacteriofaag (RUBENSTEIN e.a. 1961 ; DAVISON e.a., 1961 ; KLEINSCHMIDT e.a., 1962) en ØX-174 bacteriofaag (zie sectie 0.3.). Daarentegen worden voor andere systemen, zoals het gele mozaïek virus van de raap, soms aanwijzingen bekomen dat het nucleïnezuur een aggregaat van kleinere ketens zou zijn (COHEN en SCHACHMAN, 1957 ; HASELKORN, 1962). Het verspreiden van de erfelijke informatie over verschillende moleculen strookt evenwel niet goed met de opvattingen van de moderne moleculaire biologie, en moet met het nodige voorbehoud worden aangenomen.

WATSON en CRICK (1957) hebben gewezen op het feit dat het viraal nucleïnezuur in de meeste gevallen niet groot genoeg is om de primaire structuur van de totale hoeveelheid viraal eiwit op een directe wijze te dicteren. Een meer logische verklaring is dat het viraal eiwit, of althans de "mantel" eiwitten, uit een aantal identieke eenheden zou bestaan. Het minimum aantal bouwstenen, vereist voor een symmetrische opstapeling, bedraagt 12 (een tetraëder waarvan elk vlak uit 3 eenheden bestaat). Een opstapeling echter, die dichter een sfeer benadert en ook meer symmetrieëlementen bezit (5-tallige assen), is een icosaeëder ($12 \times 5 = 60$ bouwstenen). Laatstgenoemde structuur wordt voor de meeste sfeervormige virussen aangenomen. Een exact bewijs kan evenwel alleen geleverd worden door roentgenstralen-diffractie, en hiervoor dient men te beschikken over isomorfe en relatief grote kristallen hetgeen gewoonlijk niet het geval is (deze structuur werd wel bewezen in het geval van het "Tomato Bushy Stunt Virus", CASPAR, 1956; het gele mozaïek virus van de raap, KLUG e.a., 1957, KLUG en FINCH, 1960; en het polio-virus Type 1, FINCH en KLUG, 1959). Daarentegen kan men soms goede aanwijzingen vinden voor de icosaeëdrische structuur, op de elektronenmicroscopische opnamen (zo bijvoorbeeld voor het 130 m μ grote "Ipula iridescent virus", WILLIAMS en SMITH, 1958). Dergelijke virussen lijken op bosbessen. Het aantal bobbel (gevormd door 5 eenheden op iedere vertex) voor zover deze kunnen geteld worden, bedraagt twaalf zoals verwacht (KLUG en CASPAR, 1960). Tenslotte kan men ook door fysico-chemisch en chemisch onderzoek de aard en het aantal bouwstenen per virusdeeltje bepalen. Merken wij nog op dat in sommige virussen benevens "mantel" eiwit ook nog proteïnen voorkomen welke geassocieerd zijn met het centraal gelegen nucleïnezuur.

Aangezien de eenvoudige virussen slechts eiwit en nucleïnezuur bevatten, rees vroeger de vraag welke van deze twee componenten de drager is van de erfelijke informatie. Men slaagde erin de eiwitmantel op diverse manieren te wijzigen, zonder dat hierdoor evenwel een permanente verandering van het genoom (mutatie) optrad. Later is men zich er tenvolle van bewust geworden dat de nucleïnezuren dragers zijn van alle erfelijke informatie, en de aminozuuropeenvolging van de eiwitten rechtstreeks bepalen (zie sectie 0.0.). Het beste bewijs voor dit primordiaal belang van het nucleïnezuur, zowel RNA als DNA, is wel dat men het kan isoleren, en met dit gezuiverd preparaat infectie bekomen welke tot synthese leidt van nieuwe, volledige virussen. Dit geldt zowel voor RNA-bevattende virussen van plant (GIERER en SCHRAMM, 1956; FRAENKEL-CONRAT e.a., 1957; KAPER en STEERE, 1959; HASELKORN, 1962), dier (ALEXANDER e.a., 1958; SCHUSTER, 1960) en bacterie (DAVIS, e.a., 1961) als voor DNA-bevattende virussen van dier (LATARJET e.a., 1958; DI MAYORCA e.a., 1959) en bacterie (GUTHRIE en SINSHEIMER, 1960; MEYER e.a., 1961). Aan de basis van deze proeven ligt evenwel de noodzaak om de zuiverheid van het bereide nucleïnezuur nauwgezet na te gaan, teneinde tot de afwezigheid van geringe hoeveelheden van een essentiële niet-nucleïnezuur factor te kunnen besluiten. Dergelijke karakterisering werd het meest uitvoerig verricht met het nucleïnezuur van TMV (GIERER en SCHRAMM, 1956; FRAENKEL-CONRAT e.a., 1957), van het gele mozaïek virus van de raap (HASELKORN, 1962) en van de bacteriofaag ϕ X-174 (sectie 0.3.). Waarschijnlijk mogen de besluiten, getrokken uit proeven met deze systemen, veralgemeend worden tot de andere infectieve nucleïnezuren, waarvan ofwel niet genoeg materiaal kan verzameld worden om fysico-chemische analyses toe te laten, of waarvan de zuiverheid onvoldoende is (nucleïnezuren, geïsoleerd uit geïnfecteerde cellen).

Tenslotte willen wij nog even het probleem bespreken of virussen als "levend" of als "levensloos" moeten beschouwd worden. Vele virussen, maar zeker niet alle, kunnen gekristalliseerd worden, juist zoals vele eiwitten. Het vermogen tot kristallisatie hangt waarschijnlijk af van de vorm en de ladingsverdeling op het viraal oppervlak. Sommige kleine virussen zijn bijvoorbeeld moeilijk te kristalliseren (het TMV geeft in vitro slechts pseudo-kristallen) terwijl sommige zeer grote virussen, prachtige kristallen kunnen vormen (bijvoorbeeld het 130 m μ grote Tipula iridescent virus ; KLUG e.a., 1959). Alle kristallografische bouwstenen zijn volledig identiek, en in dit opzicht is er bijgevolg geen fundamenteel verschil tussen de virussen en de gekristalliseerde eiwitten, en - bij uitbreiding - de anorganische kristallen. Anderzijds kunnen wij volgens NORTHROP (1961), welke meer dan vier decennia over kristallijne eiwitten, autokatalytische enzymen en virussen gewerkt heeft, het leven definiëren als het vermogen tot autoduplicatie met verbruik van uitwendige vrije energie. In deze zin kunnen de virussen en zelfs de infectieve nucleïnezuurmoleculen als "levend" beschouwd worden. Besluit : "De natuur maakt tussen het levende en het levensloze rijk een zo geleidelijke overgang, dat de scheidingslijnen welke hen verdelen vaag en betwifelbaar zijn" (ARISTOTELES).

0.3. DE BACTERIOFAAG ØX 174.

SERTIC en BULGAKOV, werkzaam in het laboratorium M.F. d'Herelle te Parijs, isoleerden in 1933 een reeks bacteriofagen uit afvalwater (SERTIC en BULGAKOV, 1935 ; BULGAKOV en BONET-MAURY, 1944). Eén dezer, ØX-174 (Phage groep X, nummer 174) trok bijzonder hun aandacht wegens de relatieve stabiliteit tegenover verwarming en "veroudering" (weinig spontane mutaties). Het virus infecteerde zowel sommige E. coli stammen als Shigella paradysenteriae stammen. Ultrafiltratie en bestraling met radon (BONET-MAURY en BULGAKOV, 1944), duidde op een zeer kleine dimensie, waarschijnlijk 18 m μ \pm 5. Ook ultracentrifugatie wees op een diameter van ongeveer deze grootteorde (LEPINE e.a., 1944). De aan de basisliggende veronderstellingen en experimentele technieken weerstaan evenwel niet aan de tegenwoordige kritiek (zo werd voor de faag een densiteit van 1.25 aangenomen, in plaats van 1.40).

Vijftien jaar later werd het virus door SINSHEIMER (1959, a) uit de vergetelhoek gehaald, waar het stilaan verzeild was geraakt. Het groot belang lag voor de hand. Immers de ontwikkeling van een nieuwe wetenschap, de moleculaire biologie, liet de mogelijkheden voorzien om de zo belangrijke infectieprocessen op een moleculaire schaal te bestuderen. Het voordeel van een bacteriofaag systeem voor fundamenteel virologisch onderzoek werd in vorige sectie uiteengezet. En aangezien men logischerwijze mag verwachten dat hoe kleiner het virus, hoe minder complex het probleem is, bleek de bacteriofaag ØX-174 een uitgelezen proefobject te zijn (een andere bacteriofaag S13 welke serologisch verwant is met ØX 174 - ZÄHLER, 1958 - en even geringe dimensies bezit, blijkt genetisch niet zo stabiel te zijn).

Het virus werd gezuiverd door (NH₄)₂SO₄-fractionatie, preparatieve ultracentrifugatie en centrifugatie in een CsCl densiteitsgradiënt. Met behulp van de analytische centrifuge of de elektronenmicroscop kunnen geen onzuiverheden waargenomen worden. Minstens 25 tot 50 % van de virusdeeltjes kunnen infectie veroorzaken ("plaque"-vormers ; zie sectie 1.1.3.1.2.). Het virus is een

0,018 μ

bijna sfeervormige polyeder, waarschijnlijk een icosaeëder, met een diameter van 25 μ m (SINSHEIMER, 1959 a ; HALL e.a., 1959 ; MAC LEAN e.a., 1962). Het bevat 25,5 % DNA (dit verantwoordt 80 % van de totale hoeveelheid fosfor) en de rest is waarschijnlijk bijna uitsluitend eiwit. Een cellysaat (Nota 3) bevat eveneens "geesten" tzt. virusdeeltjes welke geen of zeer weinig nucleïnezuur bevatten (EIGNER e.a., 1963). (Dergelijke "geesten" zijn voor veel virussystemen bekend, zoals voor het TMV en voor het gele mozaïek virus van de raap).

Zoals vermeld in voorgaande sectie (0.2.) kan de kristalvorm alleen bewezen worden door X-stralenverstrooiing, maar tot nog toe slaagde niemand er in kristallen van ϕ X-174 te bekomen. Wel werden zeer goede elektronenmicroscopische opnamen verwezenlijkt, en op basis hiervan kan het bestaan van 12 knoppen afgeleid worden, ieder op de vertex van een icosaeëder gelegen (TROMANS, 1961 ; MAC LEAN e.a., 1962). Aangezien door iedere vertex een vijftallige symmetrieas gaat, bestaat iedere knop uit evenveel eenheden. De virusmantel zou bijgevolg uit 60 eenheden (of een veelvoud) bestaan. Op basis van de hoeveelheid eiwit per virusdeeltje ($4,5 \times 10^6$ Daltons) berekent men een maximum moleculair gewicht van 75°000 per eiwiteenheid. Fysico-chemisch en chemisch kan men evenwel eiwiteenheden met een moleculair gewicht van 25°000 aantonen (CARUSI en SINSHEIMER, 1961 ; Dr. E. CARUSI, persoonlijke mededeling). Bijgevolg ofwel bestaat iedere kristallografische bouwsteen (M.G. 75°000) uit 3 onder-eenheden (M.G. 25°000) ofwel bevat het virus benevens het "mantel" eiwit nog andere proteïnen. Hiervoor werd een aanwijzing bekomen op elektronenmicroscopische opnamen (Dr. E. MAC LEAN, persoonlijke mededeling).

Het DNA ligt centraal in het virusdeeltje, maar is evenwel toegankelijk voor zekere reagentia, zoals formaldehyde. Het DNA kan geïsoleerd worden, bijvoorbeeld door behandeling met gebufferde fenol (SINSHEIMER, 1959 b). Het heeft een moleculair gewicht van $1,7 \times 10^6$, bepaald door lichtverstrooiing. Hieruit volgt dat er per virusdeeltje maar één molecule DNA aanwezig is. De baseverhouding is 1,00 adenine, 1,33 thymine, 0,98 guanine en 0,75 cytosine. De pyrimidine-opeenvolging is nagenoeg in overeenstemming met een statistische distributie (HALL en SINSHEIMER, 1963 ; Dr. J. HALL, persoonlijke mededeling).

Tot eenieders verwondering bleek ϕ X-DNA niet dubbelstrengig te zijn, zoals alle andere gekende DNA-preparaten (zie sectie 0.1), maar wel enkelstrengig. Bijgevolg heeft ϕ X-DNA de chemische eigenschappen van DNA (bijvoorbeeld stabiliteit in alkalisch midden), maar de fysico-chemische eigenschappen van RNA (bijvoorbeeld een statistisch kluwen-structuur, welke afhankelijk is van de ionensterkte en de temperatuur). Het besluit van een enkelstrengige keten is gebaseerd op volgende experimentele resultaten :

1. Radiochemisch onderzoek : 32 P ingebouwd in een dubbelstrengige DNA-keten heeft bij 4°C één kans op 10 om bij desintegratie de keten te breken (HERSHEY e.a., 1951 ; STENT en FUERST, 1955). Bij ϕ X-174 leidt iedere 32 P-desintegratie evenwel tot ketenbreuk (TESSMAN e.a., 1957).

2. Chemisch onderzoek : a) De base-samenstelling is niet complementair (zie hoger). b) Het ϕ X-DNA reageert bij kamertemperatuur met formaldehyde, terwijl in natief DNA de aminogroepen niet voor deze reactie beschikbaar zijn (SINSHEIMER, 1959 b, zie sectie 3.2.1.) c) Het kan door Pb^{++} neergeslagen worden onder voorwaarden waarbij natief DNA oplosbaar blijkt.

3. Fysico-chemisch onderzoek : a) De hypochromiciteit vertoont niet alleen geen scherp smeltpunt, maar is daarenboven in overeenstemming met een structuur voorzien van minder waterstofbrug-

Nota 3 : Een lyaat is een cultuur van cellen welke gedesintegreerd zijn door gedeeltelijk oplossen van de celwand, bijvoorbeeld met lysozyme of met $CHCl_3$.

gen dan gedatureerd DNA (dit is begrijpelijk aangezien gedatureerd DNA complementair is en bijgevolg een grotere kans voor renaturatie over korte afstanden bestaat). b) De hypochromiciteit is eveneens een functie van de ionensterkte, waaruit volgt dat de structuur afhangt van de zoutconcentratie. c) De extinctiecoëfficiënt ϵ_p is veel hoger dan van natief DNA. d) Fysico-chemische parameters welke een functie zijn van de structuur (bijvoorbeeld sedimentatieconstante en gyratieradius) veranderen in sterke mate met de ionenconcentratie. e) De densiteit is 0,02 eenheden hoger dan natief DNA met hetzelfde G + C gehalte.

4. Enzymologisch onderzoek : De kinetiek van de vermindering in gemiddeld moleculair gewicht bij inwerking van een endonuclease wijst eveneens op een enkelstrengige structuur.

Het belang der ontdekking van enkelstrengig DNA kan niet genoeg beklemtoond worden. Voor het eerst immers werd hier als het ware een haploïde vorm gevonden van een molecule welke universeel en in alle levende wezens in de dubbelstrengige vorm aanwezig is. De vraag rijst of het hier gaat om een zeer speciaal geval, ofwel of ϕ X-174 de eerste vertegenwoordiger is van een nieuwe klasse virussen. Hierop kan vooralsnog geen antwoord gegeven worden. Wel werd medegedeeld dat vaccinia eveneens enkelstrengig zou zijn (PFAU en MC CREA, 1962 a) maar dit kon later niet bevestigd worden (PFAU en MC CREA, 1962 b ; JOKLIK, 1962). Ook werd uit melkzuur dehydrogenase een DNA met slechts 30 % secundaire structuur geïsoleerd, maar de biologische functie van deze verbinding is onzeker (MAHLER en DA SILVA PEREIRA, 1962). Vermelden wij nog dat het DNA van zekere oncogenische virussen eveneens in zekere opzichten een afwijkend gedrag vertoont. Zo bijvoorbeeld verhoogt de biologische activiteit van polyoma-DNA in sterke mate bij verwarming onder voorwaarden waarbij dubbelstrengig DNA smelt en de transformerende activiteit grotendeels verloren gaat (WEIL, 1963).

Het besluit is dat ϕ X-DNA wegens zijn eenvoudige structuur unieke mogelijkheden biedt, zowel voor chemisch onderzoek als voor studie van de infectieprocessen in vivo. Daarenboven is ϕ X-DNA eveneens onmisbaar gebleken voor onderzoekingen op andere gebieden, waarbij men een enkelstrengig DNA nodig had (SETLOW, 1960 ; FRASER en MAHLER, 1961 ; CHAMBERLIN en BERG, 1962 ; STOLLAR e.a., 1962 ; HURWITZ e.a., 1962 ; APOSHIAN en KORNBERG, 1962).

GUTHRIE en SINSHEIMER (1960) hebben aangetoond, dat het DNA geïsoleerd uit de bacteriofaag ϕ X-174 infectief is en tot synthese van volledig virus kan aanleiding geven. Het is bijgevolg de drager van alle erfelijke informatie. Hiermee was voor het eerst een infectief DNA ontdekt, geïsoleerd uit een zuiver virus. Wel kende men reeds sinds enkele jaren infectief, viraal RNA (GIERER en SCHRAMM, 1956 ; FRAENKEL-CONRAT e.a., 1957 ; ALEXANDER e.a., 1958 ; SCHUSTER, 1960) en ook infectief DNA, bekomen door extractie van virus-geïnduceerde tumors (LATARJET e.a., 1958 ; DI MAYORCA e.a., 1959). Onafhankelijk van GUTHRIE en SINSHEIMER hebben ook Franse, Duitse en Japanse onderzoekers (WAHL e.a., 1960 ; HOFSCHEIDER, 1960 ; SEKIGUCHI e.a., 1960 ; HUPPERT e.a., 1962) infectie bekomen met geïsoleerd ϕ X-DNA. Alleen de Amerikaanse onderzoekers hebben evenwel nauwkeurig het geïsoleerd nucleïnezuur fysico-chemisch gekarakteriseerd, en aangetoond dat hoogstens sporen eiwit in de gezuiverde preparaten aanwezig zijn. Onder optimale voorwaarden kan ongeveer 3 % van de DNA-moleculen tot infectie

aanleiding geven (dit is aanzienlijk hoger dan de efficiëntie van $< 10^{-6}$ die met plantvirussen bekomen wordt). ϕ X-DNA kan niet opgenomen worden door de normale waardcellen (meestal E. coli C), aangezien de specifieke eiwit-celwand interactie uitgesloten is. Teneinde opname, gevolgd door infectie te kunnen bekomen, is het nodig de celwand te verwijderen, bijvoorbeeld door inwerking van lysozyme. Aldus verkrijgt men protoplasten (sommige onderzoekers gebruiken alleen de naam "protoplast" voor celwandloze Gram-positieve bacteriën, en "sferoplasten" voor Gram-negatieve, zoals E. coli; GIBBY-SEN, 1962). Aangezien bij protoplasten specifieke virusreceptoren uitgeschakeld zijn, is het mogelijk met ϕ X-DNA protoplasten te infecteren van E. coli stammen, welke normaal resistent zijn tegenover het virus.

Een aanvang werd gemaakt met de studie van de processen die plaats grijpen na opname van ϕ X-DNA door een gevoelige waardcel (SINSHEIMER, 1961; KOZINSKI, 1961; RUECKERT en ZILLIG, 1962; SINSHEIMER e.a., 1962). Twee minuten na het toevoegen van ϕ X-174 aan een cultuur van de waardenbacterie E. coli C is de adsorptie volledig. Het vrijstellen van het infectief DNA uit de eiwitmantel is een relatief traag proces (in vergelijking met bijvoorbeeld infectie door T-even fagen, die praktisch onmiddellijk in eclips gaan (Nota 4)). 5 tot 8 minuten na infectie kan reeds nieuw gesynthetiseerd viraal eiwit aangetoond worden. Na 8 tot 11 minuten verschijnen de eerste intracellulaire virussen, en na 17 minuten beginnen sommige cellen opente springen, met vrijlating van ongeveer 300 tot 400 nieuwe virussen per cel. Door SINSHEIMER werd de belangrijke vaststelling gemaakt dat het viraal DNA onmiddellijk na vrijstellen uit de eiwitmantel in een dubbelstrengige vorm, "RF" genoemd, omgezet wordt. Deze "RF"-factor vermenigvuldigt ongeveer 50 maal, en is zelf eveneens infectief voor protoplasten. Door toedoen van of ten koste van deze "RF" wordt dan enkelstrengig ϕ X-DNA gevormd, welke dadelijk wordt ingebouwd in viraal eiwit. Bijgevolg is op geen enkel ogenblik vrij, viraal, enkelstrengig DNA aantoonbaar.

0.4. PROBLEEMSTELLING.

Uit voorgaande sectie blijkt dat ϕ X-DNA een uniek proefmateriaal uitmaakt voor de studie van het verband tussen chemische structuur en biologische activiteit van een nucleïnezuur. Immers, bij de aanvang van deze studie, was dit vrijwel het enig homogeen nucleïnezuur, dat zich leende tot chemisch, fysisch en biologisch onderzoek. Door combinatie van deze drie disciplines kon een onbetwifelbare interpretatie gegeven worden aan de bekomen resultaten.

Zoals in sectie 0.3. werd uiteengezet veronderstelde men dat ϕ X-DNA bestond uit één enkele keten, samengesteld uit 5°500 nucleotiden, en waarvan de opeenvolging de informatie uitmaakte van de virale genen. Het idee van ons werk was de DNA-keten op een welbepaalde plaats te wijzigen, en na te gaan hoe de genetische informatie hierdoor verstoord was. Een globaliseerde en chemisch identificeerbare modificatie van een

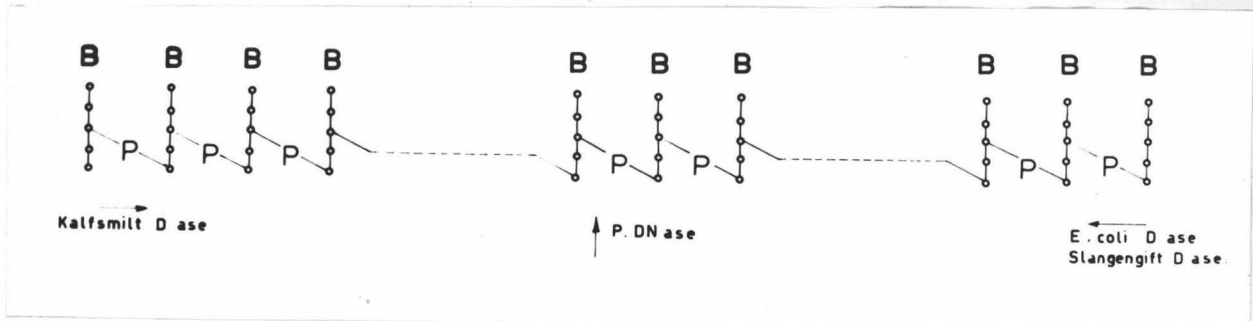
Nota 4 : De eclips is de periode volgend op de infectie, en gedurende dewelke geen infectief virus in de cel kan aangetoond worden.

nucleïnezuur kan bekomen worden door behandeling met een exonuclease. Dit is een enzyme welke langs één zijde der keten terminale nucleotiden afsplitst (Fig. 3). Bij intrede van een dergelijke, kunstmatig verkorte DNA-keten in een gevoelige waardcel, mag men veronderstellen dat één gen zich niet meer kan uitdrukken, omdat het onvolledig is. Dit gen kan mogelijks geïdentificeerd worden (bijvoorbeeld door het verlies van de capaciteit tot vormen van manteleiwit). Dit zou in principe chemische lokalisatie van een gen toelaten, een resultaat welke tot nog toe met geen enkel systeem werd bereikt (in tegenstelling met genetische lokalisatie).

Dergelijke experimenten kunnen daarenboven nog een ander probleem helpen oplossen. Zoals uiteengezet in sectie 0.0. wordt tegenwoordig verondersteld dat de opeenvolging van drie nucleotiden de informatie bevat voor één aminozuur ("triplet code"). Indien men nu ϕ X-DNA ketens gebruikt waarvan respectievelijk slechts drie, zes of $3n$ nucleotiden verwijderd zijn, mag men aannemen dat het eiwit, gevormd door het eindstandig gen, één, twee of n aminozuren minder zal bevatten. Eiwitten, welke op dergelijke manier geamputeerd zijn, behouden dikwijls nog hun biologische activiteit. Dit is onder meer aangetoond geworden met papaine (HILL en SMITH, 1956), pancreas ribonuclease (KALNITSKY en ROGERS, 1956 ; ROGERS en KALNITSKY, 1957 ; GINSBURG, en SCHACHMAN, 1960 ; VITHAYATHIL en RICHARDS, 1961) en pepsine (PERLMANN, 1954). Bijgevolg heeft men met dit systeem in principe de mogelijkheid om door directe chemische analyse der eindgroepen van het viraal RNA en van een identificeerbaar eiwit, een oplossing te vinden voor het "coding" probleem, tzt. welke volgorde van drie nucleotiden met een bepaald aminozuur overeenstemt.

Het succes van een dergelijke benadering van het probleem hangt in de eerste plaats af van de selectiviteit van het gebruikte exonucleolytisch enzyme. In dit verband mochten wij ons gelukkig achten te kunnen beschikken over de *Escherichia coli* fosfodiesterase, welke toen juist door Dr. I. LEHMAN (1960) was afgezonderd geworden, en waarvan hij ons een gedeelte schonk.

Praktisch is ons onderzoek enigszins een andere weg opgegaan. Immers het bleek dat ϕ X-DNA geen rechte keten is, maar wel een gesloten cirkel. Hiermee wordt voor het eerst een chemische en fysische basis gegeven voor het bestaan van cyclische chromosomen, die bij vele, meer complexe organismen werden aangetoond door louter genetische experimenten. Verder werd aangetoond dat één abnormale schakel of "gesp" aanwezig is per ring van $5^{\circ}500$ schakels.



Figuur 3 : De degradatie van een DNA-keten door enzymen.

De DNA-keten wordt schematisch voorgesteld :

- B base (adenine, guanine, thymine of cytosine).
- o koolstof van de ribose
- P fosfaat (diëster tussen een C'₃-OH en een C'₅-OH).

Endonuclease : Pancreas desoxyribonuclease (P.DNase) hydrolyseert op nagenoeg willekeurige wijze fosfodiesterbindingen, met vorming van C'₃-OH eindgroepen.

Exonucleasen : E. coli fosfodiësterase en slangengift fosfodiësterase tasten een C'₃-OH terminus aan, en splitsen trapsgewijze 5'-mononucleotide-eenheden af.

Kalfsmilt fosfodiësterase tast de C'₅-OH terminus aan, en splitst trapsgewijze 3'-mononucleotide-eenheden af.

Geen enkel van deze enzymen heeft een uitgesproken specificiteit voor bepaalde basen.

1. MATERIALEN EN METHODEN.

1.0. MATERIALEN.

1.0.0. HET VIRUS ØX-174.

Het virus werd gekweekt en gezuiverd zoals beschreven door SINSHEIMER (1959 a). De procedure omvat volgende stappen :

1. De waardcel E. coli C wordt gekweekt tot een concentratie van 10^9 per l.
2. De infectie wordt gestart door het toevoegen van 10 virussen per bacterie (de bepaling van de virusconcentratie wordt beschreven in sectie 1.0.3.). De aëratie wordt voortgezet tot geen verhoging van de virustiter meer optreedt (5 uur). Verdere behandelingen geschieden bij 2 - 3°C.
3. Het lysaat wordt gefractioneerd door toevoegen van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tot 90 % van het virus is neergeslagen.
4. Het virus wordt geëluëerd, en de onoplosbare celfragmenten worden verwijderd.
5. Een tweede $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -fractionatie wordt toegepast.
6. Het virus wordt terug opgelost, gedialyseerd en neergeslagen door ultracentrifugatie bij pH 10,3. Deze bewerking wordt herhaald.
7. Het virus wordt gecentrifugeerd in een RbCl gradiënt. Het virus vormt een band bij een densiteit van 1,40.
8. Het virus wordt in een boraatoplossing ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ verzadigd bij 0°C) gebracht door dialyse.

Vertrekkend van 20 l lysaat bekomt men ongeveer 10 mg gezuiverd virus. 25 tot 50 % van de virusdeeltjes zijn "plaque"-vormers (Nota 5). De overige deeltjes kunnen ofwel genetisch geïnactiveerd zijn (beschadiging van het DNA), ofwel vegetatief (degradatie van het manteleiwit of inhibitie van adsorptie door complexvorming met het manteleiwit).

Voor de groei van virus, gemerkt met ^{32}P , wordt 10 mc $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ toegevoegd aan 75 ml cultuurmedium. Onder deze voorwaarden bedraagt de verhouding $^{31}\text{P}/^{32}\text{P}$ 15.000. Op de dag van de bereiding bevatten 24,3 % van de virusdeeltjes één ^{32}P -atoom, en slechts 5 % meer dan één ^{32}P -atoom. Op deze wijze wordt vermeden dat door radioactieve desintegratie teveel fragmenten zouden ontstaan, welke nog ^{32}P bevatten.

1.0.1. HET VIRAAAL ØX-DNA.

Het enkelstrengig DNA wordt uit het virus geïsoleerd door behandeling met fenol. Dit wordt juist voor gebruik gedestilleerd, en daarna verzadigd met een boraatoplossing. Aan de virusoplos-

Nota 5 : Een virusdeeltje welke terecht komt op een dunne, continue laag gevoelige waardcellen, bijvoorbeeld gekweekt in een Petri-schaal, gaat zich vermenigvuldigen. Aldus ontstaat na incubatie (bijvoorbeeld 3 uur bij 37°C) een gaatje of "plaque" van enkele mm diameter, te wijten aan lyse van de waardcellen.

sing, bijvoorbeeld 3 ml, wordt een gelijk volume fenol toegevoegd, en het mengsel gedurende 3 min. geschud op een "Vortex mixer" (Scientific Ind.). De fasen worden gescheiden door centrifugatie, en de bovenstaande waterige oplossing, welke het DNA bevat, voorzichtig afgenomen met een speciale omgebogen pipet. De fenolfase en de gedenateerd eiwit bevattende interfase worden op dezelfde wijze uitgewassen met een half volume boraatoplossing. De originele, waterige fase wordt opnieuw met verse fenol behandeld, en dit in totaal viermaal. De fenolfase wordt telkens met dezelfde oplossing nagewassen. Tenslotte wordt deze wasvloeistof aan het extract toegevoegd.

De opgeloste fenol wordt verwijderd door drie extracties met ethylether. Vervolgens wordt de opgeloste ether vervluchtigd door inblazen van N_2 -gas. Het ϕX -DNA wordt in een 0,2 M NaCl + 0,001 M Trisbuffer pH 7,5-oplossing gebracht door herhaalde dialyse in een cellofaanhuls, vooraf gezuiverd van UV-absorberende verbindingen door uitkoken in een 1 M $NaHCO_3$ -oplossing.

Van elk DNA-preparaat wordt een absorptiespectrum opgenomen bij 37°C ("Beckman DK2"). Het maximum ligt bij 258 m μ , het minimum bij 230 m μ en de verhouding bedraagt 2,34. De concentratie ϕX -DNA wordt bepaald op basis van de optische dichtheid bij 260 m μ ; men neemt een $E_{260}^{1\%}$ -waarde aan (extinctie per nucleotide equivalent) van 8 \cdot 700. (P) De opbrengst, op basis van het DNA in het intacte virus, bedraagt ongeveer 80 %. De virale DNA-oplossing wordt bewaard bij -15°C.

1.0.2. HET KALFSTHYMUS-DNA.

Hooggepolymeriseerd kalfsthymus-DNA werd aangekocht bij "Worthington Biochemical Corp.". Het preparaat is vrij van eiwit, en werd bereid volgens de methode van ZAMENHOF (1957).

1.0.3. ENZYMEN.

1.0.3.0. Inleiding.

Algemeen wordt aangenomen dat slechts volgende mogelijkheden open staan voor enzymologische afbraak van nucleïnezuren :

- a) Het verwijderen van eindstandige nucleotiden door exonucleasen. Op te merken valt dat exonuclease-activiteit nagenoeg vrij is van de zeer frequent voorkomende endonucleasen (desoxyribonucleasen of ribonucleasen). Bijgevolg, alhoewel exonucleasen misschien tamelijk verspreid zijn in de natuur (FIERS, 1960 ; RAZZELL, 1961 ; ANDERSON en HEPPEL, 1960) werden tot nog toe slechts drie verschillende exonucleasen zo ver gezuiverd dat ze bruikbaar zijn voor structuuronderzoek van hun substraat. Het zijn de *E. coli* fosfodiësterase (sectie 1.0.3.1.), slangengift fosfodiësterase (sectie 1.0.3.2.) en kalfsmilt fosfodiësterase (sectie 1.0.3.3.). De *E. coli* en de slangengift fosfodiësterase tasten het C'_{3} -OH ketenuiteinde aan (Fig. 3) en stellen stap voor stap terminale C'_{5} -mononucleotiden in vrijheid. Kalfsmilt fosfodiësterase heeft een analoge werkwijze, maar start aan de C'_{5} -OH terminus en vormt 3'-nucleotiden. Zeer recent

hebben wij een nieuwe exonuclease afgezonderd uit *Lactobacillus acidophilus* R26 (FIERS en KHORANA, 1963). Dit enzyme heeft nage-
noeg dezelfde specificiteit als dit van kalfsmilt, maar heeft het
voordeel meer vrij te zijn van contaminerende endonuclease en
van transfer-activiteit.

- b) Het hydrolyseren van niet-eindstandige fosfodiësterbindingen door
endonucleasen. Over het algemeen zijn de enzymen specifiek het-
zij voor RNA, hetzij voor DNA (een uitzondering schijnt bijvoor-
beeld het *Micrococcus* enzyme te zijn, RUSHIZKY e.a., 1962 ; RO-
BERTS e.a., 1962). De desoxyribonucleasen worden onderverdeeld
in twee typen : Type I, met als voornaamste vertegenwoordiger
de kristallijne pancreas desoxyribonuclease (sectie 1.0.3.4.)
splitst de internucleotide-binding tussen het fosfaat en de
C'₃-OH (Fig. 3), heeft een licht alkalisch pH-optimum, en ver-
eist Mg⁺⁺-ionen. Type II, zoals kalfsmilt desoxyribonuclease
(KOERNER en SINSHEIMER, 1957), splitst de fosfaat-C'₅-OH binding,
heeft een lichtzuur pH-optimum en vereist geen Mg⁺⁺-ionen.
- c) Nucleïnezuren welke beginnen op een C'₅-fosfaat of eindigen op
een C'₃-fosfaat kunnen in principe gedefosforyleerd worden door
niet-specifieke fosfomonoësterasen. Deze activiteit kan men even-
wel slechts aantonen indien verdere enzymatische afbraak van het
nucleïnezuur uitgesloten is. Fosfatasen zijn eveneens enzymen
welke in vrijwel alle levende cellen voorkomen. De meest gezuiv-
erde, en dan ook best bestudeerde fosfatasen zijn deze van de
menselijke prostaat (BOMAN, 1958) en vooral het recent geïsoleer-
de enzyme van *E. coli* K12 (sectie 1.0.3.5.). Eerstgenoemde, de
menselijke prostaatfosfatase, werd in het verleden veelvuldig ge-
bruikt voor defosforylatie van oligonucleotiden. Het enzyme ver-
toont evenwel de nadelen van een dalende activiteit bij stijgen-
de polymeerlengte, en van steeds vergezeld te zijn van een gerin-
ge diësterase-activiteit.

1.0.3.1. Escherichia coli fosfodiësterase.

Een ver gezuiverd enzymepreparaat werd ons geschonken door
Dr. I.R. LEHMAN (Stanford University). De stockoplossing bevatte
16°600 eenheden/ml en 3,05 mg/ml (Voor definitie van eenheden zie
LEHMAN, 1960). De stockoplossing werd verdund 1/50 in steriele
0,1 % gelatineoplossing ingesteld op pH 8,0 en na verdeling in
1 ml aliquots, bewaard bij -10°C. Eenvoudigheidshalve wordt de en-
zymeconcentratie steeds aangegeven als μ l van deze verdunde stan-
daardoplossing.

De *E. coli* fosfodiësterase, beschreven door LEHMAN (1960) ver-
toont een optimale activiteit bij pH 9,2 tot 9,8 en vereist 1,5
tot 30 mM Mg⁺⁺. Zoals vermeld in vorige sectie tast dit enzyme
het C'₃-OH ketenuiteinde van een nucleïnezuur aan, door stapsge-
wijze eindstandige 5'-mononucleotiden in vrijheid te stellen
(Fig. 3). Het verschilt van slangengift fosfodiësterase (sectie
1.0.3.2.) door een engere specificiteit. Immers ribose-derivaten
en di-p-nitrofenylfosfaat worden niet gehydrolyseerd (Dr. I. LEH-
MAN, persoonlijke mededeling). Daarentegen kunnen desoxyribonu-
cleïnezuren met ongewone basesamenstelling wel afgebroken worden
zoals de bacteriofaag T-even-DNA's, welke geglycosyleerde hydroxy-
methylcytosine bevatten). Het enzyme vertoont eveneens de speciale
eigenschap om alleen enkelstrengig DNA af te breken. Aangezien de
meeste, natuurlijk voorkomende DNA's dubbelstrengig zijn (sectie
0.1.), moeten deze eerst gedenatureerd worden, bijvoorbeeld door
verwarming, vooraleer als substraat te kunnen dienen. Deze bij-
zondere karakteristieken hebben er toe geleid dat dit enzyme vlug-
ge ingang heeft gevonden bij het structuuronderzoek van nucleïne-
zuren, bijvoorbeeld om de aanwezigheid van enkelstrengig naast
dit van dubbelstrengig DNA aan te tonen (LEHMAN en PRATT, 1960,
MARMUR en GROSSMAN, 1961 ; SCHILDKRAUT e.a. 1961 ; STOLLAR en
GROSSMAN, 1962 ; FALASCHI e.a., 1963).

1.0.3.2. Slangengift fosfodiësterase.

Een enzymeoplossing werd ons ter beschikking gesteld door Dr. J.B. HALL. Het preparaat was gezuiverd volgens de methode van KOERNER en SINSHEIMER, 1957, gevolgd door kolomchromatografie op DEAE-cellulose (FELIX e.a., 1960). De oplossing, welke enzyme, 1 mM MgCl₂ en 10 mM Tris buffer pH 8,8 bevatte, werd verdeeld in 0,5 ml aliquots en bewaard bij -10°C. Ieder aliquot diende slechts voor één experiment.

De eigenschappen van het enzyme werden in een vorige verhandeling besproken (FIERS, 1960). Slangengift fosfodiësterase breekt nucleïne-zuren af tot 5'-mononucleotiden (Fig. 3). Alhoewel het enzyme een uitgesproken voorkeur vertoont voor een vrije C'₃-OH-terminus, blijkt het toch geen stricte exonuclease te zijn. Immers RAZZELL en KHORANA (1959) konden endonuclease-activiteit aantonen in de meest gezuiverde slangengift fosfodiësterase preparaten. Daarenboven kunnen ketens, welke eindigen op een C'₃-fosfaatgroep, toch afgebroken worden, met vorming onder meer van nucleoside-3',5'-difosfaten (CRESTFIELD en ALLEN, 1956; RUSHIZKY e.a., 1961). Deze endonuclease-activiteit splitst de C'₃-fosfaat binding, en is bijgevolg niet te wijten aan de slangengift endonuclease, beschreven door GEORGATSOS en LASKOWSKI (1962) aangezien dit enzyme de fosfaat-C'₅ binding hydrolyseert.

Slangengift fosfodiësterase verschilt nog in een belangrijk opzicht van de hoger beschreven E. coli fosfodiësterase: Het enzyme kan zowel natief als gedenatureerd DNA afbreken (BOMAN en KATETTA, 1957; WILLIAMS e.a., 1961).

1.0.3.3. Kalfsmilt fosfodiësterase.

Een enzymepreparaat, bereid volgens HILMOE (1960), werd aangekocht bij "Worthington Biochemical Corp.". Voor de meeste experimenten werd het enzyme verder gezuiverd door adsorptie aan calciumfosfaat-gel, zoals beschreven door RAZZELL en KHORANA (1961). De oplossing werd nadien gedialyseerd tegenover 0,01 M natriumsuccinaatbuffer pH 6,5 + 0,001 M EDTA + 0,001 % Tween-80 (Atlas Comp.), en bewaard bij 2°C.

De activiteit wordt op een analoge wijze bepaald als deze van de E. coli diësterase. Het reactiemengsel, bevattende enzyme, 0,166 mg/ml kalfsthymus-DNA, 33 mM natriumsuccinaatbuffer pH 6,5, en 0,33 mM EDTA, wordt geïncubeerd bij 30°C. Dezelfde eenheid wordt gebruikt als voor de E. coli fosfodiësterase (LEHMAN, 1960; sectie 1.0.3.1.), namelijk de hoeveelheid enzyme welke 10 m μmole mononucleotide vrijstelt in 30 min. Experimenteel is gebleken dat één Lehman-eenheid milt diësterase ongeveer gelijk is aan één Hilmoë-eenheid (HILMOE, 1960). Nochtans komt laatstgenoemde overeen met een meer dan 1000 maal hogere activiteit, uitgedrukt in μmole gehydrolyseerd per tijdseenheid. Dit verschil is te wijten aan de geringere afbraaksnelheid van kalfsthymus-DNA (sectie 2.1.1.), vergeleken met deze van de door HILMOE gebruikte oligonucleotiden.

Het enzyme vertoont een optimale activiteit rond pH 6,5. Het vereist geen cofactor, en wordt zelfs door EDTA geactiveerd (HILMOE, 1960). Kalfsmilt fosfodiësterase is specifiek voor het C'₅-OH-einde van ribo- en desoxyribonucleïne-zuurketens, en vormt

3'-mononucleotiden door trapsgewijze afsplitsing van de terminale monomeren (RAZZELL en KHORANA, 1961). De actie van het enzyme is bijgevolg complementair met deze van de slangengift of *E. coli* fosfodiësterase. Onderzoek met cyclische oligonucleotideketens, welke in principe resistent zijn tegenover exonuclease-activiteit, heeft aangetoond dat contaminerende endonuclease-activiteit veel geringer is in kalfsmilt fosfodiësterase, dan in de slangengift preparaten, maar toch nog aantoonbaar blijft (Dr. G. KHORANA, persoonlijke mededeling). De zuivering van dit enzyme is nog van recente datum, en geen onderzoekingen zijn bekend over de actie op natuurlijke polynucleotiden. Wel vermeldt HILMOE (1960) dat hij geen afbraak van DNA kon aantonen. VANECKO en LASKOWSKI (1962) vonden geen hydrolyse indien de ketenlengte meer dan 50 desoxynucleotiden bedroeg.

1.0.3.4. Pancreas desoxyribonuclease.

Het enzyme, tweemaal gekristalliseerd, werd aangeschaft bij "Worthington Biochemical Corp". Een stockoplossing werd bereid, bevattende 0,3 mg enzyme en 1 mg rundsplasma albumine per ml.

Pancreas desoxyribonuclease werd het eerst gezuiverd en gekristalliseerd door KUNITZ (1950). Het pH-optimum bedraagt 7,0 en Mg^{++} -ionen verhogen de activiteit. Het hydrolyseert fosfodiësterbindingen in DNA, zonder uitgesproken voorkeur voor de aangrenzende basen. In tegenstelling met hoger beschreven exonucleasen, is het pancreas enzyme een zuivere endonuclease. De hydrolyse komt praktisch tot stilstand wanneer de gemiddelde ketenlengte 2 tot 3 bedraagt (VANECKO en LASKOWSKI, 1961; RALPH e.a., 1962). De keten wordt steeds gesplitst tussen de C'_3 en de fosfaatrest, zodat een brokstuk met een C'_3 -OH-eindgroep ontstaat en een ander met een terminale C'_5 -fosfomonoëster. Volgens LEHMAN en medewerkers (1962) zou het enzyme een zekere voorkeur aan de dag leggen voor natief, dubbelstrengig DNA.

1.0.3.5. Escherichia coli fosfomonoësterase.

Een chromatografisch gezuiverd enzymepreparaat werd aangekocht bij "Worthington Biochem. Corp.". De activiteit werd bepaald volgens TORRIANI (1960), waarbij p-nitrofenylfosfaat gebruikt wordt als substraat. Aangezien nog residuele endonuclease activiteit in deze preparaten aantoonbaar was (sectie 2.0.2.) hebben wij een verdere zuiveringstrap uitgewerkt: Men verdunt het handelspreparaat, zodat een oplossing bekomen wordt welke 1 tot 2 mg enzyme per ml, 0,1 M NaCl, 5×10^{-3} M Tris buffer pH 8,6 en 0,01 M $MgCl_2$ bevat. Het mengsel wordt gedurende 10 min. in een waterbad bij 90°C verwarmd, en na snelle afkoeling gedialyseerd tegenover 0,02 M glycinebuffer pH 9,2 + 0,002 M $MgCl_2$. De oplossing wordt vóór gebruik gedurende minstens een week in de koelkast bewaard, teneinde renaturatie toe te laten. 92 % van de enzymatische activiteit wordt gerecupeerd. De fosfatase-eenheid van TORRIANI (1960) wordt gebruikt, welke overeenkomt met de hoeveelheid enzyme dat bij 37°C 1 m μ mole anorganisch fosfaat vrijstelt per uur.

De vorming van relatief aanzienlijke hoeveelheden alkalische fosfatase door sommige *E. coli* stammen, gekweekt in anorganisch fosfaat-vrij milieu werd ontdekt door HORIUCHI (1959) en door TORRIANI (1960). Het enzyme werd gezuiverd en gekarakteriseerd door GAREN en LEVINTHAL (1960) en door HEPPEL en medewerkers (1962). De activiteit is optimaal tussen pH 8,0 en 9,8. Het enzyme wordt sterk geremd door complexerende verbindingen,

vooral EDTA, aangezien Zn^{++} deel uitmaakt van het actief centrum (PLOCKE e.a., 1962). Alle fosfomonoësters welke werden getest, konden door deze fosfatase gehydrolyseerd worden (HEPPEL e.a., 1962). Daarenboven waren de V_M en K_M -waarden, twee parameters van de enzymatische reactie-kinetiek, nagenoeg constant voor al de verbindingen. Hieruit volgt dat de specificiteit van het enzyme beperkt blijft tot de fosfaatrest, en niet beïnvloed wordt door de veresterde alcohol of de zuuranhydride. Een nadeel van dit enzyme is wel dat het sterk en competitief geremd wordt door één der reactieproducten, namelijk het anorganisch fosfaat. Hierdoor daalt de hydrolysesnelheid aanzienlijk bij toenemende defosforylatie. Wegens zijn speciale eigenschappen is de bacteriële, alkalische fosfatase thans het voorwerp van intens onderzoek op chemisch, fysico-chemisch en genetisch gebied (GAREN e.a., 1961).

1.1. METHODEN.

1.1.0. INLEIDING.

Het basisexperiment van dit onderzoek bestond in het incuberen van ϕX -DNA met een exonuclease (sectie 0.4.). Het enzyme stelt mononucleotiden vrij welke chemisch kunnen bepaald worden (sectie 1.1.1.). De genetische informatie wordt aldus onvolledig, zodat verlies van biologische activiteit kan optreden. Deze laatste wordt kwantitatief bepaald met behulp van microbiologische technieken (sectie 1.1.3.). Maar de ϕX -DNA keten kan ook wijzigingen in primaire structuur ondergaan, welke niet gepaard gaan met vrijstelling van mononucleotiden. Meer bepaald, kettingsbreuken of verandering in vorm van de moleculen kunnen optreden, en het is mogelijk deze fenomenen te volgen met biofysische methoden (sectie 1.1.2.). Door combinatie van deze drie disciplines is men bijgevolg in staat alle gegevens in te winnen nodig voor een ondubbelzinnige interpretatie der resultaten van een experiment.

Op te merken valt dat ϕX -DNA een zeer kostbaar substraat is, en bijgevolg dienden alle methoden tot microschaal herleid te worden. Zo werd voor het totaal van alle uitgevoerde experimenten minder dan 5 mg ϕX -DNA verbruikt. De bepaling van de vrijgestelde mononucleotiden vergt ongeveer 15 μg DNA, de analytische ultracentrifugatie vereist 25 tot 30 μg DNA, welke in sommige gevallen kan gerecupereerd worden, terwijl slechts 0,1 μg ϕX -DNA of minder nodig is voor de dosering van de infectiviteit.

1.1.1. CHEMISCHE BEPALING VAN DE VRIJGESTELDE MONONUCLEOTIDEN.

De methode is een micromodificatie van deze beschreven door LEHMAN (1960). In principe worden de polynucleotiden neergeslagen bij $0^\circ C$ met $HClO_4$, waarna de mononucleotiden in het supernatans bepaald worden hetzij door spectrofotometrie of hetzij door meting van ^{32}P . Alhoewel de modaliteiten enigszins veranderden volgens de aard van de experimenten, was de standaard werkwijze als volgt :

100 μl van een reactiemengsel, welke vóór incubatie ongeveer 15 μg ϕX -DNA bevatte, wordt toegevoegd aan 50 μl ijskoude "carrier"-DNA-oplossing (2,5 mg kalfsthymus DNA per ml 0,02 M NaCl + 0,002 M Tris buffer pH 7,5). Vervolgens wordt onder heftig mengen met een "Vortex Mixer" (Scientific Instruments,

Springfield) 100 μ l ijskoude 0,625 N HClO_4 -oplossing bijgepipeteerd. Na 5 min. bewaring bij 0°C worden de buisjes gecentrifugeerd gedurende 3 min. bij 10.000 x g. Vervolgens wordt voorzichtig met een micropipet 200 μ l van het supernatans opgenomen voor bepaling van de mononucleotiden. Meestal wordt de extinctie gemeten bij 260 $m\mu$ met behulp van microkuvetten met 1 cm optische weglengte, en een aangepaste "Beckman DU"-spectrofotometer.

Een molaire extinctiecoëfficiënt van 10.000 wordt aangenomen voor de mononucleotiden (LEHMAN, 1960). Een theoretisch mengsel van de 4 desoxyribonucleotiden heeft in zuur milieu eigenlijk een gemiddelde molaire extinctiecoëfficiënt van 10.150. Wij hebben opgemerkt dat de extinctie van de oplossingen enigszins daalde in functie van de tijd (Tabel 1).

Tabel 1 : Daling van de extinctie in zuur midden.

Een equimolaire oplossing van thymidylzuur, desoxycytidylzuur, desoxyadenylzuur en desoxyguanylzuur wordt verdund enerzijds met Tris buffer pH 7,0 (controle) en anderzijds met HClO_4 tot een eindconcentratie 0,25 M. De extincties worden uitgedrukt als % van de controle.

Tijd min.	% Extinctie bij 260 $m\mu$	
	Experimenteel	Theoretisch
0		95,9 ^a
3	94,7	
6	93,2	
18	89,4	
30	87,9	
60	86,2	
105	85,8	
1440	85,8	83,9 ^b

a Vier desoxynucleotiden in zuur midden vergeleken met een pH 7,0-oplossing.

b Twee pyrimidine desoxynucleotiden en twee purinen in zuur midden.

Dit verschijnsel bleek bij nader onderzoek te wijten te zijn aan depurinatie. Immers de geëxtrapoleerde extinctie op tijd 0 van een equimolair desoxymononucleotide-mengsel in de perchloorzuuroplossing was gelijk aan 96 % van deze bij pH 7,0 in overeenstemming met de berekende waarde. Na het bereiken van een constante waarde bedroeg de extinctie 85,8 %, te vergelijken met de waarde 83,9 % berekend op basis van een equimolair mengsel van 2 pyrimidine desoxynucleotiden en 2 purinen. Depurinatie in zure oplossing is reeds sedert lang bekend (TAMM e.a. 1952).

Bij proeven met ϕ X-DNA gemerkt met ^{32}P werden de mononucleotiden bepaald door telling in een "Nuclear Chicago thin-window gasflow counter", voorzien van automatische registratie. 200 μl van het supernatans (zie hoger) werd op een aluminium draagplaatje gebracht, met 1 N KOH, en drooggedampt.

geneutraliseerd

1.1.2. ANALYTISCHE ULTRACENTRIFUGATIE.

1.1.2.0. Betekenis van de sedimentatieconstante.

De hydrodynamische eigenschappen van een molecule zijn een functie van het moleculair gewicht, de densiteit, de vorm en de hydratatie. De densiteit kan relatief gemakkelijk door directe methoden bepaald worden, en blijft nagenoeg constant voor homologe polymeren. Voor de bepaling van het moleculair gewicht zijn daarenboven nog twee fysische parameters nodig, zoals bijvoorbeeld de sedimentatieconstante en de diffusieconstante, welke algemeen in de eiwitchemie worden gebruikt.

De sedimentatieconstante s in een centrifugaal gravitatieveld is per definitie gelijk aan :

$$s = \frac{dr}{dt} \frac{1}{w^2 r}$$

waarin r : afstand tot de as

w : hoeksnelheid

t : tijdseenheid

De $s_{w,20}$ -waarde of sedimentatieconstante in water bij 20°C is gelijk $w,20$ aan de experimentele s -waarde, gecorrigeerd voor de viscositeit en de densiteit van het oplosmiddel. De eenheid van de sedimentatieconstante is de seconde. Aangezien voor de meeste macromoleculen s minstens 10^{-13} sec. bedraagt, wordt algemeen een eenvoudiger eenheid gebruikt, namelijk de Svedberg S ($S = 10^{-13}$ sec.).

De diffusieconstante van nucleïnezuren is moeilijk te bepalen bij de lage concentraties, nodig teneinde intermoleculaire interactie te vermijden. Daarom verdient het gebruik van de intrinsieke viscositeit (η) de voorkeur. Een laatste moeilijkheid is nog dat de contributie van de vorm (assymmetriefactor) niet kan onderscheiden worden van deze der hydratatie. Een oplossing werd gevonden door FLORY en MANDELKERN, later verbeterd door SCHERAGA (SCHERAGA en MANDELKERN, 1953 ; SCHERAGA, 1961). Hierbij wordt de β -waarde ingevoerd, welke theoretisch berekend of experimenteel bepaald kan worden. De β -waarde is tussen zekere grenzen weinig afhankelijk van de assymetrie en van de permeabiliteit. Voor enkelstrengige nucleïnezuren bedraagt β ongeveer $2,25 \times 10^6$ (KURLAND, 1960 ; BOEDTKER, 1960). Het moleculair gewicht is dan gelijk aan :

$$M = \left[\frac{s_{w,20} (\eta)^{1/3} \eta_{oN}}{\beta (1 - \bar{v}\rho)} \right]^{3/2}$$

waarin η_o = viscositeit van het oplosmiddel
 ρ = densiteit van het oplosmiddel
 N = getal van Avogadro
 \bar{v} = partieel specifiek volume

De sedimentatieconstante is evenwel van veel meer belang dan een eenvoudige, fysische grootheid. Immers de analytische ultracentrifugatiebeelden, waargenomen met behulp van hetzij Schlieren, interferentie of ultravioletabsorptie-optiek, laten eveneens toe de verdeling van de s-waarde te bepalen. Aldus is het mogelijk om bijvoorbeeld heterogeniteit op te sporen ofwel om de graad van polydispersiteit te bepalen van homologe polymeren, zoals vele nucleïnezuurpreparaten.

Het moleculair gewicht van ϕX -DNA is bekend (SINSHEIMER, 1959 b). Het belang van de analytische ultracentrifuge proeven voor dit onderzoek bestond meer speciaal in het volgen van de vorm en de structuurveranderingen, die het gevolg zijn van chemische, fysische of enzymologische behandelingen. Hierbij wordt enerzijds de verdeling van de verschillende componenten bepaald, en anderzijds de respectievelijke s-waarden, welke een maatstaf zijn voor hun moleculair gewicht.

1.1.2.1. Werkwijze.

0,8 ml tot 1 ml van de te analyseren oplossing, welke 25 tot 30 μg DNA bevat, wordt in een 12 mm hoge, 4° centrifugecel gebracht. Voor alkalische oplossingen wordt een cel met "Kel-F" binnenlichaam gebruikt. Men brengt de cel in een gekalibreerde "An-D" rotor en centrifugeert in de "Beckman Model E" analytische ultracentrifuge. De rotortemperatuur wordt op $20,0^\circ\text{C}$ en de snelheid op $56 \cdot 100$ t.p.m. ingesteld. Om de 4 of 8 min. wordt een opname gemaakt met behulp van de UV-absorptie-optiek. De beelden worden ontwikkeld bij 20°C (Fig. 4 a).

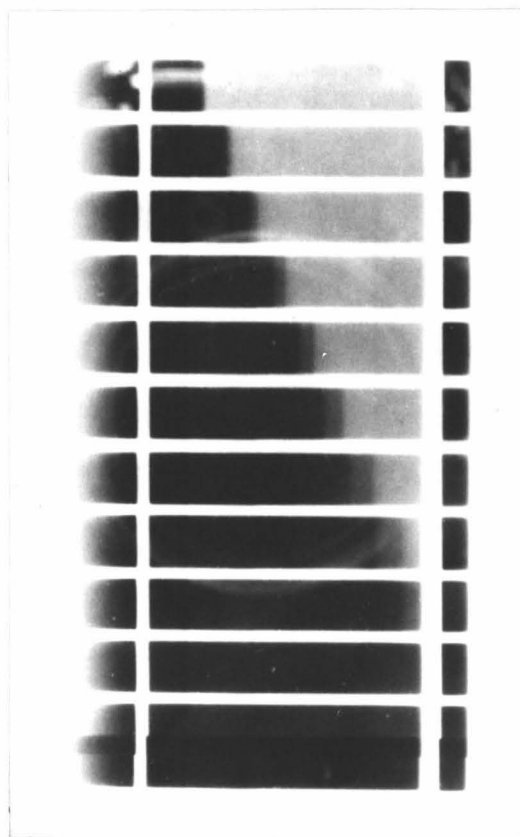
Voor de meeste bepalingen werd gebruik gemaakt van een rotor uitgerust met een exponentiële wig (ROBKIN e.a., 1959; deze rotor werd ter onzer beschikking gesteld door Professor J. VINOGRAD). Hierdoor bevat iedere opname tevens een nagenoeg rechtlijnige zwartingsgradiënt. Dit laat toe de concentraties der verschillende componenten in absolute eenheden uit te drukken, zodat de resultaten onafhankelijk zijn van de gevoeligheid der fotografische film, verschillen tussen de twee gebruikte analytische ultracentrifugen, fouten te wijten aan niet constante voorwaarden van fotografische ontwikkeling, en zo meer.

Iedere film, welke bestaat uit 12 opnamen bij verschillende centrifugatietijden (Fig. 4 a) wordt geregistreerd met behulp van een "Joyce-Loebl Recording Photodensitometer" (Gateshead on Tyne, England). Dit laat toe de relatieve zwarting van de film te meten, en de waarden uit te zetten tegenover de afstand tot de rotoras (uitgedrukt in arbitraire lengte-eenheden). Aldus bekomt men een reeks van 12 fotodensitometer-curven, zoals voorgesteld in figuur 4 b.

De s-waarde wordt als volgt bepaald. Iedere opname bevat twee referentielijnen welke overeenstemmen met gekende afstanden tot de rotatieas, namelijk 5,7 cm en 7,3 cm (één wordt gevormd door een opening in de ballast-cel en de andere door de exponentiële wig). De afstand in arbitraire eenheden, welke een homogeen grensvlak aflegt in functie van de tijd (densitometer curven) kan aldus omgezet worden in cm. Nu is per definitie (sectie 1.1.2.0.

$$s = \frac{dr}{dt} \frac{1}{w^2 r} = \frac{2,303}{w^2} \frac{d \log r}{dt}$$

Hierin is $w =$ toerental per sec. $\times 2 \pi$



Figuur 4 : De analytische ultracentrifugatie van ØX-DNA.

- a) Een ØX-DNA monster (preparaat 3 - 30 $\mu\text{g/ml}$) werd met formaldehyde behandeld (zie sectie 4.0.), en vervolgens gecentrifugeerd bij 20,0°C en 56°100 t.p.m. Na het bereiken van de topsnelheid werd om de 8 min. een opname gemaakt met behulp van de UV-absorptieoptiek (12 opnamen van boven naar onder). Op iedere opname ziet men van links naar rechts (richting van het centrifugaal veld) :

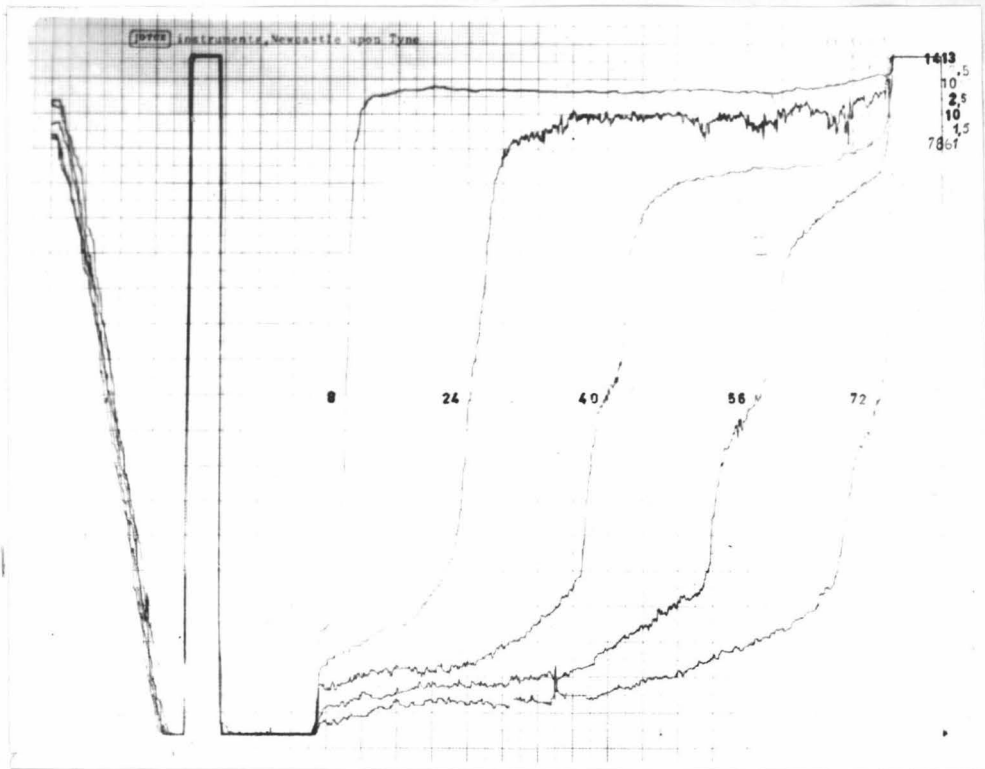
Een exponentiële zwartingsgradiënt, welke voor referentie dient.

Het bovenstaande oplosmiddel, waaruit het ØX-DNA is weggecentrifugeerd.

De ØX-DNA bevattende oplossing, welke de UV-stralen absorbeert, en bijgevolg licht grijs is.

Een tweede referentielijn.

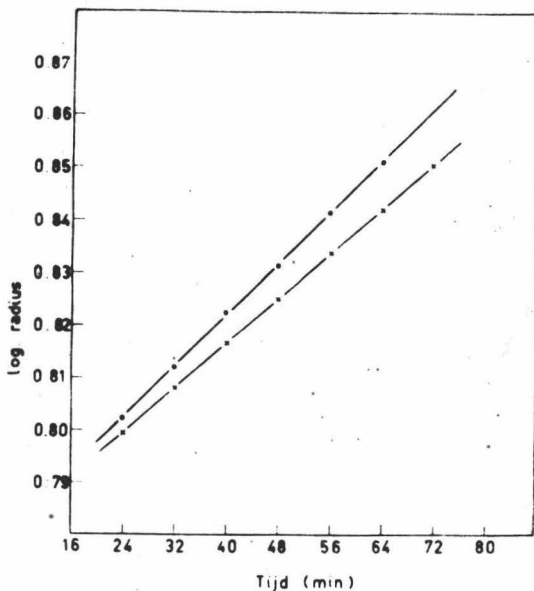
Bemerk dat er in feite twee DNA-grensvlakken voorkomen (zie opnamen 4 tot 8). Deze stemmen respectievelijk overeen met de ØX-DNA S_2 (trager migrerende) en S_1 (sneller migrerende) component (zie sectie 4.0.).



Figuur 4.

b) Van iedere opname wordt de zwarting in functie van de afstand geregistreerd met behulp van een fotodensitometer (de karakteristieken zijn opgegeven in de rechter bovenhoek). Hier afgebeeld zijn curven voor de opnamen na 8, 24, 40, 56 en 72 min. centrifugatie.

Bemerk, bijvoorbeeld op de curven na 40 min. of 56 min., de lichte stijging te wijten aan degradatieproducten, vervolgens een snelle stijging te wijten aan S_2 , en tenslotte een tweede homogene component, namelijk S_1 .



c) Met behulp van de referentielijnen worden de relatieve abscis-waarden in figuur 4 b omgezet in cm afstand tot de rotoras (radius). Dit laat toe de afstand tot ieder grensvlak te bepalen. Hier opgegeven is het logaritme van deze afstanden in functie van de centrifugatietijd. Uit de richtingscoëfficiënt van deze functie kan tenslotte de sedimentatieconstante berekend worden (zie tekst).

- — ● S_1 -component (sneller migrerend).
- x — x S_2 -component (trager migrerend).

Het logaritme van de afstand in functie van de tijd valt normaal zeer nauwkeurig op een rechte lijn (Fig. 4 c). De richtingscoëfficiënt hiervan is gelijk aan $d \log r/dt$, en bijgevolg kan s berekend worden.

In het geval van polydisperse componenten, bijvoorbeeld afbraakprodukten van ϕX -DNA, wordt de mediaan- s -waarde bepaald; dit is de s -waarde waarbij 50 gewichtspercent van het DNA sneller migreert, en 50 gewichtspercent trager.

De analytische ultracentrifugatie laat bovendien ook toe de samenstelling van DNA-mengsels te bepalen. Iedere component migreert met een karakteristieke s -waarde, en resulteert in een grensvlak, zichtbaar op de directe opname en de densitometercurve (Fig. 4 a en b). De relatieve hoeveelheid van iedere component, bijvoorbeeld een homogene ϕX -DNA fractie en een fractie degradatieprodukten, wordt dan bepaald door vergelijking met de zwartingsgradiënt, die als referentie dient (zie hoger). De vermelde resultaten zijn steeds het gemiddelde van twee bepalingen, meestal op opname 5 (40 min. centrifugatie) en 7 (56 min. centrifugatie). Experimenteel werd vastgesteld dat de zwarting der film een rechtlijnige functie van de concentratie was, zodat de ordinaatwaarden der respectievelijke componenten ook rechtstreeks met elkaar vergelijkbaar waren.

1.1.3. MICROBIOLOGISCHE BEPALING VAN DE INFECTIVITEIT.

1.1.3.0. Principe.

De standaard bepaling der biologische activiteit van ϕX -DNA is gesteund op de onderzoeken van GUTHRIE en SINSHEIMER (1960). De eerste stap van een virale infectie is meestal de adsorptie van het virus aan een gevoelige cel. Deze binding is te wijten aan een specifieke interactie tussen de eiwitmantel van het virus en de celwand, bijvoorbeeld van een bacterie. Vervolgens komt het viraal genoom in de cel terecht, en wordt aan de synthese van nieuw virus begonnen. Het vrije DNA, zoals ϕX -DNA, welke een eiwitmantel mist, wordt dan ook niet door een gevoelige waardcel, zoals *E. coli C*, gebonden. Indien evenwel ook de stijve celwand van de bacterie weggenomen wordt, waardoor een protoplast ontstaat, kan het viraal DNA wel opgenomen worden, en bijgevolg tot infectie leiden. Deze opname geschiedt misschien door het pinocytose mechanisme (CHAPMAN-ANDRESEN en PRESCOTT, 1956; CHAPMAN-ANDRESEN, 1962). Aangezien de normale virus-waardcel interactie wegvalt, kan ϕX -DNA ook protoplasten infecteren van stammen welke de specifieke virusreceptoren niet bezitten, en bijgevolg resistent zijn (zie ook sectie 0.3.). Van deze eigenschap wordt gebruik gemaakt bij de kwantitatieve bepaling van de infectiviteit. Immers een gedeelte van de protoplasten is steeds in staat om de bacteriële wand terug te synthetiseren. Deze volledige cellen zijn nu echter ongevoelig voor de volledige virussen, welke eveneens gevormd worden zodat herinfectie uitgesloten is.

In principe wordt het ϕX -DNA toegevoegd aan protoplasten van de resistente *E. coli W6*. Ieder opgenomen ϕX -DNA molecule kan tot synthese leiden van een aantal volledige virussen. Deze worden vrijgesteld door een "osmotische shock" (bij plots verlagen van de osmotische druk breken de protoplasten open). Het aantal virussen wordt dan getitreerd door bepaling van de "plaques", gevormd door een aliquot uit te spreiden op een petri-schaal be-

dekt met een laagje gevoelige waardcellen. (De dubbele agarlaag techniek wordt beschreven door ADAMS, 1959). Aangezien de kwaliteit van iedere protoplast-cultuur in zekere mate afhangt van niet-controleerbare, biologische factoren, en elke populatie heterogeen is, blijkt het noodzakelijk alle DNA-oplossingen bij verschillende concentraties te testen, en bij iedere serie bepalingen een standaard ϕ X-DNA reeks toe te voegen.

1.1.3.1. Procedure.

1.1.3.1.0. Bereiding van de protoplasten.

De samenstelling van de voedingsoplossingen wordt beschreven door GUTHRIE en SINSHEIMER (1960). Steriele voorwaarden zijn strict noodzakelijk bij iedere fase van de bepaling. 20 ml "3XD" medium wordt ingeënt met 1 ml van een nagenoeg verzadigde E. coli W6-cultuur, of een inoculum van een agarcultuur. De oplossing wordt geïncubeerd bij 37°C onder flinke verluchting. Na het bereiken van een 5×10^8 celconcentratie per ml, wordt 1 ml verdund tot 20 of 25 ml met vers, op temperatuur gebracht, "3XD" medium, en opnieuw geïncubeerd tot een concentratie van 2 tot 6×10^8 cellen per ml.

De bacteriën worden verzameld door 5 min. centrifugatie bij 1000 x g en opgenomen in 350 μ l 0,5 M sucrose-oplossing. Vervolgens voegt men 100 μ l 0,25 M Tris buffer pH 8,1 toe, 10 μ l lysozyme (2 mg/ml gekristalliseerd "Worthington Biochemical Co" lysozyme) en 20 μ l 4 % EDTA pH 8,1. Na 10 min. zijn de protoplasten gevormd, hetgeen men controleert door microscopie. De protoplasten worden gestabiliseerd door verdunning met 2 ml "Nutrient Broth", welke eveneens 2 % rondsplasma albumine bevat. Na 5 min. wordt nog 7,5 ml "Nutrient Broth" toegevoegd, teneinde de concentratie albumine te verlagen. De protoplasten dienen binnen de 30 min. gebruikt te worden.

1.1.3.1.1. Infectie met ϕ X-DNA.

Iedere reeks bepalingen bestaat gewoonlijk uit een standaard en 6 monsters. De concentratie ϕ X-DNA wordt uitgedrukt in moleculen per ml, aannemende dat één optische densiteitseenheid ϕ X-DNA (bij 260 m μ en 25°C, in 0,2 M NaCl + 0,001 M Tris buffer pH 7,5) overeenstemt met $1,3 \times 10^{13}$ moleculen per ml. Negen verdunningen, telkens met een factor 5, worden gemaakt van de standaard, en vijf verdunningen met een factor 5 van iedere onbekende ϕ X-DNA oplossing. De geteste ϕ X-DNA concentraties liggen ongeveer in het gebied van 10^{11} tot $2,5 \times 10^7$ voor de standaard, en van $2,5 \times 10^{10}$ tot 4×10^7 voor de onbekenden. De verdunningen geschieden in 0,025 M Tris buffer pH 8,1. Aangezien ϕ X-DNA bij deze lage ionensterkte niet erg stabiel is, voert men deze bewerking slechts uit juist vóór de infectie, en dan nog bij 0°C.

De infectie wordt gestart door een constante hoeveelheid protoplasten namelijk 200 μ l van de suspensie, aan 200 μ l van de verschillende ϕ X-DNA verdunningen toe te voegen (deze laatste dienen vlug op kamertemperatuur gebracht te worden).

Na 10 min. is de opname van DNA beëindigd, en voegt men 1,6 ml "Nutrient Broth" toe. De buisjes worden nu gedurende 90 min. bij 37°C geïncubeerd. Tijdens deze periode wordt in iedere geïnfecteerde protoplast een aantal virussen gevormd (ongeveer 300). In tegenstelling met volledige bacteriën treedt

geen plotse "lyse" op, maar een gedeelte der virussen wordt langzamerhand in het milieu vrijgesteld. Na 90 min. is de intracellulaire virussynthese zeker volledig, en wordt een "osmotische shock" toegepast door een verdunning 1/10 in koude boraatoplossing (natriumtetraboraat, verzadigd bij 0°C).

1.1.3.1.2. Bepaling van de virustiter.

Iedere virus-oplossing wordt verder verdund in ijskoude, verzadigde boraatoplossing tot een concentratie van 1000 tot 2000 virussen per ml (de verdunningsfactor bedraagt 5000 tot 10⁰000 voor de hoogste geteste DNA-concentratie en 10 tot 100 voor de laagste). Van onbekende DNA-monsters dienen soms 2 of 3 verdunningen bereid te worden.

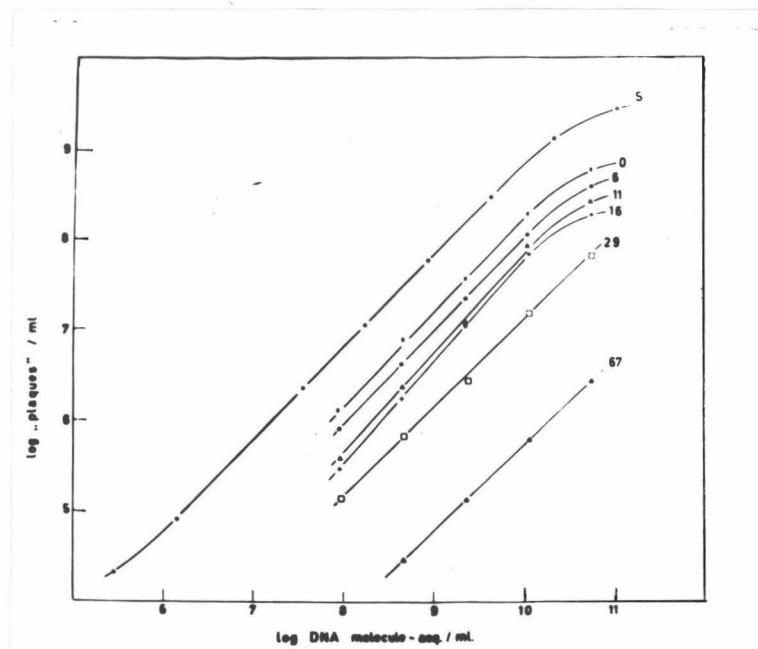
Aan 2 ml "Top agar", vloeibaar gehouden bij 45°C, voegt men 0,2 ml toe van een E. coli C cultuur in de logaritmische groeifase, en 0,1 ml van de te bepalen ØX-oplossing. Het mengsel wordt uitgespreid in een Petri-schaal, welke reeds een laagje "Bottom agar" bevat. Men incubeert de platen 3 uur bij 37°C. Ieder virus geeft aanleiding tot een heldere vlek of "plaque", te wijten aan gelyseerde waardcellen, op een continue troebele achtergrond van een dichte E. coli C cultuur. De "plaques" worden geteld met behulp van een "Colony counter" (New Brunswick).

De resultaten worden grafisch uitgezet als logaritme van de gevormde virussen tegenover logaritme van het aantal DNA-moleculen, beide berekend op basis van het ØX-DNA + protoplast infectiemengsel (Fig. 5). Meestal wordt een typische, langgerekte S-functie verkregen (zie ook GUTHRIE en SINSHEIMER, 1960). Het middendeel is rechtlijnig en strekt zich minstens uit over een gebied overeenkomstig met een verdunningsfactor van 10⁰000. De afwijking bij hoge DNA-concentratie is te wijten aan verzadiging van de hoeveelheid aanwezige protoplasten, en deze bij lage DNA-concentratie waarschijnlijk aan het voorkomen van een geringe fractie meer efficiënte protoplasten.

Het percent overblijvende biologische activiteit wordt bepaald op basis van de horizontale verschuiving van de verdunningscurve ten opzichte van de standaard ØX-DNA oplossing (Fig. 5). Dit wil zeggen men vergelijkt iedere verdunning van de onbekende met een hoeveelheid standaard ØX-DNA moleculen, welke aanleiding geeft tot eenzelfde aantal "plaques".

Het gemiddeld aantal "hits" (Nota 6) per molecule, m , kan berekend worden op basis van de overblijvende biologische activiteit p , met behulp van de Poisson-vergelijking: $p = e^{-m}$ ($e =$ basis van het natuurlijk logaritme).

Nota 6 : Een "hit" of treffer is in deze betekenis een gelokaliseerde chemische wijziging of kwetsing van het ØX-DNA, zoals bijvoorbeeld kettingbreuk. Experimenteel is gebleken dat nagenoeg elke "hit" letaal is.



Figuur 5 : De biologische bepaling van ØX-DNA.

Het te bepalen ØX-DNA-monster wordt toegevoegd aan *E. coli* protoplasten. Dit leidt tot synthese van volledige ØX-174 virussen, die dan getitreerd worden door een gepaste verdunning, samen met waardcellen, in een Petri-schaal uit te spreiden. Ieder virus vormt onder deze voorwaarden een "plaque" (zie tekst voor verdere bijzonderheden). Praktisch worden van iedere onbekende ØX-DNA oplossing 5 verdunningen getest. Abscis : logaritme van het aantal ØX-DNA-moleculen equivalenten per ml (dit is het gewicht DNA x getal van Avogadro / moleculair gewicht van ØX-DNA). Ordinaat : logaritme van het aantal "plaques" die, onder de beschreven voorwaarden, voortspruiten uit de gebruikte hoeveelheid ØX-DNA.

Alle resultaten worden uitgedrukt relatief ten opzichte van een standaard (S), in dit geval ØX-DNA preparaat 3.

Als voorbeeld is een experiment weergegeven waarbij ØX-DNA monsters gedeeltelijk geïnactiveerd werden door verwarming bij 98,2°C, gedurende de aangegeven tijd (van 0 tot 67 min. ; dit is hetzelfde experiment als beschreven in de legende van figuur 24).

De biologische inactivatie wordt berekend op basis van de horizontale verschuiving dezer verdunningscurven.

2. DE ACTIE VAN EXONUCLEASEN

OP ϕ X-DNA.

2.0. EXPERIMENTEN MET ESCHERICHIA COLI FOSFODIESTERASE.

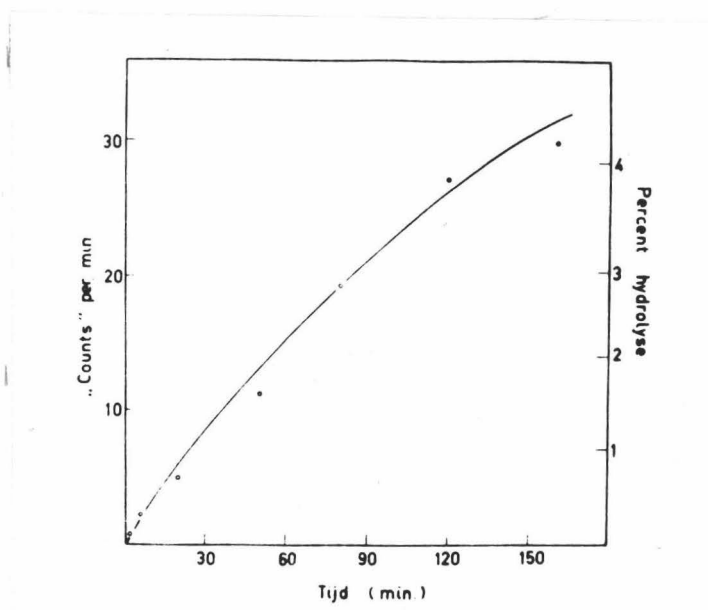
2.0.0. DIRECTE PROEVEN.

E. coli fosfodiësterase is specifiek voor enkelstrengig DNA, en aangezien ϕ X-DNA juist een enkelstrengige structuur bezit mag men verwachten dat dit een goed substraat zou zijn. Bij incubatie van ϕ X-DNA met het enzyme werden inderdaad nucleotiden vrijgesteld (Fig. 6). In een eerste reeks proeven, waarbij maximaal 6,9 % ϕ X-DNA gehydrolyseerd was, bleek evenwel geen betekenisvolle biologische inactivatie op te treden (door hydrolyse wordt steeds verstaan omzetting tot mononucleotiden). Dit is een merkwaardig resultaat, aangezien 6,9 % hydrolyse overeenstemt met een gemiddeld verlies van 378 nucleotiden per keten en het is moeilijk indenkbaar dat een klein virus zoveel informatie kan verliezen zonder ernstig gevolg.

Er weze hier terloops gewezen op de technische moeilijkheid om de enzymatische reactie stop te zetten teneinde de residuele infectiviteit en het ultracentrifugatie gedrag te kunnen bepalen, zonder dat biologische inactivatie of degradatie optreedt. Dit probleem werd opgelost door het toevoegen van natriumfosfaatbuffer pH 7,0 en EDTA pH 7,0 tot een eindconcentratie van respectievelijk 0,1 M en 0,002 M. Zowel de additie van fosfaat (pH-daling) als van EDTA (complexeren van Mg^{++}) inhibeerde de enzymatische reactie voor meer dan 99 %. Na toevoegen van de combinatie kon geen E. coli fosfodiësterase activiteit meer aangetoond worden. De fosfaat-EDTA oplossing heeft geen invloed op de biologische activiteitsbepaling of op het analytisch centrifugatiebeeld.

Door incubatie van ϕ X-DNA (preparaat 1) met E. coli fosfodiësterase gedurende 24 uur was het mogelijk een monster tot 34,0 % te hydrolyseren. De biologische activiteit bleek nagenoeg onveranderd te zijn, terwijl ook de s-waarde van de homogene component, en bijgevolg het moleculair gewicht, ongewijzigd bleef (zie ook Tabel 2). De bepalingsmethode van de infectiviteit was op dat ogenblik nog niet nauwkeurig genoeg om een 34,0 % inactivatie met zekerheid te kunnen uitsluiten, maar de daling was alleszins niet groter.

Deze resultaten betekenen dat sommige ketens niet werden aangetast (constant gebleven moleculair gewicht), terwijl andere nagenoeg volledig werden gehydrolyseerd. (De bepaling van de biologische activiteit was niet nauwkeurig genoeg om te kunnen besluiten dat infectieve ketens werden gehydrolyseerd). Terloops kan hier ook gewezen worden op de zuiverheid van het gebruikte E. coli fosfodiësterase preparaat : 34,0 % hydrolyse komt overeen met een gemiddelde van 1870 nucleotiden verwijderd per keten. Indien slechts één enkele endonuclease-"hit" had plaats gegrepen zou deze zowel door de biologische activiteitsbepaling als door de analytische ultracentrifugatie gemakkelijk



Figuur 6 : De hydrolyse van een ØX-DNA monster door de E. coli fosfodiësterase.

Het reactiemengsel (1 ml), bevattende 246 µg ØX-DNA (preparaat gemerkt met ^{32}P ; zie sectie 1.0.0.), 0,066 M glycinebuffer pH 9,5, 0,001 M MgCl_2 , 0,1 M NaCl en 31 µl E. coli fosfodiësterase, werd bij 37°C geïncubeerd. Monsters werden genomen voor de bepaling van de vrijgestelde mononucleotiden (uitgedrukt - hetzij als "counts" per min, hetzij als percent hydrolyse).

opgespoord geworden zijn. Bijgevolg bedraagt de verhouding exo- tot endoactiviteit minstens 1870.

Twee verklaringen zijn mogelijk voor de waargenomen actie van de *E. coli* fosfodiesterase op ϕ X-DNA :

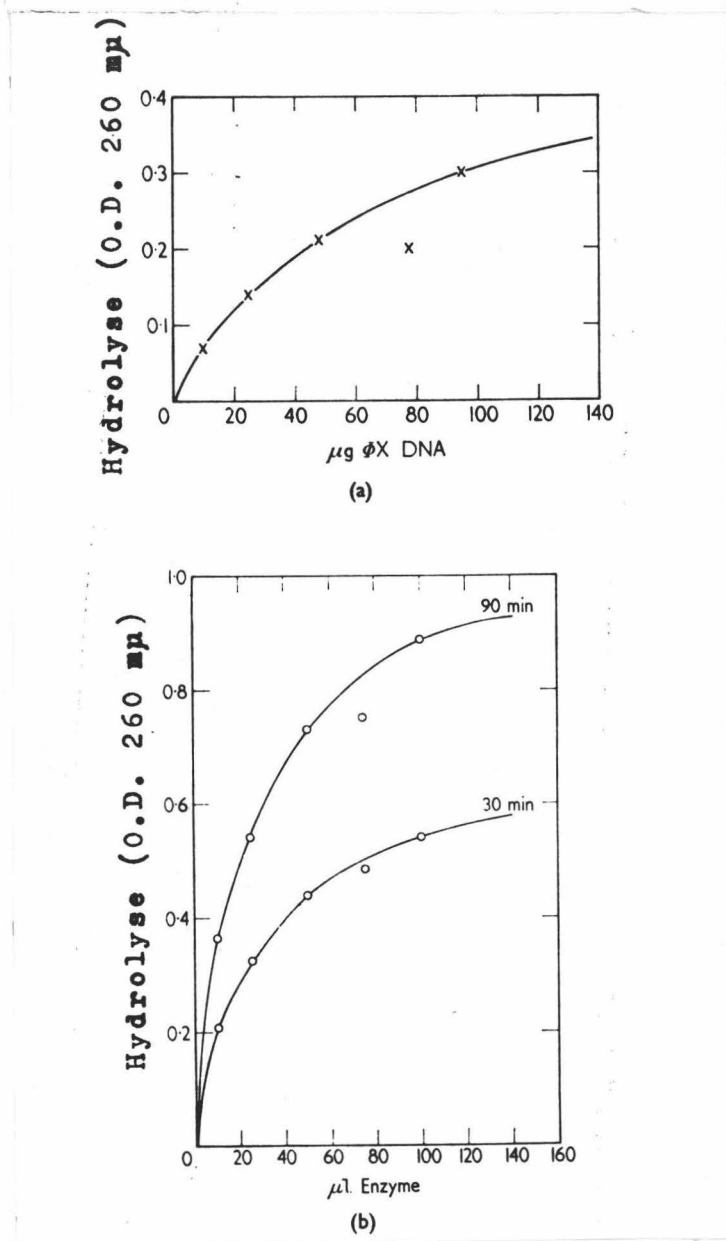
Hypothese 1 : Het enzyme bindt zich op de DNA-keten, en vormt een ondissociëerbaar enzyme-substraat complex. Mononucleotiden worden stapsgewijze in vrijheid gesteld doordat het enzyme langs de keten glijdt (ritssluiting-mechanisme).

Hypothese 2 : Het ϕ X-DNA preparaat is heterogeen ; sommige ketens kunnen worden afgebroken terwijl andere resistent zijn, waarschijnlijk wegens de afwezigheid van een vrij C'₃-OH einde.

Hypothese 1 kan kinetisch geanalyseerd worden. Aangezien de hydrolyse in functie van de tijd (Fig. 6 en analoge experimenten), start met een maximale snelheid, mag men besluiten dat de vorming van het enzyme-substraat complex een zeer snelle reactie is (volledig in 2 min. of minder) en bijgevolg in deze proeven geen beperkende factor kan zijn. Indien nu aan een constante hoeveelheid substraat een stijgende hoeveelheid enzyme wordt toegevoegd verwacht men een rechte lijnige verhoging van de hydrolysesnelheid, tot al het substraat door enzyme gebonden is (equivalentie punt). Verdere vermeerdering van de enzymeconcentratie beïnvloedt de hydrolyse-snelheid niet meer (REINER, 1959). In andere woorden een dergelijk reactiemechanisme is volledig identiek met een gewone titratiecurve. In het geval van macromoleculen is het nu niet alleen mogelijk om substraat met enzyme uit te titreren, maar ook enzyme met substraat.

In fig. 7 a en b zijn dergelijke experimenten voorgesteld. De hydrolyse blijkt niet evenredig te verhogen met respectievelijk een stijgende substraat- en enzymeconcentratie, en een scherp maximum wordt evenmin waargenomen. Integendeel, de resultaten zijn zoals verwacht voor een gewone enzymatische reactie, waarbij het enzyme-substraat complex in kinetisch evenwicht is met vrij enzyme en vrij substraat. (Een alternatief reactiemechanisme is in principe mogelijk, namelijk dat de vorming van het onomkeerbaar enzyme-substraat complex traag zou verlopen in vergelijking met de tijd nodig voor hydrolyse van de volledige keten. Maar zelfs in dit geval blijft de hydrolysesnelheid rechtstreeks evenredig met de enzyme- en de substraatconcentratie, hetgeen evenmin met de experimentele resultaten overeenstemt. Dit mechanisme is eveneens in tegenstrijd met de experimenten van LEHMAN, 1960, over de hydrolyse van DNA, gemerkt met een eindstandig ¹⁴C-nucleotide).

De onjuistheid van hypothese 1 kon nog op een tweede manier aangetoond worden. In het geval van een ondissociëerbaar enzyme-substraat complex wordt bij een stijgende concentratie enzyme een grotere fractie der ketens aldus gebonden. Deze fractie kan bepaald worden door de snelheid van hydrolyse, welke evenredig is met de concentratie enzyme-substraat complex, te vergelijken met de maximale snelheid V_M , bekomen indien alle ketens aan een exonuclease molecule zouden gebonden zijn. Deze V_M wordt berekend door de reciproke hydrolysesnelheid uit te zetten tegenover de reciproke enzymeconcentratie, en extrapolatie tot zero van deze laatste (de bewerking is analoog aan de normale Lineweaver Burk methode voor de bepaling van V_M , uitgenomen voor de vervanging van substraatconcentratie door enzymeconcentratie).



Figuur 7 : a. De hydrolyse in functie van de concentratie ϕX -DNA. Het reactiemengsel (200 μl) bevatte 0,066 M glycinebuffer pH 9,5, 0,001 M $MgCl_2$, 0,1 M NaCl, 12,5 μl E. coli fosfodiësterase en ϕX -DNA (preparaat 1) zoals aangegeven. De incubatie bij 30°C duurde 90 min.

b. De hydrolyse van ϕX -DNA in functie van de concentratie enzyme.

Het reactiemengsel (200 μl) bevatte 0,066 M glycinebuffer pH 9,5, 0,001 M $MgCl_2$, 0,05 M NaCl, 28 μg ϕX -DNA (preparaat 1) en E. coli fosfodiësterase zoals aangegeven. De incubatie werd uitgevoerd bij 30°C.

Tabel 2 : Incubatie van ϕ X-DNA met stijgende concentraties E. coli fosfodiesterase.

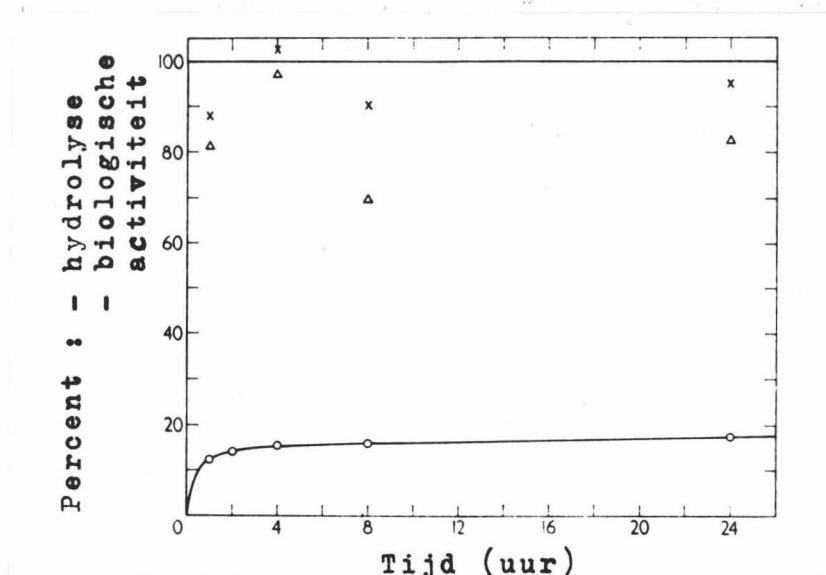
Het reactiemengsel bevatte 56,8 μ g ϕ X-DNA (preparaat 1), 66 mM glycinebuffer pH 9,5, 1 mM $MgCl_2$, 30 mM NaCl en E. coli fosfodiesterase zoals aangegeven, in een totaal volume van 400 μ l. Na 90 min. incubatie bij 30°C werd het percent hydrolyse bepaald op een 200 μ l staal terwijl de rest, na toevoeging van fosfaatbuffer pH 7,0 en EDTA, diende voor de ultracentrifugatie en de infectiviteit analyse.

Enzyme toe- gevoegd μ l	Hydrolyse %	Enzyme- substraat complex % (x)	Homogeen component		Infecti- viteit
			S ₂₀	%	
0	0	0	20,4	74	+++
3,3	5,5	16,1	20,3	77	+++
10	8,7	25,4	21,1	77	+++
40	16,1	46,9	20,6	72	+++
100	22,0	64,0	20,3	72	+++

(x) Percent der ϕ X-DNA ketens betrokken in een hypothetisch, onomkeerbaar enzyme-substraat complex (zie tekst).

De resultaten van een dergelijk experiment zijn samengevat in tabel 2. Bij een stijgende verhouding enzyme tot substraat werd een grotere fractie dezer laatste in een complex betrokken. Maar zelfs indien 64,0 % van de ϕ X-DNA ketens aldus aan een exonuclease gebonden waren, en reeds 22 % der ketens gehydrolyseerd was, trad toch geen daling op van de infectiviteit. Bovendien bleef bij ultracentrifugatie de S-waarde onveranderd, welke in het gebruikte oplosmiddel ongeveer 20,5 bedroeg. De analytische centrifugatiebeelden toonden aan dat dit ϕ X-DNA preparaat ongeveer 70 tot 75 % van een homogene component bevatte, terwijl de rest trager migrerend materiaal was met een distributie van S-waarden, en waarschijnlijk degradatieproducten uitmaakte. De relatieve hoeveelheid homogene component bleek weinig te veranderen bij stijgende hydrolyse. De nagenoeg ongewijzigde fractie DNA-ketens met onveranderd moleculair gewicht is niet in overeenstemming te brengen met hypothese 1, volgens dewelke bij de hoogste enzymeconcentratie 64 % der ketens voor 34 % (22 % x 64/100) zouden gehydrolyseerd zijn.

In tegenstelling kon de juistheid van hypothese 2 door directe methoden bewezen worden, dank zij het ter beschikking komen van een beter ϕ X-DNA preparaat (in de betekenis van een hogere specifieke biologische activiteit). De hydrolysesnelheid van dit preparaat bleek tamelijk abrupt tot een nagenoeg verwaarloosbare waarde te dalen, nadat slechts 16 % tot mononucleotiden was omgezet (Fig. 8). Dit was te wijten aan een heterogeniteit van de DNA-ketens; 16 % van het materiaal kon omgezet worden, terwijl het enzyme de rest niet aantastte, waarschijnlijk omdat een C' 3-OH eindgroep ontbrak. Immers de hydrolyse stopte niet omdat



Figuur 8 : De behandeling van ØX-DNA met E. coli fosfodiësterase.

Het reactiemengsel, bevattende 150 µg ØX-DNA (preparaat 3) per ml, 0,066 M glycinebuffer pH 9,5, 0,001 M MgCl₂, 0,014 M NaCl en 70 µl E. coli fosfodiësterase per ml, werd geïncubeerd bij 30°C. Monsters van 100 µl werden genomen voor de bepaling van het percent hydrolyse, en van 10 µl voor het meten van de overblijvende, biologische activiteit (uitgedrukt als percent van een niet-geïncubeerde standaard). Het controle-reactiemengsel bevatte geen enzyme.

- o — o percent hydrolyse (zuur-oplosbare nucleotiden).
- x — x percent biologische activiteit (versus de standaard).
- Δ — Δ percent biologische activiteit in de controle (versus de standaard).

de exonuclease geïnactiveerd of geïnhibeerd was, want het toevoegen van vers enzyme bracht geen wijziging, terwijl de additie van nieuw substraat terug tot eenzelfde percent hydrolyse leidde (zie ook sectie 6.1.0.).

De infectiviteit bleek niet te dalen door incubatie met de *E. coli* fosfodiësterase (Fig. 8). In feite waren de resultaten van de monsters met enzyme zelfs lichtjes hoger dan deze der controles. Het is bijgevolg waarschijnlijk dat de 16 % hydrolyse alleen te wijten was aan de afbraak van inactieve DNA-ketens, terwijl de infectieve ØX-DNA moleculen door deze exonuclease niet konden aangetast worden. Het experiment bevestigt tevens dat dit enzyme preparaat volledig vrij was van endonuclease-activiteit.

Het uitvoeren van ditzelfde experiment bij 37°C in plaats van 30°C had weinig invloed op de fractie hydrolyseerbaar materiaal (na 8 uur respectievelijk 18,4 % en 16,1 %).

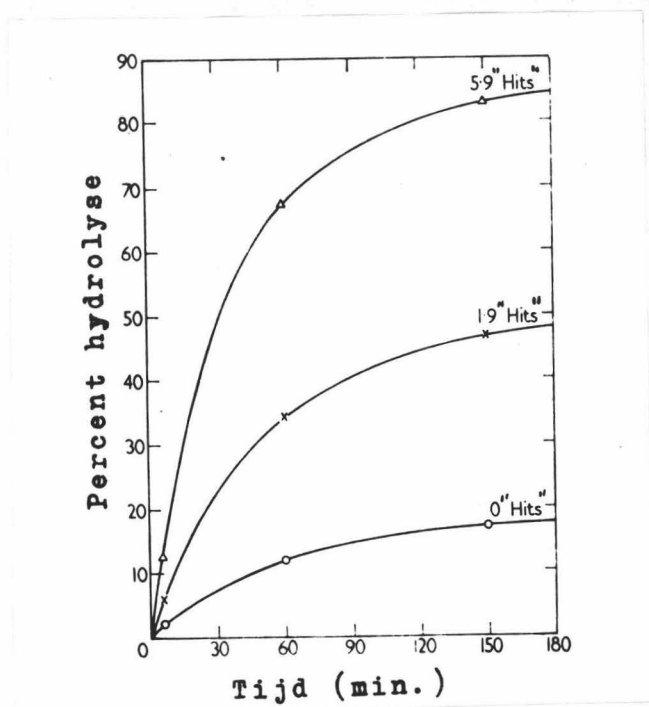
2.0.1. PROEVEN NA VOORBEHANDELING MET PANCREAS DESOXY-RIBONUCLEASE.

De resistentie van de infectieve ØX-DNA ketens tegenover afbraak door de *E. coli* exonuclease kon te wijten zijn ofwel aan een speciale structuur van dit DNA, ofwel aan de afwezigheid van een C'₃-OH terminus. SINSHEIMER (1959 b) vond evenwel geen afwijkende³ samenstelling en het ØX-DNA kon normaal worden afgebroken tot mononucleotiden door incubatie met desoxyribonuclease en slangengift fosfodiësterase. Nu is de *E. coli* exonuclease op dit gebied zelfs minder beperkend dan voornoemde fosfodiësterase, want het T-even-bacteriofagen DNA, hetwelk geglycosyleerd 5-hydroxymethylcytosine bevat, kan door de *E. coli* exonuclease afgebroken worden, maar niet door het slangengift enzyme (LEHMAN en PRATT, 1960). Ook kan van sommige ØX-DNA preparaten een aanzienlijk gedeelte door de *E. coli* fosfodiësterase gehydrolyseerd worden (wij vonden soms meer dan 30 %, terwijl LEHMAN, 1960, zelfs 40 % bekwam).

Bijgevolg bestaan er grondige redenen om te vermoeden dat infectief ØX-DNA niet intrinsiek resistent is, maar alleen een geschikt ketenuiteinde ontbeert. De susceptibele C'₃-OH terminus blijkt wel voor te komen in de degradatieprodukten.

Deze uitleg kon experimenteel getest worden. Pancreas desoxyribonuclease immers breekt DNA-ketens met vorming van C'₃-OH eindgroepen (sectie 1.0.3.4.). Indien ØX-DNA vooraf gedurende een korte tijd met dit pancreas enzyme geïncubeerd werd, zodat slechts enkele kettingbreuken optraden per keten (dit aantal is microbiologisch te bepalen, zie sectie 1.1.3.1.2.), werd hierdoor onmiddellijk het grootste deel van het ØX-DNA preparaat hydrolyseerbaar door de exonuclease (Fig. 9).

Wij mogen bijgevolg besluiten dat de infectieve ØX-DNA moleculen niet door de *E. coli* fosfodiësterase worden afgebroken, omdat zij geen normale C'₃-OH eindgroep bezitten. Merken wij terloops op dat TMV-RNA, het enige viraal nucleïnezuur dat grondig werd onderzocht, wel eindigt op een C'₃-OH terminus (SUGIYAMA en FRAENKEL-CONRAT, 1961).



Figuur 9 : Invloed van de voorbehandeling met pancreas desoxyribonuclease op de hydrolyseerbaarheid door de *E. coli* fosfodiësterase.

Het reactiemengsel (200 μ l), bevattende 95 μ g ϕ X-DNA (preparaat 1) 0,0015 M Tris-buffer pH 7,5, 0,005 M $MgCl_2$, 0,1 M NaCl, 0,005 % rondsplasma albumine en 8 m μ g pancreas desoxyribonuclease, werd gedurende 10 min. (1,9 "hits") of 100 min. (5,9 "hits") gepreïncubeerd bij 37°C. De controle werd op dezelfde wijze behandeld in afwezigheid van enzyme (0 "hits"). De voorbehandeling werd beëindigd door toevoeging van 150 μ l 0,2 M glycinebuffer pH 9,8. Na het nemen van een 10 μ l monster voor de bepaling van de residuele infectiviteit (aantal "hits"), werd de reactie gestart door het toevoegen van 50 μ l *E. coli* fosfodiësterase. Incubatie was bij 30°C. Het percent hydrolyse werd bepaald op 100 μ l monsters.

2.0.2. PROEVEN NA VOORBEHANDELING MET FOSFOMONOESTERASE.

Het is mogelijk dat ϕ X-DNA eindigt op een C'₃-fosfaat functie (alhoewel de polynucleotiden, enzymatisch gesynthetiseerd uitgaande van energierijke 5'-mononucleotiden, steeds eindigen op een vrije C'₃-OH terminus). In dit geval zou het in principe moeten mogelijk zijn om deze fosfomonoester-groep te verwijderen met behulp van een fosfatase. Dit kan al of niet gepaard gaan met verlies van biologische activiteit.

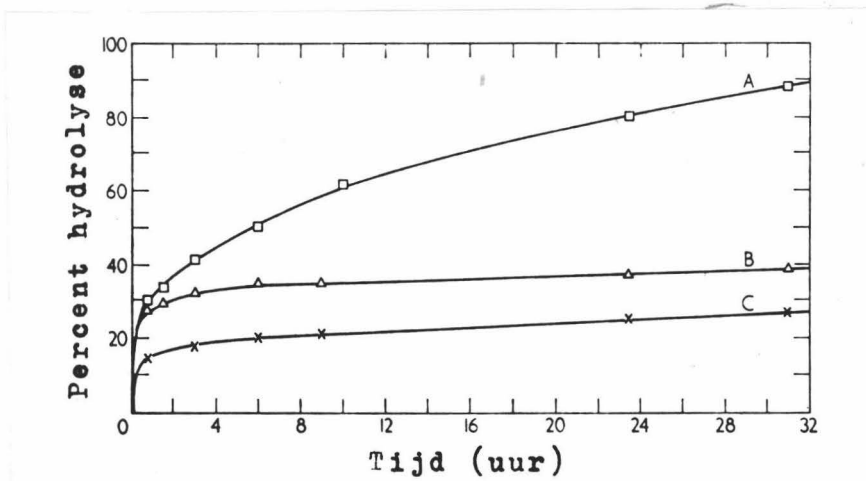
Na preïncubatie van ϕ X-DNA met een gedeeltelijk gezuiverde bacteriële, alkalische fosfomonoësterase (sectie 1.0.3.5.) werd inderdaad een verlies van biologische activiteit en een verhoging van hydrolyseerbaarheid door de E. coli exonuclease vastgesteld (Fig. 10, curve A). Dit effect was evenwel te wijten aan een contaminerende endonuclease activiteit. Immers, indien ongeveer dezelfde hoeveelheid fosfatase toegevoegd werd, maar nu na chromatografische zuivering, bleek het verlies in biologische activiteit slechts 42 % te bedragen, terwijl de hydrolyseerbaarheid verhoogde van 25,1 % tot 37,0 % (Fig. 10, curven B en C). De residuële endonuclease-activiteit welke nog in het laatst vermeld fosfatase preparaat voorkwam, kon bovendien rechtstreeks aangetoond worden door analytische ultracentrifugatie (zie sectie 4.3.0.).

Wij mogen dus besluiten dat ϕ X-DNA niet door een fosfatase tot een substraat voor de E. coli exonuclease kan omgezet worden, en bijgevolg dat het niet eindigt op een C'₃-fosfaat functie. Wel kan de opwerping gemaakt worden dat deze fosfomonoësterase misschien niet actief is op zo lange ketens als nucleïnezuren. Dit is echter weinig waarschijnlijk. Immers de studies van TORRIANI (1960), GAREN EN LEVINHAL (1960), en vooral HEPPEL en medewerkers (1962) hebben aangetoond dat de V_M - en K_M -waarden, twee parameters welke de enzymatische reactiesnelheid bepalen, opmerkenswaardig constant zijn voor alle geteste fosfomonoesters. Dit betekent dat het enzyme alleen specifiek is voor het fosfomonoëster-gedeelte, en niet beïnvloed wordt door de natuur van de veresterde alcohol. Ook dient opgemerkt te worden dat het reactiemengsel beschreven in de legende van figuur 10 een enorme overmaat fosfatase bevatte, zodat zelfs een traag reagerende groep volledig zou moeten gehydrolyseerd zijn (er is 7×10^{-5} μ mole ϕ X-DNA aanwezig en genoeg enzyme om 790 μ mole substraat om te zetten). Tenslotte werd bacteriële, alkalische fosfatase met succes toegepast om de terminale C'₅-fosfaatfunctie te verwijderen van aminozuur transfer-RNA, hetwelk nochtans een stevige secundaire structuur bezit (HARKNESS en HILMOE, 1962; FIERS en KHORANA, 1963).

2.1. EXPERIMENTEN MET KALFSMILT FOSFODIESTERASE.

2.1.0. DIRECTE PROEVEN.

Aangezien de hypothetische C'₃-OH terminus resistent bleek tegenover degradatie met exonucleasen, hebben wij gepoogd of het andere uiteinde van de keten, namelijk de C'₅-OH terminus misschien niet selectief zou kunnen afgebroken worden. Een enzyme dat specifiek is voor het C'₅-OH uiteinde is de kalfsmilt fosfodiësterase (sectie 1.0.3.3⁵).



Figuur 10 : Invloed van de voorbehandeling met fosfatase op de hydrolyseerbaarheid door de *E. coli* fosfodiësterase.

Het reactiemengsel (600 μ l), bevattende 120 μ g ϕ X-DNA (preparaat 4), 0,066 M glycinebuffer pH 9,5, 0,0035 M $MgCl_2$, 0,05 M NaCl en bacteriële, alkalische fosfatase, werd gedurende 24 uur geïncubeerd bij 37°C. Hierop werd 100 μ l 0,08 M K_2HPO_4 (inhibitie van de fosfatase) en 100 μ l *E. coli* fosfodiësterase toegevoegd, en verder geïncubeerd bij 30°C. Het percent hydrolyse werd bepaald op 100 μ l monsters.

□ — □ $3,3 \times 10^4$ eenheden gedeeltelijk gezuiverde fosfatase (12 % residuele, biologische activiteit).

Δ — Δ $4,5 \times 10^4$ eenheden chromatografisch gezuiverde fosfatase (60 % residuele, biologische activiteit).

x — x controle (geen fosfatase).

Bij incubatie van ϕ X-DNA met deze exonuclease bleek inderdaad niet alleen een hydrolyse op te treden, maar ook een daling van de biologische activiteit (Fig. 11, experiment 1). Dit verlies van infectiviteit verliep slechts traag, en was nagenoeg een exponentiële reactie. Experimenteel kwam in het voorgestelde experiment een inactivatie van 50 % overeen met het gemiddeld verlies van 3^{47} nucleotiden per keten. In de veronderstelling dat de daling van biologische activiteit alleen te wijten was aan de exonucleolytische reactie, zou men moeten besluiten dat de eerste 3^{47} nucleotiden overbodig zijn, terwijl vanaf het nucleotide 3^{48} een essentieel gedeelte begint. 50 % der ketens zouden 3^{47} nucleotiden of minder verloren hebben, en biologische actief zijn en de overige 50 % zouden van 3^{48} of meer nucleotiden geamputeerd zijn en hierdoor het vermogen tot infectie verloren hebben. Steeds op basis van deze veronderstelling kan men nu berekenen welke fractie der ketens 3^{48} of meer nucleotiden verloren heeft bij verder gaande hydrolyse (Deze berekening is gesteund op de algemene Poisson-vergelijking

$$p(m, k) = e^{-m} \frac{m^k}{k!}$$

waarin p = fractie der ketens bepaald door m en k

m = gemiddeld aantal "hits"

k = reeks onder beschouwing, bijvoorbeeld ketens welke 3^{48} nucleotiden ontbreken.

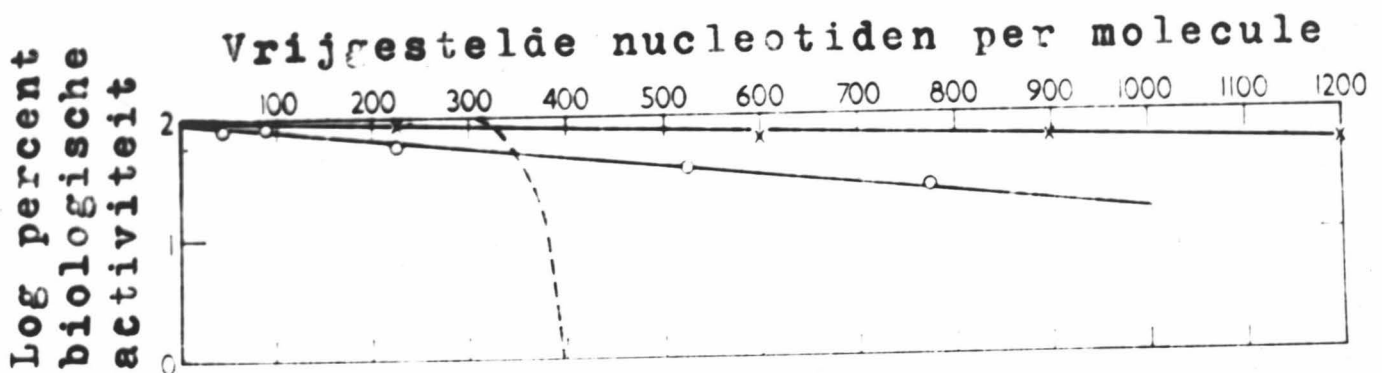
(Eenvoudigheidshalve wordt $k! = e^{-k} k^k (2\pi k)^{1/2}$ gesteld).

Uit deze berekende functie (Fig. 11, stippellijn) blijkt dat bij verdere exonuclease-werking de biologische activiteit drastisch zou dalen (Dit volgt uit het feit dat na het statistisch verwijderen van gemiddeld 300 tot 400 nucleotiden, de verdeling van de verschillende ketenlengten toch nog zeer eng is). De experimentele resultaten waren evenwel helemaal niet in overeenstemming met de berekende curve (Fig. 11), en bijgevolg diskwalificeren zij de veronderstelling dat de biologische inactiviteit te wijten is aan exonuclease werking. Zo werd bijvoorbeeld in een monster dat voor 48 % gehydrolyseerd was, toch nog 1,4 % van de originele biologische activiteit teruggevonden!

Een meer waarschijnlijke verklaring voor deze experimentele resultaten is dat het kalfsmilt-preparaat een geringe, contaminerende endonuclease-activiteit bevat, welke verantwoordelijk was voor de biologische inactivatie. De nucleotiden welke door de exonuclease werden vrijgesteld, zouden dan alleen voortkomen van degradatieprodukten, en niet van intacte, biologische actieve ϕ X-DNA ketens. Op te merken valt dat een zeer gevoelige methode, zoals de infectiviteit van viraal nucleïnezuur, nodig is om één endo-"hit" op te sporen in aanwezigheid van meer dan 300 exo-"hits".

Het voorkomen van deze endonuclease "hits" kon ook direct aangetoond worden door analytische ultracentrifugatie. Indien het aantal kettingbreuken m gering is, kan het bepaald worden op basis van de daling in de absolute hoeveelheid van de homogene component (Tabel 3, experiment 1). Bij meer gevorderde hydrolyse is het mogelijk een schatting van m te bekomen op basis van de mediaan S_{20} -waarde. Immers

$$S_{20} = k M^{\alpha} \quad (\text{DOTY e.a., 1958 ; DOTY e.a., 1960}).$$



Figuur 11 : Invloed van kalfsmilt fosfodiësterase op ØX-DNA.

Het percent overblijvende, biologische activiteit is uitgezet tegenover het gemiddeld aantal nucleotiden verwijderd per molecule (een ketenlengte van 5°500 nucleotiden wordt verondersteld). Residuele infectiviteit werd bepaald op 10 µl monsters, en hydrolysegraad op 100 µl monsters. De incubatie geschiedde bij 37°C.

Experiment 1 (o—o) : Het reactiemengsel (500 µl) bevatte 69 µg ØX-DNA (preparaat 5), 0,033 M natriumsuccinaatbuffer pH 6,5, $3,3 \times 10^{-4}$ M EDTA, 0,02 M NaCl, 0,03 % gelatine en 0,6 eenheden kalfsmilt fosfodiësterase.

Experiment 2 (x—x) : Invloed van de voorbehandeling met fosfatase. Het reactiemengsel (300 µl), bevattende 100 µg ØX-DNA (preparaat 5) 0,005 M glycinebuffer pH 9,5, 5×10^{-4} MgCl₂, 0,05 M NaCl en $4,5 \times 10^4$ eenheden bacteriële, alkalische fosfatase, werd gedurende 24 uur bij 37°C gepreïncubeerd (46 % overblijvende, biologische activiteit). Hierop werd verdund tot 600 µl door toevoeging van natriumsuccinaatbuffer pH 6,5 (eindconcentratie 0,033 M), EDTA (eindconcentratie 0,005 M) en 0,4 eenheden kalfsmilt fosfodiësterase. De controle bevatte wel fosfatase, maar geen fosfodiësterase.

----- : Theoretische functie voor de inactivatie. Men veronderstelt dat verlies van biologische activiteit alleen te wijten is aan exonuclease-activiteit en dat vanaf de C'5-OH terminus de eerste 347 nucleotiden overbodig zijn. Verwijdering van het 348^{ste} nucleotide is evenwel letaal. (De tweede veronderstelling heeft tot doel de experimentele - experiment 1 - en de theoretische waarde voor de 50 % inactivatie te laten samenvallen).

waarin α varieëert van 0,35 voor een relatief stijf staafje, tot 0,50 voor een statistisch kluwen.

$$\text{Bijgevolg is } \frac{S_{20, o}}{S_{20, t}} = \frac{M_o}{M_t} = m$$

waarin $S_{20, o}$ en $S_{20, t}$, M_o en M_t respectievelijk de sedimentatieconstante en het gemiddeld moleculair gewicht zijn zonder en met incubatie in aanwezigheid van exonuclease.

Tabel 3 : De actie van kalfsmilt fosfodiësterase op de biologische activiteit en het sedimentatiebeeld van ϕ X-DNA.

De reacties werden uitgevoerd zoals beschreven in experiment 1 van figuur 11. Enerzijds diende een 100 μ l staal voor de bepaling van het percent hydrolyse, terwijl anderzijds aan een 200 μ l staal 300 μ l 0,1 M K_2HPO_4 toegevoegd werd (de pH-verhoging stopt de exonuclease-actie). Laatst genoemde oplossing diende voor de bepaling van de infectiviteit en de analytische ultracentrifugatie, eventueel na behandeling met formaldehyde zoals beschreven in sectie 4.0. (experimenten 3 en 4).

Experiment	Hydrolyse %	Biol. act. "Hits"/mol	Ultracentrifugatie	
			S_{20}	"Hits"/mol
1	(controle)	-	21,5	-
	0,11	0,1	22,5	0,1
2	(controle)	-	21,9	-
	48,1	4,3	20,7	4,2 - 7,7 ^{a, b}
3	(controle)	-	12,1 ^c	-
	13,8	1,4	9,5	1,6 - 2,0 ^a
4	(controle)	-	12,1 ^c	-
	25,9	2,6	8,9	1,8 - 2,4 ^a

a Berekening gesteund op een α -waarde van respectievelijk 0,50 en 0,35 (zie tekst).

b Gecorrigeerd voor het feit dat de eerste "hit" tot geen daling van het moleculair gewicht leidt (sectie 4.2.).

c Sedimentatieconstante van de S_2 -component (sectie 4.0.).

De resultaten, vermeld in tabel 3, tonen aan dat het aantal letale "hits" per molecule, berekend op basis van de overblijvende biologische activiteit, in goede overeenstemming was met het aantal kettingbreuken, gevonden door analytische ultracentrifugatie. Bijgevolg inactiverde een kalfsmilt fosfodiësterase preparaat ϕ X-DNA niet door verwijdering van eindstandige mononucleotiden, maar alleen door een contaminerende endonuclease activiteit. Wij mogen dus besluiten dat de hypothetische C'_{5-OH}

eindgroep even resistent is tegenover exonuclease als de hypothetische C'₃-OH terminus. De mononucleotiden, welke werden vrijgesteld, zijn alleen afkomstig van degradatieprodukten, gevormd door de endonuclease.

Inderdaad, met een zeer homogeen ØX-DNA preparaat bleek er gedurende het eerste uur van incubatie praktisch geen hydrolyse op te treden (Fig. 12). Ondertussen echter had de endonuclease een zeker aantal brokstukken gevormd, welke dan wel door de exonuclease verder konden afgebroken worden. Dit experiment toont bijgevolg nogmaals aan dat ØX-DNA geen vrije C'₅-OH terminus bezit.

(Er weze hier terloops opgemerkt dat ieder ØX-DNA preparaat minstens 15 % tot 30 % degradatieprodukten bevatte. Aangezien deze ten minste gedeeltelijk door de E. coli fosfodiësterase konden afgebroken worden (sectie 2.0.0.), maar niet door het kalfsmilt enzyme, is het waarschijnlijk dat zij beginnen op een C'₃-OH en eindigen op een C'₅-fosfaat. Deze structuur is in overeenstemming met degradatie als gevolg van depurinatie (sectie 3.4.4.).

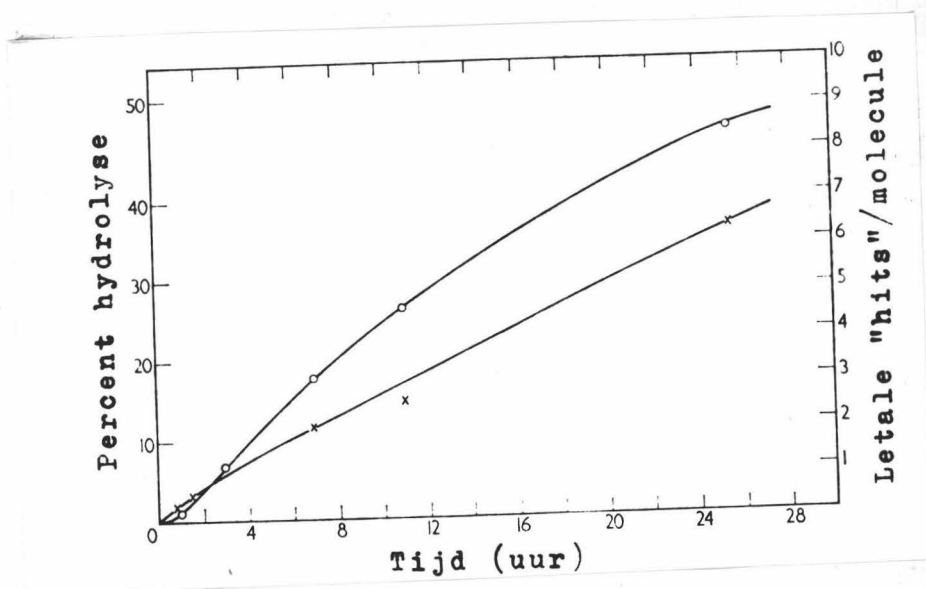
2.1.1. PROEVEN NA VOORBEHANDELING MET FOSFOMONOESTERASE.

Een mogelijke verklaring voor de resistentie van de hypothetische C'₅-OH terminus tegenover een specifieke exonuclease, is het voorkomen van een fosfomonoëstergroep. Dit werd op analoge wijze onderzocht als beschreven voor het C'₃-OH einde in sectie 2.0.2., namelijk door voorbehandeling van het ØX-DNA preparaat met bacteriële, alkalische fosfatase. De resultaten (Fig. 11, experiment 2) tonen evenwel aan dat hierdoor geen verhoging optrad van de susceptibiliteit tegenover de kalfsmilt exonuclease. Integendeel de daling van de infectiviteit verliep zelfs langzamer dan in experiment 1, waarschijnlijk wegens de hogere EDTA-concentratie, die de contaminerende endonuclease remde, en ook omdat tijdens de preïncubatie 54 % van de ØX-DNA ketens gebroken waren, waardoor de kalfsmilt exonuclease relatief meer substraat ter beschikking had en sneller mononucleotiden kon vormen.

Wij mogen bijgevolg besluiten dat de resistentie van de C'₅-OH eindgroep niet te wijten is aan verestering met een fosfaatgroep.

2.1.2. DE ACTIE OP KALFSTHYMUS DNA.

Op het ogenblik dat wij deze studies ondernomen hebben, was niets bekend over de werking van kalfsmilt fosfodiësterase op macromoleculair DNA. HILMOE (1960) vermeldt dat hij geen afbraak van DNA kon vaststellen. RAZZELL en KHORANA (1961) toonden daarentegen de stricte exonuclease specificiteit aan met behulp van desoxyoligonucleotiden gaande tot een ketenlengte van 4 eenheden, maar breidden deze studies niet uit tot natuurlijk voorkomende polydesoxynucleotiden. Volgens VANECKO en LASKOWSKI (1962) zouden desoxynucleotideketens langer dan 50 eenheden niet kunnen afgebroken worden. Vooraleer de actie van het kalfsmilt enzyme op ØX-DNA te onderzoeken (reeds beschreven in secties 2.1.0. en



Figuur 12 : Invloed van kalfsmilt fosfodiësterase op ØX-DNA.

Het reactiemengsel (1 ml), bevattende 150 µg ØX-DNA (preparaat 6), 0,033 M natriumsuccinaatbuffer pH 6,5, 0,005 M EDTA, 0,035 M NaCl en 1 eenheid kalfsmilt fosfodiësterase, werd bij 37°C geïncubeerd.

- x — x Biologische inactivatie (uitgedrukt als "hits" per molecule, rechtse ordinaat), bepaald op 10 µl monsters.
- o — o Percent hydrolyse (linkse ordinaat), bepaald op 100 µl monsters.

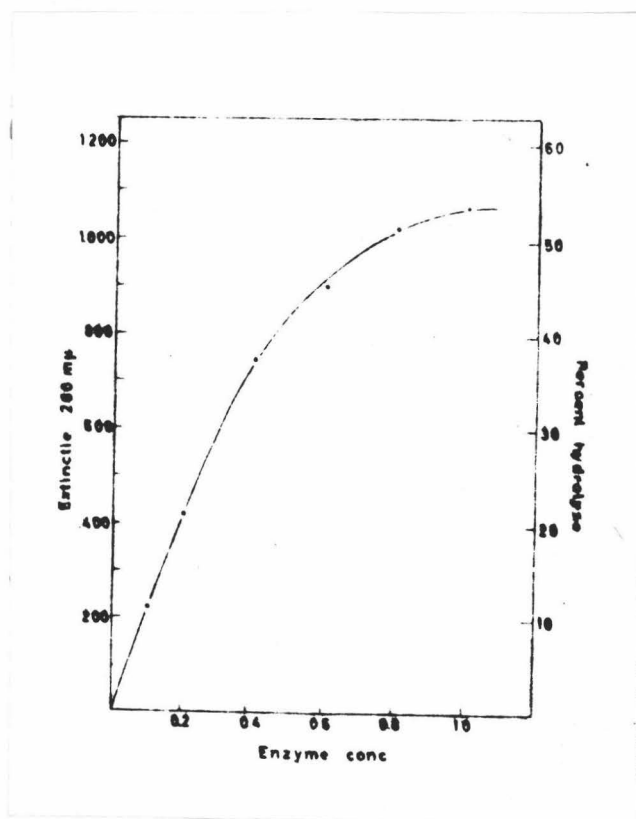
2.1.1.) was het bijgevolg gewenst vooraf een reeks controle proeven uit te voeren op een gewoon DNA, zoals dit bekomen uit kalfsthymus. Aangezien deze experimenten enkele belangrijke nieuwe gegevens over de specificiteit van kalfsmilt fosfodiesterase opgeleverd hebben, worden zij in deze sectie samengevat.

Onder geschikte voorwaarden kon gedenatureerd kalfsthymus DNA (ketenlengte ongeveer 5000 tot 10.000 nucleotiden) wel door het kalfsmilt enzyme worden afgebroken. De hydrolyse was evenredig met de enzymeconcentratie tot ongeveer 25 % van het substraat was omgezet (Fig. 13). Hiertoe was wel, in vergelijking met de experimenten van HILMOE (1960) en RAZZELL en KHORANA (1961), een betrekkelijk grote hoeveelheid enzyme nodig. De experimenten met ϕ X-DNA toonden daarenboven aan dat de activiteit hoofdzakelijk exonucleolytisch bleef, zodat de vastgestelde hydrolyse niet kan toegeschreven worden aan een contaminerende activiteit.

Er werd evenwel vastgesteld dat onder gelijke voorwaarden de afbraak van kalfsthymus DNA merkkelijk trager verliep dan van ϕ X-DNA (Fig. 14). De contaminerende endonuclease-activiteit van het fosfodiesterase preparaat in aanmerking nemend, is het onwaarschijnlijk dat dit effect te wijten is aan een verschil in concentratie C' ₅-OH eindgroepen. Een meer aanneembare verklaring is dat de grotere graad van secundaire structuur aanwezig in gedenatureerd kalfsthymus DNA (te wijten aan de interstrengige en intrastrengige basecomplementariteit - zie sectie 0.1.) de activiteit van de kalfsmilt fosfodiesterase belemmerde.

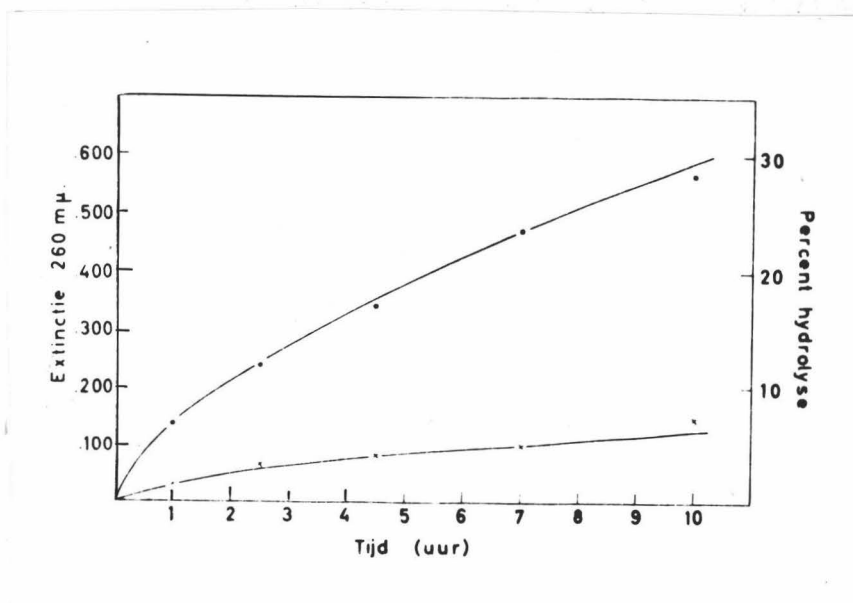
Tot eenzelfde interpretatie leidden de proeven over de invloed van de ionenconcentratie op de hydrolysesnelheid. RAZZELL en KHORANA (1961) stelden vast dat de enzymeactiviteit toenam bij stijgende succinaatconcentratie in het gebied 0,1 M tot 0,3 M. Het effect door deze onderzoekers vastgesteld, was zeker te wijten aan een intrinsieke eigenschap van het enzyme, aangezien een zeer eenvoudig substraat werd gebruikt, namelijk de p-nitrophenylester van 3'-thymidylzuur. Integendeel, de resultaten, voorgesteld in figuur 15, tonen aan dat de hydrolysesnelheid van gedenatureerd kalfsthymus DNA sterk daalde bij succinaatconcentraties hoger dan 0,033 M. Deze schijnbare tegenstelling kan best verklaard worden door aan te nemen dat de laatstgenoemde invloed van de bufferconcentratie in feite berust op een wijziging van het macromoleculair substraat. Het enzyme schijnt ketens te verkiezen of te vereisen waarin geen secundaire base-interacties voorkomen (het verbreken van de waterstof-bindingen door verlaaging van de ionensterkte werd in sectie 0.1. behandeld).

Tenslotte werd deze specificiteit bewezen in een direct experiment. Natief kalfsthymus DNA werd tot verschillende graden gedenatureerd door verwarming. De bekomen fractie onomkeerbaar gedenatureerd DNA kan bepaald worden op basis van de extinctieverhoging (zie sectie 0.1 en 3.2.1.). Anderzijds werd gemeten hoe snel ieder monster door het kalfsmilt enzyme kon gehydrolyseerd worden. Het bleek dat kalfsthymus DNA, zoals verwacht, tot een statistisch kluwenstructuur overging door verwarming boven een kritische temperatuur (middenpunt bij 80°C). Maar deze in een nauw temperatuurgebied plaats grijpende transitie bleek tevens gepaard te gaan met de omzetting van een slecht tot een zeer goed substraat voor de exonuclease. (De superpositie van de twee curven is niet volledig, waarschijnlijk omdat enerzijds een gedeelte van het DNA slechts bij veel hogere temperatuur gedenatureerd werd, en anderzijds het monster, verwarmd tot 83°C, reeds



Figuur 13 : De hydrolyse van gedenatureerd kalfsthymus-DNA in functie van de concentratie kalfsmilt fosfodiësterase

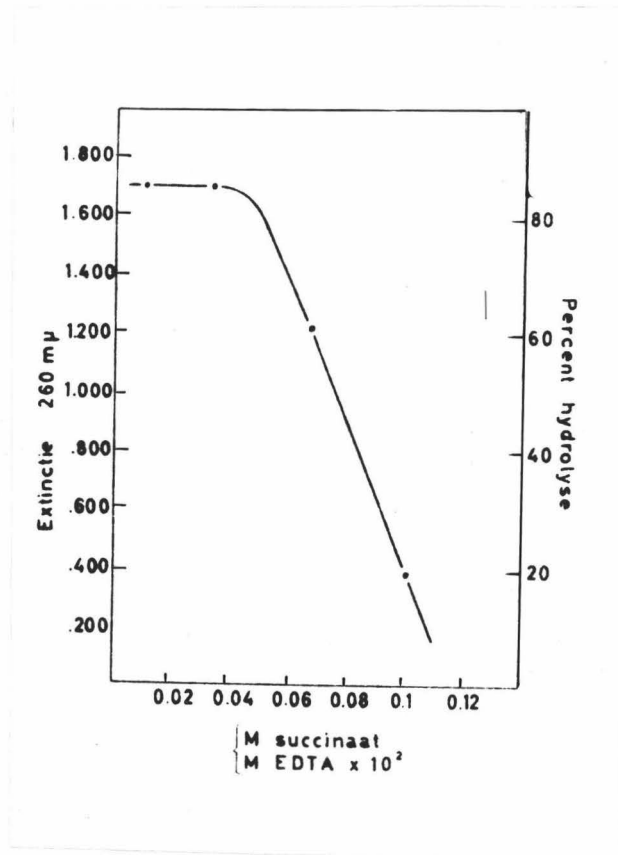
Ieder reactiemengsel bevatte $33,3 \mu\text{g}$ gedenatureerd kalfsthymus-DNA, $0,033 \text{ M}$ natriumsuccinaatbuffer pH 6,5, $3,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ EDTA, $3,3 \times 10^{-3} \text{ M}$ NaCl en enzyme zoals aangegeven (uitgedrukt in eenheden), in een totaal volume van $200 \mu\text{l}$. Er werd 5 uur geincubeerd bij 37°C .



Figuur 14 : Vergelijking tussen de hydrolyse van gedenatureerd kalfsthymus-DNA en van ØX-DNA door kalfsmilt fosfodiesterase.

Het reactiemengsel (600 μ l), bevattende 102 μ g DNA, 0,033 M natriumsuccinaatbuffer pH 6,5, 0,005 M EDTA, 0,025 M NaCl en 0,4 eenheden kalfsmilt fosfodiesterase, werd geïncubeerd bij 37°C. De hydrolysegraad werd bepaald op 100 μ l monsters.

x—x gedenatureerd kalfsthymus DNA.
 •—• ØX-DNA.

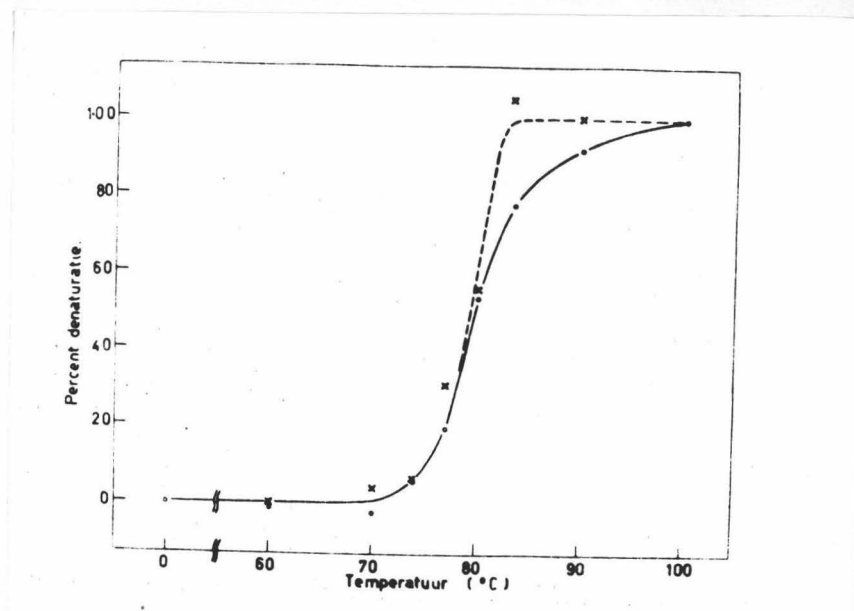


Figuur 15 : De hydrolyse van gedenatureerd kalfsthymus-DNA in functie van de zoutconcentratie.

Ieder reactiemengsel (200 μ l) bevatte 33,3 μ g gedenatureerd kalfsthymus-DNA, $3,3 \times 10^{-3}$ M NaCl, 1 eenheid kalfsmilt fosfodiësterase en natriumsuccinaatbuffer pH 6,5 + EDTA zoals aangegeven in de abs-cis. Er werd 6 uur geïncubeerd bij 37°C.

genoeg gedenatureerd DNA bevatte om maximale enzymatische reactie toe te laten). De geringe hydrolyse, namelijk 4,8 %, welke met het onverwarmd preparaat werd vastgesteld, kan eventueel te wijten zijn aan een kleine hoeveelheid gedenatureerd materiaal (deze onzuiverheid werd eveneens opgespoord door reactie met formaldehyde - zie sectie 3.2.1.), ofwel aan de contaminerende endonuclease.

Wij mogen bijgevolg besluiten dat kalfsmilt fosfodiësterase, juist zoals de *E. coli* fosfodiësterase, specifiek is voor enkelstrengig DNA. Waarschijnlijk kan het evengoed als laatstgenoemd enzyme gebruikt worden om gedenatureerd DNA te doseren in aanwezigheid van natief, dubbelstrengig DNA (LEHMAN, 1960 ; MARMUR en GROSSMAN, 1961 ; STOLLAR en GROSSMAN, 1962).



Figuur 16 : De hydrolyse van kalfsthy-mus-DNA in functie van de denaturatie.

Het DNA werd tot verschillende graden gedenatureerd door verwarming. Iedere oplossing, bevattende 666 μg kalfsthy-mus-DNA/ml, 0,001 M Tris-bu-ffer pH 7,4 en 0,02 M NaCl, werd gedurende 10 min. bij de aangegeven temperatuur verwarmd in een waterbad, en dan snel gekoeld in ijswater.

o — o Denaturatiegraad bepaald door spectrofotometrie. Ieder monster werd verdund 1/20 in dezelfde Tris-NaCl oplossing, en men bepaalde de extinctie bij 260 $\text{m}\mu$. Het percent denaturatie wordt gegeven door :

$$\frac{E_t - E_o}{E_{\text{max}} - E_o} \times 100$$

waarin E_t : extinctie bij temperatuur t.

E_o : extinctie van de niet-verwarmde controle.

E_{max} : maximale extinctie (monster verwarmd tot 100°C).

x — x Hydrolyseerbaarheid door kalfsmilt fosfodiësterase. Ieder reactiemengsel (200 μl), bevattende 33,3 μg behandeld DNA, 0,017 M natriumsuccinaatbuffer pH 6,5, 0,005 M EDTA, 0,01 M NaCl en 1 eenheid kalfsmilt fosfodiësterase, werd gedurende 8 uur bij 37°C geïncubeerd. Na precipitatie van de polynucleotiden met verdund HClO_4 werd de extinctie (E) te wijten aan de vrijgestelde nucleotiden bepaald ten opzichte van een blanco, welke op dezelfde wijze behandeld DNA bevatte, maar geen enzyme. Het percent hydrolyse van het niet-verwarmd monster bedroeg 4,8, en dit van het op 90°C verwarmd preparaat 47,0. Het percent denaturatie, enzymatisch bepaald, wordt eveneens gegeven door :

$$\frac{E_t - E_o}{E_{\text{max}} - E_o} \times 100$$

waarin E_t , E_o en E_{max} dezelfde betekenis hebben als hoger vermeld t , E_o en E_{max} (als maximum werd het monster verwarmd bij 90°C aangenomen).

3. DE SECONDAIRE STRUCTUR

VAN ØX-DNA.

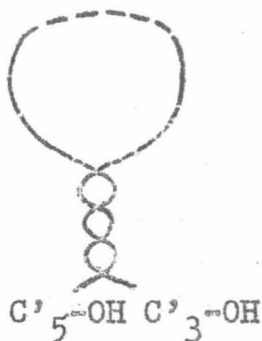
3.0. ALGEMENE INLEIDING.

Een verklaring voor de afwezigheid van een vrije C'₃'-OH en een C'₅'-OH eindgroep, is dat deze zouden betrokken zijn in een geordende secundaire structuur. Het is bijvoorbeeld mogelijk dat één, of beide keten-uiteinden als een haarspeld zouden omgeplooid zijn over een bepaalde lengte, en dat zij aldus in een korte antiparallele dubbele schroeflijnstructuur zouden ingevroren zijn (Schema A)



Schema A.

ofwel kunnen beide ketenuiteinden aan elkaar gebonden zijn door vorming van een beperkte schroeflijn (Schema B).



Schema B.

Dergelijke structuren zouden resistent zijn tegenover de geteste exonucleasen, aangezien zowel de *E. coli* fosfodiësterase (LEHMAN, 1960) als de kalfsmilt fosfodiësterase (sectie 2.1.1.) een enkelstrengig DNA vereisen als substraat. Wel werd aangetoond door SINSHEIMER (1959 b) dat de structuur van ØX-DNA enkelstrengig is (sectie 0.3.). Zijn onaanvechtbaar besluit betrof evenwel de fysico-chemische toestand van het ganse molecule, en sluit niet uit dat een zeer beperkt gedeelte misschien wel een geordende microstructuur bezit. Deze beschrijving is analoog met de structuur van verschillende globulaire eiwitten zoals myoglobine en pancreas ribonuclease, waarvan de primaire keten over slechts enkele, wel bepaalde gedeelten in een geordende α -helix betrokken is (PERUTZ, 1962 ; SCHERAGA, 1961 ; SCHERAGA, en RUPLEY, 1962).

3.1. BEHANDELING MET FORMAMIDE.

De meest gebruikte methode voor het uitsmelten van een secondaire structuur is zeker verwarming. Bij hogere temperaturen kunnen evenwel wijzigingen optreden in de primaire structuur (sectie 3.4.). Een veel mildere, maar even efficiënte methode is behandeling bij 20 of 37°C met zekere organische oplosmiddelen, zoals formamide (HELMKAMP en TS'0, 1961; MARMUR en TS'0, 1961). Zowel met chemische en fysische als met biologische methoden werd aangetoond dat normaal, dubbelstrengig DNA onder deze voorwaarden volledig gedenatureerd wordt.

Een eerste praktische moeilijkheid bestond in de afzondering op microschaal van het behandelde ϕ X-DNA. Precipitatie was niet aangewezen, wegens de geringe hoeveelheid materiaal, en verwijdering van het formamide door dialyse was eveneens uitgesloten, aangezien in een organisch oplosmiddel de ϕ X-DNA ketens zelf gedeeltelijk door de dialysehuls diffunderen (SINSHEIMER, 1959 b). Tenslotte werd een oplossing gevonden door herhaalde extractie met isobutanol.

De reactie werd als volgt uitgevoerd: 1 ml reactiemengsel, bevattende 105 μ g ϕ X-DNA (preparaat 3), 95 % (v/v) formamide (gedistilleerd bij 18 mm Hg-druk, en bewaard in het donker), 50 mM NaCl en 0,05 mM Trisbuffer pH 7,5, werd gedurende 20 min. geïncubeerd bij 37°C. Onder deze voorwaarden moet zelfs een sterk gebonden DNA-helix, zoals bijvoorbeeld een G-C polymeer, uitsmelten (Dr. P. TS'0, persoonlijke mededeling). Men koelde de oplossing tot 0°C, en voegde hieraan 0,65 ml 0,2 M NaCl + 0,001 M Tris buffer pH 7,5 toe. De formamide werd verwijderd door zes extracties met isobutanol, verzadigd met de laatstvermelde NaCl-Tris oplossing. Ieder isobutanol extract werd nagewassen met 0,2 ml 0,1 M NaCl oplossing, die men tenslotte bij de originele waterige fase voegde (de behandelingen zijn analoog als beschreven voor de fenolextractie in sectie 1.0.1.). 80,2 % ϕ X-DNA werd gerecupereerd in een totaal volume van 0,60 ml. De residuele formamide bedroeg ongeveer 0,3 % (v/v) (berekend op basis van de extincties bij 260 μ en bij 235 μ ; de verhouding van de absorptie $E_{260 \mu} / E_{235 \mu}$ was respectievelijk 2,15 en 0,0042 voor ϕ X-DNA in hoger vermelde zoutoplossing en voor formamide).

De controle ϕ X-DNA oplossing bevatte geen formamide maar werd overigens op identieke wijze geïncubeerd en behandeld met isobutanol. De opbrengst aan ϕ X-DNA bedroeg 94,0 %.

De specifieke biologische activiteit van de met formamide behandelde ϕ X-DNA bleek 89 % te bedragen in vergelijking met het controle preparaat. (Merken wij evenwel op dat de specifieke biologische activiteit van deze controle gedaald was tot 23,5 % van een standaard ϕ X-DNA; de natuur van deze inactivatie, te wijten aan de isobutanol extractie, wordt verder besproken in sectie 4.3.0.).

Er werd eveneens nagegaan of de hypothetische C'₂-OH eindgroepen van ϕ X-DNA misschien door de denaturerende behandeling met formamide werden vrijgesteld. De resultaten, samengevat in tabel 4, tonen evenwel aan dat dit niet het geval was; het met formamide behandelde preparaat werd niet sneller of niet meer afgebroken door de E. coli fosfodiësterase dan het controle preparaat.

Tabel 4 : Invloed van formamide op de hydrolyseerbaarheid door E. coli fosfodiësterase.

Een reactiemengsel, bevattende 62 μg ϕX -DNA, al of niet behandeld met formamide zoals beschreven in de tekst, 66 mM glycinebuffer pH 9,5, 1 mM MgCl_2 , 80 mM NaCl en 37 μl E. coli fosfodiësterase in 600 μl , werd geïncubeerd bij 30°C, en het percent hydrolyse bepaald op 100 μl aliquots.

Reactieduur (uur)	% hydrolyse	
	Controle	behandeld met formamide
3/4	19,3	19,4
1 1/2	22,4	21,8
3	28,0	26,8
7	31,4	33,1

Wij mogen bijgevolg besluiten dat ofwel een geordende secundaire structuur niet nodig is voor de biologische activiteit, en niet verantwoordelijk is voor de schijnbare afwezigheid van de C' ₃-OH terminus, ofwel dat deze beperkte, dubbele schroeflijn zich dadelijk spontaan terug vormt, na verwijdering van het gedeneureerd agens. De afwezigheid of omkeerbaarheid van een geordende secundaire structuur volgt eveneens uit experimenten, waarbij ϕX -DNA gedeneureerd werd met alkali in plaats van met formamide (sectie 4.1.0.).

3.2. BEHANDELING MET FORMALDEHYDE.

3.2.0. DE ACTIE VAN FORMALDEHYDE OP NUCLEINEZUREN.

Formaldehyde is sinds lang bekend als een reagens voor eiwitten en virussen, alhoewel de juiste werkwijze niet volledig begrepen wordt. FRAENKEL-CONRAT (1954) was de eerste om de reactie op nucleïnezuren te onderzoeken. Onder fysiologische voorwaarden en in aanwezigheid van 1 tot 2 % formaldehyde vond hij met TMV-RNA een 30 % stijging van de chromiciteit bij 260 m μ en een verschuiving van 3 tot 5 m μ naar een langere golflengte. De reactie was blijkbaar omkeerbaar. Na verwijdering van de formaldehyde door dialyse kon evenwel geen biologisch actief RNA teruggevonden worden (STAEHELIN, 1958). Het hyperchrom effect, te wijten aan de reactie met formaldehyde, ligt eigenlijk in de lijn der verwachtingen. Immers de hypochromiciteit van de nucleïnezuren (lagere extinctie van het nucleïnezuur in vergelijking met de som van de samenstellende nucleotiden) is grotendeels te wijten aan de base-interactie, welke gestabiliseerd wordt door H-bindingen (HALL en DOTY, 1959; STEINER en BEERS, 1961; HASELKORN en DOTY, 1961; zie sectie 0.1.). Aangezien formaldehyde gemakkelijk reageert met aminogroepen, en deze laatste in de nucleïnezuren de voornaamste proton donors zijn

voor de waterstofbruggen, is het begrijpelijk dat hierdoor de hypochromiciteit bijna volledig opgeheven wordt. Er is echter nog een bijkomend effect, want behandeling van mononucleotiden (uitgezonderd uridylzuur en thymidylzuur, die geen $-NH_2$ functie bevatten) met formaldehyde leidt eveneens tot een extinctieverhoging (FRAENKEL-CONRAT, 1954 ; STAEHELIN, 1958 ; HASELKORN en DOTY, 1961 ; GROSSMAN e.a., 1961 ; sectie 3.2.1.).

Volgens FRAENKEL-CONRAT (1954) vormt formaldehyde Schiff-basen ($R-N=CH_2$) met de aminogroepen der nucleïnezuren. STAEHELIN (1958 ; 1959) bestudeerde de reactie met behulp van ^{14}C -formaldehyde. Er treden minstens twee verschijnselen op : gedurende de eerste 4 uur is de binding volledig omkeerbaar, en worden waarschijnlijk bij lage concentratie monohydroxymethyl derivaten gevormd ($R-NH-CH_2OH$), en bij hogere concentratie dihydroxymethyl verbindingen $R=N-(CH_2OH)_2$. Na langere incubatietijd wordt de reactie evenwel gedeeltelijk onomkeerbaar (vorming van methyleenbruggen ?).

Maar benevens reactie met aminogroepen treedt nog een tweede, onafhankelijk effect op, namelijk een labilisatie van de geordende secondaire structuur. Het verschijnsel werd grondig bestudeerd met polyinosinezuur, dat geen aminogroepen bevat. In aanwezigheid van formaldehyde blijkt de smeltemperatuur T_m (temperatuur waarbij 50 % der moleculen overgaan van een geordende tweestrengige, of in dit geval driestrengige, schroeflijnstructuur naar een statistisch kluwen) te dalen en wel pro rata van $18^\circ C$ per 1 % formaldehyde (HASELKORN en DOTY, 1961).

Formaldehyde reageert alleen met vrije aminogroepen en niet met deze waarvan een waterstofatoom in een H-brug gebonden is (FRAENKEL-CONRAT, 1959 ; ZAMENHOF e.a., 1953 ; STAEHELIN, 1958). Aldus is het mogelijk om de fractie der basen te bepalen, welke in dubbele schroeflijn structuren betrokken is, door het kwantitatief volgen van de reactie bij lage concentraties formaldehyde (HALL en DOTY, 1959 ; HASELKORN en DOTY, 1961). Voor natief DNA bedraagt deze waarde 1,0 en voor een typisch RNA zoals TMV-RNA 0,55 tot 0,65 (bij $25^\circ C$ en 0,1 M fosfaatbuffer pH 7,0). Het enkelstrengig ϕX -DNA heeft waarschijnlijk een ietwat geringer gehalte aan intramoleculaire baseïnteractie. Bij hogere formaldehyde concentraties smelten de kleinere, schroeflijnvormige gebieden uit (zie hoger), zodat meer basen voor chemische reactie vrijkomen. De aanzienlijke reactie van formaldehyde met ϕX -DNA zelfs in het intacte virus, was één van de redenen om hieraan een enkelstrengige structuur toe te schrijven (SINSHEIMER, 1959 a en b).

Door verwarming kunnen tenslotte alle secondaire bindingen verbroken worden, zodat de reactie met formaldehyde volledig wordt. Aldus is het mogelijk om een onomkeerbare denaturatie te bekomen (zie ook sectie 3.2.1.). Dit is van bijzonder belang voor de meer homogene, virale, dubbelstrengige DNA's, welke normaal zeer gemakkelijk renatureren (BERNS en THOMAS, 1961).

In principe bestaat de mogelijkheid dat formaldehyde covalentgebonden bruggen tussen twee complementaire strengen zou vormen (FEL'DMAN, 1960) en aldus denaturatie zou beletten, juist zoals bijvoorbeeld difunctionele, alkylerende verbindingen en HNO_2 (GEIDUSCHEK, 1961). THOMAS en BERNS (1962) hebben evenwel bewezen dat geen dergelijke aaneenkitting van strengen plaats grijpt.

Tenslotte weze nog opgemerkt dat formaldehyde ook tot substitutie van de heterocyclische ring kan leiden. Zo wordt onder bepaalde voorwaarden met uridine het 5-hydroxymethyl derivaat gevormd (CLINE e.a., 1959).

3.2.1. EXPERIMENTEEL ONDERZOEK.

Het doel van de in deze sectie vermelde experimenten, was het aantonen door een directe methode van een gebied met een geordende, dubbelstrengige structuur in ϕ X-DNA. Het eventueel voorkomen hiervan zou een mogelijke verklaring uitmaken voor de schijnbare afwezigheid van eindgroepen (sectie 3.0.). Door een geordende dubbelstrengige structuur wordt verstaan een Watson-Crick helix (sectie 0.1.) waarvan de twee schroeflijnen volledig complementaire baseopeenvolgingen hebben, en dit over een lengte welke statistisch betekenisvol is (reeds voor een dodecanucleotide bedraagt de kans opdat in ϕ X-DNA toevallig een tweede complementair stuk ketting zou voorkomen minder dan 0,1 %). Deze geordende structuur is, in tegenstelling met niet-specifieke secundaire structuur, te wijten aan vele korte gebieden met toevallige, of onvolmaakte basecomplementariteit (HALL en DOTY, 1959 ; DOTY e.a. 1959 ; BOEDTKER, 1960 ; HASELKORN en DOTY, 1961).

Bij verwarming van een geordende, secundaire structuur treedt boven een welbepaalde temperatuur een transitie op tot een statistisch kluwen (zie ook vorige sectie). Deze overgang wordt het eenvoudigst gemeten door het hyperchromiciteitseffect. De smelttemperatuur hangt benevens van het oplosmiddel, vooral af van het gehalte G + C en de lengte van de dubbele helix (MARMUR en DOTY, 1959 ; SUEOKA e.a., 1959 ; ROLFE en MESELSON, 1959 ; PELLER, 1959). Verwarming van ϕ X-DNA leidt evenwel tot een ietwat onregelmatige verhoging van de optische densiteit, zonder bij enige temperatuur een scherpe transitie te vertonen (SINSHEIMER, 1959 b). Dit komt overeen met het uitsmelten van een heterogene populatie van korte gebieden met niet-specifieke secundaire structuur, welke verschillen in lengte, gehalte G + C en volmaaktheid van base-complementariteit. Het is echter mogelijk dat in deze achtergrond van nagenoeg graduele extinctiestijging een gebied verscholen is met een geordende secundaire structuur en een scherpe transitie. De proeven met formaldehyde, zoals hieronder beschreven, laten toe een dergelijke hypothetische transitie op te sporen met een grotere gevoeligheid.

Vooreerst werd de reactie met formaldehyde bestudeerd bij 37°C. Het reactiemengsel, bevattend ongeveer 25 μ g nucleïnezuur, 0,1 M natriumfosfaatbuffer pH 7,0 en 1,8 % formaldehyde, werd geïncubeerd in een gethermostatische celhouder van een registrerende "Beckman DK2" of een "Beckman DU" spectrofotometer. Als formaldehyde werd een 36 % oplossing gebruikt, welke eveneens 12 % methanol bevat als stabilisator ("Mallinckrodt Analytical Reagent").

De reactie zowel met ϕ X-DNA als met gedenatureerd kalfsthymus was grotendeels beëindigd in 4 uur. Het extinctiemaximum verschoof van 258 $m\mu$ tot 262 $m\mu$, in overeenstemming met de resultaten bekomen door FRAENKEL-CONRAT (1954) met TMV-RNA. Het minimumbedroeg respectievelijk 230 $m\mu$ en 234 $m\mu$.

De resultaten, bekomen met verschillende monsters, zowel wat betreft de snelheid van de reactie als de eindwaarde, zijn samengevat in Tabel 5. Zoals verwacht trad geen hyperchromiciteit op met natief, dubbelstrengige kalfsthymus DNA (de 0,5 %

extinctieverhoging is waarschijnlijk te wijten aan een geringe fractie gedenatureerd DNA, dat steeds aanwezig is ; HERSHEY e.a. 1963). Een mengsel van de vier desoxynucleotiden vertoonde een 10 % stijging van de chromiciteit. Deze waarde is bijgevolg een maat voor de rechtstreekse chemische reactie, en dient afgetrokken te worden van de totale extinctieverhoging om de bijdrage te vinden, welke geleverd wordt door het uitsmelten van de secundaire structuur.

Tabel 5 : Reactie met formaldehyde.

Het reactiemengsel wordt beschreven in de tekst. De extinctie werd gevolgd bij 262 m μ , en de resultaten zijn uitgedrukt als de verhouding van de extinctie na reactietijd t, tot de initiale waarde.

Preparaat	E ^t /E ^o na		
	20 min	1 uur	5 uur
Natief kalfsthymus DNA	1,005	1,006	1,005
4 desoxymononucleotiden (1)	1,061	1,092	1,106
Gedenatureerd kalfsthymus DNA (2)	1,108	1,152	1,205
2 x verwarmd kalfsthymus DNA (3)	1,117	1,167	1,227
ØX-DNA	1,118	1,168	1,199
Verwarmd ØX-DNA (4)	1,116	1,167	1,199
TMV-RNA (5)	1,135	1,226	1,317

- (1) Equimoleculair mengsel (zie tabel 1).
- (2) Verwarmd gedurende 10 min. bij 100°C in 0,5 M NaCl + 0,001 M Tris buffer pH 7,0.
- (3) Zelfde preparaat als (2) maar herverwarmd gedurende 10 min. bij 100°C in 0,004 M NaCl + 0,001 M Tris buffer pH 7,0 (bij deze lage ionensterkte is partiële renaturatie praktisch uitgesloten).
- (4) Verwarmd gedurende 10 min. bij 100°C in 0,033 M NaCl + 0,001 M Tris buffer pH 7,5 (residuele biologische activiteit 1 %).
- (5) Preparaat geschonken door Dr. P. CHEO.

ØX-DNA reageerde met eenzelfde snelheid en voor eenzelfde totale hyperchromiciteit als gedenatureerd kalfsthymus DNA en verwarmd ØX-DNA. Deze preeven leveren dan ook geen aanwijzing voor het bestaan van een geordende secundaire structuur (die bijvoorbeeld niet zou aanwezig zijn in het verwarmd ØX-DNA). De alternatieve verklaring, dat bij 37°C de dubbelstrengige zone reeds zou gedenatureerd zijn, is weinig waarschijnlijk, aangezien een helix met slechts 10 baseparen al een betrekkelijk hoge smeltemperatuur bezit (LIPSETT e.a., 1960 en 1961). De bedoeling

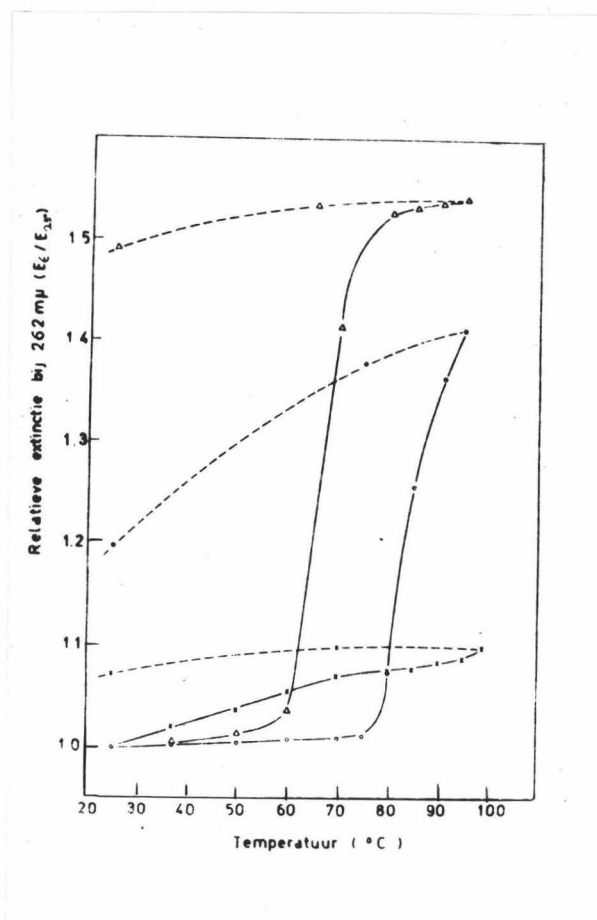
van deze proeven was bovendien om een verband te zoeken tussen de gepostuleerde, geordende structuur en de fysische heterogeniteit, zoals behandeld in sectie 4. Deze heterogeniteit bleef evenwel behouden na formaldehyde behandeling bij 37°C. TMV-RNA leidde tot een 31 % hyperchromiciteit, in overeenstemming met de resultaten bekomen door FRAENKEL-CÓNDRAT (1954); deze hogere waarde in vergelijking met enkelstrengig DNA is het gevolg van een meer compacte structuur (sectie 0.1.).

Het tweede deel van het experiment bestond in het volgen der extinctie bij verwarming van de in tabel 5 vermelde monsters. Na elke temperatuurverhoging of daling werd 10 min. gewacht ten einde het evenwicht te laten instellen, waarna een absorptiespectrum werd opgenomen. De bijzonderste resultaten zijn samengevat in figuur 17. Vooreerst werd als vergelijking de smeltcurve bepaald van onbehandeld kalfsthymus DNA. De transitie tot een statistisch kluwen gebeurde in een betrekkelijk nauw temperatuurgebied rond 83°C, en ging gepaard met een 41 % stijging van de extinctie. (Deze proef verschilt van deze voorgesteld in figuur 16, waar de irreversibele denaturatie werd bepaald na afkoeling). Het verbreken van de secundaire bindingen was voor de helft omkeerbaar. Het preparaat, verwarmd in aanwezigheid van formaldehyde, vertoonde echter een 54 % extinctieverhoging, welke nagenoeg onomkeerbaar was. De bijkomende 13 % hyperchromiciteit is te wijten aan de reactie van het formaldehyde met de vrijkomende basen. Bovendien werd vastgesteld dat in aanwezigheid van formaldehyde de smelttemperatuur daalde van 83°C tot 66,5°C. Analoge resultaten werden bekomen door HASELKORN en DOTY (1961), BERNS en THOMAS (1961) en GROSSMAN en medewerkers (1961) (deze publicaties verschenen slechts na de uitvoering van de hier beschreven experimenten). De vastgestelde daling van 16,5 % is te vergelijken met een $T_m = 32^\circ\text{C}$, berekend op basis van HASELKORN en DOTY's (1961) gegevens. Deze laatste zijn evenwel gesteund op experimentele resultaten bekomen met polyinosinezuur, en de uitbreiding tot andere geordende polynucleotiden is waarschijnlijk niet gerechtvaardigd.

Gedenatureerd DNA, vooraf behandeld met formaldehyde, vertoonde slechts een geringe hyperchromiciteit bij verwarming (Fig.17). Inderdaad reeds bij 37°C waren de meeste aminogroepen vrijgekomen voor reactie met het formaldehyde.

De gevoeligheid voor het opsporen van een geordende secundaire structuur door het volgen van de extinctie in functie van de temperatuur wordt aanzienlijk verhoogd in aanwezigheid van formaldehyde. Immers uit bovenvermelde controleproeven volgt dat (a) het hyperchrom effect, gepaard gaande met een bepaalde transitie, veel groter is, en (b) de achtergrond van graduele extinctieverhoging, te wijten aan toevallige basecomplementariteit, aanzienlijk is gedaald (vergelijk met Fig. 2 van SINSHEIMER, 1959 b). Evenwel kan bij verwarming van ϕ X-DNA in aanwezigheid van formaldehyde geen enkele transitie waargenomen worden. De resultaten met verwarmd ϕ X-DNA en met TMV-RNA waren ongeveer dezelfde als deze met ϕ X-DNA en gedenatureerd kalfsthymus DNA, en werden eenvoudigheidshalve niet in figuur 17 opgenomen.

Naar schatting zou een beperkte, geordende secundaire structuur, welke slechts 5 % der basen betreft, zeker met de hier beschreven directe methode opgespoord kunnen worden. Bijgevolg mag men besluiten dat minstens 95 % van de ϕ X-DNA keten essentieel enkelstrengig is, en dat er geen aanwijzing bestaat om de afwezigheid van vrije eindgroepen toe te schrijven aan dubbelstrengige zones.



Figuur 17 : Het uitsmelten van DNA-monsters.

De extinctie werd bepaald in een "Beckman DK₂" spectrofotometer. Bij iedere temperatuur werd vóór aflezing 15² min. equilibratie toegelaten. De extincties zijn gecorrigeerd voor thermische expansie van de oplossing.

————— Verwarming

----- Afkoeling

▲ — ▲ Natief kalfsthymus-DNA in aanwezigheid van formaldehyde (zie tekst en tabel 5).

o — o Hetzelfde monster in afwezigheid van formaldehyde.

x — x ØX-DNA in aanwezigheid van formaldehyde (zie tekst en tabel 5).

3.3. EXPERIMENTEN MET SLAGGEN - GIFT FOSFODIESTERASE.

De experimenten met formamide (sectie 3.1.) hebben aangetoond dat ϕ X-DNA geen gebied met geordende secondaire structuur bevat, tenzij deze gemakkelijk omkeerbaar is na denaturatie. Anderzijds kon door behandeling met formaldehyde geen dubbelstrengig gebied vastgesteld worden (sectie 3.2.), maar het is mogelijk dat de methode onvoldoende gevoelig was om deze te ontdekken.

Indien de reden voor de resistentie van ϕ X-DNA tegenover *E. coli* fosfodiësterase toch een geordende schroeflijnstructuur zou zijn (sectie 3.0.), dan is het evenwel waarschijnlijk dat deze laatste het viraal nucleïnezuur niet zou beschermen tegen afbraak door de slangengift exonuclease. Immers dit enzyme blijkt natief, dubbelstrengig DNA wel te kunnen afbreken (BOMAN en KALLETTA, 1957 ; WILLIAMS e.a., 1961 ; zie ook sectie 1.0.3.2.).

Bij incubatie van ϕ X-DNA met slangengift fosfodiësterase, in aanwezigheid van 66 mM glycinebuffer pH 9,8 en 1,25 mM $MgCl_2$, werd vastgesteld dat een monster hetwelk voor 2,0 % was gehydrolyseerd geworden, eveneens gemiddeld 3,7 letale "hits" had ontvangen per keten (gebaseerd op de overblijvende biologische activiteit). Door eenzelfde redenering als vermeld in sectie 2.1.0. voor kalfsmilt fosfodiësterase, kan men nu voorspellen dat indien de inactivatie alleen te wijten is aan de exonuclease activiteit, verdere hydrolyse tot drastische biologische inactivatie zal leiden (men zou moeten aannemen dat het eerste gebied van ongeveer 100 nucleotiden, welke het C'_{2-OH} ketenuiteinde uitmaakt, overbodig is, en dat na hydrolyse hiervan een essentieel deel aangetast wordt). Deze verklaring strookt evenwel niet met de experimentele resultaten. Immers een ander monster, dat voor 3,9 % was gehydrolyseerd geworden, had slechts 6,4 letale "hits" per molecule ontvangen. In andere woorden de verhouding exonuclease activiteit tot letale "hits" bleef nagenoeg constant (respectievelijk 29 en 33) bij verdubbeling van de hydrolyse. Dit is alleen mogelijk indien beide processen onafhankelijk zijn. Bijgevolg trad geen biologische inactivatie op te wijten aan de exonuclease activiteit sensu stricto, en dienen de letale "hits" toegeschreven te worden aan de contaminerende endonuclease activiteit. De mononucleotiden welke werden vrijgesteld, zijn hoogst waarschijnlijk afkomstig van degradatieproducten, maar niet van biologisch actief ϕ X-DNA.

Merken wij terloops op dat de contaminerende endonuclease activiteit van slangengift preparaten wel bekend is (RAZZELL en KHORANA, 1959 ; zie ook sectie 1.0.3.2.). Het is zelfs mogelijk dat het hier niet gaat om een onzuiverheid, maar wel om een gebrek aan strikte specificiteit van de exonuclease zelf. Immers dit enzyme, in tegenstelling met de *E. coli* fosfodiësterase, kan bijvoorbeeld ook het atypisch substraat di-p-nitrofenylfosfaat afbreken. Deze contaminerende endonuclease activiteit is relatief veel aanzienlijker dan in het geval van kalfsmilt fosfodiësterase (verhouding exo- tot endoactiviteit respectievelijk ongeveer 30 en 500).

Tenslotte werd de identificatie van de letale "hits" als kettingbreuken bevestigd door analytische centrifugatie. In het monster dat 6,4 letale "hits" had ontvangen (3,9 % hydrolyse ; zie hoger) was de sedimentatie coëfficiënt gedaald van 20,0 S (controle monster) tot 8,3 S. Al naar gelang de waarde van de

exponent voor het verband tussen moleculair gewicht en sedimentatie constante (zie tabel 3 in sectie 2.1.0.) betekent dit een gemiddelde van 5,8 tot 12,2 kettingbreuken per ϕ X-DNA molecule. Deze waarden zijn bijgevolg in goede overeenstemming met het aantal letale "hits", microbiologisch bepaald. (In het oplosmiddel gebruikt voor ultracentrifugatie, namelijk 0,1 M natriumfosfaatbuffer pH 7,0, heeft enkelstrengig nucleïnezuur reeds een tamelijk compacte structuur, zodat eerder 0,50 dan 0,35 zal be dragen, en bijgevolg het aantal kettingbreuken dichter bij de waarde 5,8 dan bij 12,2 zal liggen).

Wij mogen dus besluiten dat de hypothetische C'₃-OH eindgroep van ϕ X-DNA even resistent is tegenover hydrolyse door het slangengift enzyme als door de E. coli fosfodiësterase. Een secundaire structuur (schema A of B in sectie 3.0.) is bijgevolg een weinig waarschijnlijke verklaring voor deze resistentie tegenover exonucleasen.

3.4. THERMOINACTIVATIE.

3.4.0. INLEIDING.

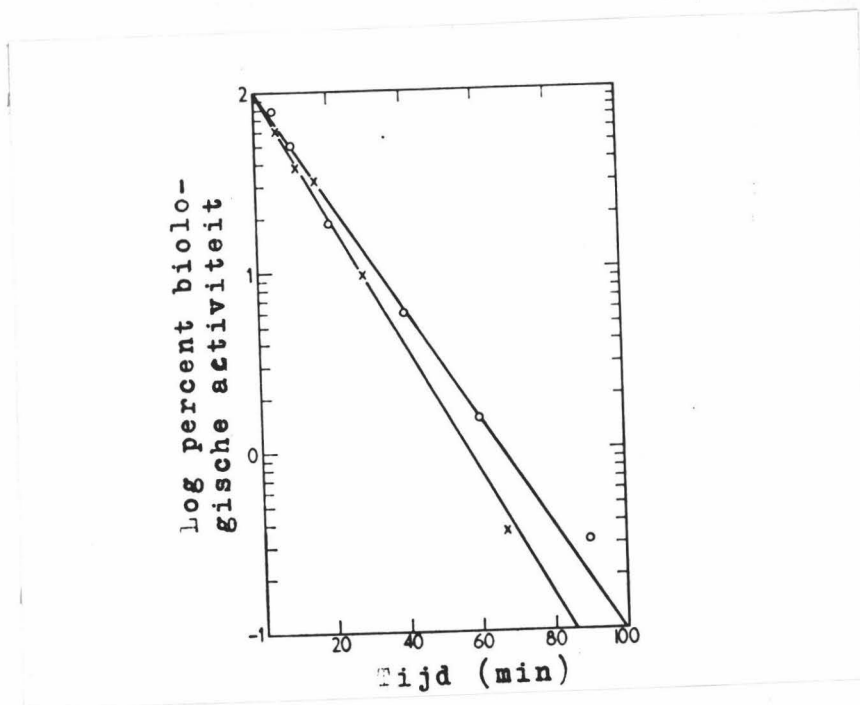
De afwezigheid zowel van een vrije C'₃-OH terminus als C'₅-OH terminus kan uitgelegd worden door een continue ringstructuur, ofwel door het voorkomen van substituenten, bijvoorbeeld aminocyl-groepen, op de respectievelijke terminale nucleotiden. Het is goed mogelijk dat de binding welke deze niet-nucleotide groepen aan de keten hecht, minder warmtestabiel zou zijn dan de normale 3'-5' internucleotidebindingen.

Ook is het niet uitgesloten dat de nucleotidesequenties, welke overeenkomen met de verschillende genen of "operons" aan elkaar zouden verbonden zijn door zwakke, niet-nucleotide bindingen, gewoonlijk "linkers" genoemd. Het voorkomen van dergelijke verbindingen in DNA is reeds meermalen voorgesteld geworden (BUTLER e.a. 1957; MONTY en DOUNCE, 1958; DOUNCE, 1959; HERMANS, 1959; BERNARDI e.a., 1961; TAYLOR, 1963; zie daarentegen LEVINTHAL en DAVISON, 1961). Het stukvallen van viraal en ribosoom RNA in subeenheden werd ook reeds meermalen beschreven (zie secties 0.1 en 0.2). ARONSON en MC CARTHY (1961) stelden bijvoorbeeld vast dat ribosoom RNA dissocieert tot kleinere stukken door korte verwarming bij 90°C.

Bijgevolg werd een studie ondernomen over de invloed van warmtebehandelingen op de structuur en de biologische activiteit van ϕ X-DNA. Tevens bood dit onderzoek de mogelijkheid om nog op een andere wijze het voorkomen van een beperkte, dubbelstrengige zone in ϕ X-DNA op te sporen.

3.4.1. INVLOED VAN TIJD EN CONCENTRATIE.

Bij verwarming van ϕ X-DNA monsters boven een bepaalde temperatuur bleek biologische inactivatie op te treden. Deze reactie is van de eerste orde en de snelheid bleef nagenoeg constant bij een daling van de DNA-concentratie met een factor 120 (Fig. 18). Men mag bijgevolg besluiten dat de biologische inactivatie een intramoleculaire reactie is. De natuur van de letale "hit" kan zijn (a) het onomkeerbaar uitsmelten van een essentieel dubbelstrengig gebied, (b) het breken of afsplitsen van een niet-nucleotide component, ofwel (c) een chemische wijziging van de primaire DNA-keten. Deze alternatieven worden in volgende secties verder onderzocht.



Figuur 18 : De inactivatiekinetiek van ØX-DNA bij verwarming.

100 μ l reactiemengsel, bevattende ØX-DNA (preparaat 3), 0,025 M glycinebuffer pH 9,0 (bepaald bij kamertemperatuur), 5×10^{-5} M EDTA en 0,025 M NaCl, werd gedurende de aangegeven tijd in een waterbad bij 98°C verwarmd, en daarna snel gekoeld in ijswater. Microproefbuisjes van 150 μ l inhoud werden gebruikt teneinde volumeveranderingen door verdamping te vermijden.

o — o 1,4 μ g ØX-DNA/ml.
 x — x 170 μ g ØX-DNA/ml.

3.4.2. INVLOED VAN DE TEMPERATUUR.

De biologische inactivatie van ϕ X-DNA oplossingen bij pH 7,5 en ionensterkte ongeveer 0,033, bleek snel te stijgen bij temperaturen hoger dan 60°C (Fig. 19). In 10 min. werd 50 % inactivatie bekomen bij 78°C. Bovendien de residuele biologische activiteit, kan nu ook de concentratie C'₃-OH eindgroepen bepaald worden. De monsters werden na verwarming met een overmaat E. coli fosfodiësterase geïncubeerd, en de fractie hydrolyseerbaar DNA gedoseerd (dit zijn de ketens met een vrije, terminale C'₃-OH groep). De resultaten voorgesteld in figuur 19, tonen aan dat de vrijstelling van C'₃-OH termini slechts geschiedde bij temperaturen hoger dan 75°C. 50 % reactie in 10 min werd bekomen bij 92°C (voor deze berekening werd verondersteld dat bij iedere vorming van een nieuwe C'₃-OH terminus slechts de helft van het DNA hydrolyseerbaar werd ; deze beperking wordt verklaard in sectie 5).

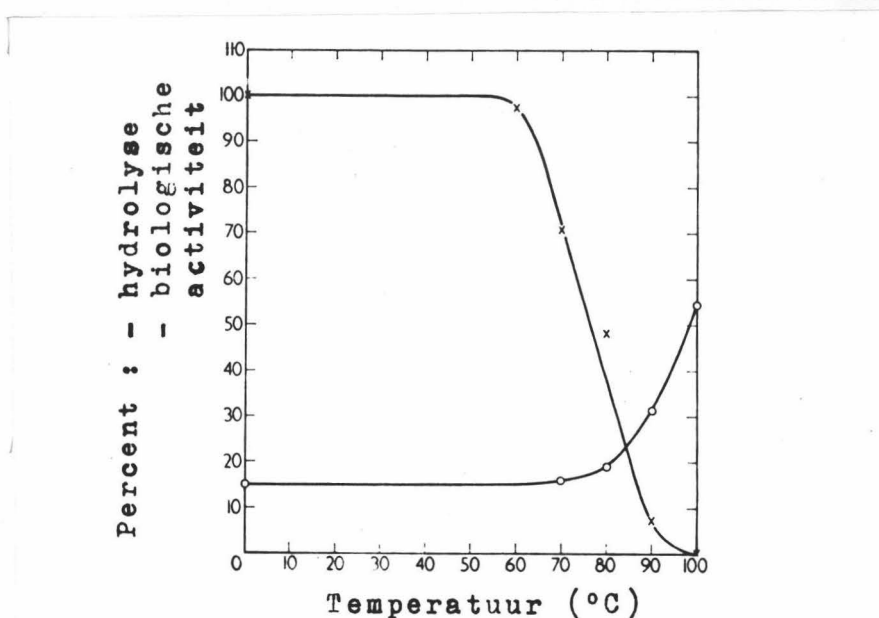
Bij verwarming van ϕ X-DNA zijn bijgevolg twee reacties te onderscheiden : 1° Het verlies van biologische activiteit en 2° het vormen van C'₃-OH ketenuiteinden.

Analytische centrifugatie van de monsters toonde aan dat de eerste reactie niet noodzakelijk gepaard ging met ketenbreuk (zie sectie 4.3.0.). De tweede reactie, namelijk het vrijstellen van C'₃-OH termini, hing daarentegen wel samen met splitsingen van de ketens. In aanmerking nemend de continuïteit van de ϕ X-DNA molecule (behandeld in sectie 5.) en het feit dat bij degradatie geen aanwijzing bekomen werd voor het bestaan van ondereenheden, mag besloten worden dat de tweede reactie te wijten is aan hydrolyse van normale fosfoësterbindingen.

Bij pH 9,0 verloopt de inactivatie veel trager dan in neutraal milieu (zie volgende sectie), zodat onder deze voorwaarden de reactie gemakkelijker in detail kon bestudeerd worden. De resultaten, voorgesteld als het logaritme van de reactieconstante in functie van de reciproke der absolute temperatuur (Arrhenius curve) zijn voorgesteld in figuur 20. Het verloop is in gans het meetbaar gebied rechtlijnig, hetgeen laat veronderstellen dat slechts één chemisch proces tot inactivatie bijdroeg. De activatieënergie voor de biologische inactivatie, berekend op basis van de richtingscoëfficiënt, bedraagt 40 kcal/mole (deze waarde is niet gecorrigeerd voor de verhoging van de protonen concentratie bij temperatuurstijging ; op basis van experimenteel gemeten pH-verschuivingen en aannemende dat de reactieconstante rechtstreeks evenredig is met (H⁺), bekomt men een waarde van 35 kcal/mole).

3.4.3. INVLOED VAN DE pH.

Een experiment, uitgevoerd onder analoge voorwaarden als vermeld bij figuur 19, maar bij pH 8,1 in plaats van 7,5, wees uit dat in dit oplosmiddel ϕ X-DNA meer stabiel was (na 10 min. verwarming werd respectievelijk volgende biologische activiteit teruggevonden : 60°C 100 %, 70°C 92 %, 80°C 76 %, 90°C 32 %, en 100°C 0,2 %). Bij pH 9,0 nam de stabiliteit nog toe. De bijzonderste resultaten van dit onderzoek zijn samengevat in tabel 6. De interpretatie wordt in volgende sectie behandeld.

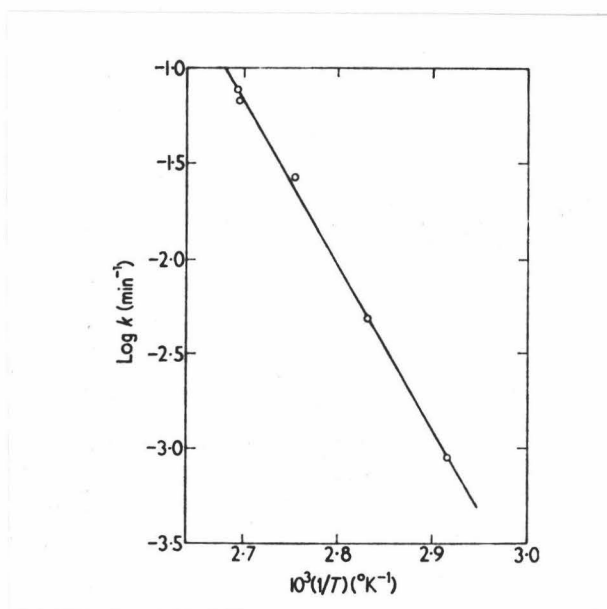


Figuur 19 : Invloed van de warmtebehandeling op de infectiviteit en op de hydrolyseerbaarheid van ØX-DNA.

60 μ l oplossing, bevattende 21 μ g ØX-DNA (preparaat 3), $1,6 \times 10^{-4}$ M Tris-buffer pH 7,5 (bepaald bij kamertemperatuur) en 0,033 M NaCl werd gedurende 10 min. in een 150 μ l microproefbuisje bij de aangegeven temperatuur verwarmd in een waterbad, en daarna snel gekoeld in ijswater. Een 10 μ l monster diende tot bepaling van de overblijvende biologische activiteit. Aan de rest werd glycinebuffer pH 9,5 (eindconcentratie 0,066 M), $MgCl_2$ (eindconcentratie 0,001 M) en 12 μ l E. coli fosfodiësterase toegevoegd. Na 6 uur incubatie bij 30°C werd het percent hydrolyse bepaald (onder deze voorwaarden was de exonuclease-reactie zeker volledig).

x — x Overblijvende biologische activiteit.

o — o Hydrolyseerbaarheid door de E. coli fosfodiësterase.



Figuur 20 : Arrhenius-functie van de ϕ X-DNA inactivatie bij verwarming.

100 μ l reactiemengsel, bevattende 0,14 μ g ϕ X-DNA, 0,025 M glycinebuffer pH 9,0 (bepaald bij kamertemperatuur), 5×10^{-5} M EDTA en 0,025 M NaCl, werd gedurende 100 min. in een waterbad bij de aangegeven temperatuur verwarmd, onder voorwaarden als vermeld in de legende van figuur 18.

Abscis : reciproke van de temperatuur (in Kelvin graden).
Ordinaat : logaritme van de inactivatie-reactieconstante.

Tabel 6 : Thermoinactivatie van ϕ X-DNA

pH	Oplosmiddel		$t_{1/2}$	Reactieconstante (sec^{-1})	
	Buffer	Zout		80°C	100°C
7,5	0,16 mM Tris	33 mM NaCl	0,033	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-2}$
8,1	21 mM Tris	17 mM NaCl	0,027	$4,6 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-2}$
9,0	25 mM glycine	25 mM NaCl	0,025	$8,2 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-3}$
7,5	0,16 mM Tris	33 mM NaCl	0,033	$8,1 \times 10^{-5}$ (x)	$1,0 \times 10^{-3}$ (x)

(x) Reactieconstante voor de vrijstelling van C'_3 -OH eindgroepen.

3.4.4. BESLUIT.

De meeste studies over de invloed van warmtebehandeling hebben betrekking op de dramatische transitie van een dubbelstrengige schroeflijnstructuur tot een statistisch kluwen. Zoals nagevoeg alle denaturatie processen is deze gebaseerd op het coöperatief uitsmelten van vele zwakke bindingen, en eens een bepaalde drempeltemperatuur bereikt, verhoogt de snelheid van de reactie aanzienlijk bij verdere stijging van de temperatuur. Deze transitie wordt meestal gevolgd door fysische methoden, zoals bijvoorbeeld spectrofotometrie rond 260 m μ (THOMAS, 1954 ; RICE en DOTY, 1957 ; zie secties 0.1. ; 2.1.1. en 3.2.). Anderzijds kan het verloop van een biologische activiteit van DNA gevolgd worden, namelijk het vermogen tot transformatie (zie sectie 0.0.) De belangrijkste studies op dit gebied zijn deze van ROGER en HOTCHKISS (1961) en vooral GINOZA en ZIMM (1961). Twee reacties zijn te onderscheiden : De eerste waarbij 90 tot 99 % van de transformerende activiteit verloren gaat, is waarschijnlijk toe te schrijven aan het ineensstorten van de secundaire structuur. De tweede inactivatie reactie gaat gepaard met een wijziging van de primaire structuur. Op te merken valt dat het met een dergelijk systeem niet mogelijk is een direct verband aan te tonen tussen fysische of chemische verschijnselen en biologische activiteit, aangezien deze laatste slechts toe te schrijven is aan een geringe fractie van de totale hoeveelheid DNA.

Een homogeen systeem zoals ϕ X-DNA biedt dan ook veel meer mogelijkheden voor een chemisch, fysisch en biologisch onderzoek van de verschijnselen die optreden bij verwarming. Enigszins analoge proeven werden reeds uitgevoerd met het infectief TMV-RNA. GINOZA (1958) besloot op basis van thermodynamische gegevens dat de letale "hit" bij verwarming van TMV-RNA in neutraal midden te wijten is aan de vorming van een intermediaire fosfodiëster, die uiteenvalt met splitsing van de keten en vorming van een C'_2 , C'_3 cyclische fosfodiëstereindgroep (BROWN en TODD, 1952). Tot eenzelfde interpretatie komen GORDON en HUFF (1962) aan de hand van chemische eindgroepbepaling. Op te merken valt dat dit reactieverloop niet kan optreden bij DNA aangezien geen vicinale OH-groep voorkomt. Het wordt om deze reden door EIGNER e.a. (1961) niet aanvaard, aangezien zij veronderstellen dat RNA en DNA door eenzelfde mechanisme thermisch gedegradieerd worden.

Bij de bespreking van de resultaten, vermeld in vorige secties, over de invloed van thermische energie op ϕ X-DNA, rijst in de eerste plaats de vraag "Wat is de natuur van de letale "hit" ? Er werd reeds opgemerkt dat hierbij geen breuk optreedt van de fosfaat-ribose ruggegraat. Men kan veronderstellen, in analogie met de resultaten handelend over transformerend DNA, dat de inactivatie zou te wijten zijn aan het uitsmelten van een gebied met een geordende, dubbelstrengige structuur (zie sectie 3.0.). Dit is echter weinig waarschijnlijk : a) Denaturatie is, tenzij voor extreme waarden, weinig gevoelig voor pH-verschuiving (ROGER en HOTCHKISS, 1961), hetgeen niet strookt met de resultaten vermeld in tabel 6. b) De letale "hits" zijn statistisch verspreid over gans de ϕ X-DNA keten (zie sectie 4.2.2.). c) Denaturatie reacties gaan steeds gepaard met grote waarden voor de activatie entropie. Immers laatstgenoemde is een maat voor het aantal vrijheidsgraden, bijgewonnen tijdens de overgang van de standaard vorm (geordende enkelstrengige of dubbelstrengige schroeflijn) tot de geactiveerde staat (verbreking van de geordende toestand). Zo worden waarden van 100 tot 300 e.u. gevonden zowel voor eiwitten (LAIDLER, 1958) als voor DNA (RICE en DOTY, 1957 ; PEACOCKE en WALKER, 1962). Op basis van de reactiesnelheden en de activatieënergie (experiment beschreven in figuur 20) wordt voor de biologische inactivatie van ϕ X-DNA een activatie entropie van 33 e.u. berekend (de berekening is gesteund op de vergelijking voor de absolute reactiesnelheid :

$$k = \frac{k' T}{h} e^{\Delta S^X/R} e^{-\Delta H^X/RT} \quad (\text{LAIDLER, 1958})$$

waarin k' Boltzman constante
 h Planck constante
 ΔS^X activatie entropie
 ΔH^X activatie enthalpie
 T absolute temperatuur
 R universele gasconstante).

De waarde voor de activatie entropie van ϕ X-DNA kan ook vergeleken worden met deze gevonden voor enkelstrengig RNA, namelijk ongeveer -20 e.u. (BACHER en KAUFMANN, 1952 ; GINOZA, 1958). Deze negatieve waarde is begrijpelijk aangezien de geactiveerde vorm in dit geval een cyclische fosfodiëster is, welke bijgevolg minder bewegingsvrijheid heeft.

Wat is dan wel de natuur van de letale "hit" ? Uit het voorgaande volgt dat de letale "hit" niet gepaard ging met het vrijstellen van C'_{3-OH} eindgroepen (zie sectie 3.4.2.), zodat het afsplitsen van een essentiële, niet-nucleotide substituent van de terminus onwaarschijnlijk is. De thermische inactivatie verliep zonder ketenbreuk, hetgeen het verbreken van zwakke "linkers" uitsluit (zie sectie 3.4.0.). Dit wordt bevestigd door experimenten welke aantonen dat de letale "hits" statistisch over de ganse keten verspreid waren (zie sectie 4.2.2.).

Deze gegevens tonen aan dat de inactivatie reactie moet gezocht worden in een chemische wijziging van de primaire polydesoxynucleotidketen, evenwel zonder hydrolyse van de fosfodiësters. In principe komen slechts twee reacties hiervoor in aanmerking, namelijk deaminatie van bepaalde basen en depurinatie. Deaminatie kan echter geëlimineerd worden, aangezien de letale "hit" tot labilisatie van de primaire keten leidt (zie sectie 4.3.0.).

Dat de letale "hit" inderdaad met een depurinatie te vereenzelvigen is, wordt door volgende argumenten bevestigd : a) De stabiliteit van ϕ X-DNA verhoogt aanzienlijk bij stijging van de pH (zie sectie 3.4.3.). Dit is in overeenstemming met de gekende proton-catalyse van de depurinatie reactie. TAMM e.a.

(1952 en 1953) hebben aangetoond dat in zuur midden (pH 2 - 4) de depurinatie veel sneller verloopt dan de fosfodiëster splitsing. Hetzelfde kan wel gelden voor verwarming in neutrale tot licht alkalische oplossing (b) GREER en ZAMENHOF (1962) hebben chemisch de purinen bepaald die worden vrijgesteld bij verwarming van kalfsthymus DNA. Bij 81°C in 0,005 M fosfaatbuffer, pH 6,8 en $\Gamma/2$ 0,009, vonden zij voor gedenateerd DNA $1,5 \times 10^{-5}$ depurinaties per basepaar per min. (deze waarde is niet gecorrigeerd voor verliezen bij de isolatie der purinen). In de veronderstelling dat iedere depurinatie dodend is, en op basis van het aantal purinenucleotiden in OX-DNA , berekent men voor laatstgenoemde een inactivatiesnelheid van $8,2 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, hetgeen in goede overeenstemming is met de onder vergelijkbare voorwaarden gevonden experimentele waarde, namelijk $1,2 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ (zie tabel 6).

De gevonden waarde van 40 kcal/mole voor de activatieënergie van het inactivatie proces (sectie 3.4.2.) is merkkelijk lager dan deze voor het uitsmelten van dubbelstrengig DNA, namelijk 55 kcal/mole (PEACOCKE en WALKER, 1962). Rekening houdend met de verschillende experimentele voorwaarden is het resultaat in overeenstemming met de 34 kcal/mole bekomen door GINOZA en ZIMM (1961) voor de inactivatie van de residuele, transformerende activiteit (dit is de activiteit die overblijft na uitsmelten van dubbelstrengig DNA, en welke waarschijnlijk te wijten is aan een geringe, maar reële biologische activiteit van de enkelstrengige ketens; GINOZA en ZIMM, 1961; ROWND e.a., 1961).

Er weze hier ook opgemerkt dat verwarming andere zekere voorwaarden mutageen is (ZAMENHOF en GREER, 1958). Het is bijgevolg wel mogelijk dat een geringe fractie (zeker minder dan 10^{-3}) van de OX-DNA depurinaties niet dodend zijn, maar tot een mutatie aanleiding geven.

Tenslotte blijft nog de bespreking van de tweede reactie, namelijk het vrijstellen van $\text{C}'_3\text{-OH}$ eindgroepen. In sectie 3.4.2. werd dit proces geïdentificeerd als de hydrolyse van $\text{C}'_3\text{-fosfaat}$ bindingen in de ruggegraat van de keten. Op basis van de gegevens voorgesteld in figuur 19, kan de activatieënergie geschat worden op 29 kcal/mole. Deze waarde is in goede overeenstemming met de 25 kcal/mole gevonden door EIGNER e.a. (1961) voor de thermische degradatie van macromoleculair, enkelstrengig DNA, bepaald door middel van analytische ultracentrifugatie.

Wat is nu het mechanisme van de kettingbreuk? In sectie 3.4.2. werd opgemerkt dat slechts één proces tot biologische inactivatie leidt, in casu depurinatie. Indien depurinatie en fosfodiëstersplitsing twee onafhankelijke processen zijn, zou dit waarschijnlijk in de Arrhenius-functie tot uiting komen, aangezien de activatieënergieën verschillen en de reactiesnelheden bij pH 9,0 van dezelfde grootteorde zijn (de fosfodiëster hydrolyse daalt niet bij stijgende pH). Ook konden door analytische centrifugatie onder bepaalde voorwaarden alle letale "hits" als kettingbreuken aangetoond worden (zie sectie 4.2.2.). Deze gegevens zijn een goede aanwijzing om aan te nemen dat de twee vastgestelde reacties niet onafhankelijk zijn, maar dat kettingbreuk alleen kan optreden op de gedepurineerde plaatsen.

Merken wij op dat GINOZA en ZIMM (1961) in hun studie over de thermo-inactivatie van transformerend DNA aannemen dat depurinatie en kettingbreuk onafhankelijk zijn en naast elkaar optreden. Deze veronderstelling was evenwel niet op experimenteel

werk gesteund (in tegenstelling met ons onderzoek, waar de biologische inactivatie van een fysisch gedefiniëerd molecuule vergeleken wordt met een chemische reactie, berekenen zij op basis van deze chemische reactie, en de biologische inactivatie de fysische dimensie van het onderzochte agens; door de depurinatie en de fosfodiëster hydrolyse als onafhankelijk te beschouwen be draagt de fout evenwel slechts 5 %).

Anderzijds nemen EIGNER e.a. (1961) depurinatie niet in beschouwing als een noodzakelijke, voorafgaande reactie, verantwoordelijk voor de labilisatie van de primaire DNA-keten. Hun argumentatie steunt vooral op de nagenoeg gelijke hydrolysesnelheid van de fosfodiësterbinding in RNA en DNA door thermische energie. Deze resultaten kunnen evenwel ook verklaard worden door aan te nemen dat ketenbreuk in RNA vergemakkelijkt wordt door fosfodiëstervorming (zie hoger) en in DNA door depurinatie.

De broosheid van de primaire fosfodiësterketen op de gedepurineerde plaatsen is overigens chemisch goed aanvaardbaar. Afsplitsing van een fosfaatgroep gebonden op de C'₃'-OH van een vrije desoxyribose (Diagram, reactie d) geschiedt gemakkelijk door β eliminatie (RALPH en KHORANA, 1961). In principe kan vervolgens ook de fosfaatgroep van de C'₅'-OH door hetzelfde mechanisme afgebroken worden. Dit zou evenwel leiden tot een polynucleotide brokstuk met een C'₃'-fosfaateindgroep, hetgeen niet met de hier beschreven experimentele resultaten overeenkomt (zie sectie 3.4.2.). Bijgevolg stellen wij een alternatief mechanisme voor, hetwelk in diagram 1 is voorgesteld. Bij verwarming van DNA-ketens in neutraal midden is de eerste wijziging in covalente structuur, die kan optreden, het verlies van een purinebase (reactie a). Nu is het bekend dat vrije desoxyribose voor een groot gedeelte tot de aldehyde vorm overgaat door opening van de furanose ring (reactie b; CHONG-FU e.a., 1949; OVEREND, 1950). De vicinale cis hydroxylgroep op de C'₄' die aldus gevormd wordt, laat toe dat bij een ietwat hogere temperatuur kettingbreuk kan optreden door vorming van een intermediaire fosfotriëster, die uiteenvalt tot een C'₄', C'₅' cyclische fosfodiëster (reactie c; deze reactie is volledig analoog met de hydrolyse van RNA, waarbij een C'₂', C'₃' cyclisch nucleotidederivaat gevormd wordt, zoals hoger beschreven). Een enigszins analoog reactieverloop werd vooropgesteld in het geval van alkalische hydrolyse van apurinezuur (JONES e.a., 1956). Veel experimentele resultaten zijn evenwel nog nodig vooraleer dit voorgestelde mechanisme aanvaard kan worden. Ook blijven bepaalde bijzonderheden nog op te helderen (zo bijvoorbeeld blijft de vraag open of reactie d plaats grijpt vóór b, en is het mogelijk dat de reactie d in feite berust op de vorming van een cyclische 3',4' fosfodiëster).

Samenvattend kan men besluiten dat er geen reden bestaat om te veronderstellen dat de integriteit van de ϕ X-DNA moleculen nog van andere bindingen afhankelijk is dan deze welke voorkomen in een normale polydesoxynucleotidketen. Evenmin kan een aanwijzing bekomen worden voor het bestaan van zones met geordende, secundaire structuur of van substituenten op de hypothetische, terminale nucleotiden.

- - - - -

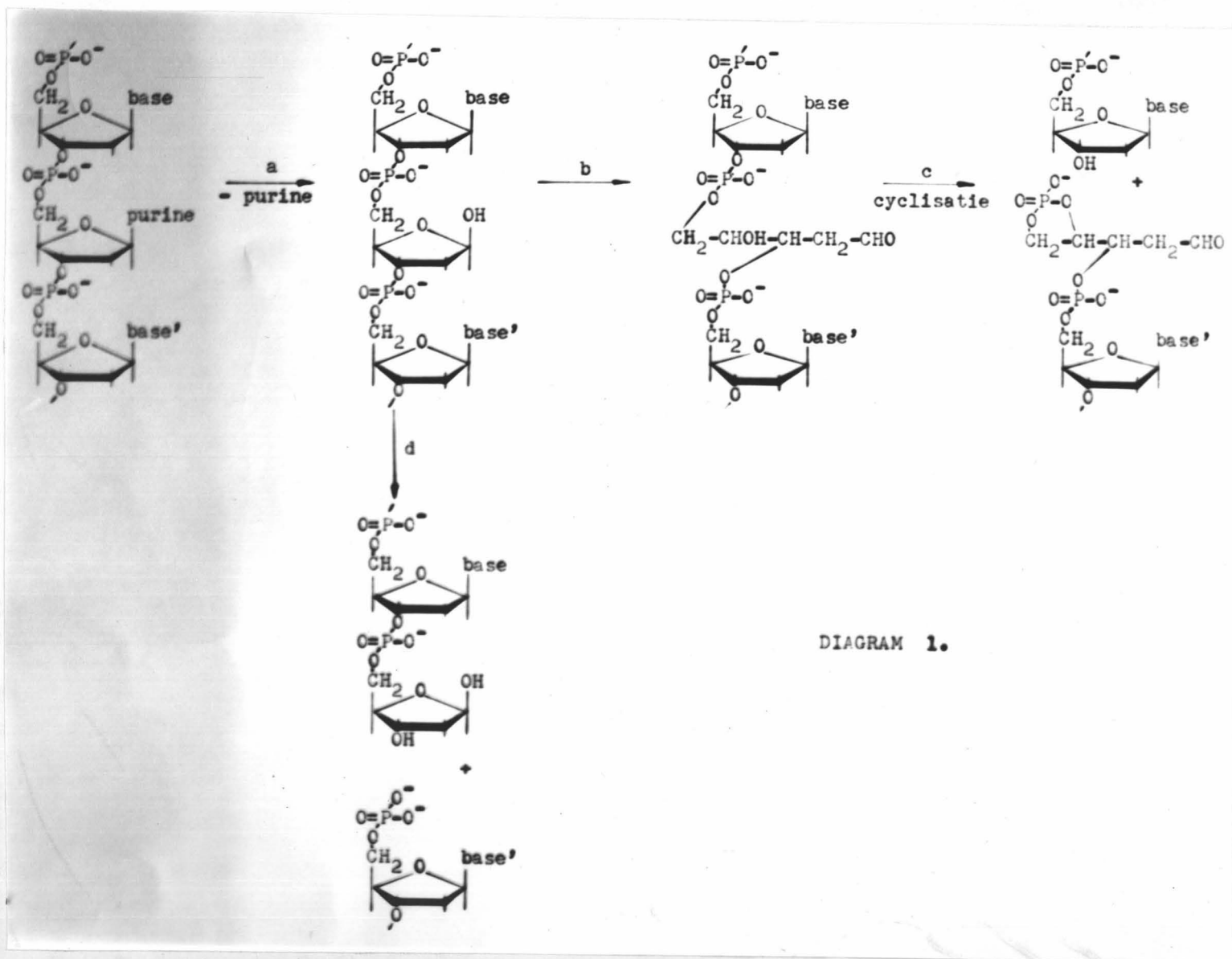


DIAGRAM 1.

4. DE FYSISCHE HETEROGENITEIT

VAN $\emptyset X$ -DNA.

4.0. INLEIDING.

In sectie 2. werd aangetoond dat $\emptyset X$ -DNA noch een vrije C'_{3} -OH noch een vrije C'_{5} -OH terminus heeft, en dat deze eindgroepen niet gemaskeerd zijn door fosfomonoësterfuncties. Volgens werd in sectie 3 de hypothese onderzocht dat de terminale nucleotidesequenties in een geordende secundaire structuur zouden betrokken zijn. Evenwel kon hiervoor niet de minste aanduiding gevonden worden door middel van methoden gesteund op behandeling met formamide, formaldehyde, slangengift exonuclease of warmte. Deze negatieve resultaten leidden tot de veronderstelling dat hetzij niet-nucleotide groepen aan de terminale nucleotiden gebonden zijn, hetzij dat $\emptyset X$ -DNA geen eindgroepen heeft en bijgevolg cirkelvormig is. Er bestaan redenen om te vermoeden dat niet-nucleotide groepen door relatief zwakke bindingen aan de polynucleotideketen zouden gehecht zijn, maar in sectie 3.4. kon geen aanwijzing bekomen worden voor het bestaan van dergelijke labiele substituenten. Bijgevolg wordt in deze sectie de alternatieve veronderstelling onderzocht, namelijk dat $\emptyset X$ -DNA cirkelvormig zou zijn.

SINSHEIMER (1959 b) had vroeger reeds opgemerkt dat bij het centrifugeren van $\emptyset X$ -DNA onder voorwaarden waarbij strekking van de ketens optrad, bijvoorbeeld bij lage ionensterkte of na behandeling met formaldehyde, twee componenten konden aangetoond worden. De hoofdcomponent, hier S_1 genoemd, maakte ongeveer 50 tot 70 % van het totaal uit, terwijl de tweede component, S_2 , ongeveer 20 tot 40 % van het DNA vertegenwoordigde, en met een 10 % tragere snelheid in het gravitatieveld migreerde. Deze heterogeniteit was zeer eigenaardig voor een DNA-preparaat dat bereid was uit een ogenschijnlijk homogeen en zuiver virus. Verontreiniging met een vreemd DNA was overigens niet zeer waarschijnlijk aangezien $\emptyset X$ -DNA preparaten met verschillend S_2 -gehalte toch een constante nucleotidesamenstelling vertoonden.

Het feit dat de heterogeniteit slechts aantoonbaar was na strekken van de ketens, schijnt erop te wijzen dat S_1 en S_2 alleen van elkaar verschillen in configuratie en niet in moléculair gewicht.

In de loop van deze onderzoeken werd dan ook het belang ingezien om een verband te zoeken tussen de schijnbare afwezigheid van terminale groepen, zoals enzymologisch werd aangetoond, en de fysische heterogeniteit. Immers de veronderstelling van een cirkelvormig molecule (zie hoger) verschaft eveneens een uitleg voor het bekomen van twee componenten. Een cirkelvormig DNA kan minder gestrekt worden, zodat het ook minder wrijvingsweerstand biedt in het centrifugaal veld en bijgevolg sneller migreert. S_1 zou bijgevolg overeenkomen met de gesloten keten. Indien om een of andere reden een bepaald aantal moleculen één enkele kettingbreuk zouden opgelopen hebben, ontstaat hierdoor een fysisch homogene fractie van open ketens, welke althans in gestrekte vorm trager sedimenteren. Twee of meer kettingbreuken leidt tot versnippering, hetgeen de kleine hoeveelheid degradatie

produkten verklaard. In de niet-gestreekte vorm (0,2 M NaCl) hebben zowel een cirkelvormig molecule als een open keten een statistisch-kluwenstructuur, zodat fysisch geen verschil kan aangetoond worden (Diagram 2).

Strekking van de ketens door ionensterkteverlaging (SINS-HEIMER, 1959 b) bleek minder geschikt voor studie van de fysische heterogeniteit (waarschijnlijk worden de grensvlakken tijdens de ultracentrifugatie verstoord door convectiestromingen). Er werd dan ook meestal gebruik gemaakt van de reactie met formaldehyde om de ketens te ontrafelen (zie sectie 3.2.). De standaard werkwijze was als volgt: Van 1 ml reactiemengsel, bevattend 25 tot 30 μg ϕX -DNA en bijvoorbeeld 0,08 M kaliumfosfaatbuffer pH 9,0 + 0,002 M EDTA, werd een 50 μl staal genomen ter bepaling van de biologische activiteit. Ter vervanging werd 50 μl 36 % formaldehyde toegevoegd (eindconcentratie 1,8 %), en het mengsel gedurende 20 uur bij 37°C geïncubeerd.

Bepaalde bezwaren kunnen misschien geopperd worden tegenover de analyse na behandeling met formaldehyde. Zo bijvoorbeeld is de reactie praktisch onomkeerbaar (zie secties 3.2.0. en 4.3.0.). Daarom werd gezocht naar een oplosmiddel dat geen base-interacties zou toelaten, en bijgevolg tot strekking van de DNA-ketens zou leiden, maar waarin niettemin geen blijvende verandering van de biologisch actieve moleculen zou optreden. Formamide (sectie 3.1.) bleek ongeschikt aangezien de UV-absorptie te hoog was. Daarentegen voldeed een alkalische buffer wel aan de gestelde eisen. Immers boven pH 10 tot 11 blijkt DNA te denatureren wegens dissociatie van de enolfuncties van guanylzuur en thymidylzuur (INMAN en BALDWIN, 1962; DOVE en DAVIDSON, 1962; VINOGRAD e.a., 1963). Deze transitie biedt daarenboven het voordeel onafhankelijk te zijn van het gehalte G + C, in tegenstelling bijvoorbeeld met de denaturatie door formamide of door verwarming. Praktisch werd ϕX -DNA gecentrifugeerd in een oplossing welke 0,04 M natriumcarbonaatbuffer pH 11,0, 0,01 M NaCl en 6×10^{-4} M EDTA bevatte. Na twee uur incubatie bij 30°C in dit milieu werd 94 % van de biologische activiteit teruggevonden.



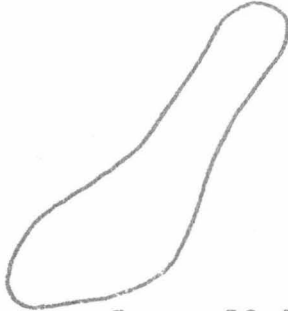
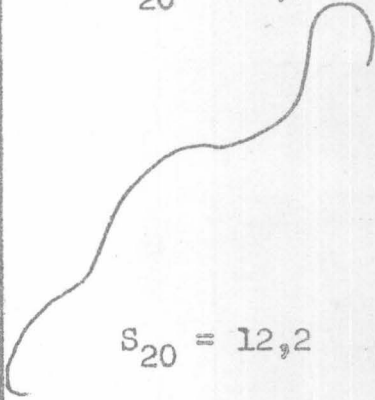
In het later gedeelte van dit onderzoek werd dan ook gebruik gemaakt zowel van analyse in alkali als na behandeling met formaldehyde. Beide methoden gaven nochtans steeds vergelijkbare resultaten, zowel wat betreft de kwantitatieve samenstelling als de relatieve waarden der sedimentatieconstanten van S_1 en S_2 (Tabel 7, experiment 1).

4.1. ONRECHTSTREEKSE AANDUIDING VOOR EEN CIRKELSTRUCTUUR.

4.1.0. VERBAND TUSSEN FYSISCH HETEROGENITEIT EN PRIMAIRE STRUCTUUR.

Het is mogelijk dat S_1 een meer compacte vorm heeft doordat het voor een gedeelte een zekere geordende secundaire structuur bezit (zie bijvoorbeeld schema A en B in sectie 3.0.). Deze veronderstelling werd getest door ϕX -DNA te centrifugeren onder voorwaarden waarbij base-interactie uitgesloten is.

DIAGRAM 2.

	Cirkel S_1	Open keten S_2
- Structuur : Hoge ionensterkte		
Lage ionensterkte of in CH_2O of bij hoge pH	$S_{20} = 20,5$  $S_{20} = 13,1$	$S_{20} = 20,5$  $S_{20} = 12,2$
- Biologische acti- viteit	+	=

In vorige sectie werd vermeld dat de secundaire structuur verbroken wordt door het uittitreren der enolfuncties. Voor ϕ X-DNA is deze dissociatie half volledig bij pH 10,6 (deze waarde hangt binnen zekere grenzen ook af van de ionensterkte ; VINOGRAD e.a., 1963). Aangezien de transitie van geordende tot statistisch-kluwenstructuur plaats grijpt in een pH-interval van ongeveer 0,1 (INMAN en BALDWIN, 1962) mag aangenomen worden dat bij pH 12,0 ϕ X-DNA geen base-interacties meer vertoont.

De resultaten van experiment 2, tabel 7, tonen aan dat onder deze voorwaarden de fysische heterogeniteit niettemin bewaard bleef, en dat nagenoeg geen wijziging optrad in de relatieve hoeveelheden van S_1 en S_2 . (De geringe daling van S_1 , welke gepaard ging met een trage biologische inactivatie, is toe te schrijven aan degradatie van de primaire DNA-ketens bij hoge pH-waarden).

Anderzijds kan een onomkeerbare verbreking van de secundaire structuur bekomen worden door verwarming bij 80°C of hoger in aanwezigheid van formaldehyde (zie sectie 3.2.1. en figuur 17). Deze behandeling bracht evenwel geen wijziging in de fysische heterogeniteit van ϕ X-DNA (Tabel 7, experiment 3).

Tabel 7 : De fysische heterogeniteit van ϕ X-DNA.

Experi- ment nr	ϕ X-DNA	Voorwaarden van centrifugatie	Sedimentatie coëfficiënt		Percent samenstelling		
			S_1	S_2	S_1	S_2	Traag (d)
1 (a)	prep.6	CH ₂ O	13,5	12,1	72,2	18,9	8,9
		OH ⁻ (pH 11,0)	12,8	12,1	67,7	16,8	15,5
		OH ⁻ (pH 11,0)	13,1	12,0	74,4	20,4	9,2
2 (b)	prep.6	OH ⁻ (pH 12,0)	11,5	10,7	62,4	25,7	11,9
3(a,c)	prep.3	CH ₂ O (controle)	13,1	12,1	60,4	17,0	22,6
		CH ₂ O (verwarmd)	13,8	12,3	57,0	25,3	17,7

- Voorwaarden zoals beschreven in sectie 4.0.
- Het monster bevatte 30 μ g ϕ X-DNA in 0,032 M natriumarsenaatbuffer pH 12,0
- Het monster werd na equilibratie met formaldehyde gedurende 10 min. verwarmd bij 80°C en vlug gekoeld.
- Trager migrerend materiaal met een statistische verdeling van S_{20} -waarden, en waarschijnlijk te vereenzelvigen met degradatieproducten.

Bijgevolg mag besloten worden dat S_1 en S_2 alleen van elkaar verschillen in primaire structuur. Dit is in volkomen overeenstemming met een covalent gebonden cirkelvorm voor S_1 en de overeenkomstige open keten voor S_2 , zoals in vorige sectie werd vooropgesteld.

4.1.1. VERBAND TUSSEN FYSISCHE HETEROGENITEIT EN INFECTIVITEIT.

In de loop van deze onderzoeken werden veel inlichtingen bekomen over de fysische samenstelling van ϕ X-DNA monsters, welke op zeer diverse manieren waren behandeld geworden. In figuur 21 wordt de residuele biologische activiteit bepaald ten opzichte van een constante standaard (ϕ X-DNA preparaat 3), uitgezet tegenover het gehalte S_1 en S_2 . (De behandelingen omvatten, van boven naar onder, incubatie bij lage ionensterkte en pH 6,5, 1 uur incubatie bij pH 9,5, incubatie met slægengift fosfodiësterase, 24 uur incubatie bij lage ionensterkte en pH 9,5, incubatie met *E. coli* fosfomonoësterase, behandeling met isobutanol, behandeling met formamide en isobutanol, en verwarming tot 100°C).

Het blijkt dat binnen de experimentele foutengrenzen, de biologische activiteit rechtstreeks evenredig is met het gehalte S_1 , maar zeker niet met de som van S_1 plus S_2 of met S_2 alleen. Dit betekent dat de infectieve moleculen fysico-chemisch identiek zijn met de S_2 -component. Dit besluit wordt verder bevestigd door de experimenten beschreven in sectie 4.2.

Dat de biologische activiteit alleen te wijten is aan de S_1 -component is in overeenstemming met de veronderstelde cirkelstructuur dezer moleculen. Bij breuk op een willekeurige plaats in de ring zou dan de open keten gevormd worden, namelijk S_2 welke biologisch inactief is.

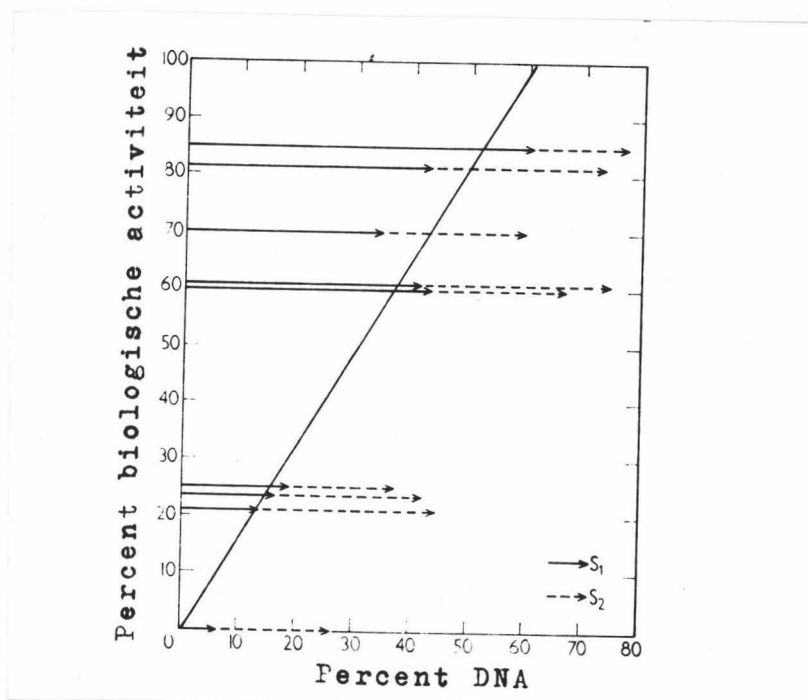
Men kan hier terloops opmerken dat de open keten toch nog alle elementen der genetische informatie bevat. Het letaal effect van de kettingbreuk is waarschijnlijk te wijten aan een essentieel gen, waarvan de continuïteit werd verbroken.

Dat de eerste ketenbreuk reeds tot biologische inactivatie leidt, kon nog op een andere wijze worden aangetoond. Indien een ϕ X-DNA preparaat met een geringe concentratie pancreas desoxyribonuclease geïncubeerd werd bleken er letale "hits" op te treden pro rata van 1 per 11 1/2 min. incubatie (Fig. 22). Bij extrapolatie van de functie, welke rechtlijnig is, tot 0 letale "hits", blijkt het snijpunt met de abscis te liggen op 0 min. incubatietijd, en niet op 11 1/2 min. Hieruit volgt dat één ketenbreuk per molecule door de desoxyribonuclease reeds dodend is. Tot eenzelfde besluit leidden ook de experimenten over de thermische inactivatie in functie van de verwarmingsduur (zie sectie 3.4.1. en figuur 18).

4.2. RECHTSTREEKS BEWIJS VOOR EEN CIRKELSTRUCTUUR.

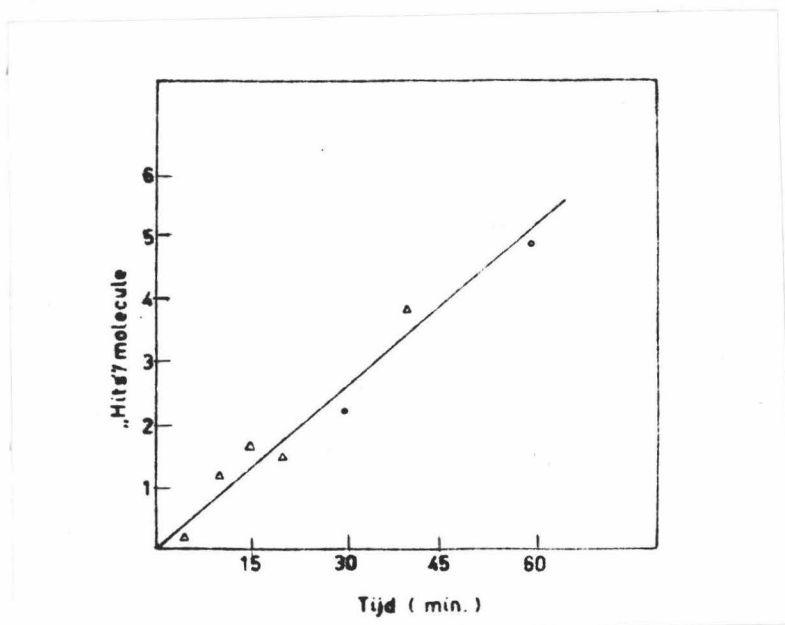
4.2.0. ONDERZOEKSPAN.

In vorige secties werd aangetoond dat de enige structuur, die een verklaring biedt voor alle experimentele resultaten, een covalent-gebonden ring is voor S_1 , terwijl S_2 het eerste degradatieprodukt uitmaakt en overeenstemt met de open keten. Verdere degradatie leidt tot kleinere brokstukken. Alleen de intacte ring is biologisch actief.



Figuur 21 : Verband tussen de biologische activiteit en de fysieke samenstelling.

ØX-DNA monsters werden op diverse wijzen gedeeltelijk geïnactiveerd (zie tekst). Enerzijds werd de overblijvende, biologische activiteit (ordinaat) bepaald ten opzichte van een constant referentiemonster (ØX-DNA preparaat 3), en anderzijds werd de fysieke samenstelling gemeten door analytische ultracentrifugatie na behandeling met formaldehyde. De relatieve hoeveelheden S_1 en S_2 (respectievelijk de sneller en de trager migrerende, homogene component) zijn uitgezet in abscis. De balans (100% - ($S_1 + S_2$)) bestaat uit degradatieprodukten.



Figuur 22 : De biologische inactivatie in functie van de incubatie met desoxyribonuclease.

Ieder 200 μ l reactiemengsel, bevattend 30 μ g ϕ X-DNA (preparaat 6), $1,25 \times 10^{-3}$ M Tris-buffer pH 7,5, 5×10^{-3} M $MgCl_2$, 0,05 M NaCl, 0,005 % rondsplasma albumine en 7×10^{-5} μ g rondsplasma desoxyribonuclease, werd gedurende de aangegeven tijd geïncubeerd bij 37°C. De reactie werd beëindigd door toevoeging van kaliumfosfaatbuffer pH 9,0 (eindconcentratie 0,08 M) en EDTA (eindconcentratie 0,002 M) tot een totaal volume van 1 ml. Een monster van 50 μ l diende voor de bepaling van de overblijvende, biologische activiteit, uitgedrukt als "hits" per molecule ; de rest werd gebruikt voor het experiment voorgesteld in figuur 23.

De vraag rijst nu : "Hoe kan een dergelijke structuur bewezen worden ?" Indien in een populatie homogene polymeren volledig willekeurig kettingbreuken gaan optreden, dan wordt de relatieve hoeveelheid van de intacte moleculen, en deze met één, twee of meer "hits", gegeven door de Poisson-vergelijking (zie sectie 2.1.0.). Meer bepaald vindt men :

$$p_0 = e^{-m} \text{ (fractie intacte moleculen)}$$

$$p_1 = e^{-m} m \text{ (fractie met één kettingbreuk)}$$

De rest, namelijk $[1 - (p_0 + p_1)]$, is dan toe te schrijven aan moleculen welke twee of meer kettingbreuken ondergaan hebben. Deze theoretische functies $p_0 f(m)$ en $p_1 f(m)$ zijn voorgesteld in figuren 23 en 24.

In het geval van een ringmodel voor de intacte molecule, bezit het eerste degradatieproduct de unieke eigenschap in fysisch (maar niet chemisch) opzicht homogeen te zijn. Daarenboven treedt hierbij nagenoeg geen verandering van moleculair gewicht op. Twee of meer kettingbreuken leiden natuurlijk wel tot fragmentatie.

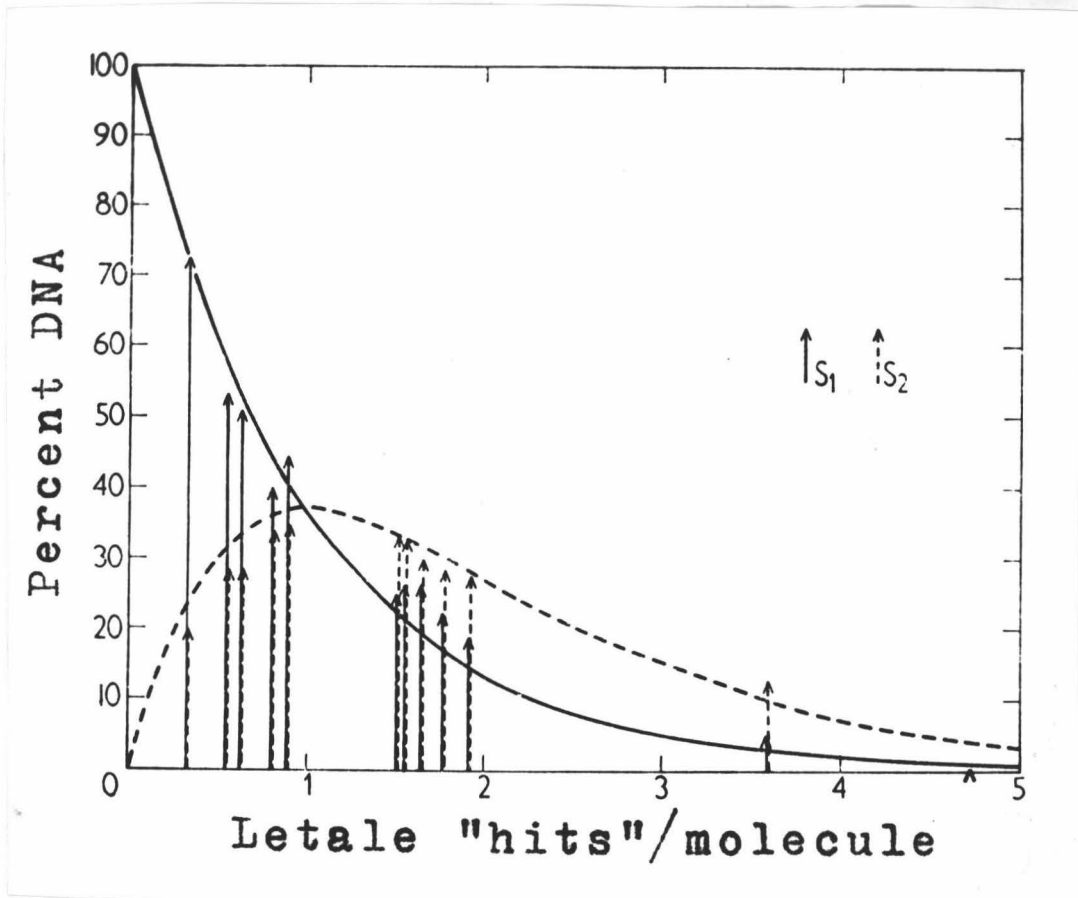
Indien S_1 inderdaad cyclisch is, en S_2 met de open keten overeenkomt, zou de relatieve hoeveelheid dezer componenten aan bovenstaande theoretische functies moeten voldoen, welke ook de natuur of het aantal der ketenbreuken weze. Deze voorwaarde wordt in volgende secties getest.

4.2.1. VERBREKING VAN DE PRIMAIRE STRUCTUUR DOOR PANCREAS DESOXYRIBONUCLEASE.

Een willekeurig aantal ketenbreuken kan ~~wobekomen~~ worden door incubatie met pancreas desoxyribonuclease. Praktisch werd het experiment als volgt uitgevoerd. ϕ X-DNA monsters werden gedurende verschillende perioden met endonuclease behandeld. De reactie werd beëindigd door pH-verhoging en complexering van de Mg^{++} -ionen. Op een staal werd de residuele biologische activiteit bepaald. Hieruit kon het aantal letale "hits" m berekend worden. De rest van het monster diende voor de analyse van de fysische heterogeniteit, door centrifugatie na behandeling met formaldehyde.

De resultaten zijn voorgesteld in figuur 23. De abscis-waarden zijn telkens de letale "hits" per molecule, terwijl in ordinat de relatieve hoeveelheden S_1 en S_2 zijn afgebeeld. Hierbij dient nog opgemerkt dat het controle-preparaat slechts voor 72 % uit S_1 bestond. Teneinde de resultaten vergelijkbaar te maken met de theoretische curven, die vertrekken van een homogene populatie, werd aangenomen dat in het controle-preparaat reeds gemiddeld 0,33 ketenbreuken hebben plaats gegrepen. ($m = -2,3 \log 0,72 = 0,33$). De m -waarden van de andere monsters werden dan ook met eenzelfde bedrag verhoogd. De waarde van de sedimentatie-coëfficiënt der beide componenten was onafhankelijk van de enzymatische degradatie, en bedroeg respectievelijk voor S_1 13,6 ; 14,0 ; 13,5 ; 14,2 ; 13,5 ; 13,5 ; 14,0 ; 13,6 ; 14,1 en 13,9, en voor S_2 12,3 ; 12,8 ; 12,1 ; 12,5 ; 11,9 ; 12,1 ; 12,3 ; 12,5 ; 12,3 en 12,1.

Uit de resultaten volgt vooreerst dat het gehalte S_1 nauw de curve $p_0 = e^{-m}$ volgt. Dit betekent dat iedere letale "hit", in dit experiment te identificeren met een ketenbreuk, het wegvallen van een S_1 -molecule voor gevolg heeft. Men mag dus besluiten dat enkel en alleen S_1 de drager is van de biologische activiteit.



Figuur 23 : De fysische samenstelling van ϕ X-DNA in functie van de ketenbreuken door endonuclease-behandeling.

De curven zijn theoretische functies, berekend op basis van de Poisson-vergelijking :

- $p = e^{-m}$; gehalte intacte moleculen (in percent) in een homogene populatie polymeren onderworpen aan willekeurige ketenbreuken, in functie van het gemiddeld aantal dezer "hits".
- - - $p_1 = e^{-m} m$; overeenkomend gehalte moleculen met één ketenbreuk.

Experimenteel gedeelte : ϕ X-DNA monsters werden tot verschillende graden geïnactiveerd door behandeling met pancreas desoxyribonuclease, zoals beschreven in de legende van figuur 22. Op een gedeelte (50 μ l) werd de residuele biologische activiteit bepaald, en de rest (950 μ l) diende, na behandeling met formaldehyde, voor fysische karakterisering door analytische ultracentrifugatie.

De letale "hits" per molecule (abscis), bepaald op basis van de overblijvende, biologische activiteit, zijn te vereenzelvigen met ketenbreuken. De overeenkomstige, relatieve hoeveelheden S_1 en S_2 (respectievelijk sneller en trager migrerende, homogene component) zijn naast elkaar uitgezet in ordinaat. Alle absciswaarden zijn gecorrigeerd voor de 0,33 ketenbreuken, welke voorkwamen in het onbehandeld ϕ X-DNA monster.

Het gehalte S_2 blijkt eerst te stijgen, om na één "hit" per molecule ongeveer de maximum waarde van 37 % te bereiken, en bij verdere hydrolyse te dalen, maar nochtans in absolute waarde groter te blijven dan S_1 . Het verloop volgt zeer dicht de theoretische functie $p_1 = e^{-m} m$, zodat mag besloten worden dat S_2 het eerste degradatieproduct van S_1 is. Het feit dat het gehalte S_2 na één "hit" per molecule zeer dicht het berekende maximum benadert, betekent daarenboven dat praktisch geen verandering in moleculair gewicht optreedt bij de overgang van S_1 tot S_2 . Aangezien S_2 na een gemiddelde van één "hit" per molecule toch nog verder de berekende curve volgt, betekent dit ook dat de ketenbreuken volledig willekeurig verdeeld zijn. In andere woorden de waarschijnlijkheid van een tweede "hit" is even groot als van de eerste.

Op te merken valt dat alle centrifugatie-beelden slechts twee grensvlakken vertoonden, zodat mag besloten worden dat enkel twee fysisch homogene componenten voorkwamen. Twee of meer ketensplitsingen leidde bijgevolg tot fragmentatie der moleculen.

Bij het zoeken naar een model, dat aan voornoemde eisen voldoet, was het ons niet mogelijk een andere structuur te bedenken dan een ring. Bij opening om het even waar in de cirkel verkrijgt men een rechte keten, met hetzelfde moleculair gewicht, en al de dusdanig gevormde moleculen zijn fysisch identiek. Een tweede breuk leidt evenwel tot een verdeling van degradatieproducten met verschillende ketenlengten.

Een alternatief model kan bijvoorbeeld bedacht worden. Men kan veronderstellen dat S_1 een rechte keten zou zijn, en dat er op een bepaalde plaats, dicht bij de terminus zich een binding zou bevinden welke noodzakelijkerwijze eerst moet gesplitst worden door de pancreas desoxyribonuclease - met vorming van S_2 - vooraleer verdere enzymatische actie kan plaats grijpen (zie onderstaand schema)



Benevens het feit dat geen aanwijzing bestaat voor het brokstuk X, is dit model volkomen onaanvaardbaar wegens het selectief karakter van de eerste kettingbreuk. Immers (a) de specificiteit van pancreas desoxyribonuclease is sedert vele jaren grondig bestudeerd geworden, en er blijkt absoluut geen selectiviteit te bestaan voor bepaalde nucleotideopeenvolgingen (KUNITZ, 1950; SINSHEIMER, 1955; VANECKO en LASKOWSKI, 1961; LASKOWSKI, 1961; RALPH e.a., 1962; HURST en BECKING, 1963), (b) een monopolie van een eerste kettingbreuk veronderstelt dat de reactie in zekere mate verschillend is van deze der volgende "hits"; dit strookt evenwel niet met de vaststelling dat de waarschijnlijkheid van de eerste ketenbreuk gelijk is aan deze der volgende, (c) de statistische verdeling der splitsingen over de ganse lengte der ketens werd experimenteel aangetoond (zie sectie 5.1.1.).

4.2.2. VERBREKING VAN DE PRIMAIRE STRUCTUUR DOOR

VERWARMING.

In vorige sectie werd aangetoond dat de enige structuur die de fysische heterogeniteit kan verklaren, een cirkelvormige biologisch actieve component is, tenzij in het zeer onwaar-

schijnlijk geval dat pancreas desoxyribonuclease op een selectieve plaats van de keten zou inwerken, alvorens tot verdere degradatie te kunnen overgaan. Deze laatste opwerping kon nog op een andere wijze onderzocht worden.

Het experiment werd in principe op dezelfde wijze uitgevoerd als beschreven in secties 4.2.0. en 4.2.1., uitgezonderd dat de ketenbreuken niet werden verkregen met pancreas desoxyribonuclease, maar integendeel door verwarming bij 98,2°C en pH 9,0. Bij deze hoge temperatuur is een beperkte secundaire structuur, welke eventueel de selectiviteit van de enzymatische afbraak zou moeten verklaren, totaal uitgesloten.

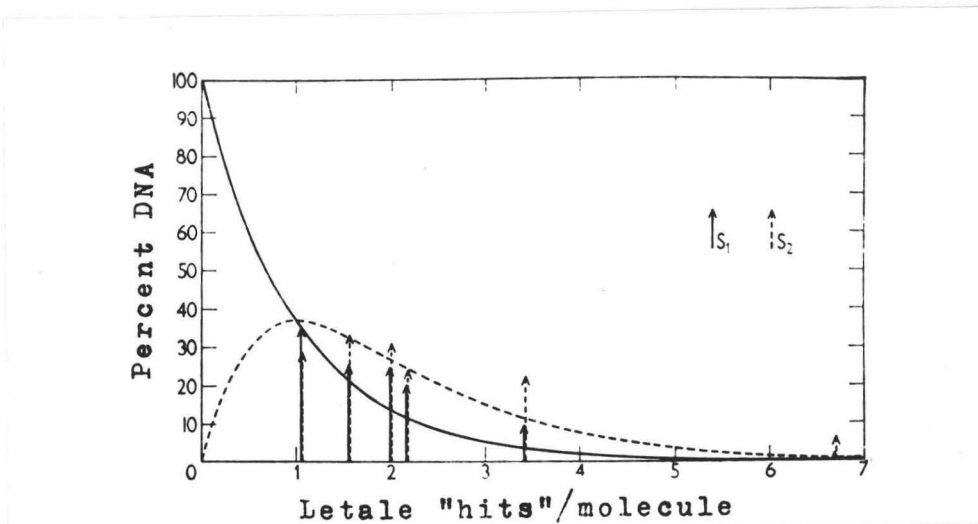
De resultaten zijn voorgesteld in figuur 24. De overeenkomst tussen de relatieve hoeveelheden S_1 en S_2 en de theoretische curven is iets minder bevredigend dan in vorig experiment (figuur 23), maar blijft niettemin binnen de aanneembare foutengrens. Deze grotere spreiding dient toegeschreven te worden aan het feit dat het ϕX -preparaat 5, waarover wij op dat tijdstip beschikten, van slechtere kwaliteit was. Het onbehandelde controlemonster bestond slechts voor 34,9 % uit S_1 , hetgeen wijst op een gemiddelde van 1,05 "hits" per ϕX -DNA molecule. Ook in deze proeven was de sedimentatie-coëfficiënt onafhankelijk van de degradatie en bedroeg respectievelijk voor S_1 12,8 ; 13,0 ; 13,2 ; 12,8 en 13,1 en voor S_2 11,4 ; 11,5 ; 11,5 ; 11,3 en 11,2 (deze waarden zijn iets lager dan deze vermeld in sectie 4.2.1., wegens de enigszins geringere ionensterkte van het gebruikte oplosmiddel).

Uit de gegevens voorgesteld in figuur 24 kan niettemin afgeleid worden dat S_1 daalt zoals verwacht voor de infectieve component. Bijgevolg leidde iedere letale "hit" tot ketenbreuk (deze vaststelling is in schijnbare tegenstelling met sectie 3.4.2., waar aangetoond werd dat bij pH 7,5 verwarming bij een hogere temperatuur nodig is voor ketenbreuk dan voor biologische inactivatie ; bij pH 9,0 echter verloopt de depurinatie veel langzamer, en wordt ogenschijnlijk onmiddellijk gevolgd door ketensplitsing, een reactie welke niet in dezelfde zin door de pH beïnvloed wordt ; zie ook de vergelijkbare reactiesnelheid voor depurinatie bij pH 9,0 en voor ketenbreuk bij pH 7,5 in tabel 6, en de invloed van formaldehyde op de gedepurineerde schakels in sectie 4.3.0.). Bij geringe degradatie wordt een verhoging van S_2 vastgesteld, welke nadien daalt in overeenstemming met de functie $p_1 = e^{-m}$. Hieruit volgt dat de kans voor een tweede ketenbreuk even groot is als voor de eerste, hetgeen een eerste exclusieve splitsing uitsluit. Bijgevolg mag de ringstructuur voor S_1 en de overeenkomstige open keten vorm voor S_2 als bewezen beschouwd worden.

4.3. CONTROLE PROEVEN.

4.3.0. HET VOORKOMEN VAN LABIELE SCHAKELS.

Indien S_2 een open keten structuur bezit, mag men verwachten dat het zou hydrolyseerbaar zijn door *E. coli* fosfodiësterase. Dit bleek evenwel niet helemaal het geval te zijn. Voor deze proeven werden monsters genomen van hetzelfde experiment als voorgesteld in figuur 8. Na 1 uur was de enzymatische reactie praktisch reeds beëindigd, en een monster werd geanalyseerd na behandeling met formaldehyde. Een tweede monster, na 8 uur, werd geanalyseerd zonder formaldehyde-behandeling. Zoals hoger vermeld (sectie 4.0., en diagram 2) sedimenteren onder deze voorwaarde S_1 en S_2 samen, aangezien ze beide een compacte, statistisch-kluwenstructuur hebben. Materiaal met twee of meer ketenbreuken migreert evenwel trager.



Figuur 24 : De fysische samenstelling van ϕ X-DNA in functie van de ketenbreuken door warmte-behandeling.

De curven zijn dezelfde theoretische Poisson-functies als beschreven in de legende van figuur 23.

Experimenteel gedeelte : Het experiment is analoog met dit voorgesteld in figuur 23, uitgezonderd dat de ketenbreuken werden verkregen door verwarming, in plaats van door behandeling met een endonuclease.

200 μ l reactiemengsel, bevattend 34 μ g ϕ X-DNA (preparaat 5), 0,025 M glycinebuffer pH 9,0, 5×10^{-5} M EDTA en 0,025 M NaCl, werd gedurende een bepaalde tijd bij 98,2°C verwarmd, en snel gekoeld. Hierop werd 800 μ l 0,1 M kaliumfosfaatbuffer pH 9,0 toegevoegd. De overblijvende biologische activiteit en de fysische samenstelling werden bepaald zoals beschreven in de legende van figuur 23.

Alle abscis-waarden zijn gecorrigeerd voor de 1,05 ketenbreuken, welke voorkwamen in het onbehandeld ϕ X-DNA monster.

Tabel 8 : Fysische heterogeniteit na behandeling met E. coli fosfodiësterase.

Zelfde experiment als voorgesteld in figuur 8.

	Monster na					
	1 uur			8 uur		
	Controle %	+ Enz. %	Vershil %	Controle %	+ Enz. %	Vershil %
S ₁	49,2	45,4	- 3,8	81,9	72,4	- 9,5
S ₂	30,7	25,6	- 5,1			
Traag	20,1	10,6	- 9,5	18,1	8,0	-10,1
Totaal	100,0	81,6		100,0	80,4	
Niet gehydrolyseerd (a)		87,5			83,9	

(a) Berekend op basis van de chemisch bepaalde, vrijgestelde mononucleotiden (Fig. 8).

De resultaten, voorgesteld in tabel 8, tonen aan dat door het enzyme slechts ongeveer 1/6 van de hoeveelheid S₂ tot mononucleotiden werd omgezet. De vastgestelde hydrolyse geschiedde grotendeels ten koste van de degradatieprodukten, welke evenwel slechts voor ongeveer 50 % werden afgebroken (dit effect wordt verder behandeld in sectie 5). Overigens is de chemisch bepaalde hydrolysegraad in goede overeenstemming met deze berekend op basis van het sedimentatiegedrag.

Men kan nu terug opwerpen dat S₂ wel overeenkomt met de open keten, maar een fosfaatgroep draagt op de terminale C'₃-OH functie (zie sectie 2.0.2.). Teneinde dit te testen werd een ØX-DNA monster gedurende 24 uur met een overmaat bacteriële alkalische fosfatase geïncubeerd, en daarna behandeld met E. coli exonuclease, zoals beschreven in experiment B van figuur 10 (sectie 2.0.2.). Analytische ultracentrifugatie toonde evenwel aan dat hierdoor nagenoeg geen verandering optrad in de relatieve hoeveelheden S₁ en S₂: In een eerste experiment bedroeg de verhouding S₁/S₂ 2,55 in vergelijking met 2,41 voor de controle (alleen met E. coli fosfodiësterase behandeld), in een tweede experiment respectievelijk 3,0 en 3,3.

Bijgevolg komt men voor S₂ tot ongeveer hetzelfde dilemma als in sectie 3.0. uitgelegd werd voor het ganse ØX-DNA preparaat. Ofwel moet men aannemen dat de C'₃-OH terminus omwille van base-interacties niet voor enzymatische reactie beschikbaar is, ofwel is S₂ onder de voorwaarden van de enzymatische incubatie niet in de open keten vorm (vide infra).

Men kan zich voorstellen dat in het normale oplosmiddel (een ionensterkte van minstens 0,1 is nodig teneinde de biologische stabiliteit te verzekeren) de ketenuiteinden als het ware in het binnendeel van de statistische kluwens ingevroren zijn. Een ØX-DNA molecule, welke enkele ketenbreuken ondergaan heeft, zou onder deze voorwaarden niet uiteenvallen, maar als een deeltje, samengehouden door secundaire bindingen, bewaard blijven. Denaturatie, hetzij met formaldehyde hetzij met alkali, zou dan leiden tot het configurationeel onderscheid tussen S₁ en S₂ en tot fragmentatie van de ketens, die op twee of meer plaatsen onder-

broken zijn. Dergelijke verborgen ketenbreuken schijnen te bestaan in macromoleculair RNA (SPIRIN, 1961). Dat een complex, samengehouden door secondaire bindingen, toch zeer stabiel kan zijn, en zich in alle fysische opzichten als een covalent gebonden molecule kan gedragen wordt bijvoorbeeld aangetoond door het complex bekomen na behandeling van pancreas ribonuclease met subtilisina. Dit bestaat uit een S-peptide van 20 aminozuren en een S-proteïne, dat de rest van het origineel molecule bevat. Na denaturatie (ureum, trichloorazijnzuur) kunnen beide componenten gescheiden worden, maar onder fysiologische voorwaarden vormen zij een sterk gebonden complex, dat fysisch en enzymatisch nagevoeg niet van een intact enzyme te onderscheiden is (RICHARDS, 1955; RICHARDS en VITHAYATHIL, 1959; VITHAYATHIL en RICHARDS, 1960).

Het al of niet bestaan van verborgen kettingbreuken in ϕ X-DNA kan getest worden door behandeling met enzymepreparaten. De biologische inactivatie hierdoor veroorzaakt is enkel en alleen te wijten aan fosfodiesterhydrolyse. Bijgevolg kan het gemiddeld aantal ketenbreuken gelijk gesteld worden aan het aantal letale "hits", microbiologisch bepaald. Indien geen complexen bestaan, zou de homogene component zichtbaar bij ultracentrifugatie in 0,1 M bufferoplossing, alleen samengesteld zijn uit de cirkelvormige S_1 en de open keten S_2 , aangezien beide eenzelfde molecuulair gewicht en een compacte statistisch-kluwenstructuur hebben (eenvoudigheidshalve wordt hier alleen gehandeld over S_2 , gevormd tijdens de enzymatische reactie). De som van de homogene component kan bijgevolg berekend worden op basis van de residuele biologische activiteit en is gelijk aan $p_0 + p_1 = e^{-m} (1 + m)$. De resultaten, voorgesteld in tabel 9, tonen aan dat deze berekende waarden inderdaad in overeenstemming zijn met deze bepaald door directe fysische meting. Bijgevolg valt een ϕ X-DNA keten, welke twee of meer ketenbreuken heeft ontvangen, uiteen, zelfs in een oplosmiddel waar niet-specifieke base-interacties veelvuldig voorkomen.

Tot eenzelfde besluit leidt overigens het experiment voorgesteld in figuur 9 (sectie 2.0.1.). Een geringe degradatie met pancreas desoxyribonuclease was voldoende om C'_{3-OH} ketenuiteinden in vrijheid te stellen, welke door de E. coli fosfodiesterase werden aangetast.

Bijgevolg dient men een onderscheid te maken tussen de S_2 -moleculen welke werkelijk in de open keten vorm voorkomen, en dan ook door de E. coli fosfodiesterase kunnen worden omgezet (zie ook sectie 5.1.0.), en degene waarvan de open keten vorm slechts werd aangetoond na denaturatie met formaldehyde of alkali. De S_2 -fractie welke reeds in de controle ϕ X-DNA preparaten aanwezig is, eenvoudigheidshalve de endogene S_2 genoemd, is grotendeels resistent tegenover de E. coli fosfodiesterase (zie hoger) en behoort tot deze tweede categorie.

Waaruit bestaat nu dit letsel van het polymeer, welke niet gepaard gaat met een kettingbreuk? Uit de gegevens vermeld in sectie 3.4. is het duidelijk dat alleen depurinatie hiervoor in aanmerking komt. In een neutrale zoutoplossing zou de ringstructuur bewaard blijven, zelfs na het verlies van meerdere purinen. Bij het uitrekken van de moleculen echter, zoals geschiedt in formaldehyde of in alkali, zou de keten op de verzwakte, gedepurineerde plaatsen openspringen.

Deze veronderstellingen worden bevestigd door de gegevens vermeld in tabel 10. Een ϕ X-DNA monster werd geïnactiveerd door incubatie in zuur milieu (experiment 1). Onder deze voorwaarde

Tabel 9 : Ultracentrifugatie na behandeling met endonucleasen.

Ongeveer 25 μg ϕX -DNA werd behandeld met pancreas desoxyribonuclease of met enzymepreparaten welke een contaminerende endonuclease bevatten (zie secties 2.0.2. ; 3.3. en 2.1.0.). De enzymatische reactie werd gestopt door het toevoegen van een geschikte buffer (A 0,1 M natriumfosfaat pH 7,0 + 0,002 M EDTA ; B 0,22 M NaCl + 0,01 M Trisbuffer pH 8,1 ; C 0,08 M kaliumfosfaat pH 9,0). Ieder ultracentrifugatiebeeld toonde slechts één homogene component, waarvan de hoeveelheid werd bepaald in vergelijking met een controle, onder dezelfde voorwaarden behandeld maar zonder enzyme.

Enzymepreparaat	Overblijvende biologische activiteit %	Oplosmiddel	Homogene component %	Berekende waarde (x) $S_1 + S_2$ %
E. coli fosfatase	42	A	62,8	78,4
Pancreas desoxyribonuclease	37	B	80,1	74,0
Slangengift diësterase	17	A	49,8	43,5
Kalfsmilt diësterase	1,4	C	0	7,5

(x) $S_1 + S_2 = e^{-m}(1+m)$ (waar m microbiologisch bepaald werd).

bestaat de enige wijziging van covalente structuur in depurinatie (TAMM e.a., 1952 en 1953). Bij centrifugatie in een zoutoplossing bleek dat inderdaad absoluut geen fragmentatie had plaats gegrepen. Dit betekent dat de ringstructuur behouden blijft, zelfs na verlies van meerdere purinen. Na behandeling met formaldehyde zoals beschreven in sectie 4.0. viel de macromoleculaire structuur grotendeels uiteen (in het geval van gevorderde depurinatie blijkt de ketenbreukreactie, veroorzaakt door de formaldehyde, niet volledig te zijn verlopen).

Na verwarming onder voorwaarden waarbij vooral depurinatie maar ook fosfodiësterhydrolyse plaats greep (zie sectie 3.4.2.) bleven een groot gedeelte der ketens nagenoeg hun oorspronkelijk moleculair gewicht behouden, desondanks het feit dat er praktisch geen aan de depurinatie ontsnapt waren (Tabel 10, experiment 2). Ook in dit geval leidde behandeling met formaldehyde tot fragmentatie. In experiment 3 werden twee monsters geanalyseerd, die door behandeling met isobutanol gedeeltelijk waren geïnactiveerd geworden. Alhoewel het mechanisme der depurinatie in dit geval niet duidelijk is, blijkt dat geen aanwijzing voor biologische inactivatie kon teruggevonden worden bij centrifugatie in de fosfaatbuffer. Na behandeling met formaldehyde echter was elke letale "hit" verantwoord door een fysische ketenbreuk.

Bijgevolg mag besloten worden dat in ϕX -DNA letale depurinaties kunnen optreden, zonder dat hierdoor verbreking van de ringstructuur plaats grijpt. Het openen van de keten op deze gedepurineerde plaatsen bij analyse in alkali ligt in de lijn der verwachtingen, aangezien apurinezuur zeer labiel is bij hogere pH (TAMM e.a., 1952 en 1953 ; zie sectie 3.4.4.). Het breken van dergelijke zwakke schakels door formaldehyde werd tot nog toe niet beschreven. Alhoewel het juiste reactiemechanisme

Tabel 10 : Ultracentrifugatie na depurinatie.

De ϕ X-DNA monsters, behandeld zoals aangegeven, werden geanalyseerd in 0,1 M fosfaatbuffer pH 7,0 + 0,002 M EDTA. De hoeveelheid $S_1 + S_2$ werd berekend op basis van de residuele biologische activiteit (zie tabel 9). Na sedimentatie werden de ϕ X-DNA monsters hergesuspendeerd, behandeld met formaldehyde onder standaard voorwaarden, en opnieuw geanalyseerd door ultracentrifugatie.

Experiment	Behandeling	Overblijvende biologische activiteit	Homogene component	Berekende waarde $S_1 + S_2$	Experimenteel gevonden (in CH_2O) $S_1 + S_2$
		%	%	%	%
1	pH 2,9 (a)	0,03	104,5	0,3	28,3
2	verwarming(b)	<0,1	56,7	<0,8	22,6
3	isobutanol(c)	20,9	101,2	53,7	51,6
	isobutanol(c)	23,5	100,6	57,6	47,5

(a) 15 uur incubatie in 0,1 N azijnzuur bij 30°C

(b) 10 min. bij 100°C en pH 7,5

(c) herhaaldelijke extracties zoals beschreven in sectie 3.1.

in dit geval niet bekend is, lijkt het wel aanvaardbaar dat in een ϕ X-DNA molecule, waar alle base-interacties uitgesloten zijn zodat aanzienlijke spanning optreedt wegens de electrostatische afstotingen, de zwakke, gedepurineerde schakels verbroken worden.

4.3.1. DE ENDOGENE S_2 -COMPONENT.

Herhaaldelijk werd vastgesteld dat zelfs vers bereide ϕ X-DNA preparaten een bepaalde hoeveelheid S_2 en trager migrerende brokstukken bevatten. Men kan zich nu afvragen of het hier gaat om een degradatie van de infectieve S_1 -moleculen tijdens de isolatie van het viraal DNA, ofwel of de S_2 -moleculen eventueel overhaastig als open ketens in een virusmantel werden gehuld, zonder dat de laatste stap in de synthese, namelijk de ringsluiting, volledig was. De trager migrerende moleculen kunnen misschien afkomstig zijn van cellulair waardcel DNA, dat aan de virusdeeltjes is blijven kleven (deze veronderstelling is overigens zeer weinig waarschijnlijk in het licht van de uitgebreide zuiveringsmethoden - zie secties 1.0.0. en 1.0.1.).

In de veronderstelling dat de virussen vóór isolatie alleen intacte, cirkelvormige moleculen bevatten, en dat nadien, op basis van een statistische verdeling, letale "hits" (depurinaties of fosfodiëstersplitsingen) hebben plaats gegrepen, kan men voor elk ϕ X-DNA preparaat berekenen op basis van de hoeveelheid overblijvende S_1 moleculen, welke de relatieve concentraties zouden

zijn van de één "hit" en de twee of meer "hits" fracties (m wordt berekend op basis van $p_0 = e^{-m}$, waarin p_0 gelijk is aan de fractie S_1 ; vervolgens wordt S_2 berekend, namelijk $p_1 = e^{-m}$ m en de degradatieprodukten $p_x = 1 - (p_0 + p_1)$)).

Tabel 11 : De fysische heterogeniteit van verschillende ØX-DNA preparaten.

Ieder preparaat werd geanalyseerd na behandeling met formaldehyde. De berekening van de verwachte hoeveelheden S_2 en degradatieprodukten op basis van de fractie S_1 wordt in de tekst beschreven.

ØX-DNA preparaat nr	% S_1	% S_2		% Traag	
		Gevonden	Berekend	Gevonden	Berekend
3	64,5	19,7	28,3	15,8	7,2
5	36,3	34,2	36,8	29,5	26,8
6	72,2	18,9	23,5	8,8	4,3

De resultaten, voorgesteld in tabel 11, tonen aan dat binnen de bereikbare nauwkeurigheid, bevredigende overeenkomst bestaat tussen de berekende waarden en deze experimenteel gevonden. Dit is een goede aanwijzing om aan te nemen dat tenminste op een zeker ogenblik in het verleden, al het viraal DNA een homogene populatie van intacte ringvormige moleculen, overeenkomstig met S_1 , heeft uitgemaakt. Het ligt dan ook voor de hand om te besluiten dat de inactivatie alleen tijdens de zuivering van het virus en de isolatie van het ØX-DNA heeft plaats gegrepen.

4.3.2. HET ZUIVEREN VAN DE CIRKELCOMPONENT.

Aangezien de endogene S_2 -component grotendeels in de gedepurineerde cyclische vorm voorkomt (zie sectie 4.3.0.) is de selectieve verwijdering niet eenvoudig. In principe zou men deze kunnen tot de open ketenvorm omzetten door behandeling met formaldehyde. Onder die voorwaarden bleek evenwel onomkeerbare inactivatie op te treden, hetgeen niet onverwacht was de vele reacties in aanmerking nemend welke door formaldehyde kunnen bewerkstelligd worden (zie sectie 3.2.0.).

Overigens wordt formaldehyde veelvuldig als kiemdodend middel gebruikt. Het is dan ook merkwaardig dat wij desondanks een geringe reactivatie konden aantonen. Inderdaad, na behandeling van ØX-DNA monsters met een overmaat formaldehyde gedurende verschillende dagen, en na wegdialyseren van de vrije en omkeerbaar gebonden formaldehyde (1 maal tegenover 0,1 M NaCl + 0,004 M K_2HPO_4 en 3 maal tegenover 0,066 M glycinebuffer pH 9,2 + 0,001 M $MgCl_2$) leek alle biologische activiteit verloren. Door verwarming van de oplossing gedurende 3 min. bij 100°C bleek echter een geringe reactivatie op te treden. Alhoewel deze slechts 2×10^{-5} tot 6×10^{-5} bedroeg in vergelijking met de onbehandelde standaard

en chemisch onbeduidend is, kan deze vaststelling van bijzonder belang zijn in het kader van de desinfecterende eigenschappen welke aan formaldehyde worden toegeschreven. (Onafhankelijk van ons werd door HASELKORN en DOTY, 1961, vastgesteld dat met formaldehyde behandelde polynucleotiden na dialyse en verwarming terug het vermogen verkrijgen om complementaire, dubbele strengen te vormen).

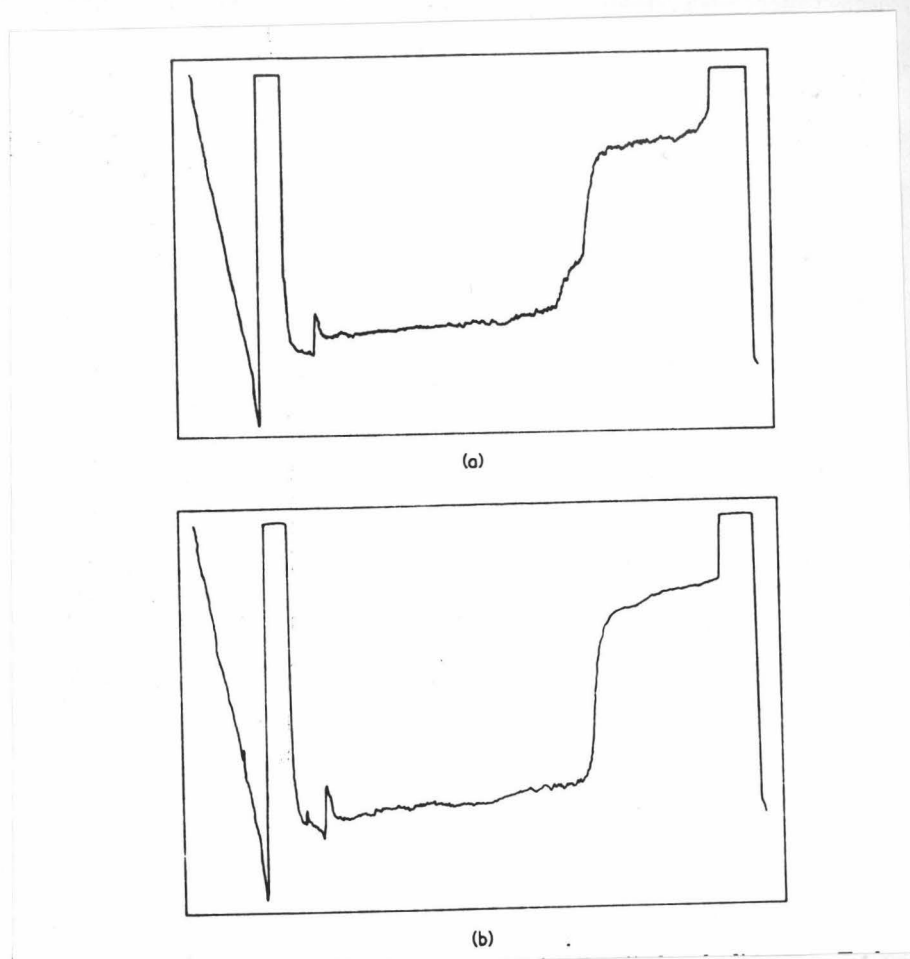
Een betere methode om gedepurineerde, cirkelvormige moleculen te openen, is behandeling in licht alkalisch midden. Een ϕ X-DNA oplossing werd geïncubeerd bij pH 11,0, een oplosmiddel in hetwelk S_2 trager migreert dan S_1 , en bijgevolg in de open keten vorm voorkomt (zie tabel 7). Na daling van de pH tot 9,5 en toevoeging van $MgCl_2$ werd verder geïncubeerd met een overmaat *E. coli* fosfodiësterase. Hierna werd het monster terug in de pH 11,0-buffer gebracht en geanalyseerd in de ultracentrifuge. Typische beelden zijn voorgesteld in figuur 25. Het is duidelijk dat door deze behandeling inderdaad de S_2 -component verdwenen is. Deze selectieve hydrolyse van S_2 is een nieuw bewijs voor de cirkelstructuur van S_1 en de overeenkomstige open keten vorm van S_2 . Tevens toont figuur 25 aan dat ondanks de alkalische voorbehandeling de trager migrerende degradatieprodukten niet volledig door het enzyme werden verwijderd. De reden hiervoor wordt behandeld in sectie 5.

4.4. B E S L U I T.

In deze sectie worden de argumenten samengevat welke tot de vaststelling van een cirkelstructuur voor de infectieve ϕ X-DNA moleculen geleid hebben. Het belang van deze ontdekking wordt in sectie 6 besproken.

Vooreerst werd aan de hand van enzymologische onderzoeken tot de bevinding gekomen dat de infectieve ϕ X-DNA ketens eindstandige nucleotiden missen (sectie 2). Dit geldt zowel voor de hypothetische C'_{3-OH} als de C'_{5-OH} terminus (Fig. 3). Aannemende een lineaire DNA-keten, kan men zich twee verklaringen voorstellen: ofwel begint en eindigt de keten op een fosfomonoësterfunctie, ofwel zijn de uiteinden niet voor de geteste enzymen toegankelijk wegens een regionale, secundaire structuur. Verschillende lijnen van onderzoek toonden de onjuistheid van deze hypothesen aan (secties 2 en 3). Een andere mogelijkheid is dat de terminale nucleotiden zouden gesubstitueerd zijn. Evenwel kon chemisch en enzymologisch geen aanduiding gevonden worden voor niet-nucleotide materiaal (SINSHEIMER, 1959 b); GUTHRIE en SINSHEIMER, 1960). Ook is het waarschijnlijk dat de meest voor de hand liggende substituenten, zoals bijvoorbeeld acyl-groepen, eerder labiel zouden gebonden zijn, hetgeen niet met de stabiliteit van infectief ϕ X-DNA tegenover verwarming of behandeling in alkalisch milieu strookt (secties 3.4. en 4.1.). Bijgevolg is een cyclische structuur voor infectief ϕ X-DNA een zeer aanvaardbare uitleg.

Maar benevens deze negatieve aanduidingen, kon de cirkel-hypothese door direct fysisch onderzoek bevestigd worden (sectie 4). Reeds door SINSHEIMER (1959 b) was aangetoond geworden dat ϕ X-DNA preparaten, gecentrifugeerd onder voorwaarden waarbij strekking der ketens optrad, heterogeen waren. In feite zijn drie fracties te onderscheiden: een homogene hoofdcomponent S_1 , een homogene component S_2 , die met een 10 % lagere snelheid migreert, en trager sedimenterende degradatieprodukten met een statistische verdeling van ketenlengten. Het lag dan ook voor de hand een verband te zoeken tussen de afwezigheid van ketentermini en deze fysische heterogeniteit.



Figuur 25 : De selectieve verwijdering van de S_2 -component door behandeling met de *E. coli* exonuclease.

Ieder monster (1 ml) bevatte 0,04 M natriumcarbonaatbuffer pH 11,0 0,01 M NaCl, $1,5 \times 10^{-4}$ M EDTA en 30 μ g ϕ X-DNA (preparaat 6), behandeld zoals hieronder beschreven. De analytische ultracentrifugatie verliep van links naar rechts bij $56^\circ 100$ t.p.m. De hier voorgestelde curven zijn registraties, bekomen met een densitometer, van de opnamen gemaakt na 56 min. centrifugatie (zie sectie 1.1.2.1. en figuur 4, a en b).

De hoofdcomponent zichtbaar in figuren a en b, is S_1 (cirkel), en de tweede component, welke ontbreekt in b, is S_2 (rechte keten).

- a) Controle : Het ϕ X-DNA monster werd onmiddellijk gecentrifugeerd in de carbonaatbuffer-NaCl-EDTA oplossing.
- b) Behandeling met de exonuclease : Het ϕ X-DNA monster werd gedurende 2 uur bij 30°C gepreïncubeerd in 150 μ l carbonaatbuffer NaCl-EDTA oplossing. Hierop werd het mengsel verdund tot 300 μ l door toevoeging van glycinebuffer (eindconcentratie 0,066 M en resulterende pH 9,5), MgCl_2 (eindconcentratie 1×10^{-3} M) en *E. coli* fosfodiësterase (eindconcentratie 166 μ l/ml). Het reactiemengsel werd gedurende 5 uur geïncubeerd bij 30°C , waarna 700 μ l 0,05 M natriumcarbonaatbuffer pH 11,0 + 2×10^{-4} M EDTA werd toegevoegd. Vervolgens werd 12 uur gedialyseerd bij 0°C tegenover de hoger vermelde carbonaat-NaCl-EDTA oplossing, en geanalyseerd door ultracentrifugatie.

In normale bufferoplossingen (ionensterkte 0,1 of hoger), waar enkelstrengige polynucleotiden een tamelijk compacte, statistisch-kluwenstructuur hebben, is S_2 niet van S_1 te onderscheiden. Bijgevolg is een verschil in moleculair gewicht praktisch uitgesloten. De tragere sedimentatiesnelheid van S_2 na ontrafelen der ketens, moet dan ook gezocht worden in een vormverandering. Hoe kan men nu verklaren dat van twee niet-vertakte polymere ketens met gelijke lengte er één meer kan uitgerokken worden dan de andere? Het meest logische antwoord is dat de ene, namelijk S_1 , een cirkelstructuur heeft waardoor het meer ineengesloten blijft, minder hydrodynamische weerstand biedt, en dus sneller migreert in vergelijking met de overeenkomstige open keten vorm, namelijk S_2 .

Vooreerst werd onderzocht of het verschil tussen S_1 en S_2 wel gebaseerd is op de primaire, covalent-gebonden structuur.² Dit werd bevestigd door centrifugatie in media waarin secundaire bindingen in DNA uitgesloten zijn (bij hoge pH of na verwarming met formaldehyde). Onder deze voorwaarden bleef niettemin het onderscheid tussen S_1 en S_2 kwantitatief bewaard (sectie 4.1.0.).

Gezien de hoge graad van structurele orde in de kleine virussen (zie sectie 0.2. en 0.3.) en het feit dat onder optimale voorwaarden nagenoeg ieder ϕX -virusdeeltje tot infectie kan aanleiding geven, is men geneigd aan te nemen dat in de volledige virussen origineel slechts intact, homogeen DNA aanwezig was. Het ontstaan van S_2 en de trager migrerende degradatieproducten zou dan te wijten zijn aan ketenbreuken (en depurinaties) opgelopen tijdens de zuivering van het virus en/of de isolatie van het viraal DNA. In andere woorden het cirkelmodel biedt het voordeel een uitleg te verschaffen voor het bestaan van een tweede homogene component en van kleinere brokstukken, door enkel aan te nemen dat een niet-selectieve degradatie opgetreden is (statistische verdeling der "hits"). Met deze veronderstelling strookt het feit dat de relatieve hoeveelheden van S_2 en van de verdere degradatieproducten in de verschillende ϕX -DNA preparaten overeenstemmen met deze berekend op basis van de Poisson vergelijking (sectie 4.3.1.). Dit wordt natuurlijk ook bevestigd door de bevinding dat slechts de intacte, cirkelvormige S_1 moleculen biologisch actief zijn (secties 4.1.1. en 4.2.1.).¹

Het eigenlijk bewijs voor de cirkelstructuur werd evenwel geleverd door een studie over de fysische heterogeniteit in functie van een verder schrijdende degradatie (sectie 4.2.). Hierbij bleek dat de fysisch bepaalde concentratie S_1 , inderdaad daalde in functie van m , het microbiologisch gemeten, gemiddeld aantal letale "hits" per molecule, zoals theoretisch verwacht voor de infectieve component. Ook de component S_2 volgde getrouw het theoretisch verloop. Hieruit volgt dat (a) S_2 ten koste van S_1 gevormd wordt door slechts één kettingbreuk, (b) bij de reactie $S_1 \rightarrow S_2$ nagenoeg geen verandering van moleculair gewicht betrokken is, en (c) de kans op een tweede kettingbreuk even groot is als voor de eerste. Het blijkt nu dat slechts één model aan deze gestelde eisen kan voldoen, namelijk een ringstructuur. Na een eerste ketenbreuk wordt een open keten gevormd, die bijgevolg een fysisch homogene component is, maar na een tweede, even toevallige ketenbreuk, valt het molecule in kleinere stukken uiteen.

De enige alternatieve uitleg om de vorming van S_2 te verklaren, vereist dat de ketenbreuken niet aan een willkeurige verdeling onderworpen zijn. In sectie 4.2.1. werden verschillende redenen opgesomd, die toelaten dit bezwaar te verwerpen. Boven-

dien wordt enerzijds in sectie 5.1.1. aangetoond dat de verspreiding der ketenbreuken door pancreas desoxyribonuclease inderdaad statistisch was, en anderzijds werden analoge uitslagen bekomen na degradatie met enzyme of door thermische energie.

Merken wij hier ook op dat de open keten vorm S_2 alleen aantoonbaar is onder enigszins denaturerende voorwaarden, zoals hoge pH of na behandeling met formaldehyde. Het is zelfs waarschijnlijk dat een groot gedeelte van de S_2 -moleculen, welke in een vers bereid ϕX -DNA preparaat voorkomen, in feite nog de ringstructuur bewaard hebben, maar één purine ontbreken. Op deze plaats is de ring gelabiliseerd, zodat hij openbreekt tot een rechte keten bij pH-verhoging of formaldehyde inwerking.

Tenslotte dient nog vermeld dat het mogelijk was selectief de S_2 -component te verwijderen. Hiertoe werd het ϕX -preparaat bij pH 11 met *E. coli* fosfodiësterase behandeld. Deze selectieve degradatie van S_2 is een onafhankelijke bevestiging van de ringstructuur der infectieve ϕX -DNA moleculen.

5. DE DISCONTINUÏTEIT VAN DE

CIRKEL.

5.0. ONDERZOEKSPLAN.

In vorige secties werd aangetoond dat de infectieve ϕ X-DNA moleculen covalent-gebonden ringen zijn. Men kan zich nu de vraag stellen of deze cirkelvormige ketens alleen desoxynucleotide schakels bevatten, welke door normale 3',5'-internucleotidebindingen aan elkaar gehecht zijn. Dit probleem is van bijzonder belang, enerzijds omdat soms verondersteld wordt dat genen of "operons" van elkaar gescheiden zijn door niet-nucleotide materiaal of "linkers", zoals peptiden (zie sectie 3.4.0.), en anderzijds omdat het mogelijk is dat de ring gesloten wordt door een sluitstuk of gesp, die een bijzondere rol zou vervullen bij de replicatie.

Dank zij het ter beschikking staan van een exclusieve exonuclease, namelijk het E. coli enzyme, was het mogelijk dit probleem experimenteel te onderzoeken. In de veronderstelling van een continue cirkel, enkel bestaande uit 3',5'-fosfodiësterbindingen, mag men verwachten dat één ketenbreuk, waarbij een vrij C'₃-OH terminus gevormd wordt, voldoende is om gans het molecuul hydrolyseerbaar te maken door de exonuclease. Bijgevolg zou na het beëindigen der enzyme-werking al het DNA tot mononucleotiden omgezet zijn, uitgezonderd voor de intact gebleven cirkels. Mathematisch uitgedrukt wordt dit :

$$h_0 = 1 - e^{-m}$$

waarin h_0 = percent gehydrolyseerd tot mononucleotiden (bijvoorbeeld chemisch bepaald)

m = gemiddeld aantal ketenbreuken per molecuul (bijvoorbeeld microbiologisch bepaald).

Indien evenwel iedere ring één discontinuïteit of gesp bevat, zou de exonuclease, welke een DNA-keten slechts in één richting kan afbreken (Fig. 3), hierdoor op een bepaalde plaats gestopt worden. De totale hoeveelheid hydrolyseerbaar materiaal na een beperkt aantal "hits", zou bijgevolg minder zijn. Zo bijvoorbeeld kan de open keten vorm (fractie met één ketenbreuk) slechts voor 50 % afgebroken worden. Het percent hydrolyseerbaar materiaal wordt in dit geval gegeven door de functie :

$$h_1 = 1 - \frac{1}{m} (1 - e^{-m})$$

In het geval van twee discontinuïteiten per keten bedraagt de fractie hydrolyseerbaar materiaal na een willekeurig aantal ketenbreuken nog minder. In het eenvoudigste geval, wanneer de twee blokken maximaal van elkaar verwijderd zijn, verkrijgt men :

$$h_2 = 1 - \frac{2}{m} (1 - e^{-m/2}).$$

De theoretische curven $h_0 f(m)$, $h_1 f(m)$ en $h_2 f(m)$ zijn in figuur 26 weergegeven. In het experimenteel gedeelte van het onderzoek werd nagegaan met welke dezer functies de resultaten het best in overeenstemming zijn.

5.1. HET AANTONEN VAN EEN DIS- CONTINUÏTEIT PER CIRKEL.

5.1.0. CHEMISCHE EN MICROBIOLOGISCHE ANALYSE.

Praktisch werd het experiment als volgt uitgevoerd. ϕ X-DNA monsters werden gedurende verschillende perioden gepreïncubeerd met pancreas desoxyribonuclease, waardoor een bepaald aantal C'₃-OH ketenuiteinden gevormd werden. Daarna werd een alkalische buffer toegevoegd teneinde de endonuclease te inactiveren en de gedepurineerde schakels te openen. Vervolgens werd zeer lang geïncubeerd met een overmaat E. coli fosfodiësterase, teneinde alle ketens met een C'₃-OH eindgroep volledig te hydrolyseren. Tenslotte werd het mengsel chemisch, microbiologisch en fysisch geanalyseerd.

De resultaten zijn voorgesteld in figuur 26. Het aantal ketenbreuken, opgelopen tijdens de preïncubatie, en bepaald op basis van de overblijvende microbiologische activiteit, zijn uitgezet op de abscis-as. De ordinaat-waarden werden berekend op basis van chemisch bepaalde, vrijgestelde mononucleotiden, en zijn gecorrigeerd voor de ongeveer 18 % hydrolyse vastgesteld in de controle preparaten.

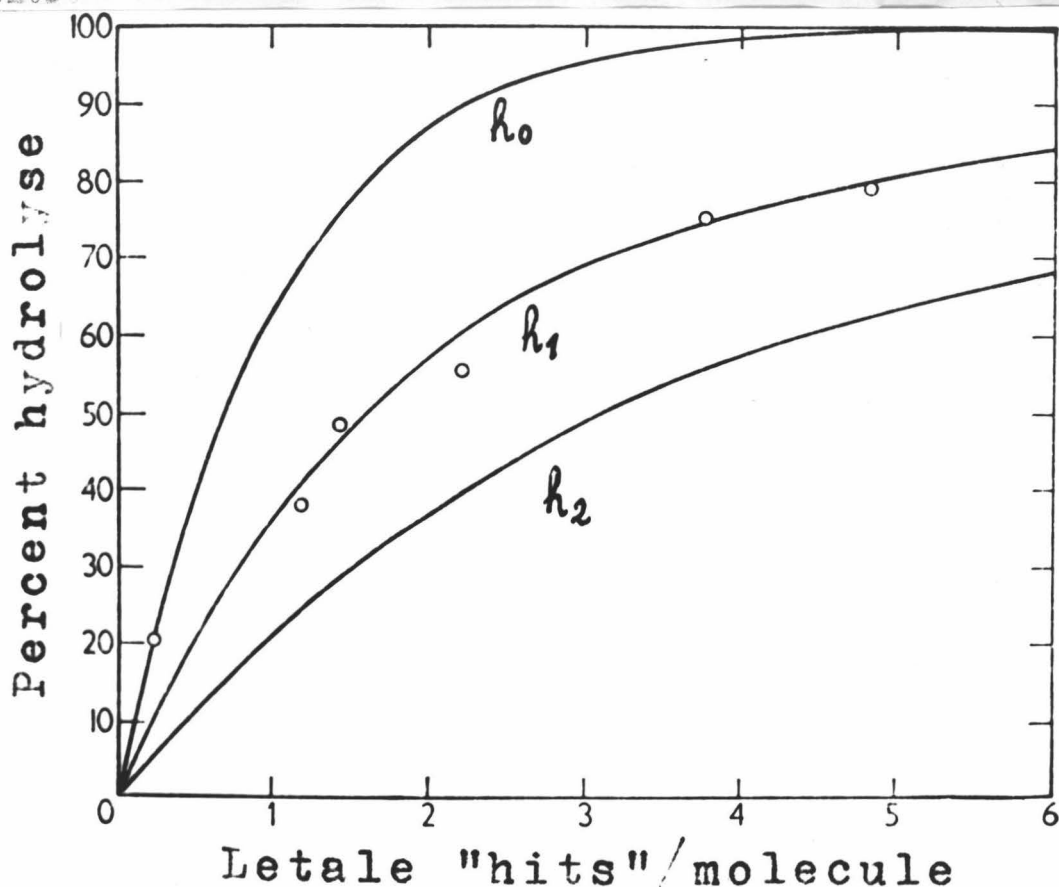
Het is verheugend vast te stellen dat er inderdaad een zeer goede overeenkomst bestaat tussen de experimentele resultaten en één der theoretische curven, namelijk deze voor één gesp per ring. (De enige waarneming, welke niet schijnt op de curve te liggen, namelijk deze na 0,2 ketenbreuken, is waarschijnlijk gesteund op een geringe overschatting van de residuele activiteit, zoals blijkt uit tabel 12, sectie 5.1.1.). Het besluit van deze experimenten is dan ook ondubbelzinnig: Er is één, en slechts één, discontinuïteit per ϕ X-DNA ring.

Deze resultaten verklaren ook waarom in vroeger onderzoek nooit een volledige afbraak van de degradatieprodukten door de E. coli fosfodiësterase werd verkregen (zie secties 4.3.0. en 4.3.2.).

5.1.1. FYSISCH ANALYSE.

De incubatiemengsels, besproken in vorige sectie, konden benevens chemisch en microbiologisch, ook fysisch geanalyseerd worden. Door centrifugatie was het mogelijk om op een volledig onafhankelijke wijze zowel het gemiddeld aantal ketenbreuken te bepalen als het percent hydrolyse. Inderdaad de abscis-waarde m kon geschat worden op basis van de residuele hoeveelheid van de intacte ringcomponent S₁. Anderzijds is de totale hoeveelheid materiaal, welke in de ultracentrifuge bezinkt, gelijk aan de fractie niet-hydrolyseerbaar DNA, zodat in vergelijking met het controle-preparaat op deze basis de ordinaat-waarde kon bepaald worden. Een vergelijking enerzijds tussen de microbiologisch en de fysisch gemeten ketenbreuken, en anderzijds tussen de chemisch en de fysisch bepaalde hydrolyse-graden is opgegeven in tabel 12.

De bepalingen van het aantal "hits" per molecule op basis van infectiviteit zijn in goede overeenkomst met deze berekend uitgaande van de ultracentrifugatie-beelden. Anderzijds liggen de waarden voor het percent hydrolyse gemeten door sedimentatie,



Figuur 26 : Het aantonen van één discontinuïteit per virale DNA-cirkel.

Exonucleasen kunnen geen cirkelvormige DNA-moleculen aantasten. Indien de ketens geopend worden, bijvoorbeeld door behandeling met een endonuclease, ontstaan eindgroepen, waardoor hydrolyse met een exonuclease mogelijk wordt. Aldus kan een continue, open keten volledig afgebroken worden. Indien de exonuclease echter een discontinuïteit of blok ontmoet, wordt verdere hydrolyse onmogelijk. Ordinaat : percent DNA gehydrolyseerd door de exonuclease. Abscis : gemiddeld aantal ketenbreuken per molecule.

Theoretische curven : Verwachte hydrolyseerbaarheid (ordinaat) door een exonuclease van een homogene populatie cirkelvormige moleculen in functie van het gemiddeld aantal ketenbreuken per molecule (abscis). Voor verdere verklaring zie tekst.

$h_0 = 1 - e^{-m}$; verwachte functie voor een continue cirkel.

$h_1 = 1 - \frac{1}{m} (1 - e^{-m})$; verwachte functie voor cirkels welke één discontinuïteit bevatten, welke verdere actie van de exonuclease verhindert.

$h_2 = 1 - \frac{2}{m} (1 - e^{-m/2})$; verwachte functie voor cirkels welke 2 dergelijke discontinuïteits bevatten, op maximale afstand van elkaar.

Experimenteel gedeelte : o—o

- Voorbehandeling met desoxyribonuclease : Ieder reactiemengsel (50 μ l), bevattende 52 μ g ϕ X-DNA (preparaat 3), $2,1 \times 10^{-3}$ M Trisbuffer pH 7,5, 8×10^{-3} M $MgCl_2$, 0,1 M NaCl, 0,01 % rundsplasma albumine en $6,2 \times 10^{-5}$ μ g rundspancreas desoxyribonuclease, werd gedurende een gepaste tijd bij 37°C geïncubeerd. Na toevoeging van 100 μ l 0,05 M natriumcarbonaatbuffer pH 11,0, werd verder gedurende 2 uur bij 30°C geïncubeerd.

- Behandeling met de exonuclease : Vervolgens werd het mengsel verdund tot 300 μ l door toevoeging van glycinebuffer (eindconcentratie 0,066 M en resulterende pH 9,5) en E. coli fosfodiësterase (eindconcentratie 166 μ l/ml). Er werd gedurende 24 uur geïncubeerd bij 30°C. Het percent hydrolyse (oplosbaar in 0,25 N $HgCl_2$) werd bepaald op een 100 μ l staal, terwijl de rest diende voor de bepaling van de overblijvende, biologische activiteit (uitgedrukt als letale "hits" of ketenbreuken per molecule), en voor analytische ultracentrifugatie (zie tabel 12).

De resultaten zijn gecorrigeerd voor de hydrolyse (16,1 % en 20,4 %) gevonden in twee controles. Deze laatste werden op dezelfde manier behandeld, maar in afwezigheid van pancreas desoxyribonuclease (zie ook tabel 12).

duidelijk lager dan deze chemisch bepaald. Deze laatste methode is ongetwijfeld de meest nauwkeurige. Het is bijgevolg waarschijnlijk dat de hoeveelheid centrifugeerbaar materiaal stelselmatig overschat werd. Niettemin de combinatie van de ultracentrifugatie-resultaten, op dezelfde wijze uitgezet als deze in figuur 26, toont nogmaals aan dat de functie voor één discontinuïteit per ring het best met de experimentele gegevens overeenstemt. Aldus wordt op basis van volledig onafhankelijke methoden het besluit bevestigd dat ϕ X-DNA één "gesp" per ring bevat. In andere woorden de goede overeenkomst tussen de experimentele en de berekende waarden in figuur 26 is niet te wijten aan systematische fouten in één der analysemethoden.

Tabel 12 : Vergelijking tussen verschillende analysemethoden.

Dezelfde incubatiemengsels werden geanalyseerd als beschreven in de legende van figuur 26. Aan een 200 μ l staal werden natriumcarbonaatbuffer pH 11,0 en EDTA toegevoegd tot een eindconcentratie van respectievelijk 0,04 M en $6,7 \times 10^{-4}$ M, en vervolgens nog 5 μ mole NaOH teneinde de pH op 11,0 te brengen (uittitreren van de glycinebuffer).

De waarden voor de biologisch bepaalde ketenbreuken en voor de chemisch bepaalde hydrolysegraden zijn dezelfde als voorgesteld in figuur 26. Anderzijds werd door analytische centrifugatie het aantal ketenbreuken bepaald op basis van de overblijvende S_1 -component, en het percent hydrolyse op basis van de totale hoeveelheid sedimenteerbaar materiaal.

Biol. bepaling Ketenbreuken/ molecule	Chem. bepaling (zuur oplosbare mononucleotiden) % hydrolyse	Analytische ultracentrifugatie	
		Ketenbreuken/ molecule	% hydrolyse
0 (controle 1)	0	0	0
0 (controle 2)	0	0	0
0,20	20,0	0,43	14,3
1,2	38,0	1,2	33,9
1,4	48,4	1,5	38,9
2,2	55,0	1,8	46,5
3,8	75,1	>2	63,0
4,9	79,0	>2	69,4

De analytische centrifugatie beelden leiden nog tot een ander besluit. Benevens de overblijvende S_1 -component waren slechts degradatieprodukten met een statistische¹ verdeling van ketenlengten aantoonbaar. Bijgevolg was de afstand tussen de discontinuïteit en de ketenbreuk, veroorzaakt door de pancreas desoxyribonuclease, niet constant. Dit bewijst dat de letale "hits" wel statistisch over de ganse keten verspreid zijn, en de eerste kettingbreuk dus niet exclusief op een bepaalde plaats voorkomt (zie sectie 4.2.1.).

5.1.2. CONTROLE PROEVEN.

Aangezien een belangrijk besluit van ons onderzoek gebaseerd is op het experiment, voorgesteld in figuur 26, dient men zich tenvolle te vergewissen van de juistheid der methodologie en van de geldigheid der basisideeën. Hierbij mag in de eerste plaats opgemerkt worden dat ieder monster een volledig onafhankelijke proef uitmaakte. In sectie 5.1.1. werd daarenboven reeds aangetoond dat geen belangrijke fouten werden begaan bij de analyse van de reactiemengsels.

Het bezwaar kan eventueel geopperd worden dat de hydrolyse door de E. coli fosfodiësterase misschien niet tot een einde gekomen was, waardoor de bepaling van het percent hydrolyse te laag zou zijn, en de ring dus in feite ^{geen enkele} discontinuïteit zou vertonen. Drie argumenten tonen evenwel de ongegrondheid aan van deze opwerping :

- a) Het reactiemengsel bevatte een grote overmaat exonuclease (166 $\mu\text{l/ml}$) en werd zeer lang geïncubeerd (24 uur). In vergelijking bevatte het experiment voorgesteld in figuur 8 slechts 70 $\mu\text{l/ml}$ en was de reactie reeds beëindigd na ongeveer twee uur.
- b) Indien de exonuclease reactie niet was beëindigd mag men aannemen dat dit proces des te minder volledig was, naarmate de absolute hoeveelheid materiaal dat het enzyme diende te hydrolyseren, groter was. Met andere woorden de verhouding van de experimenteel vastgestelde hydrolyse tot de hypothetische eindwaarde (berekend op basis van de functie voor zero discontinuïteiten) zou dalen bij stijgende absolute waarde van deze eindwaarde en dus van m. De resultaten, opgegeven in tabel 13, blijken evenwel te stijgen bij verhoging van m. Dit is in overeenstemming met het besluit dat de experimentele waarden wel overeenkomen met een maximale exonuclease werking. Immers de verhouding van de theoretische functies h_1/h_0 stijgt bij grotere m-waarden (bij een groot aantal ketenbreuken wordt een structuur met één discontinuïteit praktisch evenzeer afgebroken als een welke oorspronkelijk een continue cirkel was.

Tabel 13 : De hydrolysegraad in functie van het aantal ketenbreuken.

De berekeningen zijn gesteund op de resultaten voorgesteld in figuur 26 en tabel 12.

Ketenbreuken/ molecule m	A % Hydrolyse	B % Hydrolyseerbaar (a)	Verhouding A/B
0,20	20,0	17,7	(1,13 (b))
1,2	38,0	69,3	0,55
1,4	48,4	75,9	0,64
2,2	55,0	89,0	0,62
3,8	75,1	97,9	0,77
4,9	79,0	99,2	0,80

- a) Berekend op basis van m en in de veronderstelling dat de ring onderbroken is.
- b) Deze abnormaal hoge waarde is zeker te wijten aan een onderschatting van m (zie tekst).

- c) Tenslotte werd door een directe methode aangetoond dat de exonuclease reactie wel degelijk tot een einde gekomen was. Het incubatiemengsel welke gemiddeld 2,2 ketenbreuken (biologische bepaling) per molecule ondergaan had, sedimenteerde onder de voorwaarden zoals beschreven bij tabel 12 met een gemiddelde sedimentatie coëfficiënt van 11,9 S. Na ultracentrifugatie werd dit monster terug gesuspendeerd, en na dialyse tegenover 0,1 M NH_4HCO_3 (tweemaal 100 ml) geconcentreerd door lyofilisatie. Het residu werd opgenomen in 125 μl van een gemengde zoutoplossing, waaraan 25 μl E. coli fosfodiesterase werden toegevoegd, zodat het aldus bekomen mengsel juist dezelfde samenstelling had als dit vermeld bij figuur 26 (glycinebuffer, MgCl_2 , natriumcarbonaat, Tris, NaCl en 166 $\mu\text{l}/\text{ml}$ exonuclease), uitgezonderd voor de macromoleculaire bestanddelen, vooral DNA, welke niet door de dialyse waren verwijderd geworden. Het mengsel werd opnieuw gedurende 24 uur bij 30°C geïncubeerd. Tenslotte werd EDTA, natriumcarbonaatbuffer en NaOH bijgevoegd (zie tabel 12) en het monster geanalyseerd door analytische ultracentrifugatie. Het bleek dat de gemiddelde sedimentatie coëfficiënt nu 12,15 bedroeg. Dit bewijst dat de reactie na de eerste incubatie met de E. coli exonuclease reeds beëindigd was, aangezien bij een tweede, nageenog identieke behandeling geen verdere afbraak meer verkregen worden.

5.2. B E S L U I T.

Dat er zich op één plaats van de keten een "blok" bevindt, welke de exonuclease belet van verder de keten af te breken, lijkt praktisch onbetwifelbaar. Men kan zich nu de vraag stellen wat de natuur van deze discontinuïteit wel kan zijn. Hierover kunnen slechts enkele gissingen gemaakt worden. Het kan bijvoorbeeld een ongewone base zijn, een ongewone binding, of een kleine zone met een sterk gebonden, secundaire structuur. Het is ook mogelijk dat er zich een sluitstuk in de ring bevindt, bestaande uit niet-nucleotide materiaal, zoals bijvoorbeeld een korte peptide.

Het is eerder onwaarschijnlijk dat een ongewone base de E. coli exonuclease zou tegenhouden. Immers dit enzyme maakt weinig onderscheid tussen de vier natuurlijke basen, en kan daarenboven het DNA van de T-even fagen afbreken, waarin al het cytidylzuur vervangen is door het geglucosyleerd hydroxymethylcytidylzuur (LEHMAN en PRATT, 1960). Een zone met een geordende secundaire structuur lijkt weinig aanvaardbaar, aangezien geen experimentele aanwijzing bestaat voor een dubbelstrengig gebied, en daarenboven werd vastgesteld dat de ϕX -DNA degradatieprodukten, zelfs na denaturatie (bijvoorbeeld in formamide of in alkali) toch slechts gedeeltelijk door de exonuclease konden gehydrolyseerd worden.

Bij veronderstellingen over een ongewone binding of een niet-nucleotide sluitstuk dient men rekening te houden met het feit dat onder geen enkele voorwaarde een selectieve opening van de ring kon verwezenlijkt worden. Deze behandelingen omvatten verwarming in neutraal tot licht alkalisch midden en incubatie bij hoge pH (zelfs bij pH 13,0) en bij lage pH (0,1 N azijnzuur). De stabiliteit van de "gesp" is bijgevolg vergelijkbaar met deze van de normale 3'-5' fosfodiësterbindingen. Dit maakt het bijvoorbeeld onwaarschijnlijk dat een gewoon aminozuur of een korte peptide de ring zouden sluiten. Immers niet alleen de substitutie van de α -aminogroep is zeer labiel (fosfoamiden zijn zelfs niet bestand tegenover zachte verwarming in neutraal

midden), maar ook de binding van de carboxylgroep zowel met een alcohol (volgens VITHAYATHIL en RICHARDS, 1961, wordt de methyl-ester gehydrolyseerd in 30 min. bij pH 11,0 en 25°C ; amino-acyl transfer RNA wordt gesplitst door 15 min. incubatie bij pH 9,0 en 55°C ; BERG e.a., 1961) als met een fosfaatrest (volgens HOAGLAND, 1960 en CHANTRENNE, 1961 is een amino-acyl fosfoanhydride zeer labiel zowel in licht zure als in licht alkalische oplossing

Bovenstaande beschouwingen sluiten evenwel de mogelijkheid van een korte peptide-verbinding niet uit. Zo bijvoorbeeld is een terminale nucleoside-fosfaat functie, veresterd met de β -OH groep van serine, nagenoeg even stabiel als de normale internucleotide bindingen. In dit verband is het misschien wel van belang te vermelden dat BENDICH en ROSENKRANZ (1962) in DNA, geïsoleerd uit menselijk sperma, ongeveer één serine-rest vinden per 1000 nucleotiden.

Een andere mogelijkheid is een pyrofosfaatbinding. Immers deze komen veelvuldig voor als een verwikkeling bij de synthese van oligonucleotiden, en kunnen slechts onder bijzondere voorwaarden selectief geopend worden (TURNER en KHORANA, 1959 ; KHORANA e.a., 1961). De aanwezigheid van een pyrofosfaatbinding in ϕ X-DNA zou overigens niet totaal onverwacht zijn, gezien de centrale rol die dergelijke derivaten spelen in iedere levende cel, niet alleen als coënzymen maar ook als energie-rijke tussenproducten.

Bovenvermelde hypothesen zijn natuurlijk ver van beperkend. Hun voornaamste nut is dat zij een leidraad kunnen vormen voor verder onderzoek over de natuur van de discontinuïteit in de ϕ X-DNA ring.

6. DE SEMI-CONTINUE RINGSTRUCTUUR VAN HET INFECTIEF ϕ X-DNA -

=====

T U U R V A N H E T I N F E C T I E F ϕ X -

=====

D N A - B E S P R E K I N G .

=====

Cyclische polymeren zijn zeker geen onbekenden in de biochemie. Zo werd bijvoorbeeld een cirkelvormig polypeptide beschreven, namelijk gramicidine S (SANGER, 1946), terwijl ook het veel grotere apoferritine waarschijnlijk uit ringvormige ondereenheden bestaat (HARRISON e.a., 1962). Cyclische oligodesoxynucleotiden komen normaal voor als nevenprodukt bij de synthese van de rechte homologen (TENER e.a., 1958 ; TURNER en KHORANA, 1959 ; TENER e.a., 1959). In het geval van deze relatief eenvoudige moleculen kan de cirkelstructuur door directe, chemische methoden aangetoond worden, zoals bijvoorbeeld door dosering van terminale groepen.

Chemisch is ϕ X-DNA nauw verwant met deze groep van cirkelvormige polymeren. Het verschil is evenwel aanzienlijk zowel wat betreft de gevolgen op genetisch en biochemisch gebied (vide infra), als in methodologie. Immers alhoewel met chemische en enzymologische technieken de afwezigheid van eindgroepen werd aangetoond, volstond dit op zichzelf niet als bewijsvoering voor een cirkelstructuur. Door biofysische proeven, in casu ultracentrifugatie, kon de ringvorm evenwel op een ondubbelzinnige wijze worden aangetoond. Hierbij dient opgemerkt te worden dat de interpretatie zowel van de chemische als van de fysische experimenten alleen mogelijk was dank zij de onafhankelijke biologische bepaling van de concentratie intacte ϕ X-DNA moleculen.

In deze studie over ϕ X-DNA werd voor het eerst een chemisch en fysisch bewijs geleverd voor de cirkelstructuur van een molecule welke drager is van alle genetische informatie nodig tot replicatie van het individu. Het ligt dan ook voor de hand een verband te zoeken met de cyclische genomen, welke genetisch werden aangetoond. In principe steunt in dit geval de bewijsvoering op de relatieve afstand van drie genetische kenmerken A, B en C (bijvoorbeeld voor bacteriofagen het vermogen om verschillende bacteriële stammen te infecteren, en voor bacteriën de absolute afhankelijkheid van bepaalde exogene aminozuren en vitamines, of de resistentie tegen antibiotica). Voor een rechtlijnig genoom is de afstand AC ongeveer gelijk aan de som van AB en BC (de relatieve afstand is recht evenredig met de recombinatie frequentie). Nu is het evenwel gebleken dat veel organismen een cyclisch genoom bezitten. Dit wil zeggen dat de afstand AC aanzienlijk korter is dan AB + BC. Zo bijvoorbeeld blijkt de genetische "kaart" van de bacteriofaag T₄ praktisch zeker cirkelvormig te zijn (EDGAR, 1961 ; Dr. R. EDGAR, persoonlijke mededeling ; zie ook LURIA, 1962). Ook T₂ heeft waarschijnlijk een cyclisch genoom (STREISINGER, EDGAR en HARRER, vermeld door THOMAS en PINKERTON, 1962). In vergelijking met ϕ X-174 bevatten beide T-evenfagen ongeveer 60 tot 70 maal meer DNA, en bovendien heeft dit een normale dubbelstrengige structuur. Deze grotere hoeveelheid genetisch materiaal verleent eveneens een meer autonoom karakter, zodat deze virussen dichter staan bij zekere bacteriën. Nu is het wel mogelijk voor deze cyclische genomen andere, meer ingewikkelde verklaringen te vinden dan een ringstructuur (BARRICELLI, 1960 ;

STEINBERG en STAHL, vermeld door LURIA, 1962 ; MESELSON en STREISINGER, vermeld door LURIA, 1962). Aangezien wij evenwel in dit onderzoek op basis van enzymologische en fysische experimenten een cirkelvormig, viraal DNA hebben aangetoond, wordt het meer aanvaardbaar de cyclische genomen eenvoudig te interpreteren op basis van een fysische ring. Alhoewel het genetisch onderzoek van ϕ X-174 bemoeilijkt wordt onder meer door de lage recombinatie frequenties (TESSMAN en TESSMAN, 1959 ; PFEIFER, 1961), blijkt toch ook in dit geval aanwijzing te bestaan voor een cyclisch genoom (Dr. A. BRESCH, persoonlijke mededeling).

Cirkelvormige, genetische "kaarten" komen niet alleen voor bij bacteriofagen, maar ook bij de veel grotere, en meer biochemisch gedifferentieerde bacteriën. Zeker is de meest grondig bestudeerde vertegenwoordiger *E. coli*. In dit geval staat de cirkelvormige chromosoom in nauw verband met het sexueel gedrag. Alle F^- stammen (receptoren) en F^+ stammen (niet-geïntegreerde sex factor) hebben inderdaad een cyclisch genoom terwijl de zeldzame Hfr mutanten (donors ; Hfr staat voor "high frequency of recombination") een open keten chromosoom kunnen bezitten (JACOB en WOLLMAN, 1958 ; JACOB en WOLLMAN, 1961). Maar zelfs deze Hfr stammen behouden de gesloten cirkelstructuur indien de fysiologische voorwaarden geen donor-activiteit toelaten (TAYLOR en ADELBERG, 1961).

Het is nagenoeg uitgesloten om aan de hand van chemische of hydrodynamische methoden, zoals gebruikt in het geval van ϕ X-DNA, de cirkelstructuur van de bacteriële of van de Tevenbacteriofaag chromosomen aan te tonen, aangezien deze (hypothetische) moleculen mechanisch te labiel zijn wegens hun reusachtige afmetingen (zie sectie 0.1.). Toch is CAIRNS (1963) erin geslaagd door middel van bacteriële lyse onder zeer milde voorwaarden, en van autoradiografie, een aanduiding te vinden voor de fysische cirkelstructuur van het DNA in de *E. coli* cellen.

Tenslotte kan men nog een stap verder gaan, zowel wat betreft evolutie als methodologie. Morfologische, cirkelvormige chromosomen werden reeds in verschillende organismen cytologisch aangetoond, bijvoorbeeld in *Tradescantia*, *Vicia faba*, *Zea mays* en *Drosophila melanogaster* (Mc CLINTOCK, 1938 ; SAX, 1940 ; SCHWARTY, 1955).

Aangezien een cirkelstructuur voor het genetisch materiaal zo verspreid blijkt te zijn in de natuur, is men geneigd aan te nemen dat dit niet aan het toeval dient toegeschreven te worden, maar veeleer verband houdt met een speciale functie, zoals replicatie. Bijgevolg is het goed mogelijk dat ϕ X-DNA, hetwelk wegens zijn relatief geringe afmeting dit moleculair-biologisch onderzoek toegelaten heeft, geen laboratorium curiosum zou zijn, maar veeleer een eenvoudig vertegenwoordiger van een klasse verbindingen welke van primordiaal belang zijn voor de biochemische genetica in het algemeen.

Een cirkelvormig ϕ X-DNA biedt ook nieuwe problemen voor het begrijpen van de processen welke zich afspelen na infectie. Immers SINSHEIMER e.a. (1962) hebben aangetoond dat na intrede in de gevoelige waardcel, het ϕ X-DNA molecule in een dubbelstrengige structuur ingebouwd wordt, RF genoemd, waarschijnlijk door synthese van de complementaire streng (zie sectie 0.3.). Nu stelt zich de vraag of RF eveneens cyclisch is. Vooreerst dient hier opgemerkt dat de hoofdas van een Watson-Crick dubbele helix, alhoewel tamelijk stijf, toch minstens 3 tot 4° kan buigen per omwenteling (10 of 11 nucleotiden). Er bestaat bijgevolg geen

structureel beletsel tegen een ringvorm voor RF (5.500 nucleotiden). In het geval van een cyclische RF, dienen bij de synthese van nieuw enkelstrengig ϕ X-DNA, waarbij waarschijnlijk de complementaire streng als matrijs gebruikt wordt, de DNA polymerase en de in opbouw zijnde keten herhaaldelijk in en uit de ring te kruipen (ongeveer 550 maal). Bovendien zouden de twee strengen van RF bij denaturatie niet kunnen dissociëren. Indien daarentegen RF een open keten structuur heeft, vraagt men zich onder meer af door welk mechanisme bij de synthese van nieuw enkelstrengig ϕ X-DNA de ring gesloten wordt. Immers de grootteorde van deze moleculen overtreft ver deze van de meeste enzymen. Indien er bijvoorbeeld een specifiek eiwit bestaat, dat de kop en de staart van de ϕ X-DNA ketens bindt, vooraleer deze met elkaar te verenigen, rijst nog de vraag waarom het proces intramoleculair en niet gedeeltelijk inermoleculair verloopt.

Het is ook van belang de hier vermelde resultaten te vergelijken met deze bekomen door MACLEAN en HALL (1962) die ϕ X-174 bestudeerd hebben met behulp van de elektronenmicroscop. Deze onderzoekers vonden dat indien het virus onder bepaalde voorwaarden verwarmd wordt (30 min. bij 70°C in 0,2 M ammoniumacetaat oplossing), de eiwitmantel zich gedeeltelijk opent, waardoor de inhoud van het virus (voornamelijk DNA) eruit springt. Dit kernmateriaal ziet eruit als een rechte keten, langs één kant nog verbonden met de eiwitmantel, maar langs de andere kant eindigend op een soort lus (foto op eerste pagina). Dergelijke opnamen dienen natuurlijk met het nodige voorbehoud geïnterpreteerd te worden, maar men is toch geneigd te veronderstellen dat deze lus het gevolg is van de cirkelstructuur van het DNA. Hiervoor pleit onder meer het feit dat dergelijke terminale lussen in geen enkel ander DNA of RNA preparaat werden gevonden. Wel dient opgemerkt te worden dat het uitgeworpen kernmateriaal niet alleen uit DNA bestaat, aangezien onder meer de stabiliteit veel groter is dan deze van geïsoleerd enkelstrengig ϕ X-DNA. Waarschijnlijk zijn de fosfaatfuncties gedeeltelijk geneutraliseerd door niet-nucleotidemateriaal zoals polyaminen of basische eiwitten. Ook door GUTHRIE en SINSHEIMER (1960) werd een aanwijzing bekomen voor het bestaan van materiaal geassocieerd met de ϕ X-DNA-keten. Een kleine berekening toont evenwel aan dat het viraal kernmateriaal grotendeels DNA is (Dr. E. MACLEAN, persoonlijke mededeling). De maximale lengte van de open ϕ X-DNA keten is $3,3 \times 10^4$ Å. De grootste, experimenteel gevonden lengte van de uitgeworpen ketens was $1,3 \times 10^4$ Å, hetgeen ook aantoont dat in het middendeel, waar zich twee DNA-strengen bevinden, geen compacte, Watson-Crick schroeflijnstructuur kan optreden. Op basis van het moleculair gewicht van het DNA ($1,7 \times 10^6$) en de densiteit, berekent men voor een $1,3 \times 10^4$ Å lange cylinder een diameter van 10 Å. De ketens welke voorkomen op de elektronenmicroscopische opnamen hebben gemiddeld 14 Å diameter, zodat minstens 50 % van het volume uit DNA bestaat. Als vergelijking weze opgemerkt dat een geordende dubbelstrengige helix een diameter van ongeveer 20 Å heeft. Bijgevolg biedt dit onderzoek met een zeer directe methode een aanduiding voor de juistheid van het besluit dat ϕ X-DNA cirkelvormig is.

Tenslotte weze hier nog de betekenis besproken van de discontinuïteit welke in de ϕ X-DNA ring voorkomt (de mogelijke natuur van deze "blok" werd in sectie 5.2. behandeld).

Vooreerst wordt door het bestaan van dit sluitstuk de vraag opnieuw gesteld of het wel mogelijk is infectie te bekomen met zuiver viraal nucleïnezuur. Immers infectief nucleïnezuur (sectie 0.2.) wordt gewoonlijk bekomen door detergens- of fenolbehan-

deling van het volledige virus ; in de aldus bereide preparaten kan meestal geen eiwit meer aangetoond worden (GIERER en SCHRAMM, 1956 ; FRAENKEL-CONRAT e.a., 1957 ; SCHUSTER, 1960). In geen enkel geval werd evenwel de continuïteit van de nucleïnezuurketen bewezen. Immers zeer speciale technieken, zoals bijvoorbeeld deze beschreven in sectie 5.1., zijn nodig om een zeer geringe hoeveelheid van een niet-nucleotide component te kunnen opsporen. Men kan zich dan ook afvragen of er voor virusinfectie in het algemeen niet méér vereist is dan een DNA- of RNA-keten. Het is bijvoorbeeld mogelijk dat een kort peptide eveneens aan het nucleïnezuur gebonden is, en dat dit een bijzondere catalytische functie heeft. Het ophelderen der natuur van deze "blok" is dan ook van groot belang.

Het voorkomen van één discontinuïteit per cirkel stelt ook nieuwe problemen voor het begrijpen van de recombinatieprocessen. Zeer dikwijls neemt men aan dat recombinatie geschiedt door "copy choice" ; dit wil zeggen dat bij de synthese van nieuw DNA op een zeker ogenblik overgegaan wordt van model A naar model B. Volgens deze hypothese gaat recombinatie dus gepaard met DNA synthese. In het geval van een continue cirkel was het eventueel mogelijk te veronderstellen dat de vorming van een nieuwe nucleïnezuurketen op vele plaatsen kan beginnen (bijvoorbeeld tussen ieder gen, of zelfs bij om het even welk nucleotide). Recombinatie zou dan plaats grijpen door het feit dat het synthetiserend proces een statistische kans heeft om over te springen van ring A tot ring B. Aldus zou men het bestaan van cyclische genomen kunnen verklaren. Door het feit dat een gepolariseerde ring met een sluitstuk toch een begin en een einde heeft, is men nu eerder geneigd aan te nemen dat de synthese van nieuwe ketens steeds start bij het eerste nucleotide. Bijgevolg kan men een cyclisch genoom in dit geval niet meer verklaren op basis van een "copy choice" mechanisme voor recombinatie. Hierbij dient opgemerkt dat laatstgenoemde slechts een veronderstelling is welke op weinig experimentele gegevens berust. Integendeel, MESELSON en WEIGLE (1961) hebben aangetoond dat recombinatie van de bacteriofaag kan plaats grijpen zonder DNA synthese. Het lijkt dus alsof er een enzyme bestaat die de DNA ketens AA' en BB' op een overeenkomstige plaats breekt, en vervolgens A met B' verbindt en B met A'. In het geval van cyclische ketens hoeft men alleen te veronderstellen dat deze uitwisselingen steeds in paren plaats grijpen. Bij een dergelijk mechanisme is het van geen belang of het uitgewisseld fragment een discontinuïteit bevat of niet. Ook wordt hier niet gespecificeerd of recombinatie plaats grijpt in de enkelstrengige vorm, ofwel als cyclisch RF. (Deze bespreking heeft alleen tot doel aan te tonen dat een cyclisch genoom met een fysische, discontinue, cirkelvormige DNA-structuur kan verenigd worden, en sluit geenszins andere verklaringen voor eerstgenoemde uit).

Ook laat het bestaan van één "blok" per ϕ X-DNA toe zekere besluiten te trekken nopens het zogenaamde "coding" probleem, dit wil zeggen hoe de nucleotideopvolging de synthese van specifieke eiwitten dirigeert (zie sectie 0.0.). Immers zoals reeds eerder opgemerkt is het waarschijnlijk dat ϕ X-DNA minstens 5 tot 10 genen bevat (zie sectie 0.3.). Slechts één van deze is met zekerheid gekend, namelijk dit welke tot synthese leidt van de eiwitmantel. Voor verschillende andere virale nucleïnezuuren van ongeveer dezelfde afmetingen heeft men bijvoorbeeld experimentele aanduiding voor het bestaan van meerdere genen (WITTMANN, 1961 ; TSUGITA e.a., 1962 ; NATHANS e.a., 1962 ; TSUGITA en FRAENKEL-CONRAT, 1962 ; WEISSMANN e.a., 1963). Aangezien er nu per cirkel slechts één discontinuïteit aanwezig is, dient men te besluiten dat de verschillende genen niet van elkaar gescheiden zijn. Bijgevolg wordt de informatie voor het starten en voor het eindigen der synthese van een polypeptideketen, welke

met een bepaald gen overeenkomt, alleen geleverd door de nucleotideopvolging. Wij mogen dus besluiten dat er nucleotide-codeworden bestaan zowel voor ieder aminozuur (zie sectie 0.0.), als voor het afbreken van de aminozuurpolymerisatie.

Het bestaan van één discontinuïteit per ϕ X-DNA stelt de mogelijkheid open dat voor vele virussen een dergelijk sluitstuk een essentiële rol speelt bij het inzetten van de infectieprocessen. Verder onderzoek in deze richting zal eventueel toelaten een direct bestrijdingsmiddel te vinden tegen bepaalde virosen.

S A M E N V A T T I N G .

=====

0. - Een overzicht wordt gegeven van de biochemische processen, welke aan de basis liggen van de replicatie en van de expressie der erfelijke kenmerken. De genetische informatie wordt vastgelegd door de nucleotideopeenvolging van het desoxyribonucleïnezuur (DNA). De fenotypische uitdrukking geschiedt door synthese van een "boodschap" ribonucleïnezuur (RNA); dit bevat een afschrift van de informatie, eveneens in de vorm van een specifieke nucleotideopeenvolging. Het "boodschap" RNA dirigeert dan de vorming van een bepaald eiwit, welke met het gen in kwestie overeenstemt.

Bij virusinfectie dringen zich als het ware een nieuw stel vreemde genen aan de waardcel op. Dit heeft tot gevolg de synthese van virus-specifieke eiwitten, in het bijzonder het "virusmantel"-eiwit. Studie van de processen, welke optreden na infectie, leidt bijgevolg tot een beter inzicht op moleculaire schaal van de universele levensverschijnselen.

De bacteriofaag ØX-174 is bijzonder geschikt voor experimenteel onderzoek. Het is een klein virus, dat sommige *Escherichia coli* en *Shigella paradysenteriae*-stammen infecteert. Het DNA, geïsoleerd uit ØX-174, is merkwaardig wegens zijn enkelstrengige structuur. ØX-DNA is ogenschijnlijk een eenvoudige keten van ongeveer 5°500 nucleotiden. Het bevat nog alle genetische informatie, aangezien zuiver ØX-DNA moleculen *E. coli* protoplasten kunnen infecteren, en tot synthese van volledige virussen leiden.

Het doel van ons onderzoek was een studie van het verband tussen de chemische structuur van dit ØX-DNA, en de biologische activiteit. Als eerste benadering van het probleem werd gepoogd de genetische informatie te wijzigen door verwijdering van eindstandige nucleotiden met behulp van specifieke enzymen.

1. - De bereiding van het ØX-DNA en de eigenschappen van de gebruikte enzyme-preparaten worden beschreven.

Vooraf drie methoden werden bij dit onderzoek toegepast :

- a) Een microchemische methode : Hydrolyse door exonucleasen werd bepaald door neerslaan van de polynucleotiden met verdund perchloorzuur. De oplosbare mononucleotiden werden gemeten hetzij door spectrofotometrie, hetzij door telling van radioactiviteit.
- b) Een fysische methode : De macromoleculaire karakteristieken van het ØX-DNA werden gevolgd door analytische ultracentrifugatie. Dit laat niet alleen de bepaling toe van de samenstelling (bijvoorbeeld verschillende homogene componenten, en degradatieprodukten), maar ook deze van de sedimentatieconstanten (een maatstaf voor het moleculair gewicht) der respectievelijke componenten.
- c) Een microbiologische methode : De biologische activiteit van de ØX-DNA moleculen werd bepaald door hun vermogen om *Escherichia coli* protoplasten te infecteren en daarin tot synthese van ongeveer 300 volledige virussen te leiden. Deze virussen werden dan getitreerd door uitzaaien op de normale waardcel (*E. coli* C).

Gans dit onderzoek werd uitgevoerd met minder dan 5 mg ØX-DNA.

2. - \emptyset X-DNA wordt niet geïnactiveerd door de E. coli exonuclease, een enzyme dat de C'₃-OH terminus van een DNA-keten aantast. Dit is niet te wijten aan een specifieke eigenschap van het enzyme (om bijvoorbeeld een ondissoceerbaar enzyme-substraat complex te vormen), noch aan een inherente resistentie van het \emptyset X-DNA, maar wel aan het ontbreken van een vrije C'₃-OH eindgroep. Een C'₃-fosfomonoësterfunctie is eveneens afwezig.

Het hypothetische, andere uiteinde, namelijk de C'₅-OH kan evenmin aangetast worden door een specifiek enzyme, zoals de kalfsmilt fosfodiësterase. Ook in dit geval is de reden de afwezigheid van een vrije C'₅-OH terminus. Een C'₅-fosfomonoëster eindgroep blijkt evenmin voor te komen.

Er wordt aangetoond dat de kalfsmilt fosfodiësterase wel hooggepolymeriseerde polynucleotideketens kan hydrolyseren, maar dat dit enzyme, evenals de E. coli fosfodiësterase, specifiek is voor gedenatureerd of enkelstrengig nucleïnezuur.

3. - De afwezigheid van vrije eindgroepen kan eventueel te wijten zijn aan een gedeeltelijke, secundaire structuur. Drie lijnen van onderzoek zijn evenwel in tegenspraak met deze veronderstelling :
- a) Behandeling met formamide, een oplosmiddel dat alle secundaire structuur in nucleïnezuren verbreekt, leidt niet tot inactivatie van \emptyset X-DNA of tot vrijstelling van eindgroepen.
 - b) Door reactie van \emptyset X-DNA met formaldehyde kan geen enkele aanwijzing bekomen worden voor het bestaan van een gebied met een geordende, secundaire structuur.
 - c) De hypothetische C'₅-OH eindgroep kan niet aangetast worden door de slangengift exonuclease, een enzyme dat blijkbaar wel substraat met een secundaire structuur kan afbreken.

De inactivatie van een \emptyset X-DNA-oplossing bij verwarming verloopt volgens een reactie van de eerste orde, en is onafhankelijk van de DNA-concentratie. De stabiliteit verhoogt aanzienlijk bij pH-verhoging in het gebied 7 tot 9. De activatie-energie voor het inactivatieproces bedraagt bij pH 9,0 40 kcal/mole, en de activatie-entropie ongeveer 33 e.u. Inactivatie bij verwarming gaat niet noodzakelijk gepaard met ketenbreuk. Er wordt aangetoond dat het letaal effect met het verlies van één purine per \emptyset X-DNA molecule te vereenzelvigen is.

Verwarming tot een hogere temperatuur is nodig om tot ketenbreuk te leiden. Het is waarschijnlijk dat de keten gebroken wordt op de zwakkere, gedepurineerde plaatsen.

De resultaten over de thermoïnactivatie van \emptyset X-DNA worden besproken onder meer in verband met de warmte-inactivatie van de transformerende activiteit en met de fysische degradatie van DNA na verwarming in een neutraal midden. Er wordt besloten dat in \emptyset X-DNA geen bindingen voorkomen welke meer labiel zijn dan deze in een normale DNA-keten. Meer bepaald, de afwezigheid van vrije eindgroepen kan niet toegeschreven worden aan labiele substituenten, zoals aminoacyl-functies.

4. - Door analytische ultracentrifugatie onder voorwaarden, waarbij de ketens gestrekt zijn (bijvoorbeeld na behandeling met formaldehyde of in alkali), kunnen twee componenten aangetoond worden, benevens degradatieprodukten. S₁ is de hoofdcomponent en migreert snelst, terwijl S₂ een ongeveer 10 % kleinere sedimentatieconstante heeft.

Deze fysische heterogeniteit kan in verband gebracht worden met de afwezigheid van eindgroepen in het infectief ϕ X-DNA (secties 2 en 3): Inderdaad, indien voor deze laatste een cyclische structuur aangenomen wordt (S_1 -component), mag men verwachten dat moleculen welke één ketenbreuk hebben ondergaan, en bijgevolg een rechte ketenstructuur vertonen, meer kunnen gestrekt worden en dus trager migreren in het centrifugaal veld, zoals gevonden voor S_2 . Twee of meer ketenbreuken leiden tot fragmentatie.

Met deze voorstelling stemt de bevinding overeen, dat alleen S_1 , en niet S_2 , drager is van het vermogen tot infectie.

Deze cirkelstructuur van het infectief ϕ X-DNA kon op een directe manier bewezen worden: Indien in een homogene populatie polymeren willekeurige ketenbreuken optreden, wordt de fractie intacte moleculen gegeven door $p_0 = e^{-m}$ (waarin m het gemiddeld aantal ketenbreuken per molecule voorstelt), en de fractie met één ketenbreuk door $p_1 = e^{-m} m$. Praktisch werden willekeurige ketenbreuken in een ϕ X-DNA-preparaat bekomen hetzij door behandeling met rundspancreas desoxyribonuclease, hetzij door verwarming; het aantal werd bepaald op basis van de overblijvende, biologische activiteit. Fysisch werd gevonden dat de hoeveelheid S_1 inderdaad daalde zoals verwacht voor de intacte component ($p_0 = e^{-m}$), terwijl de hoeveelheid S_2 eerst steeg en daarna daalde, in overeenstemming met de theoretische functie voor het eerste degradatieproduct ($p_1 = e^{-m} m$). Bijgevolg, de homogene component S_1 geeft bij een eerste, willekeurige ketenbreuk aanleiding tot de homogene component S_2 , terwijl een tweede, even toevallige ketenbreuk tot fragmentatie leidt. Deze resultaten kunnen alleen verklaard worden op basis van een cirkelstructuur voor het infectief ϕ X-DNA (S_1 -component).

ϕ X-DNA preparaten bevatten steeds een bepaalde hoeveelheid S_2 en kleinere degradatieprodukten. De relatieve hoeveelheden van deze componenten wijzen erop dat zij gevormd werden door afbraak van S_1 tijdens de isolatie van het virus of bij de bereiding van het ϕ X-DNA. Gedepurineerde schakels (bijvoorbeeld door verwarming), breken open bij strekking van de DNA-ketens, hetzij in formaldehyde, hetzij in alkali.

Tenslotte wordt de cirkelstructuur van S_1 bevestigd door een experiment, waarbij op een selectieve wijze de open keten component (S_2) werd verwijderd door behandeling met een exonuclease.

5. - De vraag wordt gesteld of ϕ X-DNA een continue cirkel is. Dit kan nagegaan worden door te bepalen welke fractie hydrolyseerbaar wordt door een exonuclease, bij een stijgend aantal willekeurige ketenbreuken. Immers een continue cirkel welke één breuk ondergaat, kan volledig afgebroken worden door een exonuclease ($h_0 = 1 - e^{-m}$). Indien evenwel per cirkel één discontinuïteit voorkomt, wordt de exonuclease hierdoor gestopt, zodat het percent hydrolyse minder is ($h_1 = 1 - \frac{1}{m} (1 - e^{-m})$). Voor twee discontinuïteiten is de hoeveelheid, welke bij iedere ketenbreuk hydrolyseerbaar wordt, nog geringer ($h_2 = 1 - \frac{2}{m} (1 - e^{-m/2})$).

Experimenteel worden willekeurige ketenbreuken bekomen door behandeling met pancreas desoxyribonuclease. Het aantal kan ofwel microbiologisch bepaald worden, ofwel fysisch door ultracentrifugatie. Beide methoden geven overeenkomstige resultaten. Vervolgens wordt ieder monster behandeld met een overmaat *E. coli* fosfodiësterase. Het percent hydrolyse wordt

hetzij microchemisch gemeten, hetzij eveneens door ultracentrifugatie. De resultaten vallen samen met de theoretische functie $h_1 = 1 - \frac{1}{m} (1 - e^m)$. Hieruit volgt dat er per ϕX -DNA cirkel één discontinuïteit aanwezig is. De chemische natuur van deze gesp is onbekend, alhoewel de stabiliteit van ϕX -DNA onder diverse voorwaarden beperkingen plaatst op het soort binding dat kan aanwezig zijn.

6. - Het belang van de bekomen resultaten wordt besproken. Door genetische methoden heeft men vroeger reeds het bestaan van cyclische chromosomen aangetoond in meerdere organismen (bacteriofagen, bacteriën). Het ligt dan ook voor de hand een verband te leggen tussen de ringstructuur van ϕX -DNA en deze cirkelvormige genomen. De bevinding dat ϕX -DNA cyclisch is, geeft voor het eerst een goede aanwijzing om aan de cirkelvormige genomen een fysische ringstructuur toe te schrijven.

Het voorkomen van slechts één discontinuïteit per ring bewijst dat de informatie, vereist voor de begrenzing van de verschillende genen, alleen geleverd wordt door de nucleotideopvolging. Het bestaan van deze discontinuïteit laat vermoeden dat benevens een polynucleotideketen toch nog een andere chemische component nodig zou kunnen zijn voor virale infectie.

BESLUIT :

1. HET INFECTIEF NUCLEINEZUUR, GEISOLEERD UIT HET VIRUS ϕX -174, HEEFT EEN FYSISCHE CIRKELSTRUCTUUR.
2. OP EEN PLAATS IN DE CIRKEL IS EEN ABNORMALE SCHAKEL INGELAST.

- - - - -

R E S U M E.

=====

0. - Un aperçu des processus biochimiques, qui sont à la base de la reproduction et de l'expression des caractéristiques héréditaires, est donné. L'information génétique est déterminée par la séquence nucléotidique de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'expression phénotypique s'effectue par la synthèse d'un acide ribonucléique (ARN) "messenger"; celui-ci est une copie de l'information, également sous la forme d'une séquence nucléotidique spécifique. L'ARN "messenger" dirige alors la formation d'une protéine, qui correspond au gène en question.

Lors d'une infection virale une série de nouveaux gènes étrangers s'imposent pour ainsi dire à la cellule hôte. Cela mène à la synthèse de protéines spécifiques au virus et plus spécialement de la gaine protéique. L'étude des processus, qui se produisent après infection, mène par conséquent à une meilleure compréhension moléculaire des phénomènes universellement vitaux.

Le bactériophage ϕ X-174 est spécialement indiqué pour la recherche expérimentale. Il s'agit d'un virus de petites dimensions, qui infecte certaines souches d'*Escherichia coli* et de *Shigella paradysenteriae*. L'ADN, isolé à partir de ϕ X-174, est remarquable par sa structure monocaténaire. L'ADN de ϕ X est apparemment une simple chaîne d'environ 5 500 nucléotides. Il contient encore toute l'information génétique, puisque des molécules pures d'ADN de ϕ X peuvent infecter des sphéroplastes d'*E. coli*, et mener à la synthèse de virus complets. Le but de notre recherche était une étude du rapport entre la structure chimique de cet ADN de ϕ X, et l'activité biologique. Comme premier approche du problème on essaya de modifier l'information génétique par l'ablation de nucléotides en position terminale à l'aide d'enzymes spécifiques.

1. - La préparation de l'ADN de ϕ X et les caractéristiques des préparations enzymatiques employées sont décrits.

Trois méthodes surtout ont été appliquées lors de cette recherche :

- a) Une méthode micro-chimique : l'hydrolyse exonucléasique fut déterminée par la précipitation des polynucléotides à l'aide de l'acide perchlorique dilué. Les mononucléotides solubles furent mesurés soit par spectrophotométrie soit par dosage de la radioactivité.
- b) Une méthode physique : les caractéristiques macromoléculaires de l'ADN de ϕ X ont été observées par ultracentrifugation analytique. Cela permet non seulement la détermination de la composition (p. ex. différents composants homogènes, et produits de dégradation), mais aussi celle de la constante de sédimentation des composants respectifs (une fonction du poids moléculaire).
- c) Une méthode microbiologique : l'activité biologique des molécules de l'ADN de ϕ X est déterminée par leur capacité d'infecter des sphéroplastes d'*E. coli* et de mener ainsi à la synthèse d'environ 300 virus intacts. Ces virus furent alors titrés par numération des plages sur la cellule hôte normale (*E. coli* C).

Cette recherche fut exécutée avec moins de 5 mg d'ADN de ϕ X.

2. - L'exonucléase d' E. coli, un enzyme attaquant une chaîne polynucléotidique à partir du bout, comportant un OH libre en 3', n'inactive pas l'ADN de ØX. Ce fait n'est pas dû à une caractéristique spécifique de l'enzyme (telle, p. ex., celle de former un complexe substrat-enzyme indissociable), ni à une résistance inhérente de l'ADN de ØX, mais bien au manque d'un libre groupe OH-terminal en C'₃. De même il n'y a pas de fonction phosphomonoester en C'₃.

L'autre bout, hypothétique, l'OH en C'₅, peut non plus être dégradé par un enzyme spécifique, tel la phosphodiesterase de la rate de veau. Dans ce cas aussi la raison en est l'absence d'un terminus C'₅-OH libre. De même il apparaît qu'il n'y ait pas de groupe terminal C'₅-phosphomonoester.

Il est démontré que la phosphodiesterase de la rate de veau peut hydrolyser des chaînes de polynucléotides hautement polymérisées, mais que cet enzyme est spécifique pour l'acide nucléique dénaturé ou monocaténaire, tout comme l'est la phosphodiesterase d'E. coli.

3. - L'absence de groupes terminaux libres peut éventuellement être due à une structure secondaire partielle. Trois lignes de recherche sont toutefois en contradiction avec cette hypothèse:
- a) Le traitement au formamide, un solvant qui rompt toute structure secondaire dans les acides nucléiques, ne mène pas à l'inactivation de l'ADN de ØX, ni à la libération de groupes terminaux.
 - b) Aucune indication de l'existence d'une zone à structure secondaire, ordonnée, ne peut être obtenue par la réaction de l'ADN de ØX avec le formaldéhyde.
 - c) Le groupe terminal hypothétique OH en C'₅ ne peut pas être attaqué par l'exonucléase du venin de serpent, un enzyme qui apparemment peut dégrader un substrat à structure secondaire.

L'inactivation d'une solution d'ADN de ØX lors d'un traitement par la chaleur progresse comme une réaction de premier ordre, et est indépendante de la concentration d'ADN. La stabilité augmente considérablement lors d'une augmentation de pH dans la zone 7 à 9. L'énergie d'activation pour la réaction d'inactivation (pH 9,0) est de 40 kcal/mole, et l'entropie d'activation d'environ 30 u.e. L'inactivation par la chaleur ne s'accompagne pas nécessairement d'une scission de chaîne. Il est démontré que l'effet léthal peut être identifié à la perte d'une purine par molécule d'ADN de ØX.

La scission de chaîne est amenée par une augmentation de chaleur. Il est probable que la chaîne est scindée aux endroits dépurinés, plus faibles.

Les résultats concernant la thermoinactivation de l'ADN de ØX sont passés en revue, entre autres en relation avec l'inactivation par la chaleur de l'activité transformante, et avec la dégradation physique de l'ADN après chauffage en milieu neutre. La conclusion est que dans l'ADN de ØX il n'y a pas de liaisons plus labiles que ceux d'une chaîne normale d'ADN. Plus précisément, l'absence de groupes terminaux libres ne peut être attribuée à des substituents labiles, tels que des fonctions amino-acyles.

4. - Deux composants peuvent être démontrés, ainsi que des produits de dégradation, après ultracentrifugation analytique sous des conditions où les chaînes sont étirées (p. ex. après traitement au formaldéhyde ou en milieu alcalin). S_1 est le composant majeur, et se meut le plus vite, tandis que S_2 a une constante de sédimentation d'environ 10 % plus petite.

Cette hétérogénéité physique peut être rapprochée de l'absence de groupes terminaux dans l'ADN de ϕX infectieux (sections 2 et 3) : en effet, si l'on accepte pour ce dernier une structure cyclique (composant S_1), on peut s'attendre à ce que des molécules, ayant subi une seule rupture de chaîne, et ayant donc une structure linéaire, puissent être plus étendues, et par conséquent se mouvent plus lentement dans le champ centrifugal, comme observé pour S_2 . Deux ou plusieurs scissions de chaîne mènent à une fragmentation.

La constatation que S_1 seul, et non S_2 , possède la capacité d'infection s'accorde avec cette représentation.

Cette structure cyclique de l'ADN de ϕX infectieux put être démontrée d'une manière directe. Lorsque dans une population homogène de polymères se produisent des ruptures de chaîne arbitraires, la fraction de molécules intactes est donnée par $p_0 = e^{-m}$ (m étant le nombre moyen de scissions de chaîne par molécule), et la fraction à scission unique par $p_1 = e^{-m} m$. En pratique des ruptures arbitraires de chaîne dans une préparation d'ADN de ϕX furent obtenues soit par traitement à la desoxyribonucléase pancréatique, soit par chauffage ; le nombre fut déterminé d'après l'activité biologique survivante. Effectivement on trouva par des méthodes physiques que la quantité de S_1 diminua comme attendu pour le composant intact ($p_0 = e^{-m}$), tandis que la quantité de S_2 augmenta d'abord et diminua ensuite, en accord avec la fonction théorique pour le premier produit de dégradation ($p_1 = e^{-m} m$). Par conséquent le composant homogène S_1 produit lors d'une première rupture de chaîne quelconque, le composant homogène S_2 , tandis qu'une deuxième rupture, tout aussi arbitraire, mène à une fragmentation. Ces résultats ne peuvent être expliqués autrement que sur la base d'une structure cyclique pour l'ADN de ϕX infectieux (composant S_1).

Les préparations de l'ADN de ϕX comprennent toujours une certaine quantité de S_2 et des produits de dégradation. Les quantités relatives de ces composants indiquent qu'ils ont été formés par dégradation de S_1 pendant l'isolation du virus ou lors de la préparation de l'ADN de ϕX . Des chaînons dépurinés (par ex. par chauffage), s'ouvrent lors de l'extension de l'ADN soit dans du formaldéhyde, soit en milieu alcalin.

Finalement, la structure cyclique de S_1 est confirmée par une expérience où le composant à chaîne linéaire a été dégradé, de manière sélective, par traitement avec une exonucléase.

5. - La question se pose si l'ADN de ϕX est un cercle continu. Cela peut être vérifié en déterminant quelle fraction devient hydrolysable par une exonucléase, lors d'un nombre croissant de scissions de chaîne arbitraires. En effet, un cercle continu qui subit une seule scission, peut être complètement dégradé par une exonucléase ($h_0 = 1 - \frac{1}{m}$). Si toutefois il y a une discontinuité par cercle, celle-ci bloque l'exonucléase, de sorte que le pourcentage de l'hydrolyse est moindre ($h_1 = 1 - \frac{1}{m} (1 - e^{-m})$). La quantité qui devient hydrolysable à chaque scission de chaîne est encore moindre pour deux discontinuités ($h_2 = 1 - \frac{2}{m} (1 - e^{-m/2})$).

Des scissions arbitraires de chaînes sont obtenues expérimentalement par traitement à la desoxyribonucléase pancréatique. Le nombre peut être déterminé soit microbiologiquement, soit physiquement par ultracentrifugation, les deux méthodes donnant des résultats concordants. Ensuite un excès de phosphodiesterase d'E. coli est ajouté à l'ADN de ϕX ainsi traité. Le pourcentage de l'hydrolyse est mesuré soit microchimiquement, soit encore par ultracentrifugation. Les résultats ainsi obtenus rejoignent la fonction théorique $h_1 = 1 - \frac{1}{m} (1 - e^m)$. De là la conclusion qu'il y a une seule discontinuité par cercle d'ADN de ϕX . La nature chimique de cette boucle est inconnue, quoique la stabilité de l'ADN de ϕX sous différentes conditions limite le genre de liaison qui soit possible.

6. - L'intérêt des résultats obtenus est discuté. L'existence de chromosomes cycliques dans différents organismes (bactériophages, bactéries), était déjà connue grâce à des méthodes génétiques. On est enclin à rapprocher la structure cyclique de l'ADN de ϕX de ces génomes annulaires. La découverte de la circularité de l'ADN de ϕX donne pour la première fois une raison fondée d'attribuer une structure physique circulaire à ces génomes cycliques.

Le fait qu'il n'y ait qu'une seule discontinuité par anneau indique que l'information, requise pour la délimitation des différents gènes, est uniquement livrée par la séquence nucléotidique. L'existence de cette discontinuité permet de penser qu'à côté d'une chaîne polynucléotidique un autre composant chimique peut aussi être nécessaire pour provoquer une infection virale.

CONCLUSION :

-
1. L'ACIDE NUCLEIQUE INFECTIF, ISOLE A PARTIR DU VIRUS ϕX -174, POSSEDE UNE STRUCTURE PHYSIQUE CYCLIQUE.
 2. A UN ENDROIT UNIQUE DU CERCLE SE TROUVE UN CHAÎNON ANORMAL.
-

L I T E R A T U U R.

- ADAMS, M.H. (1959) "Bacteriophages". Interscience Publ., New York.
- ALEXANDER, H.E., KOCH, G., MOUNTAIN, I.M., SPRUNT, K., en VAN DAMME, O. (1958) Virology 5, 172.
- ANDERSON, E.P. en HEPPEL, L.A. (1960). Biochim. Biophys. Acta 43, 79.
- ANFINSEN, C.B., HABER, E., SELA, M. en WHITE, F.H. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 1309.
- APOSHIAN, H.V. en KORNBERG, A. (1962). J. Biol. Chem. 237, 519.
- ARONSON, A.I. en MC CARTHY, B.J. (1961). Biophys. J. 1, 215.
- AVERY, O.T., MACLEOD, C.M. en MC CARTY, M. (1944). J. Exptl. Med. 79, 137.
- BACHER, J.E. en KAUZMANN, W. (1952). J. Amer. Chem. Soc. 74, 3779.
- BARBU, E., SELIGMANN, M. en JOLY, M. (1960). Ann. Inst. Pasteur 99, 695.
- BARRICELLI, N.A. (1960). Virology 11, 99.
- BEADLE, G.W. en TATUM, E.L. (1941). Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 499.
- BENDICH, A. en ROSENKRANZ, H.S. (1962), in "Progress in Nucleic Acid Research", uitg. W.E. Cohn en J.N. Davidson, Vol. I, Academic Press, New York.
- BERG, P. (1961). Ann. Rev. Biochem. 30, 293.
- BERG, P., BERGMANN, F.H., OFENGAND, E.J. en DIECKMANN, M. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1726.
- BERNARDI, G. (1962). Biochem. J. 83, P32.
- BERNARDI, G., CHAMPAGNE, M. en SADRON, C. (1961). Biochim. Biophys. Acta, 49, 1.
- BERNS, K.I. en THOMAS, C.A. (1961). J. Mol. Biol. 3, 289.
- BOEDTKER, H. (1960). J. Mol. Biol. 2, 171.
- BOLTON, E.T. en MC CARTY, B.J. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 1390.
- BOMAN, H.G. (1958). Arkiv Kemi 12, 453.
- BOMAN, H.G. en KALETTA, U. (1957). Biochim. Biophys. Acta 24, 619.
- BONET-MAURY, P. en BULGAKOV, N. (1944). C.R. Soc. Biol. 138, 499.
- BRACHET, J. (1942). Arch. biol. (Liège) 53, 207.
- BRIDGES, C.B. en BRIDGES, P.N. (1939). J. Heredity 30, 475.
- BROWN, D.M. en TODD, A.R. (1952). J. Chem. Soc., 52.
- BULGAKOV, N. en BONET-MAURY, P. (1944). C.R. Soc. Biol. 138, 497.
- BURGI, E. en HERSHEY, A.D. (1961). J. Mol. Biol. 3, 458.

- BUTLER, J.A.V., PHILLIPS, D.M. en SHOOTER, K.V. (1957). Arch. Biochem. Biophys. 71, 423.
- CAIRNS, J. (1961). J. Mol. Biol. 3, 756.
- CAIRNS, J. (1963). J. Mol. Biol. 6, 208.
- CARUSI, E.A. en SINSHEIMER, R.L. (1961). Fed. Proc. 20, 438c.
- CASPAR, D.L.D. (1956). Nature 177, 475.
- CASPERSSON, T. (1941). Naturwissenschaften 29, 33.
- CHAMBERLIN, M. en BERG, P. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 81.
- CHANTRENNE, H. (1961) "The Biosynthesis of Proteins". Pergamon Press, Oxford.
- CHANTRENNE, H. (1962). Adv. in Enzymology, 24, 1.
- CHAPMAN-ANDRESEN, C. (1962). Compt. rend. Lab. Carlsberg 33, 73.
- CHAPMAN-ANDRESEN, C. en PRESCOTT, D.M. (1956). Compt. rend. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 30, 57.
- CHENG, P-Y (1957). Nature 179, 426.
- CHONG-FU, L., OVEREND, W.G. en STACEY, M. (1949). Nature 163, 538.
- CLINE, R.E., FINK, R.M. en FINK, K. (1959). J. Amer. Chem. Soc. 81, 2521.
- COHEN, S.S. en SCHACHMAN, H.K. (1957). Virology 3, 575.
- COMMONER, B., LIPPINCOTT, J.A., SHEARER G.B. en RICHMAN, E.E. (1956). Nature 178, 767.
- CRESTFIELD, A.M. en ALLEN, F.W. (1956). J. Biol. Chem. 219, 103.
- CRICK, F.H.C. (1958). Symp. Soc. Exptl. Biol. 12, 138.
- CRICK, F.H.C. en WATSON, J.D. (1957). "Ciba Foundation Symposium on the Nature of Viruses", p. 5, Churchill, London.
- DAVIS, J.E., STRAUSS, J.H. en SINSHEIMER, R.L. (1961). Science 134, 1427.
- DAVISON, P.F., FREIFELDER, D., HEDE, R. en LEVINTHAL, C. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 1123.
- DI MAYORCA, G.A., EDDY, B.E., STEWART, S.E., HUNTER, W.S., FRIEND, L. en BENDICH, A. (1959). Proc. Natl. Acad. Sci. 45, 1805.
- DOTY, P., BOEDTKER, H., FRESCO, J.R., HASELKORN, R. en LITT, M. (1959). Proc. Natl. Acad. Sci. 45, 482.
- DOTY, P., MC GILL, B.B. en RICE, S.A. (1958). Proc. Natl. Acad. Sci. 44, 432.
- DOTY, P., MARMUR, J., EIGNER, J. en SCHILDKRAUT, C. (1960). Proc. Natl. Acad. Sci. 46, 461.
- DOUNCE, A.L. (1959). Annals N.Y. Acad. Sci. 81, 794.
- DOVE, W.F. en DAVIDSON, N. (1962). J. Mol. Biol. 5, 467.
- EDGAR, R.S. (1961). Ann. Rept. California Inst. Technol., 140.
- EIGNER, J., BOEDTKER, H. en MICHAELS, G. (1961). Biochim. Biophys. Acta 51, 165.

- EIGNER, J., STOUTHAMER, A.H., VAN DER SLUYS, I. en COHEN, J.A. (1963). J. Mol. Biol. 6, 61.
- EPSTEIN, C.J. en ANFINSEN, C.B. (1962). J. Biol. Chem. 237, 3464.
- FALASCHI, A., ADLER, J. en KHORANA, H.G. (1963). J. Biol. Chem., in druk.
- FEL'DMAN, M.Y. (1960). Biokhimiya 25, 563.
- FELIX, F., POTTER, J.L. en LASKOWSKI, M. (1960). J. Biol. Chem. 235, 1150.
- FIERS, W. (1956). Mededelingen Vl. Chem. Ver. 18, 126.
- FIERS, W. (1960). "De Ribonukleïnezuur-afbrekende Enzymen van Gerst", proefschrift, Rijkslandbouwhogeschool te Gent.
- FIERS, W. en KHORANA, H.G. (1963). J. Biol. Chem., in druk.
- FINCH, J.T. en KLUG, A. (1959). Nature 183, 1709.
- FRAENKEL-CONRAT, H. (1954). Biochim. Biophys. Acta 15, 307.
- FRAENKEL-CONRAT, H. (1956). J. Amer. Chem. Soc. 78, 882.
- FRAENKEL-CONRAT, H., SINGER, B. en WILLIAMS, R.C. (1957). Biochim. Biophys. Acta 25, 87.
- FRAENKEL-CONRAT, H. en WILLIAMS, R.C. (1955). Proc. Natl. Acad. Sci. 41, 695.
- FRASER, D. en MAHLER, H.R. (1961). Biochim. Biophys. Acta 53, 199.
- FRIESEN, B.S. en SINSHEIMER, R.L. (1959). J. Mol. Biol. 1, 321.
- FRISCH-NIGGEMEYER, W. (1956). Nature 178, 307.
- FULLER, W. (1961). J. Mol. Biol. 3, 175.
- GALL, J.G. en CALLAN, H.G. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 562.
- GAREN, A. en LEVINTHAL, C. (1960). Biochim. Biophys. Acta 38, 470.
- GAREN, A., LEVINTHAL, C. en ROTHMAN, F. (1961). J. chimie physique 58, 1068.
- GEIDUSCHEK, E.P. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 950.
- GEIDUSCHEK, E.P., MOOHR, J.W. en WEISS, S.B. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 1078.
- GEORGATSOS, J.G. en LASKOWSKI, M. (1962). Biochemistry 1, 288.
- GHUYSEN, J.M. (1962). Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires 17, 43.
- GIERER, A. (1958). Z. Naturforsch. 13 b, 485.
- GIERER, A. (1960). Progress in Biophysics 10, 299.
- GIERER, A. en SCHRAMM, G. (1956). Nature 177, 702 ; Z. Naturforsch. 11 b, 138.
- GINOZA, W. (1958). Nature 181, 958.
- GINOZA, W. en ZIMM, B.H. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 639.
- GINSBURG, A. en SCHACHMAN, H.K. (1960). J. Biol. Chem. 235, 115.

- GOLDSTEIN, L. en PLAUT, W. (1955). Proc. Natl. Acad. Sci. 41, 874.
- GORDON, M.P. en HUFF, J.W. (1962). Biochemistry 1, 481.
- GORDON, M.P. en SMITH, C. (1961). J. Biol. Chem. 236, 2762.
- GREER, S. en ZAMENHOF, S. (1962). J. Mol. Biol. 4, 123.
- GRIFFITH, F. (1928). J. Hyg., Camb. 27, 113.
- GROS, F., NAONO, S., HAYES, D., HAYES, F. en WATSON, J.D. (1962) in "Acides Ribonucléiques et Polyphosphates", uitg. C.N.R.S. Parijs, p. 437.
- GROSSMAN, L., LEVINE, S.S. en ALLISON, W.S. (1961). J. Mol. Biol. 3, 47.
- GUILD, W.R. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 1560.
- GUILD, W.R. (1962). Abstracts 6th Annual Meeting of the American Biophysical Society, Washington, WA 12.
- GUTHRIE, G.D. en SINSHEIMER, R.L. (1960). J. Mol. Biol. 2, 297.
- HALL, B.D. en DOTY, P. (1959). J. Mol. Biol. 1, 111.
- HALL, C.E., MAC LEAN, E.C. en TESSMAN, I. (1959). J. Mol. Biol. 1, 192.
- HALL, J.B. en SINSHEIMER, R.L. (1962). Fed. Proc. 21, 375C.
- HALL, J.B. en SINSHEIMER, R.L. (1963). J. Mol. Biol. 6, 115.
- HARKNESS, D.R. en HILMOE, R.J. (1962). Biochem. Biophys. Res. Comm. 9, 393.
- HARRIS, R.J.C. (1961). "Protein Biosynthesis" Academic Press, New York.
- HASELKORN, R. (1962). J. Mol. Biol. 4, 357.
- HASELKORN, R. en DOTY, P. (1961). J. Biol. Chem. 236, 2738.
- HELMKAMP, G.K. en TS'0, P.O.P. (1961). J. Amer. Chem. Soc. 83, 138.
- HEPPEL, L.A., HARKNESS, D.R. en HILMOE, R.J. (1962). J. Biol. Chem. 237, 841.
- HERMANS, J. (1959). Biochim. Biophys. Acta 32, 504.
- HERRIOTT, R.M. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 146.
- HERSHEY, A.D., GOLDBERG, E., BURGI, E. en INGRAHAM, L. (1963). J. Mol. Biol. 6, 230.
- HERSHEY, A.D., KAMEN, M.D., KENNEDY, J.W. en GEST, H. (1951). J. Gen. Physiol. 34, 305.
- HILL, R.L. en SMITH, E.L. (1956). Biochim. Biophys. Acta 19, 376.
- HILMOE, R.J. (1960). J. Biol. Chem. 235, 2117.
- HOAGLAND, M.B. (1960) in "The Nucleic Acids", uitg. E. Chargaff en J.N. Davidson, Vol. III, Academic Press, New York, 349.
- HOFSCHEIDER, P.H. (1960). Z. Naturforsch. 15 b, 441.
- HORIUCHI, T., HORIUCHI, S. en MIZUNO, D. (1959). Nature 183, 1529.
- HURST, R.C. en BECKING, G.C. (1963). Can. J. Bioch. Physiol. 41, 469.
- HUPPERT, J., WAHL, R. en EMERIQUE-BLUM, L. (1962). Biochim. Biophys. Acta 55, 182.

- HURWITZ, J., FURTH, J.J., ANDERS, M. en EVANS, A. (1962). J. Biol. Chem. 237, 3752.
- INMAN, R.B. en BALDWIN, R.L. (1962). J. Mol. Biol. 5, 172.
- ISEMURA, T., TAGAGI, T., MAEDA, Y. en IMAI, K. (1961). Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 373.
- IVANOWSKY, D. (1892). St. Petersburg Acad. Imp. Sci. Bull. 35, 67. Herdrukt in Phytopathol. Classics 7, 27 (1942).
- WAMURA, T. (1960). Biochim. Biophys. Acta 42, 161.
- JACOB, F. en MONOD, J. (1961). J. Mol. Biol. 3, 318.
- JACOB, F. en WOLLMAN, E.L. (1958). Symposia Soc. Exptl. Biol. 12, 75.
- JACOB, F. en WOLLMAN, E.L. (1961) "Sexuality and the Genetics of Bacteria", Academic Press, New York.
- JEENER, R. en SZAFARZ, D. (1950). Arch. Biochim. 26, 54.
- JOKLIK, W.F. (1962). J. Mol. Biol. 5, 265.
- JONES, A.S., LETHAM, D.S. en STACEY, M. (1956). J. Chem. Soc. 2579 en 2584.
- JORDAN, D.O. (1955), in "The Nucleic Acids", uitg. E. Chargaff en J.N. Davidson, Vol. I, Academic Press, New York, p. 447.
- JOSSE, J., KAISER, A.D. en KORNBERG, A. (1961). J. Biol. Chem. 236, 864.
- KALNITSKY, G. en ROGERS, W.I. (1956). Biochim. Biophys. Acta, 20, 378.
- KAPER, J.M. en STEERE, R.L. (1959). Virology 7, 127.
- KARASEK, M. en SCHRAMM, G. (1962). Biochem. Biophys. Res. Comm. 9, 63.
- KASSANIS, B. en NIXON, H.L. (1962). J. Gen. Microbiol. 25, 459.
- KHORANA, H.G., VIZSOLYI, J.P. en RALPH, R.K. (1962). J. Amer. Chem. Soc. 84, 414.
- KLEINSCHMIDT, A.K., LANG, D., JACHERTS, D. en ZAHN, R.K. (1962). Biochim. Biophys. Acta, 61, 857.
- KLUG, A. en CASPAR, D.L.D. (1960). Adv. Virus Research, 7, 225.
- KLUG, A. en FINCH, J.T. (1960). J. Mol. Biol. 2, 201.
- KLUG, A., FINCH, J.T. en FRANKLIN, R.E. (1957). Biochim. Biophys. Acta 25, 242.
- KLUG, A., FRANKLIN, R.E. en HUMPHREYS-OWEN, S.F.F. (1959). Biochim. Biophys. Acta 32, 203.
- KOERNER, J.F. en SINSHEIMER, R.L. (1957). J. Biol. Chem. 228, 1039.
- KOERNER, J.F. en SINSHEIMER, R.L. (1957). J. Biol. Chem. 228, 1049.
- KOZINSKI, A.W. (1961). Virology 13, 377.
- KUNITZ, M. (1950). J. Gen. Physiol. 33, 349.
- KURLAND, C.G. (1960). J. Mol. Biol. 2, 83.
- LAIDLER, K.J. (1958). "The Chemical Kinetics of Enzyme Action" Oxford University Press.

- LASKOWSKI, M. (1961), in "The Enzymes", uitg. P.D. Boyer, H.A. Lardy en K. Myrback, Vol. V, Academic Press, New York, p. 123.
- LATARJET, R., REBEYROTTE, N. en MOUSTACCHI, E. (1958). Compt. rend. 246, 853.
- LEHMAN, I.R. (1959). Ann. N.Y. Acad. Sci., 81, 745.
- LEHMAN, I.R. (1960). J. Biol. Chem. 235, 1479.
- LEHMAN, I.R. en PRATT, E.A. (1960). J. Biol. Chem. 235, 3254.
- LEHMAN, I.R., ROUSSOS, G.G. en PRATT, E.A. (1962). J. Biol. Chem. 237, 819.
- LEPINE, P., BONET-MAURY, P., BULGAKOV, N. en GIUNFINI, J. (1944). C.R. Soc. Biol. 138, 728.
- LEVINTHAL, C. en DAVISON, P.F. (1961). Ann. Rev. Biochem. 30, 641.
- LEVINTHAL, C. en DAVISON, P.F. (1961). J. Mol. Biol. 3, 674.
- LEVINTHAL, C., SINGER, E.R. en FETHEROLF, K. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 1230.
- LEWIS, E.B. (1945). Genetics 30, 137.
- LIPSETT, M.N., HEPPEL, L.A. en BRADLEY, D.F. (1960). Biochim. Biophys. Acta 41, 175.
- LIPSETT, M.N., HEPPEL, L.A. en BRADLEY, D.F. (1961). J. Biol. Chem. 236, 857.
- LOEB, T. en ZINDER, N.D. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 282.
- LUBORSKY, S.W. en CANTONI, G.L. (1962). Biochim. Biophys. Acta 61, 481.
- LURIA, S.E. (1962). Ann. Rev. Microbiology, 16, 205.
- MC CLINTOCK, B. (1938). Genetics 23, 315.
- MC CULLY, K.S. en CANTONI, G.L. (1962). J. Mol. Biol. 5, 497.
- MAC LEAN, E.C. en HALL, C.E. (1962). J. Mol. Biol. 4, 173.
- MC QUILLEN, K. (1962). Progress in Biophysics, 12, 67.
- MAHLER, H.R. en DA SILVA PEREIRA, A. (1962). J. Mol. Biol. 5, 325.
- MARKS, P.A., BURKA, E.R. en SCHLESSINGER, D. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 2163.
- MARMUR, J. en DOTY, P. (1959). Nature 183, 1427.
- MARMUR, J. en GROSSMAN, L. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 778.
- MARMUR, J. en LANE, D. (1960). Proc. Natl. Acad. Sci. 46, 453.
- MARMUR, J. en TS'0, P.O.P. (1961). Biochim. Biophys. Acta 51, 32.
- MENNIGMANN, H-D. en SZYBALSKI, W. (1962). Biochem. Biophys. Res. Comm. 9, 398.
- MESELSON, M. en STAHL, F. (1958). Proc. Natl. Acad. Sci. 44, 671.
- MESELSON, M. en WEIGLE, J. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 857.

- MEYER, F., MACKAL, R.P., TAO, M. en EVANS, E.A. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1141.
- MONOD, J., JACOB, F. en GROS, F. (1962). in "The Structure and Biosynthesis of Macromolecules", uitg. D.J. Bell en J.K. Grant, Cambridge Univ. Press, p. 104.
- MONTY, K.J. en DOUNCE, A.L. (1958). J. Gen. Physiol. 41, 595.
- MORGAN, T.H., BRIDGES, C.B. en SCHULTZ, J. (1934). Carnegie Inst. Wash. Yearbook 33, 274.
- MUNDRY, K.W. en GIERER, A. (1958). Z. Vererbungs-Lehre 89, 614.
- NATHANS, D., NOTANI, G., SCHWARTZ, J.H. en ZINDER, N.D. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 1424.
- NESTER, E.W., GANESAN, A.T. en LEDERBERG, J. (1963). Proc. Natl. Acad. Sci. 49, 61.
- NORTHROP, J.H. (1961). Ann. Rev. Biochem. 30, 1.
- OFENGAND, J. en HASELKORN, R. (1962). Biochem. Biophys. Res. Comm. 6, 469.
- OVEREND, W.G. (1950). J. Chem. Soc. 2769.
- PEACOCKE, A.R. en WALKER, I.O. (1962). J. Mol. Biol. 5, 560.
- PELLER, L. (1959). J. Phys. Chem. 63, 1194.
- PERLMANN, G.E. (1954). Nature 173, 406.
- PERUTZ, M.F. (1962). "Proteins and Nucleic Acids", Elsevier Publ., Amsterdam.
- PFAU, C.J. en MC CREA, J.F. (1962 a). Biochim. Biophys. Acta 55, 271.
- PFAU, C.J. en MCCREA, J.F. (1962 b). Nature 194, 894.
- PLOCKE, D.J., LEVINTHAL, C. en VALLEE, B.L. (1962). Biochemistry 1, 373.
- PRESCOTT, D.M. (1960). Exp. Cell Res. 19, 29.
- RALPH, R.K. en KHORANA, H.G. (1961). J. Amer. Chem. Soc. 83, 2926.
- RALPH, R.K., SMITH, R.A. en KHORANA, H.G. (1962). Biochemistry 1, 131.
- RAZZELL, W.E. (1961). J. Biol. Chem. 236, 3028 en 3031.
- RAZZELL, W.E. en KHORANA, H.G. (1959). J. Biol. Chem. 234, 2105.
- RAZZELL, W.E. en KHORANA, H.G. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1144.
- REDDI, K.K. (1961). Science 133, 1367.
- REICHMANN, M.E., REES, M.W., SYMONS, R.H. en MARKHAM, R. (1962). Nature 195, 99.
- REINER, J.M. (1959). "Behavior of Enzyme Systems". Burgess Publ. Co, Minneapolis.
- RICE, S.A. en DOTY, P. (1957). J. Amer. Chem. Soc. 79, 3937.
- RICHARDS, F.M. (1955). Compt. rend. Lab. Carlsberg, Sér. chim. 29, 329.
- RICHARDS, F.M. en VITHAYATHIL, P.J. (1959). J. Biol. Chem. 234, 1459.
- RIS, H. (1957), in "The Chemical Basis of Heredity", uitg. W.D. Mc Elroy en B. Glass, Johns Hopkins Press, p. 23.

- ROBERTS, W.K., DEKKER, C.A., RUSHIZKY, G.W. en KNIGHT, C.A. (1962). Biochim. Biophys. Acta 55, 664.
- ROBKIN, E.M., MESELSON, M. en VINOGRAD, J. (1959). J. Amer. Chem. Soc. 81, 1305.
- ROGER, M. en HOTCHKISS, R.D. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 653.
- ROGERS, W.I. en KALNITSKY, G. (1957). Biochim. Biophys. Acta 23, 525.
- ROLFE, R. en MESELSON, M. (1959). Proc. Natl. Acad. Sci. 45, 1039.
- ROWND, R., LANYI, J. en DOTY, P. (1961). Biochim. Biophys. Acta 53, 225.
- RUBENSTEIN, I.R., THOMAS, C.A. en HERSHEY, A.D. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 1113.
- RUECKERT, R.R. en ZILLIG, W. (1962). J. Mol. Biol. 5, 1.
- RUECKERT, R.R., ZILLIG, W. en DOERFLER, W. (1962). J. Mol. Biol. 5, 10.
- RUSHIZKY, G.W., KNIGHT, C.A., ROBERTS, W.K. en DEKKER, C.A. (1962). Biochim. Biophys. Acta 55, 674.
- SADRON, C.L. (1960), in "The Nucleic Acids", uitg. E. Chargaff en J.N. Davidson, Vol. III, Academic Press, New York, p. 1.
- SADRON, C.L., POUYET, J. en VENDRELY, R. (1957). Nature 179, 263.
- SAX, K. (1940). Genetics 25, 41.
- SCHERAGA, H.A. (1961). "Protein Structure", Academic Press, New York.
- SCHERAGA, H.A. en MANDELKERN, L. (1953). J. Amer. Chem. Soc. 75, 179.
- SCHERAGA, H.A. en RUPLEY, J.A. (1962). Adv. in Enzymology 24, 161.
- SCHILDKRAUT, C.L., MARMUR, J. en DOTY, P. (1961). J. Mol. Biol. 3, 595.
- SCHULTZ, J. (1947). Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 12, 179.
- SCHUSTER, H. (1960) in "The Nucleic Acids", uitg. E. Chargaff en J.N. Davidson, Vol. III, Academic Press, New York, p. 245.
- SCHUSTER, H., SCHRAMM, G. en ZILLIG, W. (1956). Z. Naturforsch. 11 b, 339.
- SCHWARTZ, D. (1955). J. Cellular Comp. Physiol. 45, suppl. 2, 171.
- SCHWEET, R. en BISHOP, J. (1963), in "Molecular Genetics", uitg. J.H. Taylor, Part I, Academic Press, New York, p. 353.
- SEKIGUCHI, M., TAKETO, A. en TAKAGI, Y. (1960). Biochim. Biophys. Acta 45, 199.
- SERTIC, V. en BULGAKOV, N. (1935). C.R. Soc. Biol. 119, 1270.
- SETLOW, R. (1960). Biochim. Biophys. Acta 39, 180.
- SIMON, E. (1961). J. Mol. Biol. 3, 101.

- SIMPSON, M.V. (1962). Ann. Rev. Biochem. 31, 333
- SINSHEIMER, R.L. (1954). Science 120, 551.
- SINSHEIMER, R.L. (1955). J. Biol. Chem. 215, 579.
- SINSHEIMER, R.L. (1957). Science 125, 1123.
- SINSHEIMER, R.L. (1959 a). J. Mol. Biol. 1, 37.
- SINSHEIMER, R.L. (1959 b). J. Mol. Biol. 1, 43.
- SINSHEIMER, R.L. (1960), in "The Nucleic Acids", uitg. E. Chargaff en J.N. Davidson, Vol. III, Academic Press, New York, p. 187.
- SINSHEIMER, R.L. (1961). J. Chim. Physique, 986.
- SINSHEIMER, R.L., STARMAN, B., NAGLER, C. en GUTHRIE, S. (1962). J. Mol. Biol. 4, 142.
- SMITH, K.M. (1951). "Recent advances in the Study of the Plant Viruses", Churchill, London.
- SPENCER, M., FULLER, W., WILKINS, M.H.F. en BROWN, G.L. (1962). Nature 194, 1014.
- SPIRIN, A.S. (1961), in "Acides Ribonucléiques et Polyphosphates", C.N.R.S. Paris, p. 73.
- STAEHELIN, M. (1958). Biochim. Biophys. Acta 29, 410.
- STAEHELIN, M. (1959). Experientia 15, 413.
- STEFENSEN, D. (1959). Brookhaven Symp. in Biology 12, 103.
- STEINER, R.F. en BEERS, R.F. (1961). "Polynucleotides", Elsevier Publ., Amsterdam.
- STENT, G.S. en FUERST, C.R. (1955). J. Gen. Physiol. 38, 441.
- STOLLAR, D. en GROSSMAN, L. (1962). J. Mol. Biol. 4, 31.
- STOLLAR, D., LEVINE, L. en MARMUR, J. (1962). Biochim. Biophys. Acta 61, 7.
- SUEOKA, N. (1960). Proc. Natl. Acad. Sci. 46, 83.
- SUEOKA, N., MARMUR, J. en DOTY, P. (1959). Nature 183, 1429.
- SUGIYAMA, T. en FRAENKEL-CONRAT, H. (1961). Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 1393.
- SZYBALSKA, E.H. en SZYBALSKI, W. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 2026.
- SZYBALSKI, W. en JOANNES, S.A. (1962). Microbiol. Genetics Bulletin 18, 22.
- TAMM, C., HODES, E. en CHARGAFF, E. (1952). J. Biol. Chem. 195, 49.
- TAMM, C., SHAPIRO, H.S., LIPSHITZ, R. en CHARGAFF, E. (1953). J. Biol. Chem. 203, 673.
- TAYLOR, A.L. en ADELBERG, E.A. (1961). Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 400.
- TAYLOR, J.H. (1963), in "Molecular Genetics", Part I, Academic Press, New York, p. 65.
- TENER, G.M., GILHAM, P.T., RAZZELL, W.E., TURNER, A.F. en KHORANA, H.G. (1959). Ann. N.Y. Acad. Sci. 81, 757.
- TENER, G.M., KHORANA, H.G., MARKHAM, R. en POL, E.H. (1958). J. Amer. Chem. Soc. 80, 6223.
- TESSMAN, E.S. en TESSMAN, I. (1959). Virology 7, 465.

- TESSMAN, I., TESSMAN, E.S. en STENT, G.S. (1957). Virology 4, 209.
- THOMAS, C.A. en BERNS, K.I. (1962). J. Mol. Biol. 4, 309.
- THOMAS, C.A. en PINKERTON, T.C. (1962). J. Mol. Biol. 5, 356.
- THOMAS, R. (1954). Biochim. Biophys. Acta 14, 231.
- TORRIANI, A. (1960). Biochim. Biophys. Acta 38, 460.
- TROMANS, W.J. en HORNE, R.W. (1961). Virology 15, 1.
- TSUGITA, A. en FRAENKEL-CONRAT, H. (1962). J. Mol. Biol. 4, 73.
- TSUGITA, A., FRAENKEL-CONRAT, H., NIRENBERG, M.W. en MATTHAEI, J.H. (1962). Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 846.
- TURNER, A.F. en KHORANA, H.G. (1959). J. Amer. Chem. Soc. 81, 4651.
- VANECKO, M. en LASKOWSKI, M. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1135.
- VANECKO, S. en LASKOWSKI, M. (1961). J. Biol. Chem. 236, 3312.
- VANECKO, S. en LASKOWSKI, M. (1962). Biochim. Biophys. Acta 61, 547.
- VINOGRAD, J., MORRIS, J., DAVIDSON, N. en DOVE, W.F. (1963). Proc. Natl. Acad. Sci. 49, 12.
- VITHAYATHIL, P.J. en RICHARDS, F.M. (1960). J. Biol. Chem. 235, 1029.
- VITHAYATHIL, P.J. en RICHARDS, F.M. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1380.
- VOLKIN, E. (1963), in "Molecular Genetics", uitg. J.H. Taylor, Part I, Academic Press, New York, p. 271.
- WAHL, R., HUPPERT, J. en EMERIQUE-BLUM, L. (1960). C.R. Acad. Sci. 250, 4227.
- WATSON, J.D. en CRICK, F.H.C. (1953). Nature 171, 737.
- WEIL, R. (1963). Proc. Natl. Acad. Sci., in druk.
- WEISSMANN, C., SIMON, L. en OCHOA, S. (1963). Proc. Natl. Acad. Sci. 49, 407.
- WHITE, F.H. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1353.
- WILLIAMS, R.C. en SMITH, K.M. (1958). Biochim. Biophys. Acta 28, 464.
- WILLIAMS, E.J., SUNG, S. en LASKOWSKI, M. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1130.
- WITTMANN, H.G. (1961). Naturwissenschaften 48, 729.
- ZAHLER, S.A. (1958). J. Bact. 75, 310.
- ZAMENHOF, S. (1957), in "Methods in Enzymology" uitg. S.P. Colowick en N.D. Kaplan, Vol. III, Academic Press, New York, p.296.
- ZAMENHOF, S., ALEXANDER, H. en LEIDY, G. (1953). J. Exptl. Med. 98, 373.
- ZAMENHOF, S. en GREER, S. (1958). Nature 182, 611.

I N H O U D S O P G A V E .

	P.
Woord vooraf	2
Lijst van de gebruikte afkortingen	3
0. Inleiding	4
0.0. Over genen, eiwitten en "boodschap" ribonucleïnezuur	4
0.1. De structuur der nucleïnezuren	8
0.2. Virussen	13
0.3. De bacteriofaag ØX 174	17
0.4. Probleemstelling	20
1. Materialen en methoden	23
1.0. Materialen	23
1.0.0. Het virus ØX-174	23
1.0.1. Het viraal ØX-DNA	23
1.0.2. Het kalfsthyms-DNA	24
1.0.3. Enzymen	24
1.0.3.0. Inleiding	24
1.0.3.1. Escherichia coli fosfodiësterase	25
1.0.3.2. Slangengift fosfodiësterase	26
1.0.3.3. Kalfsmilt fosfodiësterase	26
1.0.3.4. Pancreas desoxyribonuclease	27
1.0.3.5. Escherichia coli fosfomonoësterase	27
1.1. Methoden	28
1.1.0. Inleiding	28
1.1.1. Chemische bepaling van de vrijgestelde mononucleotiden	28
1.1.2. Analytische ultracentrifugatie	30
1.1.2.0. Betekenis van de sedimentatie constante	30
1.1.2.1. Werkwijze	31
1.1.3. Microbiologische bepaling van de infectiviteit	33
1.1.3.0. Principe	33
1.1.3.1. Procedure	34
1.1.3.1.0. Bereiding van de protoplasten	34
1.1.3.1.1. Infectie met ØX-DNA	34
1.1.3.1.2. Bepaling van de virustiter	35
2. De actie van exonucleasen op ØX-DNA	37
2.0. Experimenten met Escherichia coli fosfodiësterase	37
2.0.0. Directe proeven	37
2.0.1. Proeven na voorbehandeling met pancreas desoxyribonuclease	43

2.0.2. Proeven na voorbehandeling met fosfomonoësterase	45
2.1. Experimenten met kalfsmilt fosfodiësterase	45
2.1.0. Directe proeven	45
2.1.1. Proeven na voorbehandeling met fosfomonoësterase	50
2.1.2. De actie op kalfsthymus DNA	50
3. De secondaire structuur van ϕ X-DNA	58
3.0. Algemene inleiding	58
3.1. Behandeling met formamide	59
3.2. Behandeling met formaldehyde	60
3.2.0. De actie van formaldehyde op nucleïnezuren	60
3.2.1. Experimenteel onderzoek	62
3.3. Experimenten met slangengift fosfodiësterase	66
3.4. Thermoinactivatie	67
3.4.0. Inleiding	67
3.4.1. Invloed van tijd en concentratie	67
3.4.2. Invloed van de temperatuur	69
3.4.3. Invloed van de pH	69
3.4.4. Besluit	72
4. De fysische heterogeniteit van ϕ X-DNA	77
4.0. Inleiding	77
4.1. Onrechtstreekse aanduiding voor een cirkelstructuur	78
4.1.0. Verband tussen fysische heterogeniteit en pri- maire structuur	78
4.1.1. Verband tussen fysische heterogeniteit en in- fectiviteit	81
4.2. Rechtstreeks bewijs voor een cirkelstructuur	81
4.2.0. Onderzoeksplan	81
4.2.1. Verbreking van de primaire structuur door pan- creas desoxyribonuclease	84
4.2.2. Verbreking van de primaire structuur door ver- warming	86
4.3. Controle proeven	87
4.3.0. Het voorkomen van labiele schakels	87
4.3.1. De endogene S_2 -component	92
4.3.2. Het zuiveren van de cirkelcomponent	93
4.4. Besluit	94
5. De discontinuïteit van de cirkel	98
5.0. Onderzoeksplan	98
5.1. Het aantonen van één discontinuïteit per cirkel	99
5.1.0. Chemische en microbiologische analyse	99
5.1.1. Fysische analyse	99
5.1.2. Controle proeven	102

5.2. Besluit	103
6. De semi-continue ringstructuur van het infectief ØX-DNA - Bespreking	105
Samenvatting	110
Résumé	114
Literatuur	118
Inhoudsopgave	128

- - - - -