

MUTATIEPROBLEMEN

REDE

UITGESPROKEN IN DE OPENBARE
VERGADERING VAN DE SENAAAT
DER LANDBOUWHOGESCHOOL
TER GELEGENHEID VAN DE 43e HER-
DENKING VAN DE DIES NATALIS
OP 9 MAART 1961

DOOR

DE SECRETARIS VAN DE SENAAAT

Prof. Dr. R. PRAKKEN



H. VEENMAN & ZONEN N.V. - WAGENINGEN

Dames en Heren, zeer gewaardeerde toehoorders,

Als inleiding tot mijn onderwerp, *mutatieproblemen*, moge ik U er aan herinneren dat we thans, 1961, ons ongeveer midden tussen een tweetal belangrijke 100-jaars jubilea op genetisch gebied bevinden.

In 1859 publiceerde DARWIN zijn boek „On the origin of species by means of natural selection”. De grondgedachte ervan is een geleidelijke ontwikkeling of evolutie van de tegenwoordige planten en dieren, de mens inbegrepen, uit eraan voorafgegane, in het algemeen eenvoudiger of minder gespecialiseerde vormen, en deze op hun beurt uit nog vroegere stamvormen. Thans, honderd jaar later, is de evolutiegedachte een algemeen aanvaarde werkhypothese en meer dan dat, al blijven talloze vragen naar details van het hoe, het waarom, en het waardoor nog antwoord eisen. Evolutie is voortdurende verandering, en Darwin zag de overall aanwezige variabiliteit als basis voor de natuurlijke selectie.

In 1865 publiceerde MENDEL zijn „Versuche über Pflanzenhybriden”, de resultaten van zeer nauwkeurige kruisingsproeven met erwten. Hij analyseert en verklaart daarin de erfelijkheid van duidelijke verschilpunten of kenmerkenparen, bv. van hoog of klim (H) tegenover laag of stam (h). De bastaard, aan te duiden als Hh, ontwikkelt zich tot een hoge plant. De aanleg voor de eigenschap hoog heet daarom dominant en die voor de eigenschap laag recessief. Het wezenlijke van Mendels resultaten nu was, dat hij volkomen overtuigend vaststelde, dat in de bastaard of hybride Hh de beide aanlegsels, groot H voor hoog en klein h voor laag, geheel zelfstandig naast elkaar blijven bestaan, en dat ze bij de vorming van eicellen en stuifmeel volkomen onveranderd uiteengaan, waarbij de helft der geslachtscellen de aanleg groot H ontvangt en de helft klein h. Door combinatie volgens toeval bij de bevruchting geeft de F₁-bastaard Hh zo een F₂-nakomelingschap van $\frac{1}{4}$ HH (homozygoot hoog), $\frac{2}{4}$ Hh (heterozygoot hoog) en $\frac{1}{4}$ hh (homozygoot laag).

Zo kwam dus tegenover de vloeiende veranderlijkheid van de eigenschappen volgens Darwin, de absolute constantheid van de aanlegsels volgens Mendel te staan. Misschien zijn juist mede hierdoor de geniale analyse en verklaring van Mendel in zijn tijd onopgemerkt gebleven of verwaarloosd. Het is later de *mutatietheorie* die tussen deze onveranderlijkheid en veranderlijkheid een synthese tot stand tracht te brengen. Hiermee is *het* centrale mutatieprobleem aangeduid.

In het jaar 1900 volgde de herontdekking van de regels van Mendel, gelijktijdig door DE VRIES, CORRENS en VON TSCHERMAK.

Juist gedurende de jaren van 1865-1900 waren de aard en de betekenis van de chromosomen als de voornaamste dragers van de erfelijke aanleg duidelijk geworden: constante vorm en aantal bij iedere soort, overlangse splitsing bij iedere somatische deling, halvering in aantal van $2n$ tot n en verdubbeling van n tot $2n$ bij resp. reductiedeling en bevruchting. De regels van Mendel werden nu onmiddellijk erkend en het verband met de chromosomen werd geheel duidelijk.

Ieder aanlegspaar, meestal factorenpaar of *genenpaar* genoemd, ligt in een bepaald chromosomenpaar. Het hoge erwtenras is HH, het lage is hh. Hun F_1 -bastaard bezit in al zijn lichaamcellen het chromosomenpaar Hh. In de profase van de eerste reductiedeling paren deze twee „homologe chromosomen” (en alle overige tweetalen) tot een zogenaamde bivalent, bestaande uit 4 overlangse helften of chromatiden, HHhh, en van deze vier chromatiden komt er door de beide reductiedelingen één in elk der vier tetradecellen terecht, waarvan dus twee het groot H en twee het klein h chromosoom bevatten: de 1 : 1 gametenverhouding van Mendel, grondslag voor de 1 : 2 : 1 of 3 : 1 F_2 -splitsing.

Twee genenparen die in twee verschillende chromosomenparen liggen vertonen een onafhankelijke splitsing, kennelijk hierop berustend, dat de twee bivalentparen, bv. Hh en Kk, zich in de metafase van de eerste reductiedeling onafhankelijk van elkaar oriënteren, tengevolge waarvan de vier mogelijke chromosomen- of genencombinaties (HK, Hk, hK en hk) even talrijk zijn, elk dus 25%. Of ook, de twee oude genencombinaties samen 50% en de twee nieuwe combinaties (de recombinaties) samen 50%.

Twee genenparen daarentegen die in hetzelfde chromosomenpaar liggen vertonen i.h.a. koppeling, en wel, volgens de hypothese van MORGAN c.s., des te sterker, naarmate ze in het chromosoom dichter bijeen liggen. Een bastaard met in het ene chromosoom de genen AB en in het andere ab, vormt niet 25% van elk der vier mogelijke gametentypen, maar bv. 38% AB, 12% Ab, 12% aB en 38% ab. Het *overkruisingspercentage*, dat is het aantal gameten met een der beide nieuwe genencombinaties uitgedrukt als procent van het totale aantal gameten, is hier $12 + 12 = 24$. Voor elk tweetal gekoppelde genenparen blijkt dit overkruisingspercentage een vaste waarde te zijn, voor verschillende combinaties variërend van vrijwel 0% (absolute koppeling, vlak bijeen) tot 50% (onafhankelijke splitsing, ver vaneen).

Deze hypothese van de lineaire rangschikking der genen is door het verdere *cytogenetische onderzoek* bevestigd. Bij *Drosophila* en mais zijn zo honderden genenparen in hun onderlinge volgorde op de 4 resp. 10 chromosomenparen gelocaliseerd. Men heeft zelfs wel gespeeld met de gedachte, dat de ruim 5000 herkenbare en genummerde dwarsstreepjes in de reuzenchromosomen van de speeksel-

klier van de *Drosophilalarve* met genen zouden corresponderen.

Volgens een vrij algemeen aanvaarde hypothese wordt aangenomen, dat de beide nieuwe combinaties van twee gekoppelde genenparen tot stand komen doordat, in het hiervoor genoemde bivalent stadium met vier chromatiden, twee niet-zusterchromatiden op precies overeenkomstige plaats „breken” en zich „verkeerd verbinden”, zich uitend in de zogenaamde chiasmata (chiasmatype theorie). Er zijn genetische aanwijzingen, dat twee of meer chiasmata in een chromosomenpaar de neiging vertonen om niet vlak bijeen te liggen, m.a.w. dat er een (positieve) chiasmainterferentie is.

Terloops zij hier nog vermeld dat een continue variabiliteit en een geleidelijke of glijdende verandering zoals Darwin die vaak waarnam en waarop hij zijn selectietheorie bouwde, met de voorstelling van distincte mendelende genenparen niet in strijd is. Deze zogenaamde kwantitatieve eigenschappen, van zeer groot belang voor de veredeling, berusten namelijk op een groot aantal genenparen, polymere factoren of polygenen, elk met slechts een geringe werking, gering ook ten opzichte van de invloed der uitwendige omstandigheden. Een volledige factoriële analyse is daardoor onmogelijk en bestudering dient te geschieden met de methoden van de *biometrische genetica*.

Zo leerden de jaren van 1900 tot 1925 de mendelende genenparen zien als tegelijkertijd de eenheden van werking of *functie*, de eenheden van overkruising of *recombinatie*, en ook als de eenheden van *mutatie*. Want soms gebeurt het, hoewel uiterst zelden, dat *spontaan* het ene van twee homozygoot aanwezige genen of allelen in zijn partnerallel overgaat, en in die nieuwe vorm constant blijft. De frequentie waarmee dit geschiedt varieert sterk van gen tot gen, maar is in veel gevallen van de grootteorde van één of enkele per 10^5 à 10^6 gameten.

Met een ver vooruitziende blik eindigt reeds in 1902 DE VRIES het voorwoord van het eerste deel van zijn standaardwerk „Die Mutationstheorie” als volgt: „Die Kenntniss der Gesetze des Mutirens wird voraussichtlich später einmal dazu führen, künstlich und willkürlich Mutationen hervorzurufen und so ganz neue Eigenschaften an Pflanzen und Thieren entstehen zu lassen. Und wie man durch das Selectionsverfahren veredelte, ertragsreichere und schönere Zuchtrassen heranbilden kann, so wird man vielleicht auch dereinst im Stande sein, durch die *Beherrschung der Mutationen* dauernd bessere Arten von Culturpflanzen und von Thieren hervorzubringen.”

Thans, 60 jaar later, zijn we volop in de periode van geïnduceerde, experimentele of *kunstmatige mutatie*. Ik moet daar dadelijk aan toevoegen, dat de gerichte beheersing ervan nog in een begin stadium verkeert.

In 1927 gaf de thans nog levende geneticus en Nobelprijswinnaar

MULLER zijn eerste beroemd geworden mededeling omtrent door behandeling met röntgen- of X-stralen bij het bananenvliegje *Drosophila* in hoge frequentie verkregen kunstmatige mutaties, in een orde van grootte van omstreeks honderd keer de frequentie van spontane mutaties. Kort daarna werden soortgelijke experimenten en resultaten door STADLER bij gerst en mais beschreven. Daarmee was de steeds groeiende stroom van onderzoekingen omtrent kunstmatige mutatie begonnen. De in de jaren sedert 1930 plaats vindende ontwikkeling op het gebied van de atoomenergie heeft steeds weer nieuwe en krachtiger bronnen van ioniserende bestraling beschikbaar doen komen.

Gedurende en vlak na de tweede wereldoorlog werd de mutagene werking van verschillende chemische stoffen vastgesteld: van het oorlogsgas mosterdgas, van aethylurethaan, van formaldehyde. Vooral na 1950 is het systematisch onderzoek naar en met chemische mutagenen zeer intensief aangepakt. Bijzonder sterk werkzaam blijken enerzijds veel onstabiele sterk reactieve verbindingen, die alkylierend werken of vrije radicalen vormen, anderzijds verschillende zeer stabiele sterk giftige stoffen, die waarschijnlijk enzymwerkingen remmen en daarmee de stofwisseling van de cel en de chromosomen.

Op de talloze problemen die zich bij het opwekken van mutaties voordoen zal ik hier slechts zeer kort ingaan. Een der oudste daarvan is de vraag naar het verband tussen de aard van de straling en de toegediende dosis ervan (in r-eenheden of vergelijkbare eenheden) enerzijds, en de aard en het aantal van de verkregen mutaties anderzijds. Pas zeer geleidelijk is duidelijk geworden hoeveel verschillende factoren bij de beoordeling hiervan een rol spelen. Hierbij sluit aan de vraag naar de aard van de werking, nl. *direct* op de chromosomen en de genen daarin, of meer *indirect*, bv. via als gevolg van de bestraling optredende vrije radicalen, wier optreden en verdwijnen de allerlaatste jaren o.a. bestudeerd wordt met behulp van de methode der paramagnetische resonantiespectra. Naast belangrijke algemene wetmatigheden geven de zeer talrijke publicaties ook veel tegenstrijdige resultaten te zien, waarschijnlijk in veel gevallen berustend op onvoldoende vergelijkbaarheid der experimenten. Vandaar juist de laatste jaren een streven om tot internationale *standaardisatie* te komen: wat betreft de te gebruiken soorten of rassen, leeftijd en grootte van de zaden, vochtgehalte, zuurstof, temperatuur, bepaling van aard en dosis van de bestraling, zuiverheid der chemische mutagenen, wijze van bepaling van aard en aantal der mutaties, enz.

Ook aan de problemen, mogelijkheden en reeds verkregen resultaten van de kunstmatige mutatie in dienst van de veredeling zal ik hier voorbijgaan. Eveneens aan de gevaren die de mens en vooral zijn nakomelingen zouden kunnen bedreigen door toenemende in-

tensiteit van radioactieve straling in de natuur of door het omgaan met mutagene of carcinogene stoffen in huishouding, landbouwbedrijf of industrie. Evenzo aan het zorgwekkende feit dat, bij bacteriën, schimmels en insecten, door het gebruik van antibiotica en velerlei chemische bestrijdingsmiddelen steeds meer de tegen deze bestrijdingsmiddelen resistente mutante vormen de overhand krijgen, waarbij het tot op zekere hoogte onverschillig is of de betreffende mutanten spontaan optreden dan wel door het bestrijdingsmiddel geïnduceerd worden.

In het verdere deel van mijn voordracht zal ik wél trachten duidelijk te maken welke problemen en resultaten het mutatieonderzoek opleverde omtrent de aard der mendelende genen als de veronderstelde eenheden van functie, recombinatie en mutatie.

Het begrip „mutatie” tracht men meestal te omschrijven als „iedere erfelijke verandering die niet berust op splitsing of op normale recombinatie van onveranderd erfelijk materiaal”. Straks zal blijken dat het onderscheiden van mutatie en normale recombinatie niet eenvoudig, en eigenlijk ondoenlijk is.

Van de verschillende mutatietypen zullen plasmatische mutatie, genoommutatie of polyploidie (meestal door colchicine), en chromosoommutatie of aneuploidie hier geheel buiten beschouwing blijven, zodat alleen structurele mutaties en genmutaties behandeld worden, de mutaties waaruit het meest omtrent genen en genwerking kan worden afgeleid.

Bij *structurele mutaties* verandert, microscopisch duidelijk zichtbaar vooral in de dwarsgestreepte reuzenchromosomen van *Drosophila*, de bouw of structuur van een chromosoom. De gebruikelijke termen laten duidelijk horen om welke structuurveranderingen het gaat: fragmentatie, translocatie, inversie, duplicatie en deficiency. In de beide laatste gevallen, duplicatie en deficiency, komt er genetisch materiaal bij of valt er wat weg, en daarbij is dus een phaenotypisch effect wel te verwachten. Bij inversies of translocaties echter verandert, voorzover microscopisch waarneembaar, alleen de rangschikking van het genetisch materiaal in het chromosoom, en toch treedt ook daarbij in veel gevallen, vooral bij *Drosophila*, een phaenotypisch effect op, in die zin, dat nabij de breukplaatsen liggende loci (genen) in hun werking beïnvloed worden. Voor dit verschijnsel wordt de term *positieëffect* gebruikt.

Een *genmutatie*, ook factor- of puntmutatie genoemd, is steeds microscopisch onzichtbaar en heeft betrekking op verandering van een der in het chromosoom veronderstelde genen, waarbij het nieuwe gen of allel, samen met het oorspronkelijke, een mendelend gen- of allelenpaar vormt.

Zeer kleine duplicaties of deficiency's gedragen zich genetisch vrijwel zuiver als een mendelend gen t.o.v. normaal. Ook zeer kleine

inversies, met hun begeleidend positieëffect, gedragen zich genetisch gezien zuiver als een mendelende factor. Een inversie van slechts één dwarsstreepje of een onderdeel daarvan is dus nòch microscopisch nòch op grond van zijn genetisch gedrag van een genmutatie te onderscheiden. Wel geldt misschien nog, dat een zuivere genmutatie kan *terugmuteren* en een structurele mutatie niet, maar ook dit criterium is moeilijk en dient zeer voorzichtig gehanteerd te worden.

De enkele jaren geleden overleden grote geneticus GOLDSCHMIDT kwam door een en ander tot het extreme standpunt, van het begrip der individuele genen geheel af te zien, en ieder chromosoom als één functioneel geheel te beschouwen, waarbinnen allerlei structuurveranderingen positieëffect teweeg brengen. Maar dit mag toch enigszins als het kind met het badwater weggooien worden beschouwd.

Nog van een ander complex van ervaringen uit is het oorspronkelijke genbegrip — eenheid van functie, recombinatie en mutatie — bezig een sterke wijziging te ondergaan, en wel door de ervaring bij multiple allele reeksen. Bij *Drosophila* is de normale oogkleur rood dominant over abrikoos (F_1 rood, F_2 3 rood : 1 abrikoos) en over wit (F_1 rood, F_2 3 rood : 1 wit). Verder is abrikoos dominant over wit (F_1 abrikoos, F_2 3 abrikoos : 1 wit). Waren de recessieve genen abrikoos en wit twee aparte recessieve genen, aparte loci, dan zou de F_1 ertussen dubbel heterozygoot zijn, d.i. dubbeldominant ofwel rood, ze is echter niet rood maar abrikoos; anders gezegd: abrikoos en wit werken niet complementair (complementariteitsproef). Dit alles maakt, dat de genen rood, abrikoos en wit als drie vormen van dezelfde locus worden beschouwd: een triple allele reeks. Onderzoek van de laatste tien jaren heeft echter geleerd, dat de F_1 bastaard abrikoos/wit behalve de oorspronkelijke gameten met de aanleg voor abrikoos of die voor wit, toch ook enkele uiterst zeldzame gameten met de aanleg voor rood geeft, ongeveer 1 op 20.000, en wel door overkruising, met een overkruisingspercentage van 0,01% dus. Dit betekent, dat deze oogkleurlocus (waarvan meer dan tien multiple allelen bekend zijn) op tenminste twee plaatsen kan muteren, en dat daartussenin overkruising plaats kan vinden. Bij andere loci van multiple allele reeksen van *Drosophila* is hetzelfde gevonden: de locus bezit één algemene functie of werking, maar kan op 2 tot 6 plaatsen muteren, en tussen deze plaatsen in treedt overkruising op, van maximaal omstreeks 0,05% tot minimaal 0,01% of misschien nog minder. Voor het bestuderen van deze overkruisingen of recombinaties binnen een locus zijn dus zeer grote aantallen nodig.

We hebben nu dus gezien dat het gen niet meer als één eenheid van mutatie en van recombinatie mag worden beschouwd. De volgende vraag kan zijn, wat het mutatieonderzoek omtrent de *wer-*

king of functie der genen dan wel leert. Om hierop een antwoord te vinden zullen we in de richting van de *chemogenetica* moeten kijken, die zich met de chemische aard van de werking der genen en ook met de chemische structuur van de chromosomen en genen zelf bezighoudt.

Het begin van de chemogenetica als wetenschap heeft betrekking op een afwijking bij de mens, de zgn. *alcaptonurie*, waarbij de urine een zwarte kleur vertoont. De Engelse arts GARROD zag dit reeds in 1902 als een erfelijke afwijking, terwijl spoedig duidelijk werd dat het een monofactorieel recessieve eigenschap is, bestaand in een onvolledige afbraak van de aminozuren phenylalanine en tyrosine, een stopzetting op een zeer bepaald punt van de lange afbraakserie. Enkele jaren later vond de Duitser GROSS, dat bij personen met alcaptonurie in het bloedserum een enzym ontbreekt dat katalytisch werkt op de oxydatie van alcapton. Hier was dus het eerste duidelijke verband gen — enzym — eigenschap. Personen met alcaptonurie blijken in Engeland ongeveer 5 per 1.000.000 voor te komen, wat voor de frequentie van het mutante gen ongeveer de wortel daaruit betekent, ruim 2 per 1000.

Nog één andere afwijking bij de mens zij hier kort besproken, de *sikkelcelziekte*, een dodelijk erfelijk gebrek, monofactorieel recessief, waarbij de rode bloedlichaampjes verschrompeld en daardoor vaak sikkelvormig zijn. De Nobelprijswinnaar PAULING toonde in 1949 aan, dat het een „moleculaire ziekte” is, namelijk een chemische verandering van de haemoglobine. De grote vorderingen van de eiwitanalyse maakten het aan INGRAM mogelijk in 1956 aan te tonen, dat het normale en het afwijkende haemoglobineëiwit slechts in één aminozuur verschillen: glutaminezuur van het normale eiwit is bij de homozygoot sikkelcelzieke personen in ieder molecuul (en bij de bijna normale heterozygoten in een deel der moleculen) vervangen door valine.

Als frappante bijzonderheid zij vermeld, dat gevallen van sikkelcelziekte het meest frequent voorkomen in streken met veel malaria. Verklaring: malariamuggen zijn fijnproevers, die de homozygoot normale mensen uitzuigen en besmetten, maar de iets abnormale heterozygoten met rust laten, waardoor deze een selectieve waarde bezitten hoger dan de beide typen van homozygoten, d.i. in zekere zin heterosis vertonen.

Na deze enkele opmerkingen omtrent de mens thans een en ander over schimmels, omdat daar de grootste vorderingen op chemogenetisch gebied zijn gemaakt, vooral dank zij de kunstmatige mutatie. De enkele jaren geleden als Nobelprijswinnaars aangewezen Amerikaanse onderzoekers BEADLE en TATUM hebben hierbij het baanbrekende werk verricht, gevolgd door zeer vele anderen.

Op een „complete voedingsbodem” (agaroplossing, anorganische

zouten, glucose, mout-extract en gist-extract) kiemen alle sporen, ook die met een ernstig genetisch defect in hun synthetisch vermogen. Op een „minimum voedingsbodem” (agaroplossing, anorganische zouten, koolstofbron plus een spoor biotine, echter zonder mout- en gistextract) kiemen en groeien alleen de sporen van het normale „wilde” type, en niet de sporen die het vermogen tot synthetiseren van een noodzakelijk vitamine, aminozuur of nucleïne-zuurbouwsteen hebben verloren.

Voor het verkrijgen van mutanten worden duizenden of miljoenen normale „wilde” sporen bestraald of met chemische mutagenen behandeld, en daarna op schalen met een minimumvoedingsbodem dun uitgezaaid; de normaal gebleven sporen kiemen dan direct, de gemuteerde echter niet. Korte tijd later wordt over deze minimumvoedingsbodem voorzichtig een dun laagje complete uitgegoten. De eerst ongekiemd gebleven en pas nu kiemende sporen worden geïsoleerd tot één-spore-cultures.

Deze geïsoleerde cultures worden dan elk „getoetst” op een drietal voedingsbodems nl.:

- a. minimum plus vitaminemengsel,
- b. minimum plus aminozuurmengsel,
- c. minimum plus nucleotidenmengsel.

Uit het al of niet groeien valt dan direct af te lezen op welk terrein het onvermogen ligt. Wanneer bv. op minimum plus aminozuurmengsel normale groei optreedt, terwijl de beide andere schalen geen groei vertonen, dan is er een erfelijk gebrek in aminozuursynthese, en de betreffende cultuur wordt verder afgetast op minimum plus telkens één of twee aminozuren. Bijna steeds blijkt dan, dat het gebrek door één bepaald aminozuur gecompenseerd kan worden, bv. door het toevoegen van arginine, of van adenine, enz.

Wanneer vervolgens een groter aantal zelfstandig opgetreden arginine-behoefteige mutanten verder worden bestudeerd, dan blijkt dat het zwakke punt, de stopzetting, op veel verschillende plaatsen van de arginine-synthese kan liggen, zodat deze synthese in zijn verschillende fasen uiteen wordt gelegd. Door deze ontwikkeling is de mutatiegenetica een uiterst belangrijk hulpmiddel voor gecompliceerd biochemisch onderzoek geworden.

Bij iedere bepaalde mutant is dus vooral één scherp te bepalen omzetting geremd. Het schimmelonderzoek heeft daardoor sterk de gedachte gesuggereerd van „één gen — één enzym”; of liever „één gen — één primaire werking”, daar in het zeer ingewikkelde netwerk van de chemische processen een bepaalde stap op vellerlei wijze geremd kan worden.

Evenals bij de hogere planten en bij de dieren zijn ook bij de schimmels al deze genen of loci door koppelingsanalyse in kaart te brengen: ze liggen over alle chromosomen verspreid.

Eenzelfde locus, bv. een bepaalde locus voor adenine-synthese bij

de schimmel *Aspergillus*, of bij de gist *Schizosaccharomyces*, kan in de experimenten natuurlijk twee- of meermalen muteren. Dat het inderdaad dezelfde locus met dezelfde werking betreft valt af te leiden uit de „complementariteitsproef”, die zich bij de haploïde schimmels niet binnen diploïde kernen afspeelt, doch tussen haploïde kernen. Wanneer namelijk in eenzelfde mycelium twee haploïde kernsoorten bijeen gebracht worden die elk, *op een verschillende locus*, een gebrekmutatie bezitten, dan vullen de werkingen van deze twee kerntypen elkaar aan, en het dan heterokaryotisch genoemde weefsel kan op een minimum-voedingsbodem groeien. Wanneer daarentegen twee kernen bijeen gebracht worden die *op dezelfde locus* en daarmee voor dezelfde werking een gebrekmutatie bevatten, dan vullen die twee kerntypen elkaar niet aan (evenmin als twee multiple allelen binnen een diploïde kern elkaar aanvullen: abrikoos x wit bij *Drosophila* is abrikoos, en niet rood).

Nu zijn, ongeveer vanaf 1955, verschillende onderzoekers (ROPER, PRITCHARD, PONTECORVO, LEUPOLD ea.) hele series mutanten met zo'n niet-complementair allel voor bv. adenine-behoefte gaan kruisen, op complete voedingsbodem, terwijl ze daarna de producten van de reductiedeling, de ascosporen, op minimum voedingsbodem uitzaaiden. Resultaat: in alle gevallen traden toch kiemende sporen op, zij het ook in geringe aantallen, variërend van omstreeks 2000 per 10^6 tot 10^8 , van 0,2% tot 0,001% dus. Conclusie als bij *Drosophila*: een gen of locus is een chromosoomzone met een bepaalde werking, terwijl daarbinnen op vele lineair gerangschikte punten, misschien soms wel een 1000-tal, mutaties kunnen plaats vinden, die onderling kunnen recombineren.

Zo zijn we van het oorspronkelijke gen — begrip — eenheid van functie, recombinatie en mutatie — ver verwijderd geraakt. Jammer en gevaarlijk is, dat al deze waarnemingen en conclusies betrekking hebben op een gebied met zó gering overkruisingspercentage, dat echte recombinatie verward kan worden met spontane mutatie, of nog eer met zogenaamde genconversie ofwel transmutatie. Onder dit laatste verstaat men het zeldzame, maar toch met vrij grote zekerheid vastgestelde verschijnsel, dat de vier tetradecellen van een heterozygoot, bv. Aa, niet 2 klein a plus 2 groot A zijn, doch 1 klein a plus 3 groot A. Een gangbare „verklaring” is, dat het duplicaat van het klein a chromosoom juist bij deze locus een foutje in zijn „copy-choice” maakte, een kleine copiëeringsfout dus: het gecopieerde groot A in plaats van klein a. Mutatie of recombinatie? Moeilijk te zeggen.

Een aanwijzing dat bij de proeven van Pontecorvo e.a. transmutatie een rol zou kunnen spelen, mag m.i. gezien worden in de door hem geconcludeerde sterke negatieve interferentie tussen twee plaatsen van uitwisseling op die zeer kleine afstanden, in plaats van de in het algemeen waar te nemen positieve interferentie, welke laat-

ste vanuit het gezichtspunt van de chiasmatische-theorie (breken en verkeerd verbinden tussen 2 der 4 chromatiden van een bivalent chromosoom) enigszins begrijpbaar is te achten.

Ik mag hier echter niet verhelen, dat er een neiging bestaat om van de „chiasmatische-theorie”, in zijn oorspronkelijke vorm, over te stappen naar de „copy-choice theorie”: recombinatie niet door breken en verkeerd verbinden op het voltooid 4-strengstadium, maar tussen de twee zich juist vormende nieuwe chromatiden, door gelijktijdige, d.w.z. op hetzelfde punt plaats vindende, verwisseling van copy-choice.

Tenslotte nog een enkel belangrijk verschijnsel bij bacteriën. Bij deze organismen is paring van individuen, overgang van genetisch materiaal en koppeling vastgesteld, hoewel over de aard dier geslachtelijke processen nog weinig met zekerheid bekend is.

Hier wil ik echter kort een ander verschijnsel bespreken, dat van de *transformatie* of *gerichte mutatie*. De longontstekingsbacteriën of pneumococci vormen gewoonlijk om de cel een huidje van polysacchariden, wat aan de kolonie een gladglanzend voorkomen geeft (smooth). Op deze polysacchariden berust de serologische specificiteit van de verschillende stammen. Soms, bij cultuur in vitro, gaat het vermogen om zo'n huidje te vormen irreversibel verloren en de kolonies hebben dan een ruw (rough) uiterlijk. In 1928 reeds deed GRIFFITH de belangrijke ontdekking, dat, wanneer in een proefdier tegelijk met levende rough-cellen ook (een extract van) door hitte gedode smooth-cellen (wordt) worden ingespoten, een aantal van de ingespoten rough-cellen weer een huidje gaat vormen, en wel een huidje van serologisch type gelijk aan dat van de ingespoten dode cellen. Deze „transformatie” kon later ook in vitro worden teweeggebracht, en voor andere eigenschappen; ook bij andere bacteriën en misschien bij enkele andere organismen. Ook hier weer de vraag: is transformatie als recombinatie of als mutatie te beschouwen? Er zijn verschillende aanwijzingen in de richting van recombinatie, maar daar kan hier niet verder op ingegaan worden. — In 1944 gelukte het aan AVERY, McCLEOD en MACCARTHY het transformatie teweeg brengende agens zuiver te isoleren en vast te stellen dat het desoxyribonucleïnezuur is.

Van 1945 tot 1955 vindt dan, ingeleid door het vaststellen van de rol van nucleïnezuur bij de bacteriën-transformatie en gesteund door velerlei verdere waarnemingen, een belangwekkende ontwikkeling of omzwaai plaats, hierop neerkomend, dat de primaire of meest wezenlijke genetische structuur van de chromosomen niet meer in eiwit gezien wordt, maar in desoxyribonucleïnezuur.

Van de aangeduide verdere waarnemingen ten gunste van D.N.A. (= desoxyribonucleic acid) als drager van de genetische informatie noem ik nog enkele resultaten van het virusonderzoek der laatste

jaren. HERSHEY en CHASE (1952) merkten bij een bacteriophage de D.N.A. „kern” met P³², of de eiwit „mantel” met S³⁵, waarna bacteriën met de gemerkte deeltjes werden besmet. Het resultaat van zeer subtiele bepalingen was, dat (nagenoeg) uitsluitend D.N.A. in de bacteriën binnendringt, en dat de nakomelingen-virusdeeltjes wel gemerkt D.N.A. bezitten, maar geen gemerkt eiwit. — GIERER en SCHRAMM (1956) en FRAENKEL-CONRAT c.s. (1957) wisten bij het tabaksmozaiekvirus (ribo)nucleïnezuur en eiwit van elkaar te scheiden, en aan te tonen, dat het nucleïnezuur kan besmetten maar het eiwit niet.

Van de zeer vele onderzoeken omtrent de chemische samenstelling van kern of chromosomen moet ik in dit verband thans één vermelden. Bekend was reeds lang dat nucleïnezuur, i.h.b. D.N.A., bestaat uit een lange keten van nucleotiden. Ieder nucleotide bevat fosforzuur, een pentosemolecuul en een heterocyclische stikstofhoudende groep. In de aparte nucleotiden is deze stikstofbase in het algemeen één van de vier volgende: één der purinen adenine of guanine, of één der pyrimidinen thymine of cytosine. Tot omstreeks 1950 werd algemeen aangenomen, dat de lange polynucleotideketens opgebouwd waren uit tetranucleotiden, alle met een adenine-, een guanine-, een thymine- en een cytosinegroep. Een dergelijke opbouw gaf geen of weinig mogelijkheden tot specificiteit. — Een nadere analyse van het nucleïnezuur uit de kern van verschillende soorten maakte het voor CHARGAFF (1949, 1951) duidelijk, dat de tetranucleotidehypothese niet juist is, maar dat er een andere regelmaat valt te ontdekken. Onder voorzichtig voorbehoud gaf hij als resultaat van zijn analyses, dat er steeds evenveel groepen van de purine adenine aanwezig zijn als van de pyrimidine thymine, en ook evenveel groepen van de purine guanine als van de pyrimidine cytosine. Dit betekent, dat bij alle soorten steeds evenveel purinegroepen als pyrimidinegroepen zijn; de verhouding echter van adenine plus thymine tot guanine plus cytosine is van soort tot soort verschillend, en daarmee soort-specifiek.

Het jaar 1953 brengt dan de bekende hypothese van WATSON en CRICK omtrent de structuur van het desoxyribonucleïnezuur, een hypothese die steunt op velerlei chemische en fysisch-chemische gegevens. Het model vertoont een spiraalsgewijze bouw, en wel, o.a. op grond van de dichtheid waarop het röntgendiagram wijst, van twee molecuulspiraalen (helices) om een gemeenschappelijke as. De „ruggegraad” van elk der spiralen bestaat uit de naar buiten gekeerde afwisselende pentose en fosfaatgroepen, verenigd tot regelmatige 3', 5'-fosfaatdiester verbinding. De twee spiralen worden samengehouden door waterstofbruggen tussen de rechthoekig op de lengteas van de beide spiralen naar binnen gerichte stikstofbasen. Daarbij past, op grond van stereochemische overwegingen, adenine van de ene spiraal slechts op thymine van de andere, en guanine op

cytosine, geheel in overeenstemming met de door Chargaff gevonden kwantitatieve verhoudingen.

Dit model schept een zeer bruikbare grondslag voor alle hiervoor genoemde wezenlijke chromosoom- en geneigenschappen:

- a. *Constantheid en autoduplicatie*: door vaneenvallen der beide spiralen, waarna elk als schabloon dient en zijn aanvullend „spiegelbeeld” vormt.
- b. *specificiteit en functie*: de volgorde binnen telkens bv. een drietal nucleotiden zou „code” kunnen zijn voor telkens één van de (ruim) twintig in eiwit voorkomende aminozuren.
- c. *recombinatie*: tussen iedere twee nucleotiden in, of misschien tussen nucleotidengroepen in, daarover is nog weinig bekend.
- d. *mutatie*: iedere verandering in de nucleotidenparen serie, nl.:
 1. substitutie van één of meer paren;
 2. verandering volgorde twee of meer paren;
 3. duplicatie van één of meer paren;
 4. deficiency van één of meer paren.

Het Watson-Crick model blijkt zo een vruchtbare werkhypothese voor het benaderen van een oplossing voor verschillende problemen. Het model schept echter ook weer nieuwe problemen, die hier onbesproken moeten blijven. Ik wil mijn overzicht gaarne eindigen met te laten zien, hoe het mutatieonderzoek der allerlaatste jaren bij dit model aansluit of aansluiting erbij tracht te vinden.

BENZER (1957) heeft bij de bacteriophage T_4 zeer grondig de locus ofwel het „cistron” r II bestudeerd. De term cistron is van Benzer zelf afkomstig, en ziet op het gen of de locus als een functionele eenheid, weer op grond van de „complementariteitsproef”, als besproken bij *Drosophila* tussen twee genen binnen een diploide kern, en bij *Aspergillus* tussen twee kerntypen binnen een heterokaryon. Twee mutante typen virusdeeltjes die binnen één bacterieel worden samengebracht, vullen elkaar niet tot normale werking aan, wanneer beider mutatie op hetzelfde cistron betrekking heeft. Maar recombinatie tot normaal kan wél optreden, d.w.z. dat ook hier binnen het cistron meerdere punten van mutatie mogelijk zijn. Benzer heeft zo honderden afzonderlijk ontstane rII mutanten twee aan twee bijeengebracht en op hun vermogen om door recombinatie normale virusdeeltjes te vormen onderzocht. Het bleek, dat zijn mutanten op enkele tientallen verschillende punten van mutatie binnen het cistron rII liggen. De het dichtst bijeenliggende punten vertoonden een recombinatiepercentage van ongeveer 0,02%. Het virusdeeltje bezit ongeveer 80.000 nucleotidenparen. Door middel van een berekening (met enkele onzekere aannamen erin weliswaar) weet Benzer aannemelijk te maken, dat het recombinatiepercentage 0,02 overeenkomt met een afstand van slechts zeer enkele nucleoti-

denparen! Hiermee gaat de genetische analyse de elementaire bestanddelen van de informatiebevattende nucleïnezuurketen dus benaderen. Het rII cistron zou enkele honderden punten van mutatie bevatten.

Benadering van deze elementaire bestanddelen geschiedt, juist bij de rII locus van de T4 bacteriophage, ook door middel van behandeling met bepaalde „chemische mutagenen”. Ik noem hier de namen BRENNER (1958) en FREESE (1959). Men dwingt daarbij de phage om inplaats van de vier normale stikstofbasen (adenine en guanine; thymine en cytosine) uit de bacteriecel drie normale basen op te nemen, maar inplaats van de vierde een nauw verwante stof of analogon, bv. 5-bromouracil inplaats van thymine. Het gemakkelijkst wordt dit bereikt door voor het kweken van de bacteriophage een mutante thymine-eisende bacterie te gebruiken en die onder bijvoeging van 5-bromouracil te kweken; evenzo voor elk der andere stikstofbasen.

Als gevolg van deze vervanging treden mutaties in het rII cistron op, en wel op genetisch verschillende punten binnen het cistron, al naar mate een analogon van adenine, guanine, thymine of cytosine is gebruikt.

Freese meent reeds te mogen aannemen, dat een analogon, om mutagen werkzaam te zijn, het vermogen moet bezitten om met *beide* purinen resp. met *beide* pyrimidinen waterstofbruggen te vormen in plaats van met slechts één. Het incorporeren van het analogon op zich zelf zou niet een mutatie betekenen, maar slechts het middel ertoe zijn, daar het door zijn tweërlei paringsmogelijkheid er toe leidt, dat een adenine-thymine paar door een guanine-cytosine paar vervangen wordt, of omgekeerd.

Zo heeft het genetisch, chemisch en chemogenetisch onderzoek tenslotte dus tot de kleinste eenheden van de informatiegevende structuren een weg gebaad, eenheden met een grootste afmeting van bijna één $m\mu$, één miljoenste millimeter, op een onderlinge afstand van ruim 0,3 $m\mu$.

Om te groot optimisme te voorkomen, moge ik hier echter een uitspraak aanhalen van Lovell, de directeur van het bekende radioobservatorium Jodrell Bank, Engeland, in zijn in 1958 verschenen boek „The Individual and the Universe”. Hij herinnert er aan dat we in het Universum te maken hebben met afstanden van miljoenen en miljoenen lichtjaren en meent, dat het wel heel vermetel zou zijn aan te nemen, dat een opvatting omtrent de kosmos die juist in onze tijd ontwikkeld is, de definitieve oplossing zou zijn. Hij komt dan tot de uitspraak, „dat de beslissende experimenten vrijwel steeds onze horizon verruimen over gebieden die nieuwe twijfel en onzekerheid opleveren.”

Het moge bedacht worden dat deze uitspraak niet alleen van toe-

passing is op het oneindig grote Universum en het ontstaan ervan, maar evenzeer op de bijna oneindig kleine informatiedragende structuren van het leven en het ontstaan van het leven.

Mijne Dames en Heren, in dit in vogelvlucht gegeven en dikwijls geschematiseerde historische overzicht omtrent mutatieproblemen heb ik U met veel tegenstellingen, onzekerheden en veranderende opvattingen kennis laten maken:

genentheorie — positieëffecthypothese;
 chiasmatypie — „copy choice”;
 genen een eenheid — genen veel uitwisselbare delen;
 eiwit — nucleïnezuur;
 mutatie — recombinatie; enz.

Ik meen U echter tevens te hebben getoond, hoe het mutatiebegin van zestig jaar geleden is uitgegroeid en ontwikkeld tot de *mutatiegenetica* van heden:

Tandem fit surculus arbor.

Ik heb gezegd.