

- duction to denture simplification. *J Prosthet Dent* 26: 570.
25. *Robinson, S. G.* (1969): Physiological placement of artificial anterior teeth. *J Can Dent Assoc* 35: 260.
26. *Silverman, M. M.* (1952): Vertical dimension must not be increased. *J Prosthet Dent* 2: 188.
27. *Silverman, M. M.* (1956): Determination of vertical dimension by phonetics. *J Prosthet Dent* 6: 465.
28. *Silverman, M. M., Gillings, B. R. D.* (1974): Jaw movements; letters to the editor. *J Prosthet Dent* 31: 103.
29. *Subtelny, J. D. e.a.* (1974): Comparative study of normal and defective articulation of s as related to malocclusion and deglutition. *J Speech Hear Dis* 29: 269.
30. *Tanaka, H.* (1973): Speech patterns of edentulous patients and morphology of the palate in relation to phonetics. *J Prosthet Dent* 29: 16.
31. *Tench, R. W.* (1927): The influence of speech habits on the design of full artificial dentures. *J Am Dent Assoc* 14: 644.
32. *Vig, P. S.* (1973): The production of dental fricatives and the development of speech. *J Int Assoc Dent Chil* 4: 31.
33. *Weir, F. S.* (1932): Relating tooth positions in full dentures to the oral vestibule to obtain accuracy of speech, esthetics and anatomic function. *J Am Dent Assoc* 19:

- 1706.
34. *Victorin, L., Agnello, J. G.* (1970): Speech pattern changes during edentulous and denture conditions, I. Palatographic study. *Acta Odontol Scand* 28: 729.
35. *Victorin, L., Agnello, J. G.* (1972): A study of phonetic changes in edentulous patients following complete denture treatment. *J Prosthet Dent* 27: 133.
36. *Ylppö, A., Sovijärvi, A.* (1962): Sonagraphic and palatographic studies of full denture, half denture, and edentulous cases. *Acta Odontol Scand* 20: 257

September 1976.

De Boelelaan 1115,
Amsterdam.

GENETIC ENGINEERING (II)

DE INBOUW VAN DIERLIJKE GENEN IN BACTERIËN

A. RÖRSCH

Trefwoorden: Genetica

Inleiding

In een voorgaand artikel^{*)} werd een overzicht gegeven van de onconventionele methoden die thans in de moleculaire en somatische cel-genetica worden gebruikt. Daarbij werd aandacht besteed aan de overdracht van genetische informatie tussen bacteriën onderling met behulp van DNA dat uit een bepaalde bacterie-mutant wordt geïsoleerd en aan een andere mutant wordt gevoed (bacterie-transformatie). Tevens werd besproken de mogelijkheid de genetische constitutie van cellen van hogere organismen te veranderen door de toevoeging van geïsoleerd DNA, een mogelijkheid die niet erg groot werd geacht.

De overdracht van genen van hogere organismen naar bacteriën kwam daarbij nog niet ter sprake, omdat de recente vorderingen die op dit terrein zijn gemaakt een behandeling in een



Tigerlillia Terribilis

Uit het laboratorium voor Moleculaire Genetica van de rijksuniversiteit te Leiden.

afzonderlijk artikel rechtvaardigen. We zullen hier tevens de mogelijke praktische toepassingen van de inbouw van dierlijke (waaronder menselijke) genen in bacteriën bespreken, terwijl de gevaren die daaraan kunnen zijn verbonden in een volgend artikel onder ogen zullen worden gezien.

Recombinatie op moleculair niveau

Voor een goed begrip is het noodzakelijk, dat we allereerst enige aandacht besteden aan de structuur van DNA en aan het verloop van het recombinatie-proces op moleculair niveau^{*)}.

Het DNA, zoals we het uit bacteriën en dierlijke cellen kunnen isoleren, is een bijzonder lang molecuul; het kan een lengte van bijna een millimeter

hebben. Het bestaat uit twee desoxyribosefosfaat-ketens die als spiralen om elkaar zijn gewonden. Aan iedere desoxyribose-eenheid is tevens één van de purine- of pyrimidine-derivaten adenine, guanine, thymine of cytosine gebonden. Dit zijn de zogenaamde nucleïnezuur-basen, of kortweg basen genoemd, omdat deze verbindingen zich in oplossing als basische stoffen gedragen. DNA zelf gedraagt zich echter als een (poly) zuur vanwege fosfaatgroepen die in de zogenaamde dubbelspiraal aan de buitenkant zitten. De basen die aan elk der strengen vastzitten steken naar het midden van de dubbelspiraal, waarbij de basen uit de ene streng zwakke, zogenaamde waterstofbindingen onderhouden met die uit de andere spiraal. Deze bindingen houden in feite de twee om elkaar gewonden spiralen op hun plaats. Daarbij staat tegenover een adenine (A) in de ene keten steeds een thymine (T) in de andere keten en tegenover een guanine (G) in de ene keten een cytosine (C) in de andere keten. De base-volgorde in de ene keten bepaalt dus volledig de base-volgorde in de andere, en omgekeerd. Men zegt: de twee strengen zijn complementair aan elkaar. De volgorde van de basen in DNA is tevens bepalend voor de aminozuur-volgorde in de eiwitten, die onder regie van het DNA in de cel worden aangemaakt. De genetische code die aan de door DNA gedragen genetische informatie ten grondslag ligt, is dus niets anders dan de volgorde van de genoemde basen in het DNA. Recombinatie,

^{*)} Ook zonder dit begrip kan men wel enig inzicht in de draagwijdte van de experimenten krijgen. De lezer die elke moleculair-biologische achtergrond mist en de draad in de volgende paragrafen verliest, kan deze bij de paragraaf 'de betekenis van recombinant-DNA' weer oppakken.

waarbij homologe chromosomen gedeelten uitwisselen, is op moleculair niveau terug te voeren tot een uitwisseling van poly-desoxyribosefosfaatstrengen met de daaraan bevestigde basen, tussen twee DNA-moleculen. In het recombinatie-proces kunnen we twee fasen onderscheiden:

1. eerst vindt paring van de twee DNA-moleculen plaats, waarbij de base-volgorde van deze moleculen met elkaar in register worden gebracht;

2. vervolgens treden breuken op waarna het linker deel van het eerste molecuul wordt gekoppeld aan het rechter deel van het tweede molecuul en het rechter deel van het eerste molecuul aan het linker deel van het tweede molecuul.

Hoewel we thans tal van bacteriële enzymen kennen die bij het recombinatie-proces zijn betrokken, zijn nog lang niet alle details van het verloop ervan bekend. Ook over de wijze waarop de paring van de twee DNA-moleculen tot stand wordt gebracht moeten we nog speculeren. Waarschijnlijk wordt daarbij elk der dubbelspiralen van de twee moleculen gedeeltelijk ontbonden.

Voor ons betoog is vooral van belang te weten dat voor het uitwisselen van brokstukken DNA, op de plaats waar het breken en de hereniging plaatsvinden (de cross-over), de base-volgorde van de recombinerende moleculen over een groot gebied identiek of vrijwel identiek moeten zijn (namelijk om de paring tot stand te kunnen brengen). Het gevolg hiervan is dat *in vivo* uitsluitend homologe chromosomen en homologe DNA-moleculen met elkaar kunnen recombineren. Wanneer het gelukt het DNA van een bepaalde soort te brengen in cellen van een andere soort, dan lukt het niet zonder meer het binnengebrachte DNA met het reeds aanwezige DNA te doen recombineren.

De replicatie van DNA

Het DNA-molecuul zoals wij het in een bacterie of in de chromosomen van hogere organismen aantreffen, is zelf-replicierend. Bij de replicatie gaan de twee om elkaar gewonden

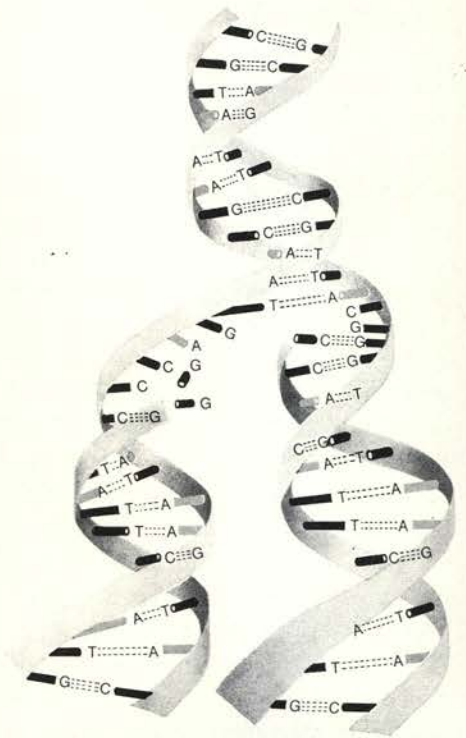
strengen uiteen, en op elk van deze strengen als matrijs wordt door enzymen (DNA polymerases) een complementaire streng gebreed.

Niet elk willekeurig brokstuk DNA kan zichzelf in een cel repliceren. De DNA-replicatie is aan een nauwkeurige controle onderworpen. Een bacterie bevat één heel groot DNA-molecuul, dat zich als eenheid kan repliceren. Zo'n eenheid noemt men een replicon. Wordt nu een brokstuk DNA van de ene bacterie-mutant (het is heel moeilijk het grote DNA-molecuul geheel ongebroken uit de bacterie te isoleren) aan de andere bacterie-mutant gevoed, dan kan dit brokstuk zich niet automatisch repliceren. Indien de genetische informatie die het bevat, voor het nageslacht van de bacterie die het DNA heeft opgenomen, in stand moet blijven, dan dient het recombinatie met het reeds aanwezige replicon te ondergaan: het moet, zoals men zegt, in het genoom van de ontvangende bacterie worden ingebouwd. Dit is de reden waarom transformeerbare bacteriën, die dus wel in staat zijn alle soorten DNA uit hun omringende medium op te nemen, toch de genetische informatie in het DNA uit andere soorten niet overnemen.

Plasmiden

Naast het grote DNA-molecuul dat bacteriën bevat komen echter in het cytoplasma toch wel andere kleinere DNA-moleculen voor, die zich onafhankelijk van het grote molecuul kunnen vermenigvuldigen en die dus op zichzelf een replicon zijn. Men noemt deze plasmiden of episomen. Uit medisch oogpunt zijn de kleine replicons die in bacteriën de resistentie tegen een aantal antibiotica bepalen vooral van groot belang. Men noemt deze resistentie-factoren of R-factoren.

Vele van deze R-factoren hebben de onaangename eigenschap, dat ze van de ene bacterie op de andere kunnen worden overgedragen en zelfs van de ene bacterie-soort op de andere. Daarvoor is het nodig dat deze twee bacteriën die een R-factor uitwisselen met hun celwanden en membranen contact met elkaar maken.



Afb. 1. De DNA-duplicatie zoals deze volgens de gangbare opvatting plaatsvindt. De twee ketens van een dubbelspiraal maken zich van elkaar los. Op de vrijgekomen strengen hechten zich passende nucleotiden. Onder invloed van een enzym-systeem vormen zich nieuwe ketens.

Er wordt daarbij tussen deze cellen een brug gevormd (conjugatie-brug), waardoor de R-factor kan passeren. Op deze wijze kunnen R-factoren van *E. coli* op *Salmonella*-, *Pseudomonas*- en *Staphylococcus*-soorten worden overgedragen.

Naast de R-factoren bestaan er tal van plasmiden die onschuldig zijn; we laten ze daarom hier buiten beschouwing. Wel moeten we nog opmerken, dat we een virus-DNA dat een replicon is in feite ook als een plasmide kunnen opvatten.

Sommige bacteriële virussen dragen een DNA-molecuul dat met het bacterie-DNA een recombinatie kan ondergaan. De vermenigvuldiging van het virus-DNA komt dan onder de controle van het replicatie-mechanisme van dat bacteriële DNA en een infectie leidt in dit geval niet tot een lytisch effect. Wel kan het virus-DNA zich in een later stadium weer vrijmaken van het bacteriële DNA en dan alsnog zelfstandig gaan repliceren en tot lysis van de gastheer aanleiding geven. Een voorbeeld van een dergelijk (zo-

genaamd lysogeen virus) is de bacteriofaag lambda van *E.coli*.

De incorporatie van een lysogeen virus in het genoom van een bacterie staat nog steeds model voor de werking van oncogene virussen op dierlijke cellen. Men is inderdaad in staat geweest in het DNA van *in vitro* gekweekte cellen base-volgorden aan te tonen die overeenkomen met die van bepaalde oncogene virussen. We moeten ernstig rekening houden met de mogelijkheid, dat ook in het DNA van normale cellen base-volgorden voorkomen die overeenkomen met die van tumorvirussen. We moeten er, met andere woorden, op rekenen dat tumorvirus-DNA in een latente vorm in dierlijke cellen steeds aanwezig is. Het komt dan echter niet tot expressie, evenmin als grote andere delen van het genoom van een gedifferentieerde dierlijke cel.

Wanneer een dierlijke cel *in vitro* met een oncogeen virus wordt geïnfecteerd en zich daarna als een tumorcel manifesteert, dan noemt men dit proces celtransformatie. Deze celtransformatie vertoont wel enige gelijkenis met de eerder genoemde bacterietransformatie, maar is toch van geheel andere aard.

Overdracht van soort-vreemd DNA

Wanneer aan een bacteriecel een soort-vreemd DNA wordt aangeboden en deze het in zijn cytoplasma opneemt, dan is dit DNA geen lang leven beschoren: enzymen (nucleasen) breken het soort-vreemde DNA betrekkelijk snel af tot kleinere brokstukken.

Dit is ongetwijfeld een van de redenen waarom bacteriën in discrete soorten kunnen worden ingedeeld en er niet voortdurend nieuwe soorten ontstaan (althans niet met een hoge frequentie). Waarom nu breken de nucleasen van een bacterie-cel wel soort-vreemd DNA af, doch niet voortdurend hun eigen DNA? De re-

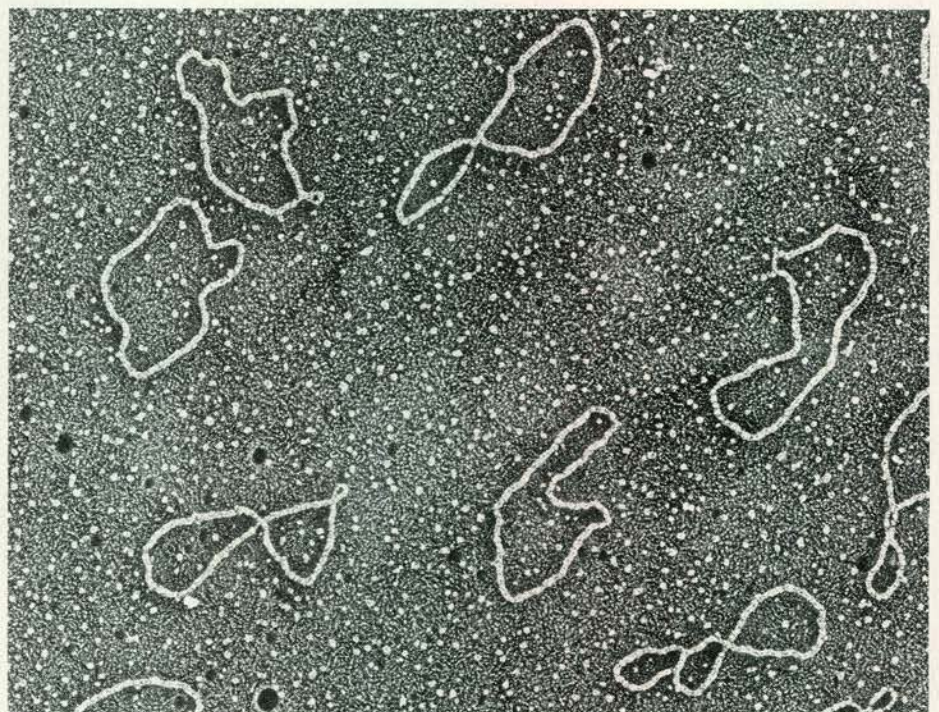
den is, dat het DNA van alle soorten structureel verschillend is. Niet alleen is de base-volgorde in het DNA van elk soort verschillend, doch naast de gewone basen thymine, adenine, guanine en cytosine komen er in elk DNA afwijkende, zogenaamde zeldzame basen voor. Deze basen zijn methyl-derivaten van de standaardbasen. Wanneer de replicatie van een bacterie-DNA is voltooid, waarbij uitsluitend de standaardbasen in het genoom worden opgenomen, wordt daarna een beperkt aantal basen door enzymen (methyl-transferasen), volgens een voor elk soort specifiek patroon, van een extra methylgroep voorzien.

De enzymen die een soort-vreemd DNA in een bacteriecel afbreken noemt men restrictie-enzymen. Deze enzymen herkennen een zeer specifieke base-volgorde (van circa 3-10 basen) in het vreemde DNA en geven ter plaatse knippen in elk der beide DNA-strengen. In het DNA van de eigen soort zijn een tweetal basen van die specifieke base-volgorde van extra methylgroepen voorzien, waardoor het restrictie-enzym zijn werking niet kan uitvoeren: het specifieke methyleringspatroon van het eigen DNA beschermt dus dit DNA tegen aanvallen van de restrictie-enzymen van de eigen soort. Het

optreden van deze restrictie van soort-vreemd DNA belemmert ook de overdracht van de eerder genoemde R-factoren, doch maakt deze niet geheel onmogelijk omdat een soort-vreemde R-factor die een bacterie binnenkomt, vóórdat hij wordt afgebroken, met een zekere efficiëntie, voorzien kan worden van het voor de gastheer specifieke methyleringspatroon.

Opmerkelijk is, dat bepaalde R-factoren zelf ook voor specifieke restrictie- en methylerings-enzymen kunnen coderen. Deze kunnen het DNA van de receptor-bacterie breken en op deze wijze hun gastheer om zeep helpen. Aangezien zij echter ook de specifieke methylerings-enzymen produceren, kan het DNA van een gastheer wat betreft het methyleringspatroon zich aan de wensen van de soort-vreemde plasmiden, die de bacterie draagt, aanpassen.

De incorporatie van een brokstuk soort-vreemd DNA in het genoom van een bacterie wordt dus door twee factoren belemmerd: (1) verschillen in base-volgorden tussen het binnenkomende DNA en het aanwezige DNA belemmeren de paring van de moleculen en daarmee de recombinatie; (2) door verschillen in methyleringspatroon is het soort-vreemde DNA gevoelig voor de restrictie-en-



Afb. 2. Elektronenmicroscopische foto van SV40 (virus) DNA

(Foto Dr. A. J. van der Eb. Overgenomen uit *Natuur en Techniek*, 1973.)

zymen van de ontvangende bacteriecel. Wanneer het soort-vreemde DNA om de een of andere reden wel zou kunnen paren met het residente DNA – en dus kunnen recombineren – dan hoeft de restrictie geen ernstige belemmering meer te zijn voor de incorporatie van het soort-vreemde DNA in het genoom, omdat het brokstuk het specifieke methyleringspatroon van de ontvangende bacterie kan aannemen. Ook zelf-replicerende DNA-moleculen (R-factoren, virussen) maken om dezelfde reden een goede kans zich in een soort-vreemde gastheer te vermenigvuldigen.

Recombinatie in vitro

Kunnen we *in vivo* dus twee soort-vreemde DNA-moleculen niet aaneengesmeed krijgen, *in vitro* lukt dit thans wel, dank zij ons toegenomen enzymatisch manipulatievermogen van DNA. We zullen dit beschrijven aan de hand van het experiment (waarvan een variant het eerst door Jackson et al. werd beschreven in 1972), waarbij het DNA van het dierlijke tumorvirus SV40 gekoppeld wordt aan het DNA van de bacteriofaag lambda. We maken daarbij gebruik van een merkwaardig restrictie-enzym van het *E. coli* plasmide RII. Dit enzym herkent in ieder willekeurig DNA-molecuul de base-volgorde

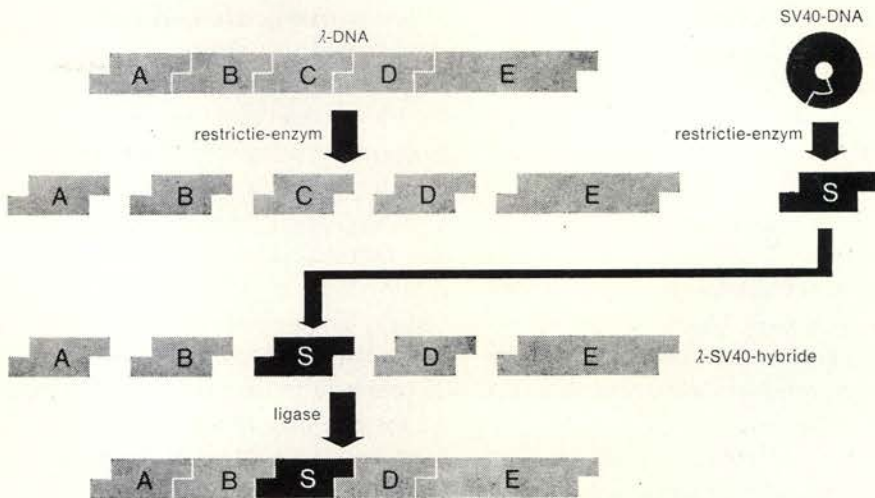
C-C-A-G-G
G-G-T-C-C

Het geeft daarbij een breuk (althans wanneer de cytosines aan weerszijde van het A-T-paar geen extra methylgroep dragen) vóór de meest linkse C in de ene streng en na de meest rechtse C in de andere streng. Er ontstaan twee brokstukken (waarbij we de base-volgorde in de rest van het DNA-molecuul even vereenvoudigen tot

X
Y

waarin X en Y ieder willekeurig base-paar kan zijn):

X-X-X-X
Y-Y-Y-Y-G-G-T-C-C



Afb. 3. Vervanging van een gedeelte van het lambda-genoom (brokstuk C) door het SV40-genoom (brokstuk S).

Een restrictie-enzym maakt meerdere breuken in het lambda-DNA en één in het circulaire SV40-DNA. De brokstukken worden met een koppelingsenzym (polynucleotide-ligase) weer aaneengesmeed.

Overgenomen uit *Natuur en Techniek*, 1973.

en

C-C-A-G-G-X-X-X-X-X-X
Y-Y-Y-Y-Y-Y-Y

Laten we nu op een ander soort-vreemd DNA hetzelfde restrictie-enzym los, waarin ongetwijfeld wel een keertje de base-volgorde

C-C-A-G-G
G-G-T-C-C

voorkomt, dan krijgen we daarvan de brokstukken (rest van molecuul nu weergegeven met P-Q base-paren):

P-P-P-P-P-P
Q-Q-Q-Q-Q-G-G-T-C-C

en

C-C-A-G-G-P-P-P-P-P-P
Q-Q-Q-Q-Q

Mengen we nu de brokstukken van beide DNA-moleculen, in aanwezigheid van het enzym dat breuken in DNA kan herstellen (polynucleotide-ligase) dan ontstaan de configuraties:

X-X-X-X-X-C-C-A-G-G-P-P-P-P-P-P
Y-Y-Y-Y-Y-G-G-T-C-C-Q-Q-Q-Q-Q-Q

en

P-P-P-P-P-C-C-A-G-G-X-X-X-X-X-X
Q-Q-Q-Q-Q-G-G-T-C-C-Y-Y-Y-Y-Y-Y

waarmede de cross-over tussen de twee DNA-moleculen een feit is. Op deze wijze kan het SV 40-DNA aan het Lambda-DNA worden bevestigd. Het oorspronkelijke lambda-DNA is voor zijn gastheer *E. coli* geen onbekend replicon, kan door transformatie worden opgenomen en zelfs in het bacterie-genoom worden geïncorporeerd. De SV 40/lambda-combinatie kan dit eveneens en door onze *in vitro*-manipulatie kan aldus het DNA van een dierlijk virus in een bacterie worden gebracht en aldaar de status van resident DNA verwerven.

De betekenis van recombinant-DNA
Deze koppeling van soort-vreemde DNA-moleculen, gevolgd door inbouw in bacteriën is méér dan een moleculair biologisch stuntje; het is uit experimenteel oogpunt van zeer grote betekenis. Tijdens de recent gehouden internationale conferentie (februari 1975) in Pacific Grove in de V.S. werd door een aantal Nobelprijswinnaars in de geneeskunde en scheikunde deze fabricage van recombinant-DNA-moleculen een gereedschap genoemd dat de grootste doorbraak in dit decennium (en wellicht zelfs van deze eeuw) in de biologie zou bewerkstelligen. Om de betekenis hiervan op de juiste waarde te schatten is een historische toelichting noodzakelijk.

In de periode 1945-1970 zijn enorme vorderingen gemaakt met het beschrijven van essentiële levensprocessen op moleculair niveau. De aandacht van de fysici en chemici die bij deze ontwikkelingen waren betrokken, was vooral geconcentreerd op bacteriën en hun virussen en eencellige eukaryoten zoals bepaalde schimmels en gisten. Onze huidige kennis van de genetica is voor het overgrote deel ontleend aan experimenten met micro-organismen.

Wat voor de genetica geldt gaat op voor vele andere biologische processen, met vooral de nadruk op alles dat met stofwisseling heeft te maken. De bij micro-organismen ontrafelde processen, zoals DNA- en eiwit-synthese, zijn thans uitermate belangrijk als model (werkhypothese) bij het overeenkomstig onderzoek aan cellen van hogere organismen.

Het is niet toevallig, dat een verschuiving van de aandacht van grote groepen onderzoekers omstreeks 1970 voor bacteriën als proefobject naar cellen van hogere organismen, samenvalt met een toenemend streven naar het stimuleren van zogenaamd 'maatschappelijk relevant' onderzoek. Gedurende de laatste vijf jaren hebben zeer vele moleculair-biologen, met name in de V.S., de micro-organismen gelaten voor wat zij zijn en zich op de bestudering van de dierlijke cel geworpen. Het is duidelijk dat voor het verwerven van inzicht in bijvoorbeeld de oncogenese bij mens en dier, we niet kunnen volstaan met het bestuderen van de regeling van de stofwisseling bij bacteriën, schimmels en gisten en het onderzoek van de levenscyclus van bacteriofagen

Dat juist nu de synthese van macromoleculen bij hogere dieren en dierlijke virussen zoveel aandacht trekt, is dus niet verwonderlijk. Dat de ervaring opgedaan met microbiële systemen daarbij van groot nut is, behoeft geen betoog. De werkelijke waarde ervan blijkt nog wel eens minder te zijn dan men enige jaren geleden verwachtte. Menige moleculair-bioloog die van bacteriën op dierlijke

cellen is overgeschakeld heeft grote teleurstellingen moeten verwerken. Zijn door ambitie gekenmerkt ongeduld is daaraan niet vreemd. De voor moleculair-biologisch onderzoek favoriete bacteriën zoals *E. coli* en *B. subtilis* groeien nu eenmaal véél sneller dan dierlijke en plantaardige cellen.

De teleurstelling over te hoog gespannen verwachtingen ten aanzien van de 'eenheid in de natuur' gaat echter dieper dan dat. In de jaren '50 werd door Jacob en Monod een fraai en beroemd model voor de regeling van de expressie van genetische informatie bij bacteriën gepostuleerd, dat tot op de dag van vandaag met nieuwe experimentele gegevens nog steeds verder wordt verfijnd (R. Beckwith en D. Zipser, 1970). Voor het overeenkomstig onderzoek naar de regeling van de stofwisseling bij dierlijke en plantaardige cellen heeft dit model echter nog steeds weinig aanknopingspunten opgeleverd. Dit doet ook de sterkst aan bacteriën verknochte moleculair-bioloog twijfelen aan het belang voor het onderzoek op hoger biologisch niveau.

Men moet echter ook de vraag stellen of wij bij het volgen van de modieuze trend niet ineens te veel willen. Zijn de kennelijk veel ingewikkelder dierlijke en plantaardige systemen eigenlijk al wel rijp voor een moleculair-biologische benadering? Zijn we niet een beetje te vlug van bacteriën op dierlijke cellen aan het overschakelen?

Het dilemma waarvoor de hedendaagse onderzoeker zich ziet gesteld: (1) doorgaan met de nog steeds gemakkelijk succes opleverende bacteriën, of (2) de aandacht richten op de meer voor de humane biologie relevante eukaryotische cellen, wordt nu plotseling in belangrijke mate doorbroken door de mogelijkheid recombinant-DNA van gedeeltelijk eukaryotische en gedeeltelijk prokaryotische oorsprong te maken. Immers, de bestudering van de expressie van DNA in dierlijke en plantaardige cellen kan nu ook ter hand worden genomen door een portie van dat DNA te koppelen aan een bacterieel

DNA en over te brengen naar de structureel eenvoudiger bacteriën, waarover reeds zeer grote kennis is verkregen.

Moleculair kloneren

In deze gedachtengang is essentieel, dat een portie van eukaryotisch DNA wordt afgezonderd. De schaalvergroting van de experimentele problemen bij overstappen van bacteriën naar dierlijke cellen wordt voor een belangrijk deel veroorzaakt door de veel grotere genetische informatie-inhoud van laatstgenoemde in vergelijking tot eerstgenoemde. Deze bedraagt een factor 1.000 tot 10.000. Bovendien biedt de constructie van recombinant-DNA waarbij één van de partners een bacterieel virus is, de mogelijkheid het daaraan gekoppelde stukje eukaryotisch DNA nogmaals per cel enige honderden malen extra te vermenigvuldigen. Ook andere plasmiden dan bacterie-virussen bieden deze mogelijkheid, doch hierop zullen we thans niet nader ingaan.

Dit afzonderen en vermenigvuldigen van een brokstuk DNA noemt men thans *moleculair kloneren* en het is in tal van laboratoria reeds een routine-techniek geworden.

De genetische expressie van dierlijk DNA in bacteriën

Als de machinerie voor het tot expressie brengen van genetische informatie in bacteriën en dierlijke cellen zo verschillend is, dringt zich de vraag op of een gekloneerd brokstuk eukaryotisch DNA ooit wel tot expressie kan komen in een bacterie. Op grond van de recente resultaten moeten we concluderen dat dit inderdaad niet zonder meer gebeurt, althans niet op een correcte wijze (Boyer, 1975, mededeling tijdens conferentie in Pacific Grove). Genen voor de productie van histonen van de pad (*Xenopus*) werden in *E. coli* gekloneerd, waarna wel een histon-achtig (basisch) eiwit werd geproduceerd doch niet met de correcte samenstelling.

Het zal duidelijk zijn, dat het onderzoek naar de expressie van dierlijk DNA in bacteriën op zichzelf een

boeiend en belangrijk onderzoek is. Uit het vergelijkend onderzoek van nucleïnezuur en eiwit-synthese bij bacteriën en eukaryotische cellen is gebleken dat deze naast overeenkomst ook belangrijke verschillen vertonen. De overdracht van een gedeelte van de genetische informatie voor deze syntheses van eukaryotische cellen naar bacteriën zal dus als eerste op het programma staan van hen die zich met de expressie van eukaryotisch DNA in bacteriën bezighouden.

Praktische toepassingen

In principe kan men thans overwegen natuurprodukten die tot op heden uit dierlijke of plantaardige cellen worden gewonnen ook uit bacteriën te gaan winnen door de genetische informatie voor deze produkten naar bacteriën over te brengen. Als voorbeeld wordt hiervoor algemeen de produktie van menselijke insuline genoemd. Met het oog op de in de vorige paragraaf genoemde experimentele moeilijkheden, lijkt dit op het eerste gezicht toch niet mogelijk. Men bedenke daarbij echter, dat het manipulatievermogen van de bacterie-geneticus reeds zeer sterk ontwikkeld is. Het chromosoom van *E. coli* is in het recente verleden dankzij allerhande trucs in aanzienlijke mate door elkaar gehutseld, waarbij regulator-genen voor één bepaalde functie werden gekoppeld aan die van een andere functie. Het is op dit moment beslist denkbaar dat een nucleotidensequentie voor de produktie van bijvoorbeeld insuline, gekoppeld gaat worden aan een regulator-gen, bijvoorbeeld voor de synthese van het lactose-splitsende enzym. Kweek van bacteriën op lactose als koolstofbron zal dan de cellen tot synthese van insuline aanzetten.

De praktische toepassingen die men

kan bedenken zijn legio, doch eerlijkheidshalve moet nog op een volgende experimentele moeilijkheid bij het kloneren van een brokstuk DNA worden gewezen. Het aantal gen-functies in cellen van dierlijke of menselijke oorsprong is van de orde van grootte van 10^5 tot 10^6 . Het afzonderen van één zo'n gen-functie te midden van alle andere is dus geen eenvoudige zaak en vergt de ontwikkeling van selectietechnieken. Toch schuwt de bacterie-geneticus niet de benadering waarbij niet wordt geselecteerd doch net zo lang wordt gezocht tot de gewenste gen-functie is gevonden, hetgeen ook de benadering was die bij bovengenoemd experiment van Boyer werd gevolgd bij de klonering van histon-genen.

Men laat dan op het volledige DNA van de eukaryoot een restrictie-enzym los, dat dit opsplijt in 1.000 tot 10.000 brokstukken. Deze worden met koppelingsenzymen geïncubeerd met een stuk prokaryotisch DNA dat als vector (ook wel vehicle genoemd) dienst moet doen, bijvoorbeeld een bacterie-virus. Er ontstaat dan een grote verscheidenheid aan recombinant-DNA-moleculen, zo'n 10.000 verschillende vectors, waaraan allemaal verschillende brokstukken eukaryotisch DNA zijn gekoppeld. Na infectie hiermede van transformeerbare bacteriën, moet men dan 10.000 verschillende klonen onderzoeken op het vóórkomen van het gezochte brokstuk DNA. Een dergelijk experiment noemt men in het Engels een 'shot gun experiment': een hagelshot produceert allerhand brokstukken eukaryotisch DNA en elk 'neer' gehaald brokstukje moet vervolgens worden onderzocht op zijn gewenste eigenschappen.

Vooruitzichten

In een volgend artikel zullen nog

enige voorbeelden worden gegeven van de toepassing van moleculaire klonering aan de hand van de veiligheidsmaatregelen die voor het uitvoeren van deze experimenten moeten worden getroffen.

Hoe snel deze nieuwe experimentele benaderingswijze werkelijk tot volle bloei kan worden gebracht, zal vooral afhangen van de snelheid waarmee die veiligheidsvoorschriften landelijk, of liever in Europees en wereldverband, worden opgesteld. Dat deze experimenten niet van gevaar ontbloeit zijn zal ieder duidelijk zijn, vooral wanneer gewerkt gaat worden met viraal DNA van eukaryotische oorsprong. Wanneer een bacterie die dergelijk DNA met zich draagt uit het laboratorium zou ontsnappen, dan is dat virale DNA buitengewoon moeilijk meer aan te tonen en de gevolgen van de verspreiding van viraal DNA langs deze weg zijn voorsnog niet te overzien (A. Rörsch et al., 1973). Grote voorzichtigheid is dus geboden. Hoe belangrijk dit onderzoek, juist naar de expressie van genetische informatie van virussen met veronderstelde oncogene eigenschappen, ook moge zijn, de moleculair-biologen leggen de grootst mogelijke aarzeling aan de dag om juist dit virale DNA te kloneren (Berg et al., 1974).

Literatuur:

1. Beckwith, J. R., Zipser, D. (1970): The lactose operon. ColdSpring Harbor Laboratory.
2. Berg, P., Baltimore, D., Boyer, H. W., Cohen, S. N., Davis, R. W., Hogness, D. S., Nathans, D., Roblin, R., Watson, J. D., Weissman, S., Zinder, N. D. (Committee on recombinant DNA molecules, NAS) (1974): Zie (editorial) 'NAS ban on plasmid engineering'. Nature 250: 175.
3. Jackson, D. A., Seymonds, R. H., Berg, P. (1972): Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of SV40. Proc Nat Acad Sci USA 69: 2904.
4. Rörsch, A., Pouwels, P. H., Van de Putte, P. (1973): De inbouw van tumor-virussen in bacteriën. Natuur en Techniek 41: 3.

(wordt vervolgd)

Boekbesprekingen

P. Fuchs: *Die Quintessenz des Brücken-zahnersatzes*. 172 pag. Verlag 'Die Quintessenz', Berlijn 1976. Prijs f 40,—.

In de eerste drie hoofdstukken komen de

materiaalkunde en de gnathologie zeer summier aan de orde. Vervolgens worden alle mogelijke vormen van kronen als brugpijler opgesomd in het vierde hoofdstuk. Hiervan is bijna de helft gewijd aan implantaten als brugpijler. Ook geeft de auteur hierin blijk een grote voorkeur te

hebben voor telescoopconstructies, veelal uitgevoerd in combinatie met precisiesloten. Het vijfde hoofdstuk behandelt de verschillende vormen van brugwerk. Na ternauwernood één bladzijde aan vast brugwerk te hebben besteed, stort de schrijver zich uitvoerig in het uitneemba-