

VRIJE UNIVERSITEIT TE AMSTERDAM

Dr. L. BOSCH (1962).

**Op zoek naar de Steen van
Rosette in de Genetica**

Biochemische Ontcijferingen van de Genetische Code

**Referaat voor de vierenveertigste Wetenschappelijke Samenkomst
op woensdag 4 juli 1962**

G. F. HUMMELEN'S BOEKHANDEL EN ELECTRISCHE DRUKKERIJ N.V. - ASSEN

BIBLIOTHEEK UNIVERSITEIT UTRECHT



De Steen van Rosette.

De geschiedenis van de steen van Rosette is bekend. In juli van het jaar 1799 vond een soldaat uit het napoleontische leger in de nabijheid van de stad Rosette aan de Nijl een stuk zwart bazalt ter grootte van een normaal tafelblad en met een dikte van ongeveer 30 cm. De betekenis van deze vondst werd door één der aanwezige officieren ingezien, toen bleek dat in de steen drie soorten schrift waren gegrift. Bij later en meer nauwkeurig onderzoek herkende men behalve 14 regels hiërogllyphen, 32 regels van het z.g. demotische schrift, - een schrijfschrift dat zich uit het schrift der hiërogllyphen heeft ontwikkeld -, en voorts 54 regels van een in het Grieks gestelde tekst. De veronderstelling lag voor de hand, dat de drie verschillende teksten dezelfde inhoud zouden bezitten. Het Grieks bleek een document uit 196 v. Chr. te zijn, waarin de priesters van Memphis hulde brengen aan koning Ptolemaeus V. Weldra identificeerde men de namen van Ptolemaeus, Cleopatra en Berenice in de demotische tekst, om ten slotte ook in de z.g. cartouches, de ovaal ingeraamde hiërogllyphengroepen, bovengenoemde namen te herkennen.

De steen van Rosette bleek de sleutel te bevatten voor de ontcijfering van het geheimzinnige schrift der oude Egyptenaren, hetgeen door Champollion in zijn „Précis de système hiéroglyphique des anciens Egyptiens” op overtuigende wijze is aangetoond.

De rijke verscheidenheid waarin de levende natuur zich aan ons openbaart doet vermoeden dat elk organisme zich ontwikkelt en ontplooit overeenkomstig een schoon en boeiend programma, dat het reeds vanaf het meest prille begin in zich bergt. Het zaadje in de grond wordt tot een wonderboom, waarover wij ons met Jona niet alleen verheugen vanwege zijn schaduw, maar waarover wij ons verbazen. Welke boodschap schuilt er in de eerste eicel, waaruit hetzij Cleopatra, hetzij Champollion te voorschijn komt?

Wij zijn vertrouwd met de voorstellingen van de genetica en schrijven al deze informatie toe aan de erfsubstantie, waarover de levende cel beschikt. In deze substantie liggen de potenties van het groeiende organisme verankerd, doch men vraagt zich terecht af, hoe deze rijkdom van mogelijkheden op zo compacte wijze is vastgelegd. Het inzicht heeft zich in de loop der laatste jaren baan gebroken, dat de erfsubstantie zich in dezen van een code-systeem bedient en dat in de erfelijkheidsfactoren een raadselachtig geheimschrift is gegrift, dat wij niet vermogen te ontcijferen, aangezien de sleutel ons daartoe ontbreekt. Vele theoretische bespiegelingen zijn aan deze sleutel, welke de natuur ons tot nu toe angstvallig verborgen hield gewijd, en de verwachting was gewettigd, dat de ontcijfering uitgebreide experimenten en moeizame onderzoekingen zou vergen. Geheel tot ieders verassing is er enkele maanden geleden echter, experimenteel gezien,

een keer gekomen, waarvan de betekenis te vergelijken valt met de vondst te Rosette. Het laat zich aanzien dat de decodering van de genetische code nu nog slechts een kwestie van tijd (één of twee jaar) is, en dat ons inzicht in de „blauwdrukken” van het leven zoals het Algemeen Handelsblad van 17 februari 1962 zich uitdrukte, in de naaste toekomst bijzonder zal worden verdiept.

Men kan zich natuurlijk afvragen of een dergelijke enigszins romantische aanduiding van de probleemstelling geen anachronistische instelling verraadt, beter passend in de tijd van Gregor Johann Mendel, die in 1865 voor het eerst de regels formuleerde, volgens welke de overerving van bepaalde kenmerken zich voltrekt. Men dient zich echter te realiseren, dat ondanks de toenemende kennis aangaande de aard en de structuur van de erfelijkheidsfactoren van 1865 af, het *mechanisme* van de overerving in wezen onbekend is gebleven (1). De erfelijkheidsfactoren of genen konden in feite alleen worden geïdentificeerd door individuen of organismen op grond van bepaalde eigenschappen met elkaar te vergelijken. Een herkenbaar verschil in typering (de vorm, een chemische verbinding of een proces, resp. enzymatische activiteit), dat zich opnieuw openbaarde in latere generaties overeenkomstig bepaalde regels, werd in verband gebracht met een verschil in de genen. De moeilijkheden in de begripsvorming, die hiermede samenhangen zijn b.v. door Pontecorvo nog in 1952 uiteengezet (2). De belangstelling voor het probleem werd uiteraard bijzonder geprikkeld toen men na herontdekking van de wetten van Mendel door botanici als Corren, Tschermak en onze landgenoot Hugo de Vries in 1901 inzag, dat de dragers van de erfelijkheid ge-localiseerd waren in de chromosomen, onderdelen van de celkern welke thans zowel in vorm als in aantal duidelijk zijn te herkennen. Nog boeiender werd het vraagstuk, toen bleek dat een bestanddeel van de chromosomen, het z.g. desoxyribonucleïnezuur (DNA) verantwoordelijk kon worden gesteld voor de overdracht van alle eigenschappen van moeder- op dochtercel. Gedurende de laatste 10 jaar is achtereenvolgens de chemische opbouw en de moleculaire vorm van het DNA opgehelderd (3-5). Het bleek een hoogpolymere verbinding met een molecuulgewicht, dat volgens de allerlaatste metingen niet minder dan 120 miljoen bedraagt (6). Dit polymeer is opgebouwd uit een viertal verschillende monomeren, elk met een molecuulgewicht van ongeveer 300, en aan dit polymeer schrijven wij het vermogen toe zich bij de celdeling te dupliceren, zodat de dochtercel weer is uitgerust met het vermogen, om bepaalde chemische processen uit te voeren op een wijze, die volkomen identiek is aan die der moedercel. Deze ontwikkeling van het abstracte begrip gen tot een hoogpolymere chemische verbinding heeft in wezen de nog even reële en uitdagende vraag onbeantwoord gelaten, hoe in een der-

gelijke verbinding de geheimen schuil gaan van de kleur der ogen, de artistieke vermogens zowel als de aangeboren kwalen en gebreken.

Eén gen, één enzym

Ten aanzien van de laatstgenoemde, z.g. phenotypische eigenschappen, waardoor de verschillen in de genen (het z.g. genotype) zich manifesteren heeft de biochemie veel bijgedragen tot een afgrenzing van de problemen, door een betere analyse van het phenotype (7). Aan de hand van het volgende voorbeeld kan dit nader worden toegelicht (2).

Patiënten lijdende aan de erfelijke ziekte phenylketonurie vertonen een groot aantal morfologische, psychologische en andere sprekende kenmerken, waardoor het ziektebeeld duidelijk te herkennen valt. Het bloed bevat phenylalanine in abnormaal hoge concentraties, terwijl de urine de geur van bittere amandelen verspreidt. Op grond van zulk een grote verscheidenheid aan abnormale eigenschappen is men geneigd aan meerdere veranderingen in de erfsubstantie te denken. Biochemische onderzoeken hebben echter geleerd, dat de enzymatische omzetting van phenylalanine in tyrosine gestoord is en het gevolg van deze inefficiënte omzetting is een ophoping van phenylalanine in het bloed. Dit aminozuur wordt als pyrodruivenzuur in de urine uitgescheiden, waar het tenslotte aan de lucht tot benzaldehyd wordt geoxydeerd, hetgeen de karakteristieke geur verklaart. Hoe de andere genoemde eigenschappen met de inefficiënte omzetting van phenylalanine in tyrosine in verband moeten worden gebracht, is nog niet opgehelderd doch het staat wel vast, dat we hier met een aangeboren fout in de stofwisseling te maken hebben, waarbij slechts één enzym is betrokken.

Dit éne voorbeeld, dat echter met vele andere is uit te breiden, vestigt onze aandacht op een relatie, die bekendheid heeft verkregen als de *één gen, één enzym-relatie* *). Zij brengt dus tot uitdrukking, dat voor de synthese van een enzym of een polypeptide in het organisme, de aanwezigheid van een DNA-fragment (gen of cistron *) vereist is. Veranderingen in het DNA (mutaties) corresponderen met veranderingen in de samenstelling en structuur van het proteïne, waardoor de specifieke functie van het eiwit geheel of gedeeltelijk kan uitvallen, terwijl ten gevolge van bepaalde mutaties de synthese van het betrokken eiwit geheel onmogelijk wordt (7).

De boven geschetste problematiek is aldus teruggebracht tot een relatie tussen twee chemisch vrij goed gedefinieerde hoogmoleculaire verbindingstypen en een beter begrip van deze relatie vereist aller-

*) De huidige genetica spreekt van één cistron, één enzym relatie. Het onderscheid is voor ons betoog niet van essentieel belang (vergelijk S. Benzer in (4)).

eerst een duidelijk beeld van structuur en eigenschappen van beide polymeren.

Chemische structuur, eigenschappen en de biosynthese der proteïnen

De eiwitten bezitten de meest gecompliceerde structuur van alle polymeren die in het levend organisme voorkomen. Dit wordt plausibel wanneer men let op de veelomvattende functionele eisen, welke aan hen worden gesteld. Het stereospecifieke oppervlak speelt een belangrijke rol bij de enzymen, terwijl het organisme ook voor structurele doeleinden van proteïnen gebruik maakt.

De eiwitten zijn opgebouwd uit een twintigtal verschillende aminozuren, die via peptide-bindingen op lineaire wijze aan elkaar zijn gebonden. Van verschillende proteïnen is deze rangschikking (de z.g. primaire structuur) thans volkomen bekend. Met een enkele uitzondering (zoals bij het zijde-eiwit) is de polypeptideketen niet gestrekt, maar vertoont een z.g. secundaire structuur, waarbij met name de spiraalstructuur (α -helix) op de voorgrond treedt. Deze spiraal treft men zowel in vezelachtige als ook in globulaire proteïnen aan. Laatstgenoemde verschijningsvorm (vezel- resp. bolvorm) noemt men de tertiaire structuur en het ligt op het arbeidsterrein van de eiwit-kristallographen om deze tertiaire structuren tot klaarheid te brengen (8).

Tenslotte kan men nog quaternaire structuren onderscheiden wanneer de proteïnen zijn opgebouwd uit een aantal sub-eenheden.

Er is aanleiding om te veronderstellen (en in sommige gevallen bestaat hiervoor ook experimentele steun) dat de secundaire en tertiaire structuur en vanzelfsprekend ook de quaternaire het rechtstreekse gevolg zijn van de primaire structuur. Dit betekent, dat de volgorde der twintig verschillende aminozuren waarschijnlijk de uitwendige vorm van het eiwitmolecuul bepaalt. Geheel hiermee in overeenstemming is er een vrij strikte relatie tussen de aminozuur-volgorde in het proteïne en haar biologische activiteit. In sommige gevallen is deze samenhang zelfs zo subtiel dat structuur en functie door de vervanging van slechts één aminozuur fundamenteel wordt gewijzigd en ernstige ziektebeelden er het gevolg van zijn (9).

De gecompliceerde opbouw der proteïnen roept automatisch het probleem op, hoe deze hoogmoleculaire verbindingen, zowel binnen één generatie als van generatie op generatie steeds maar weer zonder „fouten” worden gereproduceerd. Men heeft in dit verband het begrip informatie (9) ingevoerd en bedoelt daarmee de volgorde waarin de 20 verschillende bouwstenen in het eiwit-molecuul zijn gerangschikt. Deze informatie bepaalt volgens het bovenstaande structuur en functie der proteïnen en het probleem der biologische synthese der eiwitten is samengevat in de vraag hoe deze informatie in deze moleculen wordt vastgelegd.

Chemische structuur, eigenschappen en biosynthese van DNA

De desoxyribonucleïne-zuren zijn, zoals reeds eerder werd vermeld,

opgebouwd uit een viertal verschillende mononucleotiden. Laatstgenoemden onderscheiden zich door de vier verschillende basen: adenine en guanine (purine-basen) en cytosine en thymine (pyrimidine-basen). In het voorgaande is het begrip informatie in verband met de eiwitstructuur gedefinieerd als de volgorde waarin de verschillende aminozuren tot een polypeptide zijn gecondenseerd. Deze informatie ontleent het proteïne volgens de huidige inzichten aan het DNA en het ligt dus voor de hand om het begrip informatie uit te breiden tot de volgorde waarin de vier verschillende mononucleotiden in het DNA zijn gerangschikt.

Thans kan het probleem, dat ons in dit referaat bezig houdt, exact worden gesteld n.l.: *Hoe vindt de informatie-overdracht van DNA naar proteïne plaats.* Hoe wordt de genetische code, opgesloten in de volgorde van de vier nucleotide-elementen vertaald in de taal der proteïnen, een taal die zich bedient van twintig elementen. Teneinde een antwoord te vinden op deze vraag, moeten wij ons nog iets meer verdiepen in de bouw van het DNA (10).

Röntgen-diffractiemetingen hebben aangetoond dat het DNA, zoals het wordt aangetroffen in de chromosomen van somatische cellen, micro-organismen en de meeste tot nu toe bekende bacteriophagen, bestaat uit twee polynucleotide-ketens, die spiraalvormig om elkaar geslingerd, via waterstofbruggen tussen de basen aan elkaar zijn gebonden. De basen vormen base-paren, waarbij bepaalde restricties door stereochemische factoren worden beheerst. Dit betekent dat paarvorming slechts voorkomt tussen adenine en thymine enerzijds en tussen guanine en cytosine anderzijds. Dit impliceert voorts dat het adenine-gehalte in het DNA gelijk moet zijn aan dat van het thymine, terwijl guanine in dezelfde mate moet voorkomen als het cytosine, hetgeen door chemische analyse is bevestigd. Het gevolg is, dat de twee samenstellende polynucleotide-spiralen complementair zijn wat hun informatie betreft. Op grond hiervan hebben Watson en Crick in 1953 (11) een zeer fraaie interpretatie gegeven van de informatie-overdracht van moeder- op dochtercel. Eén van de primaire eisen, waaraan het DNA in zijn rol van erfsubstantie moet voldoen, is de potentie om zichzelf op identieke wijze te dupliceren, zodat de dochtercel over dezelfde informatie zal beschikken als de moedercel. Watson en Crick veronderstelden dat de beide complementaire spiralen vóór de celdeling uit elkaar gaan, waarna elke partner als matrix fungeert voor de synthese van een nieuwe complementaire partner uit de voorhanden zijnde mononucleotiden. Het resultaat is twee nieuwe duplexen, volkomen identiek aan het oorspronkelijke duplex-DNA. Deze briljante interpretatie heeft grote steun gekregen uit talrijke biochemische experimenten, waarop wij in dit verband niet nader kunnen ingaan. De kroon op het werk werd tenslotte gezet door Arthur Kornberg c.s. (12), die een enzym isoleerden uit *Escherichia coli* waarmee *in vitro* de synthese van DNA uit mononucleotiden kon

worden gerealiseerd. De synthese voltrekt zich slechts dan, wanneer aan het enzym-systeem tevens intact DNA (de z.g. „primer”) wordt toegevoegd. Deze „primer” bepaalt de samenstelling van het te synthetiseren polymeer, hetgeen dus een bijzonder fraaie bevestiging geeft van de juistheid van het concept van Watson en Crick.

Speculaties over de DNA-code

De voorstelling van Watson en Crick vormde, zoals uiteraard te verwachten viel, spoedig aanleiding tot speculaties aangaande de genetische code. Hoewel men zich geen duidelijke voorstelling kon vormen over de informatie-overdracht zelf, was het zeer aannemelijk geworden dat de code is opgebouwd uit vier en niet meer dan vier elementen (de vier verschillende nucleotiden) wier rangschikking die van de twintig verschillende aminozuren in het proteïne dicteert. Deze vier elementen kan men eenvoudigweg voorstellen door de letter A, B, C en D. Aangezien minstens twintig aminozuren te verantwoorden zijn, zal elk aminozuur moeten corresponderen met meer dan één van de vier letters. Rangschikt men de letters in groepjes van twee, dan zijn 16 combinaties en permutaties mogelijk, terwijl een rangschikking in groepjes van drie (triplets) $4 \times 4 \times 4 = 64$ mogelijkheden op levert. In 1954 deed de bekende physicus Gamow een voorstel aangaande een codering, gebaseerd op groeperingen van drie verschillende letters (13). Een dergelijke triplet-code bevat echter een surplus aan informatie (64 mogelijkheden tegenover 20 aminozuren), zodat hij suggereerde dat de code „ontaard” moest zijn, d.w.z. dat meer dan één triplet correspondeert met één enkel aminozuur. Bovendien nam Gamow een overlappende code aan (14). Wat hiermee wordt bedoeld, moge blijken uit het volgende. Stel dat de informatie in een DNA-fragment als volgt is samengesteld:

C A B B C D C A B A D C

dan kan men drie verschillende manieren van codering onderscheiden:

Een overlappende code: C A B
 A B B
 B B C
 B C D etc.

Een gedeeltelijk overlappende code: C A B
 B B C
 C D C
 C A B etc.

Een niet overlappende code: C A B
 B C D
 C A B
 A D C

Bij een overlappende code zal elk willekeurig dipeptide, bestaande uit slechts twee aminozuren, gecodeerd worden door een opeenvolging van vier letters. Theoretisch zijn er dan echter slechts $4^4 = 256$ rangschikkingen en dus peptiden mogelijk. Wanneer de volgorde van de aminozuren in de natuurlijk voorkomende proteïnen echter aan geen beperkingen onderhevig zijn, dan bedraagt het maximum aantal dipeptiden dat men uit twintig verschillende aminozuren kan samenstellen $20^2 = 400$.

Gedurende de laatste jaren is de aminozuurvolgorde van verschillende zuivere proteïnen opgehelderd en er zijn tot nu toe geen aanwijzingen gevonden dat bepaalde aminozuur-volgordes „verboden” zouden zijn, waardoor een overlappende code dus niet zo waarschijnlijk blijkt te zijn. Reeds in 1957 kon Brenner (15) op grond van de toen bekende gegevens aantonen, dat overlappende triplets niet voldoen aan de eisen van de natuurlijk voorkomende aminozuur-volgordes. Dit argument*), dat dus ontleend is aan experimentele resultaten kan nog met recente gegevens uit de virologie worden aangevuld.

Duitse (16) en Amerikaanse (17) onderzoekers brachten langs chemische weg veranderingen aan in de erfsubstantie van het tabaks-mozaïek-virus en onderzochten vervolgens de aminozuur-samenstelling van de eiwitomhulling van de aldus gemuteerde viren. De chemische procedure bestond hierin, dat men met behulp van salpeterigzuur de NH_2 -groepen van de purine- resp. pyrimidine-basen in OH -groepen omzette, waardoor b.v. cytosine in uracil verandert en de code dus een wijziging ondergaat. In een overlappende code zal een verandering in één base effect moeten hebben voor drie aangrenzende aminozuren in het eiwit. Dit bleek echter niet zo te zijn. Gewoonlijk werd niet meer dan één aminozuur door een andere vervangen, wanneer één base door salpeterigzuur was veranderd. Soortgelijke overwegingen zijn ook te ontlenen aan onderzoeken (18) betreffende de z.g. abnormale haemoglobinen, voorkomende bij erfelijke ziekten.

Op grond van bovengenoemde onderzoeken zal ook een gedeeltelijk overlappende code minder waarschijnlijk moeten worden ge-

*) De argumentatie is als volgt: aangezien opeenvolgende triplets twee letters gemeenschappelijk hebben, kan elk triplet slechts worden vooraf gegaan door 4 verschillende triplets en ook slechts gevolgd worden door 4. In een aminozuurvolgorde j.k.l. noemen we j een N-buur en l een C-buur van k. Voor alle N-buren (of C-buren) of een deel ervan, moet k een triplet bezitten dat daaraan beantwoordt. Wanneer nu het aantal in de natuur voorkomende burenen voor elk aminozuur wordt opgeschreven, kan men hieruit het minimum aantal nodige triplets voor elk aminozuur berekenen, Brenner komt aldus tot 70 triplets, vereist voor de codering van alle volgordes, terwijl uit 4 letters slechts 64 triplets kunnen worden samengesteld.

acht, zodat in feite slechts een niet-overlappende code als de meest reële mogelijkheid overblijft. In dit laatste geval is er echter nog steeds de moeilijkheid, hoe de code moet worden gelezen, hetgeen duidelijk als volgt kan worden geïllustreerd:

Leest men de code:

C A B, B C D, C A B, A D C,

of

C, A B B, C D C, A B A, D C

van links naar rechts, dan is het probleem dus waar de komma's moeten worden geplaatst *). Een code zonder komma's is voorgesteld door Crick c.s. (19), gebaseerd op de aanname dat bepaalde triplets zinvol zijn, andere daarentegen zinloos. Wanneer we de posities van de vier verschillende letters in de boven aangegeven code nummeren als volgt:

	zinvol	zinvol	zinvol								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		zinloos		zinloos		zinloos		zinloos			
		zinloos		zinloos		zinloos		zinloos			

dan kan de code slechts op één manier correct worden gelezen, terwijl alle aminozuur-volgordes in principe mogelijk zijn. Het mathematisch probleem om het maximum aantal aminozuren te vinden, dat aldus kan worden gecodeerd, is door Crick c.s. opgelost (19). Het bleek nooit groter dan twintig te zijn, terwijl voor twintig aminozuren een groot aantal oplossingen te geven is. Eén van deze oplossingen is b.v.:

		A	A	A	A	A	A
A	B			C	B	B	D
		B	B	C	C		D

waarbij A B A betekent dat de beide tripletten A B A en A B B

zinvol zijn („make sense”) terwijl tripletten als B A C, A C D en D B B zinloos zijn („make nonsense”). Crick besluit één van zijn publicaties (9) met een opmerking die de aard van deze zeer elegante

*) Dit probleem doet zich niet voor, wanneer de code vanaf een vast beginpunt wordt gelezen. Op deze mogelijkheid wordt nog nader teruggekomen (pag. 17).

en boeiende beschouwingen in het juiste licht stelt: „I must confess that I find it impossible to form any considered judgement of this idea. It may be complete nonsense or it may be the heart of the matter. Only time will show”.

„Time begins to show”

Het zoeken naar de sleutel tot de genetische code vertoonde vele jaren een opmerkelijke gelijkenis met het even vruchteloos speuren naar een speld in de hooiberg. Experimentele toetsing van de vele mogelijkheden stuitte vooreerst nog op te grote moeilijkheden, terwijl een decodering op grond van een uitsluitingsprincipe niet toepasbaar bleek, daar in de onderzochte proteïnen geen „verboden” aminozuur-volgordes konden worden aangetoond.

Even belangrijk als de genetische code zelf echter was de vraag, hoe in de levende cel de informatie van de code wordt overgedragen. Zoals reeds eerder is opgemerkt geeft het concept van Watson en Crick aangaande de duplex-structuur van het DNA een plausible verklaring voor de informatieoverdracht van het DNA van de moedercel naar dat van de dochtercel. Deze overdracht geschiedt n.l. via een duplicerings-mechanisme, waarbij de dochtermoleculen identiek zijn aan die van de moedercel. Veel gecompliceerder en tegelijk veel intrigerender is het vraagstuk hoe de synthese van een polypeptide tot stand komt onder de regie van de erfsubstantie.

In de normale somatische cel vindt een intensieve eiwit-synthese plaats in het cytoplasma, d.w.z. buiten de kern, zodat dit proces dus topographisch gescheiden is van de chromosomen (3). Dat het DNA slechts indirect bij de eiwit-synthese betrokken is blijkt ook uit het feit, dat eencellige organismen, die door een experimentele ingreep van hun celkern zijn ontdaan, nog enige tijd proteïnen blijven synthetiseren (20).

In dezelfde periode, waarin de bovengenoemde opvattingen aangaande overerving op moleculair niveau vorm, inhoud en experimentele steun begonnen te krijgen, werden nieuwe methoden ontwikkeld, om het proces der eiwitbiosynthese in onderdelen van de levende cel te bestuderen. Zo bleken bepaalde deeltjes uit het cytoplasma, rijk aan ribonucleïnezuur (RNA) een intensieve eiwit-synthese te vertonen. Deze ribonucleïnezuren, die in tegenstelling tot het DNA ribose bevatten, onderscheiden zich van het laatstgenoemde polymeer nog door het feit, dat zij in plaats van thymine uracil bevatten. Een waarschijnlijk nog belangrijker verschil is, dat het RNA doorgaans aan ribonucleïnezuur (RNA) een intensieve eiwit-synthese te vertoont zoals het DNA. Alle gegevens wijzen erop, dat het RNA als een intermediaire drager van informatie dient en het probleem van de informatieoverdracht valt dus uiteen in twee fasen:

- a) Informatie-overdracht van het DNA naar het RNA
- b) Informatie-overdracht van het RNA naar het eiwit *).

Ten aanzien van proces *b*, de informatie-overdracht van RNA naar eiwit, zijn gedurende de laatste tien jaren belangrijke vorderingen gemaakt (20). Een mijlpaal werd bereikt, toen men er voor het eerst in slaagde de incorporatie van radioactieve aminozuren *in vitro* te vervolgen. Voor dit proces waren allereerst subcellulaire deeltjes, met een hoog gehalte aan RNA benodigd. Verwijdering van het RNA door middel van het enzym ribonuclease resulteerde in een volledige remming der aminozuur-incorporatie. Behalve dit RNA uit de subcellulaire deeltjes (ribosomen) bleek er nog een ander soort RNA nodig te zijn. Dit laatste RNA, ook wel oplosbaar of s-RNA (soluble RNA) genoemd, heeft een betrekkelijk laag molecuulgewicht (± 25000) en het werd spoedig duidelijk dat het een zeer specifieke functie vervult n.l. het transport van elk aminozuur naar zijn eigen karakteristieke plaats op de matrijs. Het is nu wel praktisch zeker, dat er voor elk aminozuur een specifiek s-RNA-molecuul bestaat, begiftigd met de informatie nodig voor dit aminozuur om zijn plaats op de ribosomale matrijs te herkennen. De synthese van een polypeptide wordt aldus voorafgegaan door een assemblage van de verschillende aminozuren in de karakteristieke volgorde, doordat elke s-RNA-transporteur een interactie via waterstofbruggen met het matrijs-RNA aangaat, en elke transporteur dus een complementair gedeelte op deze matrijs herkent. De complementariteit bestaat wederom hierin (zie boven bij de duplicering van het DNA) dat adenine alleen reageert met uracil, en guanine alleen met cytosine. Deze gedachtegang houdt dus in, dat de informatie opgesloten in de volgorde van de mononucleotiden van het matrijs-RNA der ribosomen de specificiteit der proteïnen dicteert, terwijl het s-RNA informatie moet bevatten voor slechts één aminozuur (22).

Omtrent de details van de hoogst gecompliceerde interactie tussen s-RNA en de ribosomen is men nog slechts zeer spaarzaam geïnformeerd. Zeer interessante vorderingen zijn echter gemaakt bij de fractionering van het s-RNA en in sommige gevallen is het gelukt

*) De structurele verwantschap tussen RNA en DNA doet vermoeden dat het eerste proces gelijkenis zal vertonen met het replicatiemechanisme van de erfsubstantie zelf, zoals deze zich vóór de celdeling voltrekt. In geval *b* echter resulteert de overdracht in de vastlegging van informatie in een geheel ander patroon n.l. in de rangschikking van twintig totaal andere bouwstenen, de aminozuren. De informatie krijgt aldus een veel rijkere uitdrukkingvorm en men heeft dit proces wel aangeduid als een transcriptie, in tegenstelling dus tot de replicatie waar de informatie in dezelfde vorm wordt doorgegeven. In de strikte zin van het woord is proces *a* dus ook als transcriptie op te vatten, terwijl replicatie alleen bij de synthese van DNA optreedt (21).

een polynucleotide-fractie te isoleren, die slechts één aminozuur kan transporteren (23). Dergelijke zuiveringen van een specifieke transporteur maken het voor het eerst mogelijk, om de nucleotide-volgorde van een dergelijk polynucleotide te bestuderen teneinde aldus de aminozuur-codering op te helderen. De grote afmetingen van de aminozuur-transporteurs vormen echter een ernstige belemmering van een dergelijk onderzoek. Een molecuulgewicht van 25000 komt overeen met 80-100 mononucleotiden en het is ondenkbaar dat het gehele molecuul voor de informatieoverdracht nodig is, nog afgezien van de vraag of de volgorde van zoveel mononucleotiden met enige nauwkeurigheid te bepalen is. Indien, zoals in het voorgaande is besproken, slechts een triplet van mononucleotiden nodig is om één aminozuur te verantwoorden, dan wordt het wel uitermate gecompliceerd om na te gaan welke nucleotiden van het totale polynucleotide bij de informatie zijn betrokken. Het is echter mogelijk dat de bestudering van de nucleotide-volgorde, welke thans binnen de experimentele mogelijkheden begint te komen, ons toch wel iets zou kunnen leren omtrent de code, aangezien het niet uitgesloten is, dat bepaalde polynucleotidefragmenten voor elk s-RNA-molecuul identiek zijn. Een dergelijke experimentele benadering van het coderingsprobleem zal echter zeer moeizaam zijn en men kan dan ook van een verrassende wending spreken, toen op het Vde Internationale Biochemische Congres te Moskou in augustus 1961 door een jonge Amerikaanse onderzoeker mededeling werd gedaan van onderzoekingen, welke geheel nieuwe mogelijkheden bieden en op grond waarvan men in één tot twee jaar de genetische code verwacht te hebben ontcijferd.

Boodschapper-RNA

De electronenmicroscop en de ultracentrifuge hebben onze kennis van de ultrastructuur van het cytoplasma bijzonder verrijkt. Kleine ribonucleoproteïne-deeltjes, de z.g. ribosomen zijn aldus in de cel aangetroffen, gekenmerkt door een actieve eiwit-synthese. Het lag voor de hand te veronderstellen dat de informatie voor de synthese van specifieke proteïnen is opgesloten in het RNA van de ribosomen, en dat er evenveel ribosoom-soorten zouden zijn, als er specifieke eiwitten door de cel worden gemaakt. Hoewel men geruime tijd aan deze opvatting heeft vastgehouden, heeft men deze thans weer verlaten.

Experimenten met bacteriophagen, waarbij tijdens het infectieproces vreemd DNA afkomstig van de phaag de gastheercel binnendringt (24), en dus een nieuwe erfsubstantie wordt geïntroduceerd, leerden dat kort na deze penetratie een nieuw soort RNA wordt gesynthetiseerd (25, 26).

Dit RNA bezit een hoge metabolische activiteit en een basesamenstelling, die correspondeert met die van het phaag-DNA (27). Het ontving de naam: boodschapper-RNA, daar men op grond van genetische experimenten het bestaan reeds had gepostuleerd van zulk een

boodschapper die zijn informatie ontleent aan het DNA en deze overdraagt aan de ribosomen, waar de uiteindelijke polypeptide-synthese plaats vindt.

Deze hypothese, die velen aanvankelijk gewaagd voorkwam, heeft opmerkelijke steun van het experiment gekregen, zodat zij thans als de meest reële interpretatie van de informatieoverdracht DNA - proteïne kan worden beschouwd. Zo werd n.l. terzelfder tijd een enzym geïsoleerd, dat *in vitro* RNA synthetiseert uit mononucleotiden mits tevens DNA wordt toegevoegd (28). Dit DNA dicteert de nucleotide-volgorde van het gesynthetiseerde RNA, zoals door biochemisch-analytische experimenten kon worden aangetoond. In het levende organisme (deze onderzoeken zijn uitgevoerd met bacteriën) associeert de boodschapper zich kort na zijn synthese met de ribosomen, geheel in overeenstemming met de functie die men eraan had toegedacht (25).

De vraag rees daarna uiteraard of men *in vitro* informatie aan de ribosomen zou kunnen opdringen; met andere woorden of men door toevoeging van boodschapper-RNA aan een systeem, bestaande uit ribosomen en enzymen, verder uitgerust met transporteur-RNA beladen met de nodige aminozuren en tenslotte voorzien van de nodige cofactoren, de synthese van een polypeptide zou kunnen induceren, waarvan de aminozuursamenstelling de nucleotide-volgorde van de boodschapper zou weerspiegelen. Deze vraag werd op ongedachte wijze bevestigend beantwoord op het laatste Internationale Biochemische Congres te Moskou door Nirenberg en medewerkers (29). Zij maakten gebruik van een polynucleotide dat als enige base uracil bevat. Dit z.g. polyuridylylzuur of poly-U, als boodschapper toegevoegd aan het bovengenoemde ribosomale systeem, stimuleerde de incorporatie van slechts één aminozuur, het phenylalanine in sterke mate. Geen van alle andere aminozuren vertoonde deze stimulering door poly-U. Uitgaande van ¹⁴C-phenylalanine kregen Nirenberg c.s. een radioactief polymeer, dat in zijn eigenschappen beantwoordde aan die van poly-phenylalanine. Blijkbaar bevatte de toegevoegde boodschapper een „zinnvolle” code (zie pag. 10), die in het poly-U dus vele malen uniform wordt herhaald en dus ook aanleiding geeft tot de vorming van een uniform opgebouwd polypeptide: het poly-phenylalanine.

Het is duidelijk dat dit klassieke experiment een geheel nieuwe en ongedachte mogelijkheid ontsloot om het probleem van de genetische code te benaderen. Immers polynucleotiden van het type poly-U zijn in rijke verscheidenheid te synthetiseren met behulp van een enzym, dat voor het eerst door Ochoa (30) is geïsoleerd. Polymeren als poly-A, poly-C en poly-G, maar ook copolymeren opgebouwd uit meerdere mononucleotiden van verschillende aard, zoals poly-UC, poly-AU etc. staan thans ter beschikking. Ochoa en medewerkers zijn enige maanden geleden met een systematisch onderzoek begonnen

(31, 32), waarbij ribosomen uit bacteriën met dergelijke kunstmatige boodschappers worden geprogrammeerd en vervolgens de incorporatie van alle aminozuren wordt bestudeerd. Tot nu toe zijn de volgende polynucleotiden onderzocht: poly-U, poly-A, poly-C, poly-UC (U : C 5 : 1), poly-CU (U : C 1 : 5), poly-UA (U : A 5 : 1), poly-UC (U : C 3 : 1), poly-UG (U : G 5 : 1), poly-UAC, poly-UCG en poly-UAG.

Tabel I geeft een kwalitatieve samenvatting van de resultaten die met de verschillende aminozuren tot nu toe zijn verkregen (32, 33).

Tabel I

*Inbouw van aminozuren in de ribosomen in aanwezigheid van kunstmatige boodschapper-polynucleotiden *). (32, 33)*

Aminozuur	Polynucleotide						
	U	UC	UA	UG	UAC	UCG	UAG
Cysteïne	+	...	+	+
Histidine	+
Isoleucine	+	...	+	...	+
Leucine	...	+	+	+	...
Lysine	+	...	+	...	+
Phenylalanine	+	+	+	+	+	+	+
Proline	...	+	+	+	...
Serine	...	+	+	+	...
Threonine	...	+	+
Tyrosine	+	...	+	...	+
Valine	+	...	+	+
Arginine	+	...
Glycine	+	...	+	...
Tryptophaan	+	...	+	...

*) Elk aminozuur wordt vervolgd op grond van zijn radioactiviteit in de aanwezigheid van alle andere niet-radioactieve aminozuren.

Men dient zich wel te realiseren, dat de synthetische copolymeren geen ononderbroken opeenvolging van coderingseenheden bevatten en dat slechts de verhouding waarin de verschillende mononucleotiden voorkomen bekend is. Dit verklaart b.v. het feit dat phenylalanine door alle polymeren van tabel I in meer of mindere mate wordt gestimuleerd, aangezien deze boodschappers waarschijnlijk alle bepaalde ononderbroken U-fragmenten zullen bezitten. Met deze beperkingen voor ogen komen Ochoa c.s. reeds nu, op grond van een quantitative verwerking van hun gegevens, tot de volgende codeletters voor 19 verschillende aminozuren (Tabel II) (32, 33). Zij nemen hierbij aan, dat elk aminozuur door een triplet wordt verant-

woord. Hoewel de volgorde van de nucleotiden in de verschillende triplets uit hun resultaten nog niet is af te leiden, wettigen het tempo waarmee de boven besproken onderzoeken worden uitgevoerd en de praktisch onbeperkte mogelijkheden der methode het vermoeden, dat de code in de naaste toekomst spoedig in al zijn details zal zijn uitgewerkt.

Bijzonder bevredigend is voorts dat langs geheel andere weg een fraaie bevestiging van de resultaten van Nirenberg en Ochoa c.s. is verkregen. Zoals op pag. 9 werd vermeld, kan door inwerking van salpeterigzuur de informatie van het tabaksmozaïekvirus worden gewijzigd, waarbij het cytosine b.v. in uracil overgaat. Dit impliceert dat zich een wijziging in de tripletcodering van het virus alleen volgens bepaalde regels kan voltrekken. Is een triplet opgebouwd uit de letters U en C, dan zal deze in de mutant één of meer C's hebben verloren, waarvoor U's in de plaats zijn gekomen. Bepaalde vervangingen van aminozuren door andere ten gevolge van de mutatie zijn dus „verboden”. Geheel in overeenstemming met deze regels

Tabel II

*Triplet Codeletters voor de aminozuren *)*

Aminozuren	Codeletters
Cysteïne	2 U 1 G
Histidine	1 U 1 A 1 C
Isoleucine	2 U 1 A
Leucine	2 U 1 C
Lysine	1 U 2 A
Phenylalanine	U U U
Proline	1 U 2 C
Serine	2 U 1 C
Threonine	1 U 2 C
Tyrosine	2 U 1 A
Valine	2 U 1 G
Arginine	1 U 1 C 1 G
Glycine	1 U 2 G
Tryptophaan	1 U 2 G
Alanine	1 U 1 C 1 G
Asparagine	1 U 1 A 1 A
Methionine	1 U 1 A 1 G
Asparaginezuur	1 U 1 A 1 G
Glutaminezuur	1 U 1 A 1 G

*) De volgorde van de letters in de triplets is onbekend.

vonden Amerikaanse (17) zowel als Duitse virologen (16) dat proline door leucine, threonine door serine en serine door phe-

nylalanine kan worden vervangen (vergel. tabel II). Ook komt men tot de slotsom dat de code ontaard moet zijn, zodat meerdere triplets één aminozuur verantwoorden, doch deze triplets behorende bij één en hetzelfde aminozuur, zouden dezelfde letters bevatten doch in verschillende volgorde (16).

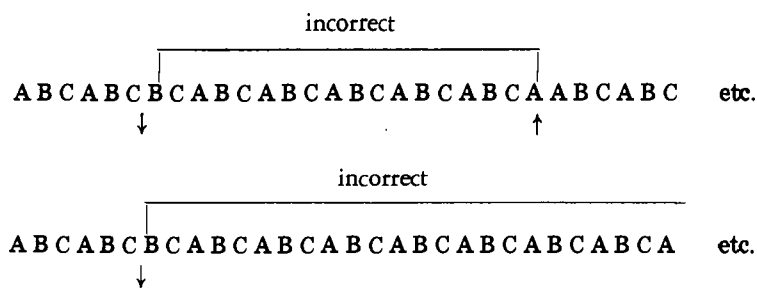
In het voorgaande is aangetoond hoe door middel van biochemische onderzoeken de ontcijfering van de genetische code kan worden verwezenlijkt. Opvallend is, dat met uiteenlopende methoden een wederzijdse bevestiging van elkaars resultaten wordt verkregen. Ook de genetica zelf leverde haar bijdrage tot het begrijpen en het lezen van de code. Zoals vermeld op pag. 10 dient in het geval van een niet-overlappende code de vraag te worden beantwoord, hoe de code moet worden geïnterpreteerd. Crick en anderen hebben mogelijkheden aan de hand gedaan om uit de moeilijkheden te geraken. Zo zou na elke drie nucleotiden de vierde een „komma” voorstellen. Ook de aanname van zinvolle en zinloze triplets maakt het mogelijk om de code correct te lezen. In een zeer recent onderzoek komen Crick en Brenner met hun medewerkers tot de conclusie dat de code vanaf een vast beginpunt moet worden gelezen. De uiterst geraffineerde experimenten (34), uitgevoerd met mutanten van de bacteriophage T4 kunnen hier slechts summier worden aangeduid. Mutanten van de phage werden verkregen met behulp van acridines, waarvan de mutagene werking daarop zou berusten, dat een letter uit de code hetzij wordt uitgewist, hetzij daaraan wordt toegevoegd.

Indien in de code:

—Beginpunt
 ↓
 A B C A B C A B C A B C A B C A B C A B C A B C A B C *)

met de eerste letter als vast beginpunt op de plaats ↑ een letter wordt uitgewist, resp. op de plaats ↓ eenzelfde letter wordt toegevoegd, dan zal de code slechts tussen de twee pijlen onjuist worden geïnterpreteerd. Dubbel-mutanten van het boven beschreven type zullen dus minder van de oorspronkelijke phage verschillen dan mutanten die gekenmerkt zijn door slechts één verandering, waarbij de code vanaf deze wijziging voortdurend incorrect wordt gelezen:

*) Eenvoudigheidshalve is hier een zich steeds herhalende triplet codering aangenomen opgebouwd uit de letters A, B en C, welke dus nucleotiden voorstellen.



Genetische experimenten, waarbij deze dubbel-mutanten werden verkregen door recombinaties van enkel-mutanten, bevestigen volkomen de boven geschetste veronderstelling dat één bepaalde „sport” op de DNA-ladder als het beginpunt moet worden aangezien.

Slotbeschouwing

De ontrafeling van het geheim der erfelijkheid is gedurende de laatste paar jaren zeer snel gevorderd. Even onverwacht als de steen, die te Rosette werd gevonden, de sleutel opleverde voor de ontcijfering van de hiërogliefen heeft de opheldering langs geheel nieuwe chemische wegen van het mechanische der informatie-overdracht ons de mogelijkheid geschonken het geheimschrift, dat ligt opgesloten in de erfsubstantie van het levende organisme, te verstaan.

Deze dramatische wending in de geschiedenis der genetica is buiten de meer enge kring van de vak-wetenschap niet onopgemerkt gebleven. In de New York Times van 2 februari j.l. en het Algemeen Handelsblad van 17 februari j.l. wordt de lezer over de recente vorderingen ingelicht en sieren afbeeldingen van het DNA-molecuul de dagbladpagina. Deze voortreffelijke voorlichting in bovengenoemde bladen gaat uiteraard vergezeld van speculatieve beschouwingen in de z.g. boulevardbladen, welke de voorstellingen van Aldous Huxley's „Brave New World” in de schaduw trachten te stellen. Het behoeft dan ook niet te verwonderen dat de vraag begint te rijzen in hoeverre het menselijk ingrijpen in de erfsubstantie van levende organismen anders dan bacteriën en viren, kan worden gerealiseerd en wat daarvan de consequenties zouden zijn. De gedachten gaan daarbij uit naar een corrigerend zowel als naar een regelend optreden, zodanig dat enerzijds erfelijke kwalen kunnen worden uitgeschakeld alvorens zij de mens naar de dood voeren, anderzijds de aard en het wezen van de progenituur wordt bepaald. Uit het voorgaande is gemakkelijk af te leiden, dat dergelijke vragen worden geboren uit ontoelaatbare extrapolaties, niettemin kan toch ook met zekerheid worden vastgesteld, dat de merites van de huidige wetenschappelijke methode slechts bij benadering kunnen worden geschat en geenszins in al hun consequenties kunnen worden overzien.

Tenslotte dienen wij in het kort nog aandacht te schenken aan een ander aspect van de boven besproken z.g. „blauwdrukken” van het leven. In de inleiding is reeds ter sprake gebracht, dat aan de ontplooiing en de differentiatie van het organisme een programma ten grondslag ligt, dat in beginsel in de eerste eicel reeds voorhanden is. Niettemin worden de programmapunten in de later gevormde somatische cellen lang niet alle afgewerkt. Uit de éne eicel ontwikkelt zich zowel de lever- als de niercel, terwijl toch beide somatische cellen met dezelfde genetische informatie zijn uitgerust. Hieruit volgt, dat tijdens de differentiatie in de embryonale, resp. post-natale fase reguleringen optreden, waardoor de verwezenlijking van bepaalde onderdelen van het genetische programma wordt onderdrukt. Dit beginsel van de „repressie” is hoofdzakelijk ontleend aan recente onderzoekingen op het gebied der microbiologische genetica. Het is waarschijnlijk dat de regulatie zich afspeelt op het niveau der genen zelf en men spreekt in dit verband van regulator- en operatorgenen (21).

Factoren van buiten af kunnen de repressie opheffen waardoor er een wisselwerking mogelijk wordt tussen de erfsubstantie en het extra-cellulaire milieu. Deze beschouwingen, welke een uiterst suggestieve betekenis hebben voor het probleem der embryonale ontwikkeling en de daarmee samenhangende differentiatie, moeten wij voor zover het de details betreft ter zijde laten. Het is echter goed te bedenken dat het hier om uiterst fijn afgestemde reguleringsmechanismen gaat. De recente ontwikkeling aangaande de genetische code richt onze aandacht uiteraard wel zeer speciaal op de materiële basis van het erfelijkheidspatroon, waarbij een „computerachtig” systeem de oneindig rijk geschakeerde biologische informatie tot expressie zou brengen. Parallele vondsten op het gebied der microbiologische genetica sluiten echter reeds bij voorbaat het misverstand uit, zo dit al ooit mocht post vatten, dat de erfsubstantie zou functioneren als een puur materialistisch systeem met een streng determinerend karakter. Integendeel, de jongste triomfen der „moleculaire biologie” hebben ons niet alleen een blik gegund in de geheimtaal der genen, maar ons tevens laten zien hoe het genoom functioneert in relatie tot de extra-cellulaire omgeving, waartoe wij naar alle waarschijnlijkheid ook de omgeving van het organisme zelf mogen rekenen. Deze omgeving dan, in de ruime zin van het woord, kent vele centra van biologische informatie en men kan niet stilzwijgend voorbijgaan aan het feit, dat het huidige natuurwetenschappelijk onderzoek onze ogen opent voor een samenspel op hoger niveau. Adaptatie aan wisselende omstandigheden beheerst door de genen zelf, kan men niet alleen vervolgen bij de z.g. adaptatieve enzymvorming in de bacteriën, maar ligt waarschijnlijk eveneens ten grondslag aan de embryonale ontwikkeling en de differentiatie als ook aan de aanpassing van het levende organisme aan zijn omgeving. In dit licht zal men het genetisch apparaat nooit zien als een star dirigerend systeem, maar als een regu-

lerend informatorisch centrum in wisselwerking met andere soortgelijke centra, op zulk een wijze dat al deze programma's opgaan in het grote plan, dat God met de kosmos heeft. Een dergelijk inzicht wordt echter niet geboren uit de kennis, die men langs experimentele weg vergadert, doch is slechts te ontleen aan de Openbaring die ons God in Zijn Woord wil schenken.

Amsterdam-Leiden
maart 1962.

LITERATUUR

1. L. Algera
Nieuwere inzichten in aard en werking der erfsubstantie.
Referaat voor de 31ste Wetenschappelijke Samenkomst op de Vrije Universiteitsdagen in 1948.
Uitgegeven bij G. F. Hummelen Boekh. & Electr. Drukk. N.V., Assen. zie verder (4).
2. G. Pontecorvo
Adv. in *Enzymology* 13, 121 (1952).
3. J. Brachet
Biochemical Cytology,
Acad. Press. Inc. New York 1957.
4. W. D. McElroy,
B. Glass (Eds.)
A symposium on the Chemical Basis of Heredity,
The Johns Hopkins Press, Baltimore 1957.
5. Structure and Function of Genetic Elements;
Brookhaven Symposia in Biology Nr. 12 1959.
Available from the office of Technical Services, Department of Commerce, Washington 25 D.C.
6. C. Levinthal,
P. F. Davison
J. Mol. Biol. 3, 674 (1961).
7. A. C. Allison
Chem. Weekblad 57, 427 (1961).
8. J. C. Kendrew
Fed. Proc. 18, 740 (1959).
9. F. H. C. Crick
Symp. Soc. Exp. Biol. 12, 138 (1958).
10. C. B. Anfinsen
The Molecular Basis of Evolution,
New York,
John Wiley and Sons Inc. London
Chapman and Hill, Ltd. 1959.
11. J. D. Watson,
F. H. C. Crick
Cold Spring Harbour Symposia Quant. Biol. 18, 123 (1953).
F. H. C. Crick
in (4) p. 532.
12. A. Kornberg
Science 131, 1503 (1960) (Nobel Lecture).

13. G. Gamow Nature 173, 318 (1954).
14. G. Gamow, A. Rich, M. Yčas Adv. Biol. Med. Phys. 4, 23 (1956).
15. S. Brenner Proc. Nat. Acad. Sci. 43, 687 (1957).
16. H. G. Wittmann Naturwissenschaften 48, 55 (1961).
17. A. Tsugita, H. Fraenkel-Conrat Proc. Nat. Acad. Sci. 46, 636 (1960).
18. H. C. Watson, J. C. Kendrew Nature 190, 670 (1961).
19. F. H. C. Crick, J. S. Griffith, L. E. Orgel Proc. Nat. Acad. Sci. 43, 416 (1957).
20. H. Chantrenne The Biosynthesis of Proteins, Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris (1961).
21. F. Jacob and J. Monod Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 26, 193 (1961).
22. M. B. Hoagland in: E. Chargaff and J. N. Davidson: The Nucleic Acids III, Acad. Press New York London 1960 p. 349.
23. R. W. Holley, J. Aggar, B. P. Doctor, J. Farrow, M. A. Marini, S. H. Merrill J. Biol. Chem. 236, 200 (1961).
- P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, J. F. Scott Proc. Nat. Acad. Sci. 46, 811 (1960).
- G. L. Brown, A. V. W. Brown, J. Gordon in (5) p. 47.
- H. G. Zachau, W. Karan, M. Tada Proc. V Int. Congress of Biochem. Moscow 1961 p. 70.
24. C. R. Fuerst Proc. Can. Cancer Conf. 3, 271 (1959).
25. F. Gros, H. H. Hiatt, W. Gilbert, C. G. Kurland, R. W. Risebrough, J. D. Watson Nature 190, 581 (1961).
26. S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson Nature 190, 576 (1961).
27. F. Gros, W. Gilbert, H. H. Hiatt, G. Attardi, P. F. Spahr, J. D. Watson Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 26, 111 (1961).
- S. Brenner ibid. 26, 101 (1961).
28. M. Chamberlin, P. Berg Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 81 (1962).
- W. B. Wood, P. Berg ibid. 48, 94 (1962).
29. M. W. Nirenberg, J. H. Matthae, Proc. Nat. Acad. Sci. 47, 1588 (1961).
- M. W. Nirenberg, J. H. Matthae, O. W. Jones ibid. 48, 104 (1962).
30. S. Ochoa, L. A. Heppel in (4) p. 615.
31. P. Lengyel, J. F. Speyer, S. Ochoa Proc. Nat. Acad. Sci. 47, 1936 (1961).
32. J. F. Speyer, P. Lengyel, C. Basilio, S. Ochoa Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 63 (1962).
33. P. Lengyel, J. F. Speyer, C. Basilio, S. Ochoa Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 282 (1962).
34. F. H. C. Crick, L. Barnett, S. Brenner, R. J. Watts-Tobin Nature, 192, 1227 (1961).