

ser beiden Erklärungsversuche nicht direkt ausschließen läßt, mögen physiko-chemische und biologische Deutung als etwa gleich wahrscheinlich angesehen werden.

Während die Versuche zur Erfassung der Gleichgewichtskonzentration in den Bakterien in einem Bereich ausgeführt worden sind, der einen Vergleich zwischen gleich großen sowie gleich wirksamen B-PAS und PAS-Konzentrationen erlaubt, sind bei den Auswaschversuchen allein die bakteriostatisch gleich wirksamen Konzentrationen in Betracht gezogen worden. Da diese in vitro um einen Faktor 100 verschieden sind, kann zunächst nicht entschieden werden, ob die verzögerte Eluierbarkeit der aufgenommenen B-PAS durch die wässrige Spülflüssigkeit lediglich Ausdruck der besseren Fettlöslichkeit ist, oder ob sie infolge begrenzter Penetration auf den Größenunterschied der angewandten Konzentra-

tionen zurückzuführen ist. Es ist ferner möglich, daß noch andere Faktoren, wie z. B. Substratspezifität oder die Bindungs- und Verteilungsverhältnisse im Bakterieninneren in Erwägung gezogen werden müssen.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß diese vergleichenden Experimente keine Aussage darüber erlauben, in welcher Form und an welchem Ort PAS bzw. B-PAS ihre bakteriostatische Wirkung entfalten. Hingegen ist die Kenntnis der beträchtlichen Anreicherung – speziell der B-PAS – in den Tuberkelbazillen geeignet, die in vivo-Wirkung dieser Bakteriostatika dem Verständnis näher zu bringen.

Wir danken den Herren Dr. E. EICHENBERGER, Dr. R. FISCHER und Dr. J. ZEYER für Unterstützung und Beratung und den Laborantinnen Fräulein EVA SCHMIEDER und KÄTHY EGGLER für ihre zuverlässige Mitarbeit.

Über die Abhängigkeit der bakteriziden Wirkung von Mitomycin C auf *E. coli* B und B/MC von der Temperatur und dem Nährmedium

VON ULRICH WINKLER

Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Frankfurt/M.
(Z. Naturforschg. **17 b**, 670–675 [1962]; eingegangen am 13. März 1962)

The bactericidal effect of Mitomycin C on *E. coli* B and the partial reactivability of MC induced cell-inactivations depends on the genotype, the composition of the plating medium and the post-incubation temperature in a way rather similar to that found in corresponding UV-experiments. This indicates that at least one type of MC-induced damage in *E. coli* must be identical or similar with lesions produced by UV.

The kinetics of MC-binding to the cells is the same for the wildtype and an MC-resistant mutant. The temperature coefficient Q_{10} for binding of MC is between 2 and 4 in the range from 20 °C to 45 °C; this shows that the MC-uptake is probably not limited by physical reasons.

The results have been discussed considering the hypothesis that MC acts by activating the cellular DNase.

Mitomycin C (= MC) ist ein kristallines, bakterizides und tumorhemmendes Antibiotikum noch unbekannter chemischer Struktur aus *Streptomyces caespitosus*¹. In *E. coli*-Bakterien hemmt es in niedrigen Konzentrationen selektiv die DNS-Synthese² und depolymerisiert die vorhandene DNS^{3,4,5}. Bisher wurde jedoch erfolglos versucht, unter in vitro-Bedingungen mit MC DNS aus *Bac. subtilis*

oder aus Heringsspermien abzubauen oder die Aktivität von Desoxyribonuclease, Desoxyribonucleotid-Kinase und Polymerase zu beeinflussen^{3,5}. Somit sind weitere MC-Versuche an intakten Organismen zur Aufklärung der MC-Wirkungsweise (oder Plural) nötig.

Kürzlich wurde in parallelen MC- und UV-Versuchen nachgewiesen, daß getrennt isolierte MC-

¹ S. WAKAKI, H. MARUMO, K. TOMIOKA, G. SHIMIZU, E. KATO, H. KAMADA, S. KUDO u. Y. FUGIMOTO, *Antibiotics and Chemotherapy* **8**, 228 [1958]; N. OTSUJI, M. SEKIGUCHI, T. IJIMA u. Y. TAKAGI, *Nature* [London] **184**, 1079 [1959].
² S. SHIBA, A. TERAWAKI, T. TAGUCHI u. J. KAWAMATA, *Nature* [London] **183**, 1056 [1959]; S. SHIBA, A. TERAWAKI, T. TAGUCHI u. J. KAWAMATA, *Biken's J. I.* **1**, 179 [1958].

³ H. KERSTEN u. H. M. RAUEN, *Nature* [London] **190**, 1195 [1961].

⁴ E. REICH, A. J. SHATKIN u. E. L. TATUM, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **53**, 132 [1961].

⁵ Y. NAKATA, K. NAKATA u. Y. SAKAMOTO, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **6**, 339 [1961].

resp. uv-resistente Mutanten von *E. coli* B (genannt B/MC resp. B/r) hinsichtlich ihrer Koloniebildungsfähigkeit gegen beide Noxe kreuzresistent sind⁶. In derselben Arbeit wurde weiterhin gezeigt, daß kurzfristig MC-behandelte B-Zellen bei einer Nachbebrütungstemperatur von 45 °C eine bedeutend höhere Überlebenschance haben als bei 37 °C; bei uv-bestrahlten B-Zellen ist diese sog. Hitzereaktivierbarkeit schon seit mehr als 10 Jahren bekannt^{7, 8}. Beide Befunde lieferten der schon von mehreren Autoren (Literatur s. l. c.⁹) geäußerten Hypothese der zumindest teilweisen Wirkungsgleichheit von MC und UV des Wellenlängenbereiches um 254 m μ neuen Stoff.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Milieu-Abhängigkeit der bakteriziden Wirkung von MC gründlicher untersucht. Die Resultate sind auffällig ähnlich denjenigen entsprechender UV-Versuche^{8, 10}.

Material und Methoden

Es wurden die Bakterienstämme *E. coli* B und fünf auf Gradientenplatten isolierte MC-resistente Mutanten verschiedener klonaler Herkunft verwendet⁶. Stets wurden belüftete Bouillonkulturen in der log-Phase abzentrifugiert und durch Resuspendieren der Zellen in wenig eiskaltem, neutralen Phosphatpuffer (plus 2 · 10⁻³ Mole MgSO₄) konzentrierte Suspensionen der gewünschten Dichte hergestellt. Sollte die inaktivierende Wirkung von MC in Abhängigkeit von der Einwirkungstemperatur (genannt T₁) bestimmt werden, so wurden 0,2 ml der Zellsuspension für 1 min zum Temperaturgleich in das gewünschte Wasserbad eingestellt, bevor das gleiche Volumen einer MC-Lösung in Puffer hinzugegeben wurde. Die MC-Behandlung dauerte in der Regel 4 Minuten. Danach wurde sofort in Puffer verdünnt und auf DIFCO-Bouillonagar (plus 0,5% NaCl) und/oder M9-Minimalagar¹¹ mit der Gußplattentechnik¹² ausgeplattet. Genau 10 min nach Beendigung der MC-Behandlung der Bakterien wurde die Bebrütung in Brutschränken, die mit Ventilatoren ausgestattet waren (ausgenommen der 20 °C-Brutschrank), begonnen. Agarplatten, auf denen nach 24-stdg. Aufenthalt bei den verschiedenen Temperaturen (genannt T₂) die Kolonien noch nicht sichtbar oder nur winzig waren, wurden weitere 18 bis 24 Stdn. bei 37 °C bebrütet und erst dann ausgewertet.

⁶ U. WINKLER, Naturwissenschaften **49**, 91 [1962].

⁷ E. H. ANDERSON, J. Bacteriol. **61**, 389 [1951]; W. STEIN u. I. MEUTZNER, Naturwissenschaften **37**, 167 [1950].

⁸ W. HARM u. W. STEIN, Z. Naturforschg. **8b**, 123 [1953].

⁹ M. LEVINE, Virology **13**, 493 [1961].

¹⁰ R. B. ROBERTS u. E. ALDOUS, J. Bacteriol. **57**, 363 [1949].

¹¹ G. KOCH u. W. WEIDEL, Z. Naturforschg. **11b**, 345 [1956].

Sollte nur die Kinetik der MC-Bindung durch *E. coli*-Zellen bestimmt werden, wurden je 2 ml Bakterien-suspension und MC-Lösung vermischt, nachdem die MC-Lösung die gewünschte Einwirkungs-Temperatur T₁ angenommen hatte. Nach einer bestimmten Bindungszeit wurde eisgekühlt und dann 30 min bei 5000 Upm in einer ausschwingenden Christ-Zentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden zur Bestimmung der Menge des bis dahin noch ungebundenen Mitomycins bei der Wellenlänge $\lambda = 362 \text{ m}\mu$, bei der MC ein charakteristisches Absorptionsmaximum hat, in einem Zeiss-Spektrophotometer, Modell PMQ II, gemessen; der Inhalt einer „2 mg potency“ MC-Ampulle¹³, gelöst in 200 ml Puffer, hat bei 362 m μ bei 1 cm Schichtdicke eine optische Dichte von etwa 0,68. Alle photometrisch erhaltenen Meßwerte wurden für die optische Dichte nicht interessierenden Materials korrigiert.

Ergebnisse

1. Abhängigkeit der MC-Bindung vom Genotyp und der MC-Einwirkungs-Temperatur (T₁)

Zellen streptomycin-resistenter *E. coli*-Mutanten unterscheiden sich u. a. dadurch von solchen des Wildtyps, daß sie weniger Antibiotikum aufnehmen können¹⁴. Da nun das Molekulargewicht von MC nicht kleiner als jenes vom Streptomycin ist, sondern mit ca. 1200 sogar etwa doppelt so groß¹⁵, wurde geprüft, ob die MC-Resistenz von B/MC2 vielleicht ebenfalls auf verminderter Aufnahme-

T ₁	Nicht zellgebundenes MC in %			
	B	B/MC2	Mittel	Q ₁₀
45 °C	32,1	32,5	32,3	3,86
37 °C	67,3	68,9	68,1	2,50
30 °C	81,2	82,3	81,7	2,94
20 °C	88,6	98,1	93,3	

Tab. 1. Bindung von MC durch *E. coli* B und B/MC2 binnen 10 min in Abhängigkeit von der MC-Einwirkungs-Temperatur T₁. In den Versuchsröhrchen war die anfängliche MC-Konzentration 10 $\mu\text{g/ml} = 100\%$ und die Zellzahl 6,5 · 10⁹/ml.

¹² M. H. ADAMS, Bacteriophages, Interscience Publ., New York 1959.

¹³ Der KYOWA HAKKO KOGYO Co., Inc., Tokyo, sei für die kostenlosen Mitomycin C-Proben herzlich gedankt.

¹⁴ N. ANAND, B. D. DAVIS u. A. K. ARMITAGE, Nature [London] **185**, 23 [1960].

¹⁵ T. KORZYBSKI u. W. KURYLOWICZ, Antibiotica, VEB Fischer Verlag, Jena 1961.

fähigkeit für das Antibiotikum beruht. Aus Tab. 1 geht folgendes hervor:

a) Wildtyp- und Mutantenzellen haben unter den gewählten Versuchsbedingungen dasselbe MC-Bindungsvermögen.

Der bei 20 °C gefundene Unterschied ist zufallsbedingt, wie sich bei einer Versuchswiederholung ergab.

b) Die Menge von gebundenem MC pro 10 min ist T_1 -abhängig. Der Temperaturkoeffizient Q_{10} liegt im gesamten gemessenen Bereich (20° bis 45°) zwischen 2 und 4. Nach der RGT-Regel von Van't Hoff ist daraus zu schließen, daß die T_1 -Abhängigkeit der MC-Bindung an die Zellen wohl nicht physikalisch, z. B. durch unterschiedliche Permeabilität der Zellwände für die MC-Moleküle, bedingt sein kann¹⁶. Wahrscheinlicher ist eine sofortige echte chemische Bindung des MC an irgendeine Zellkomponente.

In einem weiteren Experiment wurden T_1 bei 37 °C und die MC-Konzentration (10 µg/ml) konstant gehalten, dafür aber die MC-Einwirkungszeit zwischen 5 und 30 min variiert. Auch hierbei waren Wildtyp und Mutante hinsichtlich der Kinetik der MC-Bindung nicht zu unterscheiden.

Versucht man die MC-Bindungsfähigkeit von B-Zellen durch Vorbestrahlung derselben mit UV „kompetitiv“ zu erniedrigen, so zeigt sich erst bei der hohen Dosis von etwa $1,2 \cdot 10^5$ erg mm⁻², entsprechend etwa 10⁴ Letaltreffern, ein Effekt: Es werden 15% weniger MC gebunden als in der Kontrolle. Gleichzeitig sinkt aber auch die Menge ausgeschiedenen Zellmaterials, das bei 260 mµ absorbiert, um etwa 10 Prozent. Somit ist das Resultat wohl nicht im Sinne einer echten Konkurrenz von MC-Molekül und UV-Quant am primären Bindungs-ort zu deuten. Die Annahme einer unspezifischen Reduktion der Zellwandpermeabilität bei sehr hohen UV-Dosen ist wahrscheinlich berechtigter.

2. Abhängigkeit der bakteriziden MC-Wirkung vom Genotyp, T_1 und der Nähragar-Zusammensetzung

Dieselbe Zellzahl von *E. coli* B resp. *B/MC2* wurde bei verschiedener Temperatur (T_1) für 4 min mit 10 µg/ml MC behandelt. Danach wurde ver-

dünnt und auf Bouillon- und M9-Agar die überlebende Keimzahl bestimmt. Die in Abb. 1 wiedergegebenen Überlebendenkurven zeigen, daß die bakterizide MC-Wirkung T_1 -abhängig ist und zum Zeitpunkt der zellulären MC-Bindung das Ausmaß der daraus resultierenden biologischen Schäden noch nicht festliegt. Zumindest folgende Faktoren können es beeinflussen:

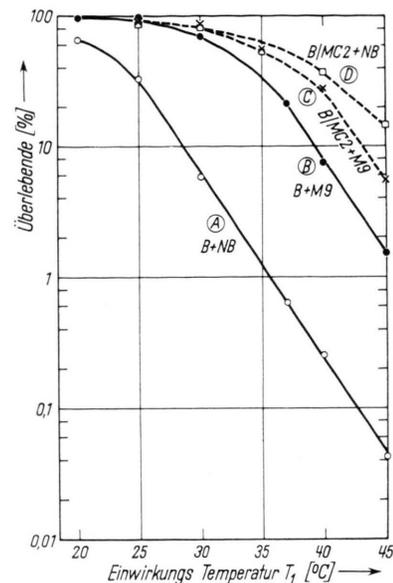


Abb. 1. Die bakterizide Wirkung von MC (10 µg/ml Endkonz.) auf *E. coli* B (—○—●—) und *B/MC2* (—□—⊗—) in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Nähragars und der MC-Einwirkungs-Temperatur T_1 . Die MC-Einwirkungszeit war stets 4 min, und die Bebrütungstemperatur T_2 aller Agarplatten 37 °C.

Kurven A und D=DIFCO-Bouillonagar; Kurven B und C=M9-Minimalagar. $N_0=1,5 \cdot 10^8$ /ml.

a) Der Genotyp der Zellen. Dieser macht sich bei verschiedenen T_1 unterschiedlich bemerkbar.

b) Die Zusammensetzung des Nähragars. MC-behandelte Wildtypzellen werden auf Bouillonagar weit stärker inaktiviert als auf M9-Agar. Dagegen verhalten sich Zellen der Mutante *B/MC2* auf den beiden Nährböden gerade umgekehrt und sind außerdem hinsichtlich ihrer MC-Empfindlichkeit weniger nährboden-abhängig als die Wildtypzellen.

In entsprechenden UV-¹⁰ und Röntgen-Versuchen¹⁷ überlebte *B* ebenfalls auf Minimalagar besser als auf Bouillonagar und *B/r* verhielt sich analog *B/MC2*.

¹⁶ H. NETTER, Theoretische Biochemie, Springer Verlag, Berlin 1959.

¹⁷ G. E. STAPLETON, A. J. SBARRA u. A. HOLLAENDER, J. Bacteriol. **70**, 7 [1955].

3. Abhängigkeit der bakteriziden MC-Wirkung vom Genotyp, der Nachbebrütungstemperatur (T_2) und der Nähragar-Zusammensetzung

Die Versuche wurden entsprechend denen des letzten Abschnittes durchgeführt, nur mit dem Unterschied, daß diesmal T_1 bei 37 °C konstant gehalten und T_2 variiert wurde. Die Ergebnisse (Abb. 2) zei-

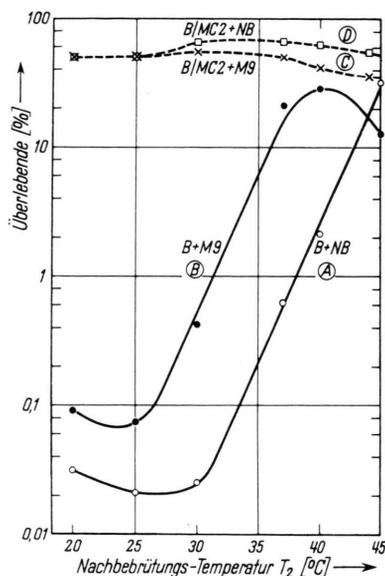


Abb. 2. Die bakterizide Wirkung von MC (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonz.) auf *E. coli* B ($-\circ-\bullet-$) und *B/MC2* ($-\square-\times-$) in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Nähragars und der Bebrütungstemperatur T_2 der Agarplatten. $T_1 = 37^\circ\text{C}$. Näheres s. Abb. 1.

gen, daß bei *E. coli* B die biologische Auswirkung zellgebundenen MC's in erster Näherung eine der MC-Bindung entgegengesetzte Temperaturabhängigkeit hat. Die Chance der Zellinaktivierung ist sowohl auf Bouillon- als auch auf M9-Agar bei $T_2 \approx 25^\circ\text{C}$ am größten. Das MC-Wirkungsminimum liegt auf Bouillonagar bei $T_2 \gg 45^\circ\text{C}$ und auf M9-Agar bei $T_2 \approx 40^\circ\text{C}$.

Das Abknicken der Kurve B in Abb. 2 oberhalb 40 °C könnte vielleicht durch die Annahme erklärt werden, daß infolge MC-Behandlung viele thermo-

auxotrophe Mutanten¹⁸ entstanden sind, die bei $T_2 = 45^\circ\text{C}$ zwar auf Bouillon-, aber nicht mehr auf M9-Agar überleben können; denn MC ist ein Mutagen¹⁹. Um diese Annahme zu prüfen, wurden 850 bei 45 °C auf Bouillonagar überlebende Kolonien von MC-behandelten *B*-Zellen auf M9-Agar gestempelt²⁰ und Parallelplatten bei 37 °C und 45 °C bebrütet. Jedoch war keine einzige Kolonie bei den beiden Temperaturen auxotroph. Also ist obige Hypothese unzutreffend. Die geringere Überlebenschance MC-behandelter *B*-Zellen bei 45 °C auf M9-Agar an Stelle von Bouillonagar läßt sich somit nur durch Annahme eines nicht-erblichen, MC-empfindlicheren physiologischen Zustandes bei 45 °C erklären.

Beim Stamm *B/MC2* ist die Zellinaktivierung durch zellgebundenes MC kaum T_2 -abhängig. *B/MC2* ist hinsichtlich der fehlenden „45 °C-Reaktivierbarkeit“ der MC-Schäden keine Ausnahme, denn 4 weitere Mutantenstämme (*B/MC* 1, 4, 6 und 9) verhielten sich annähernd ebenso.

In Abb. 2 ist der Wirkungsreduktions-Faktor *WRF*²¹, der sich durch Vergleich der bei 37 °C und 45 °C bestimmten Überlebens-Prozentsätze (\bar{U}) in Kurve A ergibt, etwa 4,5. Seine Höhe ist abhängig (a) vom Zeitintervall zwischen der MC-Behandlung der Bakterien und ihrer Nachbebrütung bei 45 °C und (b) von der Konzentration.

Zu (a): *B*-Zellen wurden bei 37 °C 10 min mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MC behandelt und danach verdünnt auf 37 °C warme Bouillonagarplatten verteilt. Nach verschieden langer anschließender Bebrütung bei 37 °C wurden die Platten bei 45 °C weiterbebrütet (Abb. 3). Wurden die Platten schon 10 min nach Beendigung der MC-Behandlung bei 45 °C weiterbebrütet, so überlebten 52% der Bakterien (in Abb. 3 = 100%), entsprechend einem *WRF* von 8,9. Dauerte die 37 °C-Bebrütung dagegen 110 min, überlebten weniger als 1%, entsprechend der Überlebenschance bei alleiniger 37 °C-Bebrütung. Somit sind nach diesem Zeitintervall von ca. 2 Std. alle bei 37 °C entstandenen und u. U. durch 45 °C reaktivierbaren MC-Schäden irreversibel geworden. Da die durchschnittliche lag-Periode für die Zellteilung

¹⁸ U. LEUPOLD u. N. H. HOROWITZ, Z. Vererbgs. **84**, 306 [1952].

¹⁹ T. IJIMA u. A. HAGIWARA, Nature [London] **185**, 395 [1960].

²⁰ J. LEDERBERG u. E. M. LEDERBERG, J. Bacteriol. **63**, 399 [1952].

²¹ $WRF = \frac{\log 100 - \log \bar{U}_{37}}{\log 100 - \log \bar{U}_{45}}$. Der *WRF* könnte vorläufig ebensogut Wirkungsverstärkungs-Faktor genannt werden; bisher ist nämlich noch unbekannt, ob der Beeinflussung der Überlebensrate MC-behandelter *B*-Zellen durch verschiedene Nachbebrütungs-Temperaturen Reaktivierungs- oder Verstärkungs-Prozesse zugrunde liegen.

von *B* unter gewählten Versuchsbedingungen etwa 2 bis 2,5 Stdn. dauert, werden die MC-Schäden wahrscheinlich bei den Vorbereitungen zur ersten Zellteilung manifestiert.

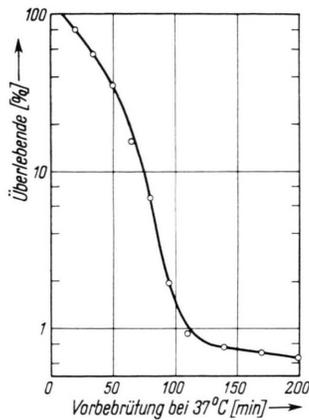


Abb. 3. Abnahme der Überlebenden von kurzfristig MC-behandelten *E. coli* B-Zellen bei 45 °C als Funktion der Vorbereitungsdauer bei 37 °C. Die Keimzahl der MC-unbehandelten Kontrolle war $4,4 \cdot 10^7$ /ml. Näheres im Text.

In UV-Versuchen²² oder nach ³²P-Einbau²³ in *B*-Zellen wurden von anderen Autoren Ergebnisse erhalten, die unserem Resultat mit MC weitgehend entsprechen.

Zu (b): Läßt man bei 37 °C für 4 min verschiedene MC-Konzentrationen auf etwa $8 \cdot 10^7$ /ml *B*-Zellen einwirken und bebrütet anschließend auf Bouillonagar parallel bei 37 °C und 45 °C, so nimmt der *WRF* oberhalb 2,5 µg/ml ab (Tab. 2), weil oberhalb dieser Konzentration die Inaktivierung bei 37 °C Nachbebrütung nicht mehr dosisproportional verläuft. In einem Parallelversuch mit $1,4 \cdot 10^{10}$ /ml *B*-Zellen und 10 min MC-Einwirkungszeit wurde aber festgestellt, daß die MC-Bindung bei höheren MC-Konzentrationen keinesfalls abnimmt (Tab. 2).

Diese Befunde besagen, daß entweder MC-Moleküle nicht nur an lebensnotwendige, sondern auch

an irgendwelche anderen Zellstrukturen gebunden werden können, oder aber, daß oberhalb einer bestimmten Grenzzahl von MC-Molekülen pro Zelle die Wirkungschance pro Molekül vermindert wird.

Diskussion

Die Resultate mehrerer Autoren deuten daraufhin, daß der dominierende Effekt von MC auf *E. coli* B in einer unphysiologisch starken Aktivierung zell-eigener DNasen besteht^{3, 4, 5, 24}. Vorliegende Arbeit zeigt nun, daß die bakterizide Wirkung von MC auf *B*-Zellen bei einer Nachbebrütungstemperatur von etwa 25 °C maximal ist; es ist aber unwahrscheinlich, daß die *E. coli*-DNasen bei dieser niedrigen Temperatur ihr Wirkungsoptimum haben. Diesen Widerspruch zwischen unseren Befunden und den in der Literatur vorliegenden kann man mit Hilfe einer der beiden folgenden Annahmen umgehen:

a) Die Überlebenschance MC-behandelter *B*-Zellen ändert sich tatsächlich annähernd umgekehrt proportional mit der DNase-Aktivität in denselben; das eigentliche Temperatur- und zugleich Wirkungsoptimum der DNasen wird aber durch andere, chemisch und kinetisch noch unbekannte Prozesse (z. B. sekundäre Reaktivierungen) überdeckt.

b) Der beträchtliche Anstieg der DNase-Aktivität in MC-behandelten Zellen hat nur untergeordnete Bedeutung für deren Überlebenschance; die eigentliche Ursache der bakteriziden MC-Wirkung ist noch unbekannt.

Zwischen diesen beiden Annahmen kann vielleicht bald entschieden werden, weil augenblicklich die Stämme *B* und *B/MC* hinsichtlich des Ausmaßes der DNase-Aktivierung nach MC-Behandlung verglichen werden.

Die Abhängigkeit der bakteriziden MC-Wirkung auf *E. coli* B vom Genotyp und verschiedenen Um-

<i>E. coli</i> B	µg/ml MC (Endkonz.)							
	0	1	2,5	5	7,5	10	20	40
N/N_0 bei 37°C [%]	100	45,8	14,9	5,5	1,8	0,80	—	—
<i>WRF</i>	1	10	10	6,8	6,1	5,2	—	—
Gebundenes MC [%]	0	—	23,7	22,9	26,7	26,6	28,8	28,4

Tab. 2. Abnahme der Überlebenden (N/N_0) von *E. coli* B bei $T_1=T_2=37$ °C und des *WRF* (infolge 45 °C-Bebrütung) in Abhängigkeit von der MC-Konzentration. Weiterhin MC-Bindung in Abhängigkeit von der MC-Konzentration. Näheres s. Text.

²² E. M. WITKIN, Cold Spring Harbor Sympos. quantitativ. Biol. **21**, 123 [1956].

²³ R. F. HILL, Nature [London] **188**, 412 [1960].

²⁴ H. KERSTEN, persönliche Mitteilung.

weltfaktoren gleicht in vieler Hinsicht derjenigen in entsprechenden UV-Versuchen anderer Autoren⁸; z. B. sind von den MC- resp. UV-Schäden in einer *B*-Population unter gleichen Versuchsbedingungen gleiche Anteile durch 45 °C Nachbebrütung reaktivierbar. SINSHEIMER²⁵ vermutete, daß evtl. ein Cytosin-Photoprodukt die Ursache für die temperaturreaktivierbaren Schäden in uv-bestrahlten Zellen ist, weil es nämlich leicht wärmervertiert werden kann.

Die Tatsache aber, daß auch nach ³²P-Einbau²³ und MC-Behandlung⁶ wärmeraktivierbare Schäden in *B*-Zellen wie nach UV-Bestrahlung entstehen, spricht gegen diese Annahme.

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt und unter der fleißigen und gewissenhaften Mitarbeit von Fräulein GISELA DITTRICH durchgeführt. Herrn Prof. Dr. R. W. KAPLAN sei für anregende Diskussion herzlich gedankt.

²⁵ R. L. SINSHEIMER, Rad. Research 6, 121 [1957].

Strukturuntersuchungen an Plastiden*

III. Röntgenographische Untersuchungen an isolierten Chloroplasten und Chloroplasten lebender Zellen

VON WERNER KREUTZ und WILHELM MENKE

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln
(Z. Naturforschg. 17 b, 675—683 [1962]; eingegangen am 21. März 1962)

Orientierende Röntgenkleinwinkel-Untersuchungen an isolierten Chloroplasten von *Antirrhinum majus* und an Chloroplasten lebender Zellen von *Chlorella pyrenoidosa* haben folgendes ergeben: Die ungestörte Periode der Thylakoidstapel beträgt 177 ± 3 Å. Die Thylakoide bestehen aus zwei asymmetrisch gebauten Membranen, die spiegelbildlich zueinander liegen. Die einzelnen Thylakoidmembranen setzen sich aus einer kompakten Lipidschicht von maximal 35 Å Dicke und einer korpuskular gebauten Proteidschicht mit einer Periode von etwa 36 Å in der Schichtebene zusammen. Der Schwerpunktsabstand beider Schichten beträgt 41 ± 1 Å. Vergleichend ausgeführte elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben für die Periode Werte zwischen 230 und 360 Å.

Chloroplasten bestehen aus dem Lamellarsystem, an welchem die photochemischen Reaktionen der Photosynthese ablaufen, der Matrix, welche die löslichen Enzyme enthält, und der Plastidenmembran, welche die Chloroplasten gegen das Cytoplasma abgrenzt. Als Einschlüsse können in Chloroplasten Stärkekörner, Globuli (osmiophile Granula) und gelegentlich auch sogenannte Proteinkristalle vorkommen.

Das Lamellarsystem der Chloroplasten besteht aus Thylakoiden, die in Abb. 1 a im Querschnitt schematisch dargestellt sind. Bei diesen übermolekularen Bauelementen handelt es sich nicht um doppelt konturierte Platten, sondern um zwei miteinander verbundene Membranen, was schon daraus hervorgeht, daß die Thylakoide blasig anschwellen können. Die chemische Analyse ergibt, daß Thylakoide aus Proteiden und Lipiden bestehen, wobei der Lipidgehalt etwa 35% beträgt. Zerstreut liegende Thylakoide (Abb. 1 a) findet man im Chromato-



Abb. 1. Allgemeines Bauprinzip des Lamellarsystems der Plastiden in schematischer Darstellung, a) isoliert in der Matrix liegende Thylakoide, b) Thylakoidstapel eines granafreien Chloroplasten, c) Thylakoidstapel aus einem Chloroplasten mit Granastruktur. Die Zeichnungen sind nicht maßstäblich.

plasma der Cyanophyceen und wahrscheinlich auch in den Plastiden der Rhodophyceen. In den Chloroplasten der übrigen Algen und höheren Pflanzen sind die Thylakoide zu Stapeln vereinigt, wie in

* Herrn Professor Dr. OTTO KRATKY zum 60. Geburtstag gewidmet.