

# Über die intrazelluläre Formation von Bakterien - DNS\*

Von A. KLEINSCHMIDT, D. LANG, unter Mitarbeit von C. PLESCHER, W. HELLMANN und J. HAASS

Aus dem Hygiene-Institut der Stadt und Universität

und

R. K. ZAHN, unter Mitarbeit von A. HAGEDORN

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. 16 b, 730—739 [1961]; eingegangen am 31. Mai 1961)

Herrn Prof. Dr. K. HERZBERG zum 65. Geburtstag gewidmet

1. Electron micrographs of ultra-thin sections of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus lysodeikticus* in Vestopal as embedding medium disclose a multiplicity of DNA containing threads with varying interparticular distances.

2. The diameter of these threads is about one tenth of the average optimal section thickness.

3. This section thickness inevitably is implicated in the visualization of the internal distances between the threads as well as in some common trends in the DNA pool, a fact that has to be accounted for in the analysis of the macromolecules.

4. By spreading lysozyme protoplasts of *M. lysodeikticus* on a water-air interface in a Langmuir trough and by transferring this surface layer to carbon supported Formvar films, two-dimensional systems can be demonstrated which as a thread of constant width comprise the total DNA content of one microorganism each.

5. Such a macromolecular system shows equally shaped, coiled loops in a peripheral zone and many crossings towards the center. Branching of threads never has been observed so far.

From this evidence we conclude:

a) Intracellular DNA in these bacteria seems to exist in one pool as a "woolen ball" which is centered in the cytoplasm as a more or less dense object.

b) This "woolen ball" embodies the total amount of DNA most probably as one single threadlike unit.

6. Partial destruction of the thread system of protoplasts will result upon changing optimal spreading conditions.

7. The same kind of destruction is shown upon isolation of the DNA from protoplasts, the length of the threads being an inverse function of the number of precipitation steps showing purification.

Im Cytoplasma der Zellen sind die lebensnotwendigen Desoxyribonucleinsäuren (DNS) mit weiterem cytoplasmatischem Material, insbesondere Proteinen und ribonucleinsäure (RNS)-haltigen makromolekularen Gebilden, auf engem Raum gepackt. Bakterien weisen gegenüber Zellen höherer Organisation, wie pflanzliche und tierische Zellen, keinen mit einer Membran versehenen Nucleus auf. Die verschiedenartigen biochemischen Nachweismethoden von DNS-Material haben aber, zusammen mit bakteriengenetischen Versuchen, schon seit längerer Zeit dazu geführt, einen Bakterienzellkern zu postulieren. Er hat bei sonst ähnlichen Funktionen nicht das Aussehen eines animalen Zellkerns. Es werden weder Teilungsfiguren noch verschiedene Stadien mit Kernmembran

gefunden. Die Frage, wie man sich den physikalischen Zustand und Zustandsänderungen der DNS-Makromoleküle<sup>1</sup> vorstellen kann, wurde mit morphologischen Methoden untersucht.

Lichtmikroskopische Verfahren<sup>2-4</sup>, mit hoher Anfälligkeit für „Artefakte“ bei DNS-Makromolekülen, treten bei den Bakterien gegenüber der wesentlich höheren Auflösung des Elektronenmikroskops<sup>5</sup> in den Hintergrund. Da die Bakterien Durchmesser in der Größenordnung von  $1 \mu$  aufweisen, die DNS-Fäden dagegen, die seither aus Zellkernen isoliert wurden, *alle* einen konstanten Durchmesser von etwa 20–25 Å besitzen und durchschnittlich 3 bis 4% des Bakterienzellgewichtes haben<sup>6</sup>, erheben sich Fragen nach der inneren Ordnung ihrer

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>1</sup> E. KELLENBERGER, The physical State of bacterial DNA, 10. Sympos. Soc. gen. Microbiol., 39 (1960).

<sup>2</sup> G. PIEKARSKI, Arch. Mikrobiol. 8, 428 [1937].

<sup>3</sup> C. F. ROBINOW, The Chromatin Bodies of Bacteria, 6. Sympos. Soc. gen. Microbiol. 181 (1956).

<sup>4</sup> D. J. MASON u. D. M. POWELSON, J. Bacteriol. 71, 474 [1956].

<sup>5</sup> R. G. E. MURRAY, The internal Structure of the Cell, in: The Bacteria, Vol. I (ed. I. C. GUNSALES a. R. Y. STANIER), p. 35, Academic Press New York-London 1960.

<sup>6</sup> S. E. LURIA, The Bacterial Protoplasm: Composition and Organization, in: The Bacteria I, 1 (1960).

Packung und nach den Längen dieser unverzweigten „linearen“ Makromoleküle. Für die Darstellung der Bakterien-DNS sind die Präparation, die dadurch bedingten Einflüsse auf die DNS-Struktur und die elektronenmikroskopischen Phänomene zu berücksichtigen.

Man kann eine Vielzahl von physikalisch-chemischen Untersuchungen über isolierte Desoxyribonucleinsäuren<sup>7</sup> und physiologische Erscheinungen, die die Funktion der DNS als Informationsträger für Wachstum und Vererbung<sup>8-13</sup> betreffen, zusätzlich für ihre intrazelluläre Morphologie heranziehen. Eine Analyse der Packungsverhältnisse setzt voraus, daß die DNS-Makromoleküle gleichartig aufgebaut sind. Dies ist nach Röntgenstreuungs-Aufnahmen offensichtlich bei DNS verschiedenartiger Herkunft der Fall<sup>14</sup>; sie entsprechen alle dem Watson-Crick-Modell<sup>15</sup>. (Nur eine Ausnahme, die einsträngige DNS von *Escherichia coli*-Phagen  $\Phi$ X 174 ist bekannt geworden<sup>16</sup>.) Weil das makromolekulare DNS-Modell für sämtliches Kernmaterial zutrifft, behandeln zahlreiche Untersuchungen die bekannte Variabilität von intrazellulären DNS-Strukturen; sie sind, bei Bakterien stärker als bei Zellen größerer Dimension und höherer Ordnung, von der Präparation und von der Deutung vor allem elektronenmikroskopischer Bilder abhängig.

Nach unseren seitherigen Ergebnissen<sup>17</sup> lassen sich, auf hauptsächlich zwei unterschiedlichen Verfahren basierend, morphologische Analysen der intrazellulären DNS-Ansammlungen vornehmen. Die Dünnschnitte<sup>1, 5</sup> ergeben stets Scheiben von kugelförmigen, stäbchenförmigen oder anders gestalteten drei-

dimensionalen Bakterien. Da die DNS fädig und gegenüber der Schnittdicke als erheblich dünneres Makromolekül vorliegt, sind die Fragen der geometrischen Abbildung mehr oder weniger dicht gelagerter Anhäufungen von DNS zu betrachten und die elektronenmikroskopischen Abbildungen auf Fadenstrukturen hin zu untersuchen. Serienschnitte spielen vor allem für die Raumerfüllung des gesamten Fadenaggregates eine Rolle<sup>18</sup>.

Die Herstellung von dünnsten proteinhaltigen DNS-Mischfilmen<sup>19</sup> läßt sich ebenfalls auf die intrazelluläre Bakterien-DNS anwenden<sup>17</sup>, wenn nur dabei die rigide Zellwand schonend entfernt werden kann. Dazu sind vor allem Bakterien-Protoplasten<sup>20</sup> geeignet. Da die intrazelluläre DNS-Formation vor und nach der Spreitung und in Dünnschnitten mit anderen makromolekularen Zellbestandteilen strukturell verbunden ist (RNP-Partikel oder Ribosomen, lösliche RNS<sup>21, 22</sup> Proteine – Enzyme<sup>23, 24</sup>), werden die hier vorgelegten Untersuchungen auch zu morphologischen Vergleichen mit weiteren subzellulären Komponenten benützt. Die Schlußfolgerungen beziehen sich auf DNS-Struktur in Verbindung mit ihren Funktionen, wie Information und Realisation sowie ihre Reduplikation.

## Material und Methodik

1. *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* (*Staphylococcus aureus*), Stamm S.A.B. (CUNNINGHAM, CATLIN u. DE GARILHE 1956<sup>25</sup>)\*. Der Keim wächst u. a. in Brain Heart Infusion, teils mit Zusatz bis zu 1-m. NaCl (Nährboden: 37,0 g Brain Heart Infus. Extrakt (Difco), 53,5 g NaCl ad 1000 ml H<sub>2</sub>O), bei 37 °C<sup>26</sup>.

<sup>7</sup> The Nucleic Acids (ed. s. E. CHARGAFF a. N. DAVIDSON) I, II, III Academic Press, New York-London 1954, 1960.

<sup>8</sup> The chemical Basis of Heredity (Eds.: McELROY a. B. GLASS) Baltimore 1957.

<sup>9</sup> A. KORNBERG, Biosynthesis of nucleic acids, in: Rev. Modern Physics **31**, 209 [1959].

<sup>10</sup> P. ELIAS, Coding and information theory, in: Rev. Modern Physics **31**, 221 [1959].

<sup>11</sup> C. LEVINTHAL, Genetics and the role of nucleic acids, in: Rev. Modern Physics **31**, 227 [1959].

<sup>12</sup> R. C. WILLIAMS, Replication of nucleic acids, in: Rev. Modern Physics **31**, 233 [1959].

<sup>13</sup> W. HAYES, The Bacterial Chromosome, in: 10. Symp. Soc. gen. Microbiol. 1960, 12 (Cambridge).

<sup>14</sup> L. D. HAMILTON, R. K. BARKLEY, M. H. F. WILKINS, G. L. BROWN, H. R. WILSON, D. A. MARVIN, H. EPHRUSSI-TAYLOR u. N. S. SIMMONS, J. Biophys. Biochem. Cytol. **5**, 397 [1959].

<sup>15</sup> J. D. WATSON u. F. H. C. CRICK, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. **18**, 123 [1953].

<sup>16</sup> R. L. SINSHEIMER, J. Mol. Biol. **1**, 37 [1959].

<sup>17</sup> A. KLEINSCHMIDT u. D. LANG, Proc. Europ. Regional Conf. Electron Microscopy, Delft 1960, Eds.: A. L. HOUWINK u. B. J. SPIT, S. 690.

<sup>18</sup> A. RYTER, J. Biophys. Biochem. Cytol. **8**, 399 [1960].

<sup>19</sup> A. KLEINSCHMIDT, D. LANG u. R. K. ZAHN, Naturwissenschaften **47**, 16 [1960].

<sup>20</sup> K. MCQUILLEN, Bacterial Protoplasts, in: The Bacteria I, 249 (1960).

<sup>21</sup> A. TISSIERES, J. D. WATSON, D. SCHLESINGER u. B. R. HOLLINGWORTH, J. Mol. Biol. **1**, 221 [1959].

<sup>22</sup> R. B. ROBERTS, K. MCQUILLEN u. J. Z. ROBERTS, Ann. Rev. Microbiol. **13**, 1 [1959].

<sup>23</sup> P. MITCHELL, Ann. Rev. Microbiol. **13**, 405 [1959].

<sup>24</sup> A. G. MARR, Ann. Rev. Microbiol. **14**, 241 [1960].

<sup>25</sup> L. CUNNINGHAM, B. W. CATLIN u. M. P. DE GARILHE, J. Amer. chem. Soc. **78**, 4642 [1956].

\* Miss B. W. CATLIN, Marquette Univ. School of Med., Milwaukee, Wisc. danken wir für die Übersendung des Stammes.

<sup>26</sup> A. KLEINSCHMIDT, M. GEHATIA u. R. K. ZAHN, Kolloid-Z. **169**, 156 [1960].

Nach 24 Stdn. sind große, oft aggregierte Bakterien in Suspension entstanden, zugleich findet man im salzhaltigen Medium reichlich Ansammlungen von extrazellulärer DNS, vor allem in fadenziehenden schleimigen zellreichen Sedimenten<sup>27</sup>.

2. *Micrococcus lysodeikticus* (*Staphylococcus afermentans*), (von National Collection of Type Culture, London, dankenswerterweise erhalten) wurde auf Nähragar bei 37 °C 18 Stdn. als Oberflächenkultur gezüchtet. Die Keime befinden sich dann außerhalb der log-Phase des Wachstums.

**Protoplasten:** Nach Abschwemmen und zweimaligem Waschen mit 1-m. Ammoniumacetat  $pH$  5 läßt man Lysozym (reinst, 3-mal krist.) bis zu 50  $\mu g/ml$  im gleichen Medium bei 37 °C einwirken<sup>28</sup>. Die Abnahme der Extinktion (dekadischer Logarithmus der reziproken Durchlässigkeit für Licht) gilt als Maß für die Umwandlung in Protoplasten (s. Abb. 1). Die Geschwindigkeit ist von der Konzentration und Molarität abhängig. Die Keimmenge beträgt maximal etwa  $2 \cdot 10^8$  Protoplasten/ml in der Ausgangssuspension. Bezüglich der Zahl der Protoplasten pro Bakterienzelle vgl. l. c.<sup>20</sup>. Bei Herabsetzung der hyper- zur hypotonen

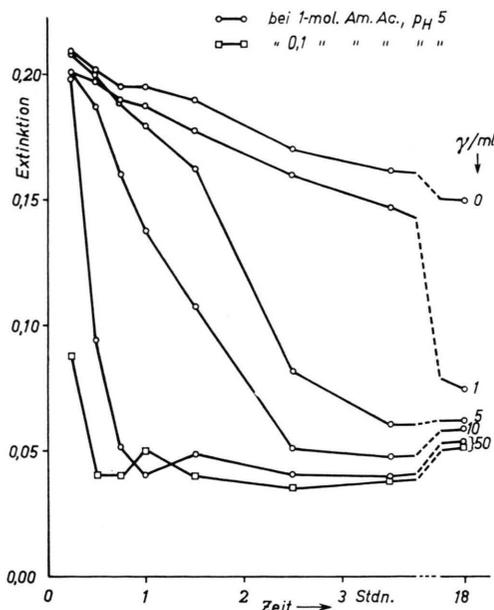


Abb. 1. Zeitliche Abnahme der Extinktion infolge Zellwandabbau durch Lysozym (Parameter: Lysozymkonzentration). Zeiss-Elko-Photometer, Rotlicht.

Lösung von Ammoniumacetat erhält man bei 0,1-m. Lösung vollständige Lysis der Zellen.

3. **Fixierung und Einbettung der Dünnschnitte.** Nach bewährten Verfahren<sup>29</sup> werden die Zellen in gepufferter salzhaltiger 1-proz.  $OsO_4$ -Lösung fixiert und in Vestopal<sup>30</sup> eingebettet. Durch Verlangsamung des Austausches von Aceton durch Vestopal über mehrere Tage erzielt man mit den die Bakterien bzw. Protoplasten enthaltenden Agarblöckchen (nach Osmium-Uranylacetat-Behandlung bei  $pH$  6) die brauchbarsten Resultate. Dünnschnitte wurden mit Glasmessern und verschiedenen Mikrotomen (nach Vogell, nach Porter-Blum und LKB-Ultratome) hergestellt. Serienschnitte können mit dem Ultratom regelmäßig erhalten werden und sind in der Regel gleichmäßig dick: erstens weisen die Schnitte auf Wasser schwimmend im reflektierten Licht den gleichen Grauton auf, zweitens zeigen sie im Elektronenmikroskop etwa den gleichen Kontrast gegenüber der Trägerfolie (Formvar bzw. Mowital F\* + Kohle). Daher läßt sich aus vollständigen Serienschnitten durch kugelförmige Gebilde aus deren Durchmesser und der Schnittzahl die Schnittdicke (z. B. von 200 Å oder mehr) errechnen.

4. **Die Spreitung von DNS-haltigem Material in Proteinfilmern (Protoplasten).** Sie wird in gleicher Weise wie bei extrazellulärer reiner DNS vorgenommen<sup>19, 31, 32</sup> (Abb. 2). Sie bietet gegenüber den Verfahren, reine proteinfreie DNS darzustellen<sup>33, 34</sup> Vorteile<sup>35</sup>. Dieses Vorgehen wird als Standard-Methode bezeichnet. Das Protoplasten-Präparat wird in 1-m. Ammoniumacetat,  $pH$  5, ohne weitere Reinigung, also mit Lysozym und Zellwandbruchstücken, mit 1-m. Ammoniumacetat,  $pH$  7, um das 10-fache, und mit Cytochrom c, 0,01% Endkonzentration, im gleichen Medium auf maximal das 100-fache verdünnt. Dadurch erreicht man, daß die Protoplasten nach der Spreitung sicher einzeln liegen. Die Spreitung erfolgt im Langmuir-Trog auf 0,1-m. Ammoniumacetat,  $pH$  7, wobei die spreitfähige Suspension (0,25 ml) von der wasserbenetzten Glasfläche eines Objektträgers als Ablauframpe auf 550  $cm^2$  Wasseroberfläche abgeschwemmt wird<sup>31</sup>. Nach Ausbreitung des Films wird er auf 300  $cm^2$  (entsprechend 1,2  $m^2/mg$  Cytochrom c) langsam bis zu einem Schub von 0,1 bis 0,3 dyn/cm komprimiert. Die geringe Konzentration der Protoplasten ergibt weder eine Filmvergrößerung noch Änderungen in den Kraft/Flächenkurven<sup>35</sup>. Der Film ist dann für längere Zeit stabil und kann durch Adsorption an die Kohleschicht einer horizontal gehaltenen, befilmten Objektblende zum Elmiskop I (Siemens-Elektronenmikroskop) übertragen werden. Auch

<sup>27</sup> B. W. CATLIN u. L. CUNNINGHAM, J. gen. Microbiol. **19**, 528 [1959].

<sup>28</sup> H. J. ROGERS u. H. R. PERKINS, Nature [London] **184**, 520 [1959].

<sup>29</sup> A. RYTER, E. KELLENBERGER, A. BIRCH-ANDERSON u. O. MAALOE, Z. Naturforschg. **13b**, 597 [1958].

<sup>30</sup> A. RYTER u. E. KELLENBERGER, J. Ultrastructure Res. **2**, 200 [1959].

\* Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt a. M.

<sup>31</sup> A. KLEINSCHMIDT u. R. K. ZAHN, Z. Naturforschg. **14b**, 770 [1959].

<sup>32</sup> A. KLEINSCHMIDT u. R. K. ZAHN, IV. Internat. Kongr. Elektronenmikroskopie, Berlin 1958, Bd. II, 115 (1960).

<sup>33</sup> C. E. HALL u. M. LITT, J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**, 1 [1958].

<sup>34</sup> C. E. HALL, Ann. New York Acad. Sci. **81**, 723 [1959].

<sup>35</sup> A. KLEINSCHMIDT, III. Internat. Kongr. grenzflächenaktive Stoffe, Köln 1960, S. 128 (1961).

hier ist die Isopentan-Methode nützlich<sup>36</sup>: Entfernung des Wassertropfens durch Äthanol 30 Sek., dieses durch Isopentan (99% rein) 10 Sek., lufttrocknen (s. Abb. 2). Die freie Fläche der Objektblende ist 1,0,1 Millimeter.

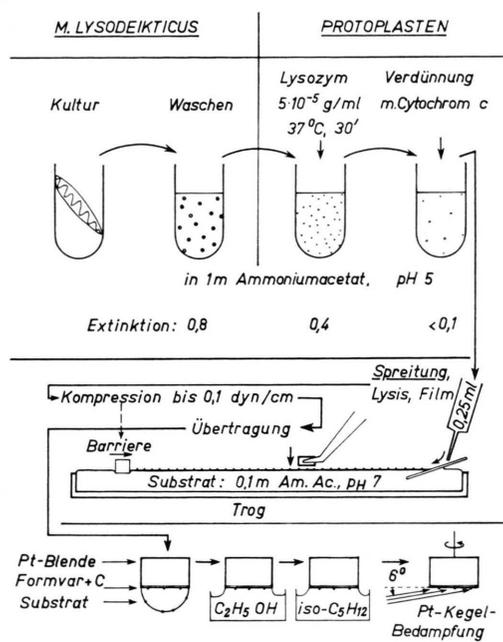


Abb. 2. Präparationsschema für die elektronenmikroskopische Darstellung von gespreiteten Protoplasten.

Da sich im Ausgangspräparat ca.  $10^8$  Protoplasten pro ml befinden, ergibt sich aus den obigen Daten in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß pro Objektblende im Mittel größenordnungsmäßig 1 gespreiteter Protoplast aufgenommen wird. Aus Vorversuchen ergab sich, daß der Cytochrom-c-Film gleichmäßig mit Protoplasten besetzt ist. Die Platinbedampfung wird durch Rotation des Objekts allseitig unter einem flachen Winkel von 6 bis 10 Grad (Abstand 13 cm Objekt-Bedampfungsquelle) vorgenommen (Kegelbedampfung<sup>37</sup>). Elektronenmikroskopische Aufnahmen werden in der Regel bei 8000-facher (Übersichtsaufnahme) oder 80 000-facher Vergrößerung (hochauflösende Aufnahmen) auf Perutz-Kontrast-Platten gemacht.

5. Herstellung der DNS aus *M. lysodeikticus*. Wie vorher angegeben, werden zunächst Protoplasten dargestellt. Solange sie intakt vorliegen, bleibt

auch die darin befindliche DNS intakt. Jedoch ist zu beachten, daß die Protoplasten zerfallen, und zwar um so schneller, je unphysiologischer das umgebende Medium ist. Sind sie erst einmal zerfallen, so attackieren die dabei frei gewordenen Enzyme u. a. auch die makromolekulare Struktur. Daher ist es sehr wichtig, mit der Auflösung der Protoplasten möglichst gleichzeitig die DNS-abbauenden Enzyme (Desoxyribonucleasen), die schon in geringen Konzentrationen in freiem Zustand Aktivitäten entwickeln, zu hemmen. Das nächste Ziel ist die Denaturierung dieser Enzyme und ihre nachfolgende Abtrennung von den DNS-Makromolekülen. Leider sind die DNasen wie auch andere Proteine<sup>38, 39</sup>, in Gegenwart von DNS besonders stabil. Nach allen Erkenntnissen ist es einleuchtend, daß eine DNS-Darstellung ohne Störung durch DNase-Angriff nur angenähert erreicht werden kann, und zwar:

### 1. Durch Einstellung eines geeigneten $p_H$ -Wertes

Wir wählten  $p_H$  7. Die sauren DNasen sind dabei teilweise gehemmt. Eine weitere Hemmung erfahren sie durch Salzzusatz.

### 2. Durch Anwendung von Komplexon

Die neutralen DNasen bedürfen des  $Mg^{2+}$  für ihre Aktivität. Dieses wird durch Äthylendiamintetraacetat (EDTA) komplex gebunden.

### 3. Durch Anwendung von Detergens

Natrium-dodecylsulfat dissoziiert DNS-Protein-Verbindungen, also auch DNS-DNase-Komplexe. Es denaturiert ferner Proteine.

### 4. Durch Anwendung von Hitze

Reine Bakterien-DNS besitzt einen scharfen Schmelzpunkt, unterhalb dessen sie thermostabil ist<sup>40</sup>. Da dieser Schmelzpunkt eine Funktion des Guanin-Cytosin-Gehaltes ist und die DNS aus *M. lysodeikticus* besonders reich an dieser Basenkombination ist  $[(A+T)/(G+C)=0,4$ <sup>41, 42</sup>], darf man mit einer hohen Hitzestabilität rechnen (ca. 80 °C). Temperaturen von 65 °C dürften zur Denaturierung der Fermentproteine beitragen, ohne die DNS zu schädigen.

Aus diesen Überlegungen wurde bereits früher<sup>43</sup> ein hier modifiziertes Verfahren entwickelt:

#### Bereitung einer Lösung A-

1 Vol. Äthylendiaminotetraacetat-di-natriumlösung 8-proz. + 1 Vol. Na-dodecylsulfat\* als 10-proz. Lösung in 40-proz. Äthanol.

Das Ganze wird gemischt und mit  $K_2CO_3$  neutralisiert ( $p_H$  7,0  $\pm$  0,2) + 8 Vol. dest. Wasser.

<sup>36</sup> Nach D. PETERS: vgl. l. c. <sup>31</sup>.

<sup>37</sup> L. REIMER, Elektronenmikroskopische Versuchs- u. Präparationsmethoden, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959, S. 186.

<sup>38</sup> J. P. GREENSTEIN u. M. L. HOYER, J. biol. Chemistry **82**, 457 [1950].

<sup>39</sup> G. ZUBAY u. P. DOTY, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **23**, 213 [1957].

<sup>40</sup> N. SUEOKA, J. MARMUR u. P. DOTY, Nature [London] **183**, 1429 [1959].

<sup>41</sup> K. Y. LEE, R. WAHL u. E. BARBU, Ann. Pasteur **91**, 212 [1956].

<sup>42</sup> J. JOSSE, A. D. KAISER u. A. KORNBERG, J. biol. Chemistry **236**, 864 [1961].

<sup>43</sup> G. KIEFER, R. KIEFER, G. ZAHN u. R. K. ZAHN, Biochem. Z. **334**, 49 [1961].

\* Den Deutschen Hydrierwerken GmbH und Herrn Dr. H. LANGE, Henkel u. Co., Düsseldorf, danken wir für das Präparat (Texapon K 12 umkrst.).

Die Lösung wird jetzt erwärmt, bis der gesamte Alkohol entwichen ist und dann auf ca. 100 °C gebracht.

#### Lösung B

2,5 Vol. Protoplasten-Suspension (ca.  $2 \cdot 10^8$  Pr./ml) in einen großen Erlenmeyer-Kolben mit hitzebeständigem Nichtmetall-Rührer geben.

7,5 Vol. dest. Wasser zufügen, rasch Rührer einschalten, schnell 100 °C heiße Lösung A zugeben und in ca. 5 Sek. homogen rühren. Dabei muß heftiges Wirbeln vermieden werden.

Sollte die spezifische Viskosität (bei ca. 23 °C) über 3 liegen, so wird mit 5-proz. Detergens-Lösung entsprechend verdünnt. Zu der so eingestellten Lösung wird unter vorsichtigem Rühren NaCl zugefügt, bis eine Endkonzentration von 10% erreicht ist. Bei -2 bis 0 °C wird ca. 15 Stdn. gehalten. Die sich abscheidenden groben Schollen gelben lipoiden Materials werden entfernt. Ein Niederschlag aus denaturiertem Protein und Dodecylsulfat wird durch langsame Filtration (nicht forcieren!) abgetrennt (KS-Filter-schichten Fa. Seitz).

Im klaren Durchlauf befinden sich: fast alle DNS, etwas RNS und Protein sowie viele niedermolekulare Anteile der Protoplasten.

Soweit hat die bisher beschriebene Methode die DNS weitgehend vor enzymatischem Angriff geschützt, der Gefahr der mechanischen Zerkleinerung der fadenförmigen Molekeln kann aber nicht annähernd in gleichem Maße begegnet werden. Jedesmal wenn die DNS-Molekeln einem Strömungsgradienten unterworfen werden (Strömen, Rühren, Filtrieren, Zentrifugieren usw.), zerbrechen sie in kleinere Stücke. Diese haben eine charakteristische Längenverteilung, bei denen in günstigen Fällen die mittleren Längen der einzelnen Banden im Verhältnis ganzzahliger Vielfacher zueinander stehen<sup>26, 31, 44</sup>. Damit ergibt sich auch eine Erklärung für die relativ einheitlichen mittleren Mol.-Gew. der meisten beschriebenen DNS-Sorten.

Für die weitere Reinigung der DNS stellt sich hier das Problem: mit wieviel Schritten wird das Endziel erreicht und wie weit wird bis dahin die mittlere molekulare DNS-Länge abgesunken sein?

Für uns war es wichtig, möglichst die morphologische Kontinuität von den fädigen Gebilden der Protoplasten bis zu den möglichst reinen Präparaten zu demonstrieren.

Wir haben daher das klare Filtrat in kleinen Portionen in -5 °C kaltem 60-proz. Äthanol eingegossen, um die DNS zu fällen. Das fädige Material, das möglichst feinflockig und ohne Verklumpung ausfallen soll, wird noch mehrmals mit frischem 60-proz. Alkohol gespült, um alles Reagenz zu entfernen, dann nach vorsichtigem Ablauflassen ein Aliquot in 1-m. Ammoniumacetat gelöst und wie bei anderen Präparaten<sup>31</sup> zur Elektronenmikroskopie verwendet (Präparat L<sub>1</sub>).

Der Rest des Gefällten wird in 1% NaCl + 0,1% EDTA gelöst, mit Detergens bis zu 5% und NaCl ca. 10% versetzt ( $p_H$  5)<sup>31</sup> und dann in der Kälte neuerlich langsam (ca. 10 Stdn. lang) filtriert. Der klare Durchlauf wird wie bei L<sub>1</sub> mit kaltem Äthanol gefällt, gewaschen (Präparat L<sub>2</sub>) und zur elektronenmikroskopischen Darstellung verwendet.

Trocknung nach Spülen mit absolutem Alkohol und anschließendem Spülen mit Äther in der Kälte ist möglich. In getrocknetem Zustand in der Kälte aufbewahrt, verliert das Präparat im Laufe von Monaten an mittlerer Länge, besonders bei den extrem langen Fäden, und zeigt zunehmend Denaturierungsstellen. Auch in gelöstem Zustand fanden wir bisher keinen Weg, den makromolekularen Charakter über Monate unverändert zu erhalten.

Hydrolyse und Chromatographie zeigten keinen Uracil-Flecken (RNS-Gehalt unter 4%) und nur einen Glycin-Flecken (Proteingehalt unter 3%).

Nach Behandlung mit DNase I (Worthington), 5 µg/ml,  $p_H$  7, 0,05-m.  $Mg^{2+}$ , 0,005-m.  $Ca^{2+}$  geht die Säurefällbarkeit spätestens nach 2 Stdn. verloren. Die Feulgen-Reaktion ist stark positiv. Es handelt sich bei dem Präparat L<sub>2</sub> also um eine relativ reine DNS.

## Resultate und Diskussion

### 1. Dünnschnitte

Durch Züchtung von Bakterien in NaCl-haltigem Nährmedium<sup>29</sup> erhält man intrazellulär kondensierte, zentral liegende Regionen gegenüber dem randständigen Cytoplasma. Sie sind durch das Fehlen von Ribosomen ausgezeichnet und haben kleinere elektronenoptische Dichte als das Cytoplasma. Dies trifft auch für Staphylokokken zu<sup>26</sup>. Die Orte geringen mittleren Kontrasts kann man mit „Nucleoplasma“ oder Nuclearregion bezeichnen. Durch die große Formänderung des Bakterienkerns in einzelnen Zellindividuen (z. B. in Ruhe- und Wachstumsstadien, nach Phageninfektion<sup>45</sup>, nach Chloramphenicol-Behandlung<sup>46</sup>) und der großen Konzentrations-Unterschiede im Cytoplasma (hauptsächlich Proteine und RNP-Partikel) treten regelmäßig keine definierten, scharf umgrenzten Bezirke auf. Man erhält auch oft bei Bakterienschnitten nur Andeutungen von Nuclearregionen, zuweilen erkennt man nur einzelne Fadenaggregate. Bei in Teilung begriffenen, rasch wachsenden Bakterien können auch die zentralen Orte durch ein kontrastreiches, oft granulär oder nahezu homogenes cytoplasmatisches Material so

<sup>44</sup> E. BURGI u. A. D. HERSHEY, Biol. Proc. 1961, 148.

<sup>45</sup> E. KELLENBERGER, Growth of Bacteriophage, 9. Sympos. Soc. gen. Microbiol., S. 11, (1960).

<sup>46</sup> E. KELLENBERGER, A. RYTER u. J. SÉCHAUD, J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 671 [1958].

überdeckt werden, daß weder Einzelfäden noch Nuclearregionen deutlich erkennbar sind. Nur eine cytoplasmatische Aufhellung, bzw. in extrem dünnen Schnitten eine Verflechtung von granulärem und fädigem Material, deutet den intrazellulären DNS-Pool an<sup>26</sup>. Das Erscheinungsbild des Bakterienzellkerns hängt nicht allein von der unterschiedlichen intracytoplasmatischen Materialfüllung, also von Wachstumsphase und Syntheseleistung der Zelle ab. Es überlagern sich die Eigenheiten der kontrastgebenden, mehr oder weniger spezifischen Fixierung und Einbettung, die Einflüsse der Schnittdicken und Eigenschaften der elektronenmikroskopischen Abbildung.

Die Chancen, einzelne DNS-Fäden im Bild zu erkennen, sollen am einfachen Modell etwas näher abgeschätzt werden. Zur Vereinfachung sei angenommen, daß es sich erstens um statistisch ungeordnete gerade Fäden ohne gegenseitige Behinderung handelt, die zweitens sehr lang im Vergleich zur Schnittdicke  $D$  sind. Die in Abb. 3 dargestellten Fäden haben auf  $D$  bezogene Bildlängen von  $l/D = \text{tg } \vartheta$ .

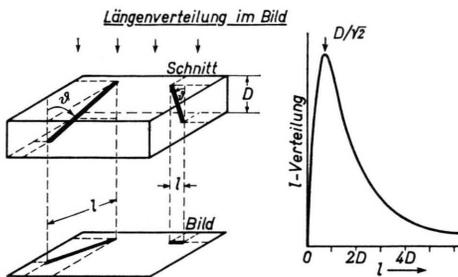


Abb. 3. Schema der Abbildung von Fäden in Dünnschnitten (ohne Berücksichtigung der elektr.-mikr. Vergrößerung) und berechnete Bildlängenverteilung (Bildlänge in Einheiten der Schnittdicke  $D$ ).

Deren Verteilung sei gesucht. Die statistische Anordnung ohne gegenseitige Behinderung bedeutet, daß keine Lage im Schnitt bevorzugt ist. Daraus folgt die Richtungsverteilung (die infinitesimale Wahrscheinlichkeit  $dW(\vartheta)$  dafür, daß der Faden im Schnitt einen Winkel zwischen  $\vartheta$  und  $\vartheta + d\vartheta$  einnimmt, dividiert durch den infinitesimalen Winkel  $d\vartheta$ ) aus einer geometrischen Überlegung als

$$\frac{dW(\vartheta)}{d\vartheta} = \frac{1}{2} \sin \vartheta. \quad (1)$$

Die Bildlängenverteilung ergibt sich dann mit der Beziehung

$$\frac{dW(l/D)}{d(l/D)} = \frac{dW(\vartheta)}{d\vartheta} \cdot \frac{d\vartheta}{d(l/D)}$$

zu (vgl. Abb. 3)

$$\frac{dW(l/D)}{d(l/D)} = \frac{1}{2} \frac{l/D}{\sqrt{[1 + (l/D)^2]^3}}. \quad (2)$$

Die Längen  $l = D/\sqrt{2}$ , entsprechend einem Winkel  $\vartheta = 35^\circ$ , sind die häufigsten. Fäden, die länger als einige Vielfache der Schnittdicke sind, würde man nur selten finden. [Auch hier erweist es sich als nützlich, die Schnittdicken anzugeben. Bei ungenügender präparativer Differenzierung (dichte Packung, dichtes Zwischen- oder Anlagerungsmaterial) und sehr dünnen Schnitten kann u. U. das fädige Aussehen im Bild zugunsten einer Granulierung oder einer nahezu homogenen Struktur verlorengehen, zumal außerdem der Bildkontrast mit wachsendem  $\vartheta$  abnimmt.] Der Nachweis oder gar die objektgetreue Abbildung eines querschnittenen Fadens ( $\vartheta \approx 0$ ) ist ebenfalls ein seltenes Ereignis. Denn für die echte Querschnittsabbildung muß man bei einer elektronenoptischen Auflösung  $\varepsilon$  fordern, daß  $\vartheta$  nicht größer ist als etwa  $\varepsilon/D$ . Die Wahrscheinlichkeit dafür ist aber nach Gl. (1) ( $\varepsilon \ll D$ ):

$$W(\varepsilon/D) = 2 \int_0^{\varepsilon/D} \frac{1}{2} \sin \vartheta \, d\vartheta \approx \frac{1}{2} (\varepsilon/D)^2.$$

Hieraus ergibt sich, daß z. B. für  $D = 500 \text{ \AA}$  und  $\varepsilon = 10 \text{ \AA}$  unter 5000 angeschnittenen Fäden nur eine reelle Querschnittsabbildung im Mittel möglich ist.

Die bei der Ableitung gemachten Annahmen sind im Bakterienzellkern nur ungenügend erfüllt. Weder ist die Lage der Fadenstücke voneinander unabhängig, noch sind die Fäden gerade. Der letzte Umstand läßt jedoch keine wesentliche Änderung im Typ der Längenverteilung erwarten. Dagegen könnte die wechselseitige Behinderung infolge hoher DNS-Konzentration in der Nuclearregion bei den einzelnen Bakterien zu teilweise geordneten Aggregaten (Strängen) Anlaß geben, wie sie oft auch gefunden werden (Abb. 4\*), deren allgemeiner Verlauf in Serienschnitten verfolgt werden kann (Abb. 5).

Nimmt man den Durchmesser eines intrazellulären DNS-Fadens (einschließlich angelagerter Proteine und „Färbesubstanz“) mit  $30 \text{ \AA}$  an, können bis zu ca. 10 Fadenschichten in einem Schnitt von  $300 \text{ \AA}$  aufeinander liegen. Bei dieser dichten Packung wird es nicht möglich sein, die Einzelfäden zu erkennen, da kaum noch ein Kontrast zur unmittelbaren Umgebung vorhanden ist. Umgekehrt kann

\* Abb. 4–9 s. Tafel S. 736 a–d.

man bei Erkennbarkeit von Einzelfäden sagen, daß diese in einer anderen Substanz bzw. Flüssigkeit locker eingebettet sind.

Bei der Kenntnis des durchschnittlichen DNS-Gehaltes einzelner Bakterien, des aus Serienschnitten erhaltenen Volumens der Nuclearregion und einigen Annahmen über den Fixierungsprozeß, der mit einer Proteineinlagerung an die Fäden verbunden ist<sup>17</sup>, kann man auf die Raumbesetzung schließen. Die Berechnung des DNS-Gehaltes von *Micrococcus lysodeikticus*<sup>6</sup> ergibt ca.  $10^{-14}$  g pro Zelle, die in einem durchschnittlichen Volumen (z. B. nach Abb. 5) von  $3 \cdot 10^{-14}$  cm<sup>3</sup> untergebracht sind. Bei einem spezifischen Volumen von ca. 1,5 cm<sup>3</sup>/g (unter Einschluß eingelagerter osmiophiler Proteine) erhält man an Hand von Aufnahmen etwa das Vierfache des für die DNS-Makromoleküle zur Verfügung stehenden Raums. Es ist wohl denkbar, daß auch darin sich die Pleomorphie des Nucleus ausdrückt; physiologisch oder artifiziell bedingtes Verhalten der Fadenmoleküle kann zu Heterogenitäten in der Raumerfüllung führen. Nach den seither erhaltenen Untersuchungsergebnissen scheint jedoch bei sehr verschiedenartigen Bakterien eine gleichförmige Erfüllung dieses Raumes, gewissermaßen durch flotierende Fäden, die Regel zu sein. Bei rasch wachsenden Staphylokokken, in der log-Phase der Vermehrung, werden diese Räume mit cytoplasmatischem Material, insbesondere Ribosomen, zusätzlich angereichert<sup>27</sup>.

## 2. Gespreitete Protoplasten

Da relativ stabile Zellwände von Bakterien oder Reste davon eine Ausbreitung intrazellulären makromolekularen Materials beim Spreiten verhindern, ist die Umwandlung von kugeligen Teilchen in stärker aufgelockerte Gebilde nur mit zellwandfreien Protoplasten möglich. Der rasche und vollständige Abbau der Zellwand durch Lysozym gelingt besonders gut bei *Micrococcus lysodeikticus*<sup>20, 28</sup>. Schon die Darstellung dieser Protoplasten in Dünnschnitten ergibt eine unterschiedlich starke Auflockerung der Nuclearregion (Abb. 6). Dies bedeutet, daß der DNS-Inhalt in eine gegenüber intakten Bakterien (Abb. 5) aufgelockerte Form übergehen kann, wenn die raum-

beengende Zellwand ganz oder teilweise entfernt ist. Dies wurde nicht nur an *Micrococcus lysodeikticus*, sondern auch an anderen Bakterien (z. B. *E. coli*-Sphäroplasten<sup>47</sup>) gefunden. Nach der Fixierung sind bis zur Einbettung zusätzlich kleine intrazelluläre Materialverschiebungen — trotz der anfangs angewendeten hypertonen Lösung — möglich.

Eine viel weitergehende Auflockerung gelingt bei Anwendung des Spreitungsverfahrens nach der Standardmethode (Abb. 7). Man erhält von jedem gespreiteten Protoplasten einen zusammenhängenden zweidimensionalen „DNS-Knäuel“, dessen Durchmesser etwa das Zehnfache des ursprünglichen Protoplasten beträgt. Die Spreitungskräfte sind in der Regel geringer als die Stabilität des DNS-Fadensystems, da Brüche sehr selten beobachtet werden. Dieses Fadensystem kann vor allem in den Außenzonen untersucht werden (Abb. 8). Die Bilder zeigen regelmäßig eine zentrale vielfache Überlagerung von Einzelfäden, die in der Peripherie des Knäuels rückläufig sind. Diese Strukturen werden durch die Spreitung verursacht, da man in Suspensionen bis vor dem Abschwemmen nur kugelige Protoplasten, und sehr selten Zelltrümmer im Phasenkontrastmikroskop erkennt. Von letzteren können die gelegentlich zwischen einzelnen gespreiteten Protoplasten liegenden DNS-Fäden herrühren.

Die peripher stets vorhandenen Schlaufen können breit (Abb. 7) oder in engen meist verdrillten Stücken zu liegen kommen (Abb. 8). Diese verdrillten Bereiche müssen vor der endgültigen Ausbildung zum zweidimensionalen Film entstanden sein, da eine Rotation zweier Fäden um ihre gemeinsame Längsrichtung nicht möglich ist, wenn sie im oberflächen-denaturierten Proteinfilm fixiert sind. Zwei verdrillte DNS-Fäden (Abb. 8 a) ergeben eine Zick-Zack-Linie, wie sie ähnlich als Helixstruktur bei RNS-haltigen Virusarten (Mumps-, Newcastle- und Sendai-Virus<sup>48, 49</sup>) mit der Methode des Negative Staining<sup>50, 51</sup> gefunden wurde. Ihr mittlerer Durchmesser ist aber nicht einheitlich, man erkennt auch Schlaufen zweier Einzelfäden. Diese zeigen jedoch wohl keine weiteren Details mehr. Hier liegt auch die Grenze der bei Schräg- und Kegelbedampfung bisher erreichten Auflösung von Punktstrukturen:

<sup>47</sup> P. H. HOFSCHEIDER, Proc. Europ. Regional Conf. Electron Microscopy, Delft 1960, S. 1028 (Eds.: A. L. HOUWINK u. B. J. SPIT).

<sup>48</sup> R. W. HORNE u. A. P. WATERSON, J. Mol. Biol. 2, 75 [1960].

<sup>49</sup> R. W. HORNE, A. P. WATERSON, P. WILDY u. A. E. FARNHAM, Virology 11, 79 [1960].

<sup>50</sup> C. E. HALL, J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 1 [1956].

<sup>51</sup> H. E. HUXLEY, Stockholm Conference on Electron Microscopy 1956, S. 260 (1957).

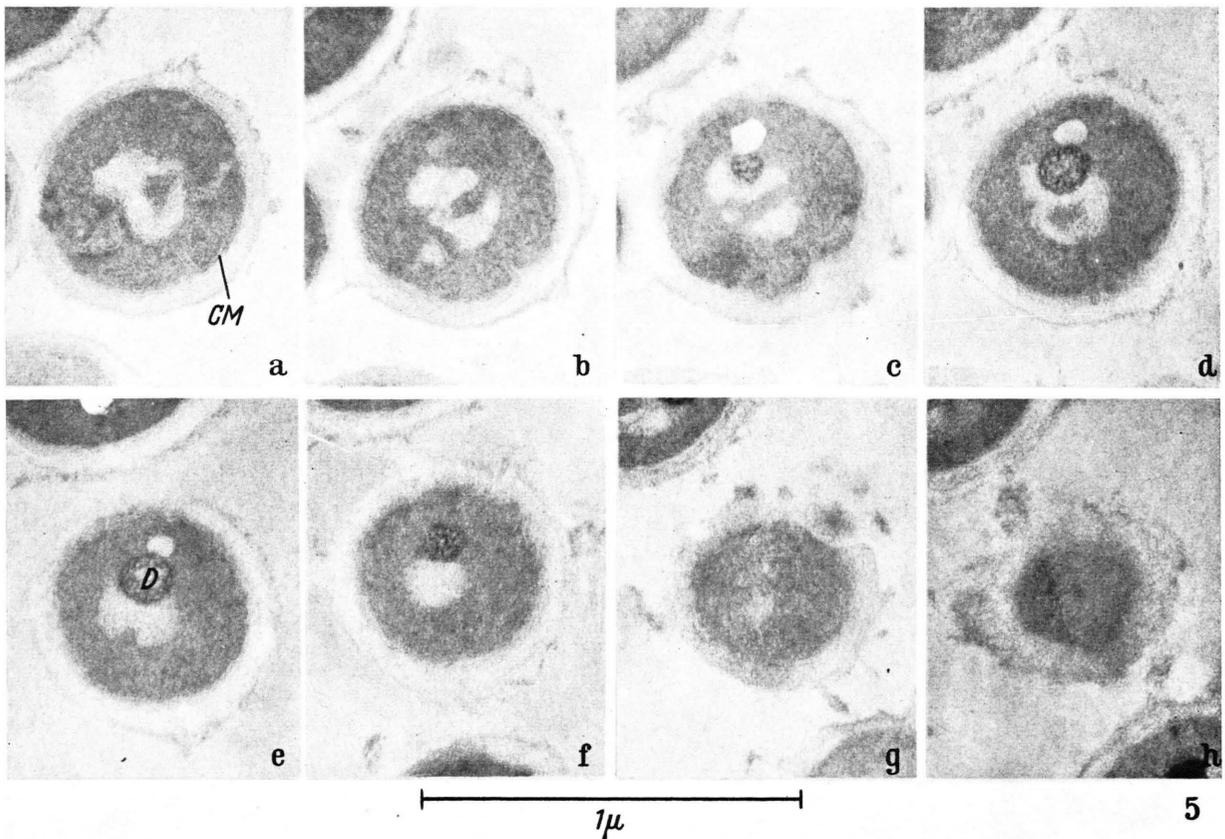
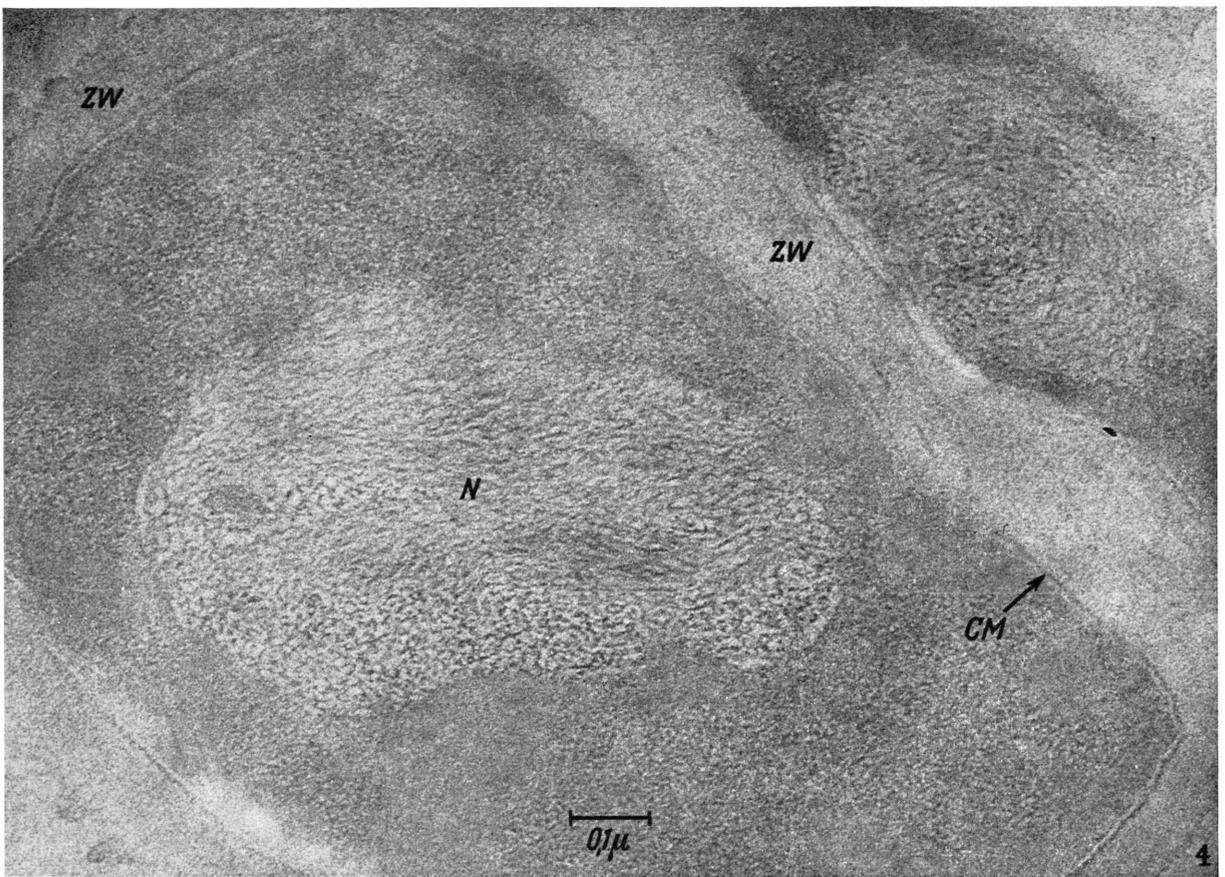


Abb. 4. Dünnschnitt von *Staphylococcus aureus*, Stamm S.A.B. in 1-m. NaCl enthaltendem Nährboden gewachsen. Vergrößerung: 110 000-mal. Schnittdicke ca. 200 Angström-Einheiten. ZW: Zellwand. CM: Cytoplasma-Membran. N: Nuclearregion.  
 Abb. 5. Serienschritte (a bis h) von *Micrococcus lysodeikticus*. Vergrößerung: 51 000-mal. D: Dichtes Körperchen. CM: Cytoplasma-Membran. Durchschnittliche Dicke ca. 270 Angström-Einheiten.

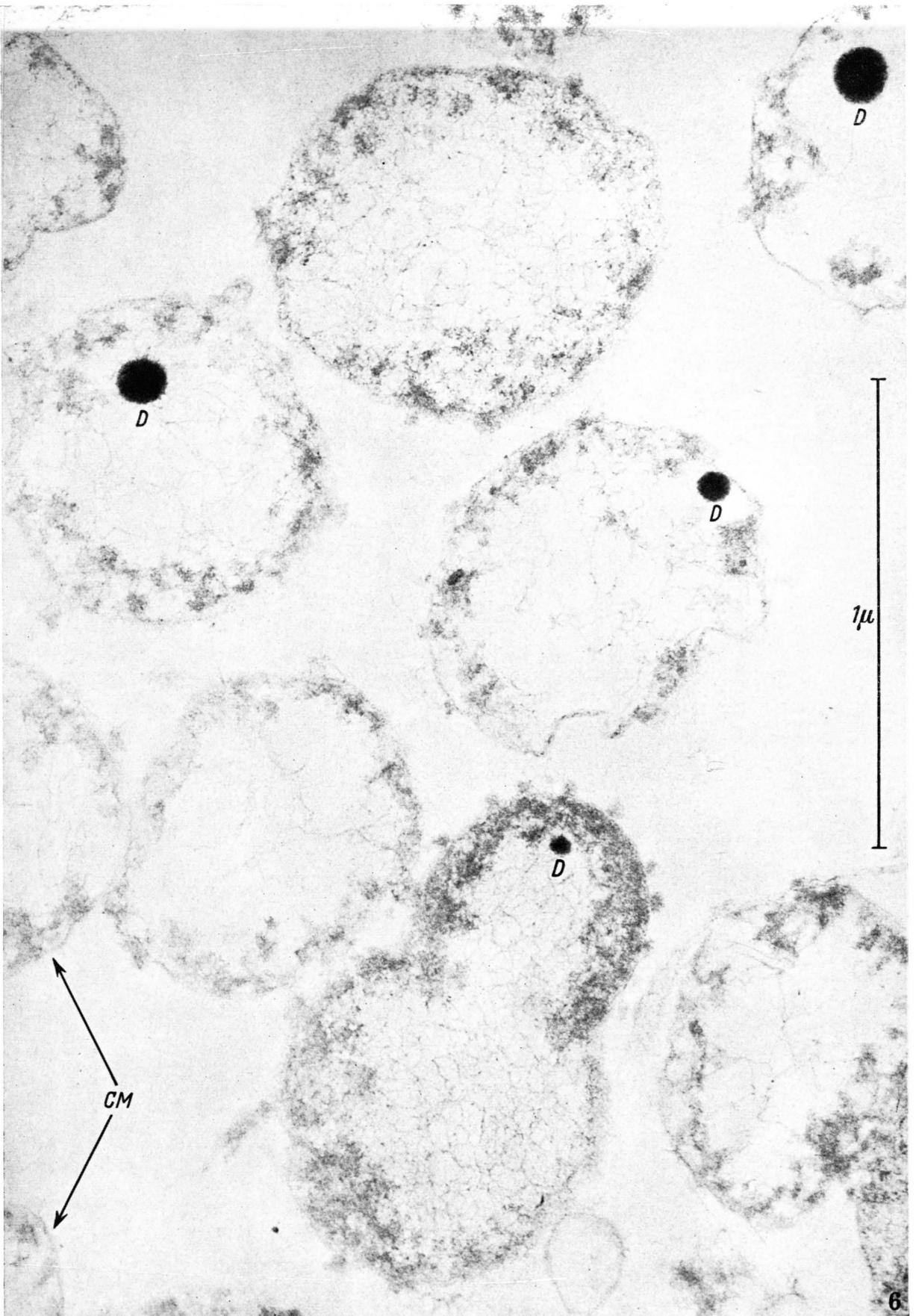


Abb. 6. Dünnschnitt von Protoplasten von *Micrococcus lysodeikticus*. Vergrößerung: 82 000-mal. CM: Cytoplasma-Membran. D: Dichtes Körperchen. Schnittdicke ca. 250 Angström-Einheiten. Wechselnder Gehalt an DNS-Fäden im Zentrum.

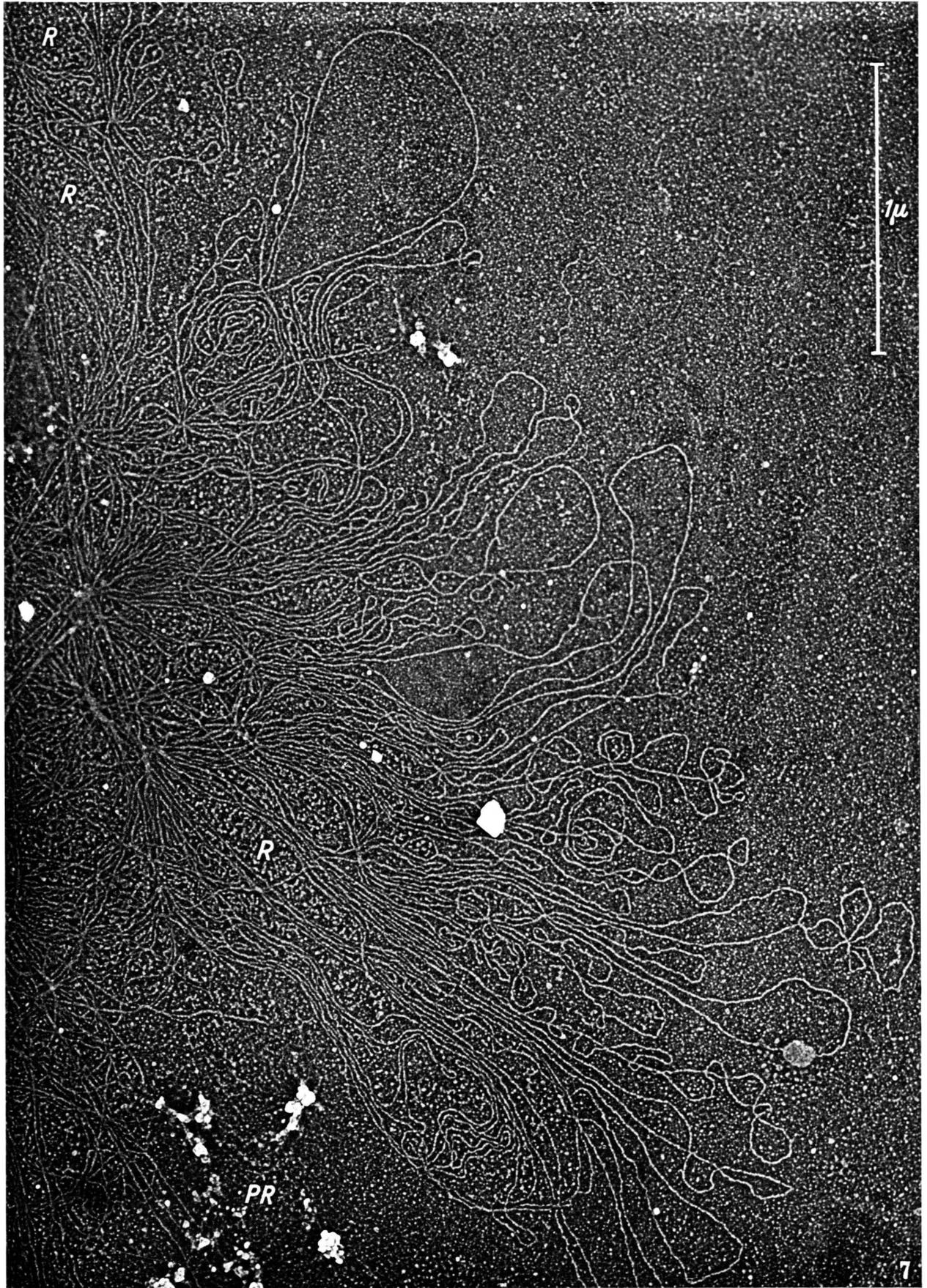


Abb. 7. Gespreiteter Protoplast. Ausschnitt. Vergrößerung: 52 000-mal. R: Ribosomen, PR: Protoplasten- und Zellwandreste. Breite Schlaufen in der Peripherie.

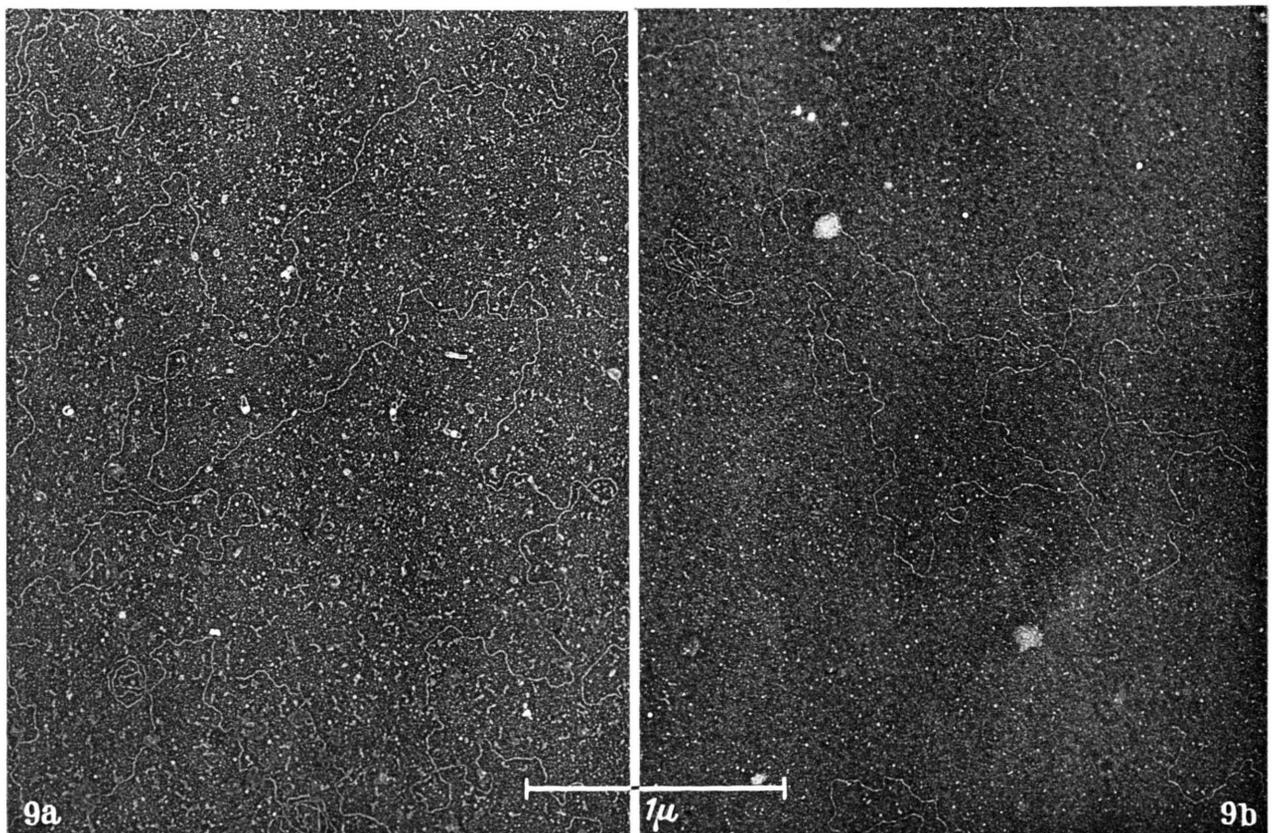
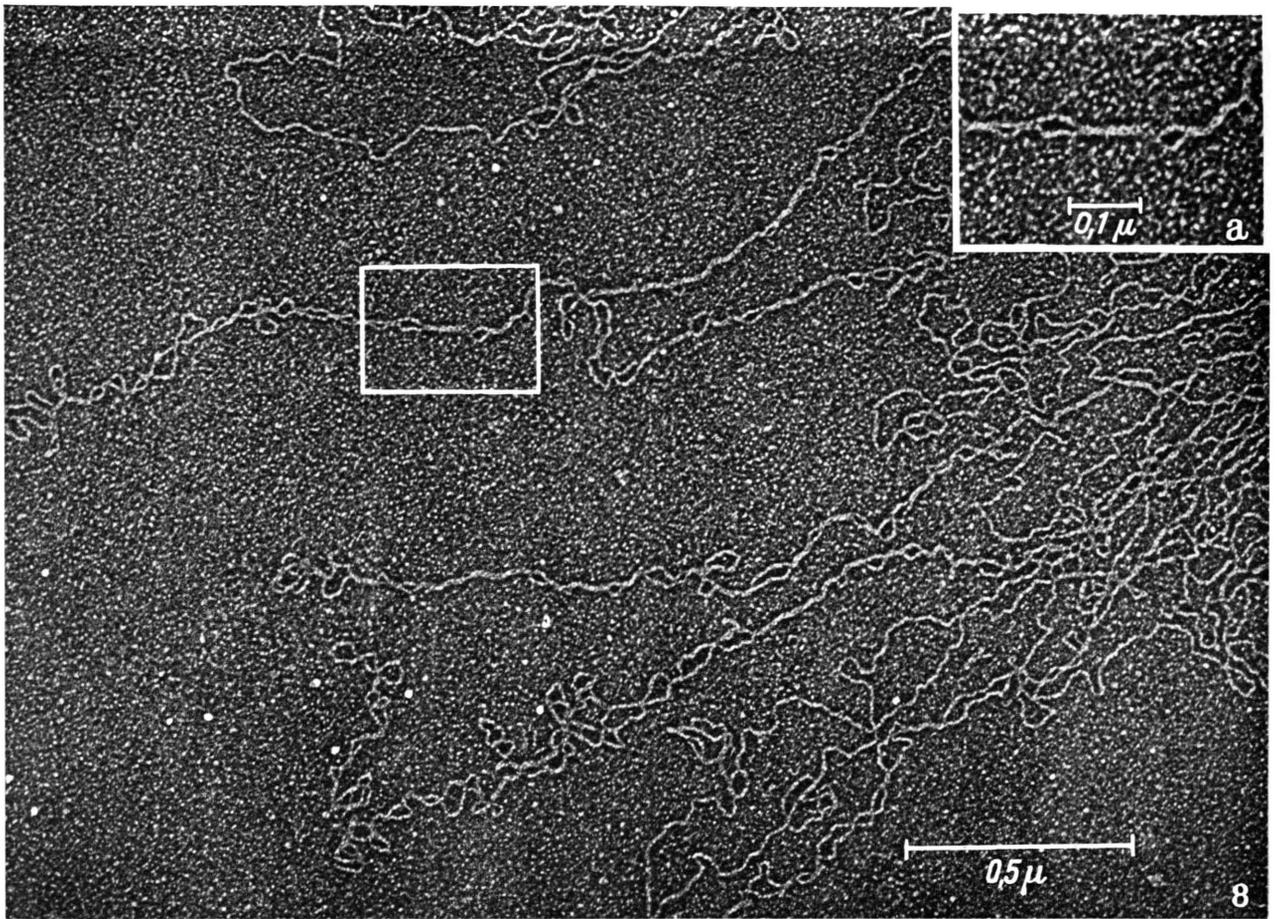


Abb. 8. Peripherie eines gespreiteten Protoplasten, Vergrößerung: 60 000-mal. Lang auseinander gezogene Fadenpaare, am Ende stets Schlaufen. Teilbild a: 96 000-mal. Verdrilltes DNS-Fadenpaar.

Abb. 9. Aus *Micrococcus lysodeikticus* gewonnene gespreitete DNS. Vergrößerung: 34 000-mal. a: Präparat L<sub>1</sub> schwach gereinigt. b: Präparat L<sub>2</sub> höher gereinigt.

Bei höheren Vergrößerungen stellen sich die Fäden als Spur von Platinkriställchen (mittlerer Durchmesser verschiedener Präparationen 15–20 Å) entlang dem kontrastarmen und daher unsichtbaren DNS-Faden dar. Daß die Durchmesser der Einzel-fäden verschiedener Präparationen variieren (70 bis 130 Å, vgl. Abb. 7 bis 9), ist eine Folge derjenigen Parameter der Pt-Kontrastierung (z. B. Mengenverteilung im Bedampfungsstrahl, effektiver Aufdampfwinkel), welche durch ihre schwer kontrollierbare Inkonzanz die pro Flächeneinheit auf dem Objekt deponierte Platinmenge verändern und zusammen mit den adsorptiven Eigenschaften des Objektes die für die Auflösung entscheidende Platin-Korngröße mitbestimmen. Sicher ist die Anlagerung von Proteinen oder ähnlichen Stoffen, wie sie natürlicherweise in den Protoplasten oder bei Zusatz von Cytochrom c vorkommen, nicht die ausschlaggebende Ursache für die Variation der queren Durchmesser. Dies ergaben viele Versuche an hochgereinigten DNS-Präparaten und Zugabe verschiedener Mengen von Cytochrom c und anderen Proteinen, wie Rinderserumalbumin<sup>31, 32</sup>. Ähnliche Grenzen der Auflösung ergeben auch Verfahren mit Phosphorwolframsäuren und Wolframat<sup>50–52</sup>.

Kontrolliert man, durch Variation der  $p_H$ -Werte zwischen 7 und 5, die Konstanz der einzelnen Präparationsschritte bezüglich des Ergebnisses mit der Standardmethode (s. Methodik 4), so erhält man nur bei der Lysozymeinwirkung  $p_H$  5 gespreitete Protoplasten, die entsprechend Abb. 7 auf zusammenhängender Fläche noch „vollständig“ sind. Bei Verschiebung der  $p_H$ -Werte zum Aktivitätsoptimum einiger Enzyme, insbesondere Nucleasen, hin treten mehr oder weniger auseinandergezogene Fäden auf. Die verschiedenen Versuche lassen sich tabellarisch zusammenfassen (Tab. 1):

Sobald man die Lysozymbehandlung oberhalb  $p_H$  5 vornimmt, erhält man Effekte, die erst bei der Spreitung sichtbar werden. Im Lichtmikroskop erkennt man nur Protoplasten (außer bei e). Unterhalb  $p_H$  5 treten mit Cytochrom c und DNS oder anderem Material nicht filmbildende Präzipitate in Lösung auf, so daß die Spreitfähigkeit der Suspension rasch abnimmt.

	Lysozym-wirkung		Spreitung auf Substrat (0,1-m.) $p_H$	Ergebnis
	bei $p_H$	Molar. Am. Ac.		
a	5	1	7	Protoplasten rund, begrenzt
b	7	1	7	Einzelne lange, auch kürzere Fäden
c	7	1	5	Einzelne lange, selten kürzere Fäden
d	5	1	5	Protoplasten rund, begrenzt
e	5	0,1*	7	Viele, oft zusammenhängende Fäden

Tab. 1. Versuch a = Standardmethode. Vor der Spreitung Verdünnung (1 : 100) und Cytochrom c-Zusatz (0,01%) bei gleichbleibender Molarität. \* Keine Protoplasten im Phasenkontrastmikroskop sichtbar, bei a–d sonst vorhanden.

Am.Ac = Ammoniumacetat.

Dieser  $p_H$ -abhängige weiterreichende Zerfall läßt sich wohl morphologisch nicht näher analysieren. Da dabei auch sehr lange DNS-Fäden zerkleinert werden, wird man hier eine Aktivierung von Desoxyribonucleasen (DNasen) in Betracht ziehen, beim Zerfall von Ribosomen auch Ribonucleasen frei werden<sup>53, 54</sup>. Da die Lösungen nur Ammoniumacetat als Lösungsmittel enthalten, sind solche Erscheinungen leicht zu verstehen auf Grund der bekannten Empfindlichkeit der Ribosomen gegenüber einem Defizit an  $Mg^{2+}$ <sup>55</sup>. Beim Zerfall von Protoplasten bei  $p_H$  7 werden latente RNase- und DNase-Aktivitäten frei, während bei  $p_H$  5 die Aktivität dieser zelleigenen Nucleasen noch gering ist. Während des Spreitungsvorgangs verändern sie die  $p_H$  7-Protoplasten so, daß im endgültigen Bild des Protein-Mischfilms die DNS auseinandergezogen, z. T. auch zu unterschiedlichen Bruchstücken verkürzt erscheint. Bei diesen Fäden sind ebenfalls in unterschiedlichem Maße Ribosomen und weiteres cytoplasmatisches Material in nächster Umgebung im Film verteilt. Nach der Lysozym-Einwirkung  $p_H$  5 lassen sich ebenfalls noch  $p_H$ -Verschiebungen bis 7 in der Protoplasten-Suspension vornehmen; diese haben aber dann keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Entknäuelung. Im Lichtmikroskop sind auch hier, bis zum Abschwemmen der Protein-

<sup>52</sup> H. E. HUXLEY u. G. ZUBAY, Proc. Europ. Regional Conf. Electron Microscopy, Delft 1960, S. 703, (Eds.: A. L. HOUWINK u. B. J. SPTT).

<sup>53</sup> D. ELSON, Biochim. Biophysica Acta [Amsterdam] **36**, 372 [1959].

<sup>54</sup> D. ELSON, Biochim. Biophysica Acta [Amsterdam] **27**, 207, 216 [1958].

<sup>55</sup> R. B. ROBERTS, Ann. New York Acad. Sci. **88**, 752 [1960].

lösung auf dem Substrat, stets intakte Protoplasten vorhanden.

In Analogie zur Wirkung natürlich vorhandener Nucleasen-Aktivitäten erhält man einen raschen Zerfall der DNS-Fäden zu sehr kurzen DNS-Stücken, wenn man Ribonuclease (10 bzw. 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $p_{\text{H}}$  7, 1-m. Ammoniumacetat) auf Protoplasten in Suspension einwirken läßt. Dabei sind nach den seither gewonnenen Abbildungen alle RNP-Partikel soweit abgebaut, daß sie nicht mehr morphologisch als typische Filmbestandteile in Erscheinung treten.

DNase (I, aus Rinderpankreas [Worthington], 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0,05-m.  $\text{Mg}^{2+}$ , 1-m. Ammoniumacetat  $p_{\text{H}}$  7, 22 °C) ruft bei sonst gleichen Ansätzen wie bei den RNase-Versuchen einen so intensiven Abbau der DNS-Fäden hervor, daß man schon nach 10 Min. Einwirkungszeit überhaupt keine Fadestücke mehr vorfindet. Selten treten nur bizarr aggregierte, stark denaturierte fädige Konglomerate auf, ähnlich denen beim kurzen Erhitzen der DNS in Lösung<sup>56</sup>.

### 3. Direkte Beziehungen intakter DNS-Fäden zu cytoplasmatischem Material

Man findet sie, an Hand zahlreicher Dünnschnitte und gespreiteter Protoplasten, weiter bestätigt<sup>22, 23</sup>. Der ganze DNS-Pool besteht, wie die zweidimensionale Ausbreitung im Proteinfilm zu zeigen vermag, wahrscheinlich aus nur einem oder einzelnen wenigen Fäden, da freie Enden selten sind und meist nur in Einzahl auftreten<sup>17</sup>. Paarig nahe beieinanderliegende Fadenenden, in einer (gedachten) Schlaufe, weisen mehr auf einen präparationsbedingten Abriß hin. Das kann durch die Oberflächenkräfte bei der Filmbildung oder bei der Adsorption an die Trägerfolie auftreten.

In Dünnschnitten verschiedenster Bakterien (z. B. *E. coli*<sup>1, 18, 29, 45</sup>, *Proteus*<sup>26</sup>, *Salmonella typhimurium*<sup>57</sup>, *Staphylococcus aureus*<sup>17, 26</sup>, Mikrokokken<sup>58</sup>, *Bacillus megaterium*, *subtilis* und *cereus*<sup>59-62</sup>, *Streptomyces*<sup>63</sup> u. a.) findet man, bei optimaler Fi-

xierung der Nuclearregion<sup>29</sup> am Rand der DNS-Pools vielfach auch Stellen, in denen Fadenmaterial in cytoplasmatische Bezirke überzugehen scheint. Nur an den Orten, wo dieses der Cytoplasmamembran bzw. der Zellwand dicht anliegt (Abb. 4), oder wo fadenfreie Bezirke ohne das Cytoplasma-Material vorhanden sind, fehlt der Kontakt. In der Zeitfolge von Zellteilungen, bei der Reduplikation der DNS, kann sich das sehr wahrscheinlich rasch ändern. Besonders in wachsenden und sich vermehrenden Keimen wird die Nuclearregion im Schnittbild auf Kosten einer diffus, z. T. auch granulär erscheinenden zentralen Zone von Cytoplasma verkleinert oder ganz überdeckt<sup>26</sup>. Hier scheinen also stärkere Wechselbeziehungen von DNS zu Cytoplasma zu bestehen, im „Ruhezustand“ oder bei Wachstumshemmung z. B. durch NaCl differenzieren sich die nucleären und cytoplasmatischen Regionen deutlich.

In zweidimensional ausgebreiteten Protoplasten im Proteinfilm findet man die Ribosomen nicht ausschließlich in der Peripherie. Sie liegen nicht nur zwischen DNS-Fäden oder -Strängen (Abb. 7), sondern sind auch in konzentrierter Form in flächigen Ansammlungen vorhanden, die durch DNS-Schleifen begrenzt sind<sup>17</sup>. Bei dichter Packung besetzen sie dann das ganze Areal, manchmal sind kleine kompakte Anhäufungen vorhanden, aus denen die Ribosomen in die Filmfläche zu treten scheinen. In anderen Arealen findet man kettenförmig aggregierte Gebilde. Diese können kurzen DNS-Stücken ähneln, lassen sich aber durch ihre Ketten-Glieder und Größenunterschiede meist deutlich davon abtrennen.

Die ribosomenhaltigen Anteile und weiteres cytoplasmatisches Material trägt zur Filmvergrößerung, in nächster Umgebung der DNS-Fäden bei. Dafür spricht auch eine um die Protoplasten befindliche Zone, die offensichtlich nicht dem Bild des Cytochrom-c-Films entspricht.

### 4. Isolierung von DNS aus Protoplasten von *Micrococcus lysodeikticus*

Der enzymatische Abbau von Bakterien erscheint als ein besonders schonender erster Schritt auf dem Weg

<sup>56</sup> D. LANG, A. KLEINSCHMIDT u. R. K. ZAHN, Proc. Europ. Regional Conf. Electron Microscopy, Delft 1960, S. 686 (Eds.: A. L. HOUWINK a. B. J. SPIT).

<sup>57</sup> A. BIRCH-ANDERSEN, IV. Internat. Kongr. Elektronenmikroskopie, Berlin 1958, Bd. II, 44 (1960).

<sup>58</sup> W. VAN ITERSON u. C. F. ROBINOW, J. Biophys. Biochem. Cytol. **9**, 171 [1961].

<sup>59</sup> P. C. FITZ-JAMES, J. Biophys. Biochem. Cytol. **8**, 507 [1960].

<sup>60</sup> W. VAN ITERSON, Proc. Europ. Regional Conf. Electron Microscopy, Delft 1960, S. 763 (Eds.: A. L. HOUWINK a. B. J. SPIT).

<sup>61</sup> W. VAN ITERSON, J. Biophys. Biochem. Cytol. **9**, 183 [1961].

<sup>62</sup> P. GIESBRECHT, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt., Orig. **176**, 413 [1959].

<sup>63</sup> D. A. HOPWOOD u. A. M. GLAUERT, J. Biophys. Biochem. Cytol. **8**, 267 [1960].

zur Freilegung von DNS aus *Micrococcus lysodeikticus* und anderen Bakterien zu sein<sup>20, 41, 64</sup>. Zur Reindarstellung wurde der Zellwandabbau durch Lysozym kombiniert mit der Proteinabtrennung durch Dodecylsulfat. Je schonender dies durchgeführt wird, umso längere Fäden darf man dabei erwarten. Das je nach Erfordernis mit verschiedenen Präparationsschritten vorgehende Verfahren<sup>43</sup> läßt sich mit der morphologischen Darstellung von DNS-Fäden in verschiedenen Reinigungsstufen verbinden. Die ersten Schritte (einmalige Proteinabtrennung) zeigen noch reichlich zwischen den DNS-Fäden liegende, teils aggregierte Partikel (Abb. 9 a), die bei weiterer und eventuell wiederholter Dodecylsulfat-Behandlung ganz entfernt werden können. Dabei bleiben die DNS-Fäden aber sehr lang, und länger als bei früheren Präparationen<sup>19, 26, 35</sup>.

Andererseits entfernt man sich mit jedem Reinigungsschritt immer mehr von der ursprünglichen Länge der Einzelfäden der Protoplasten. Sie sind jedoch als ideale unverzweigte Fäden in beiden Fällen (Abb. 7, 8 und 9) morphologisch untereinander gleich. Es besteht deshalb kein Grund, an der Identität der Protoplasten-DNS-Pools im Spreitungsbild und daraus isolierter DNS zu zweifeln.

Die mit der Spray-Methode auf frisch gespaltenem Glimmer (nach HALL<sup>33, 34, 65, 66</sup>) erhaltenen Abbildungen ergeben ähnliche Auflösungen, wenn auch dünner erscheinende Fäden. Sie sind nur einseitig mit Pt beschattet, und es fehlt ihnen eine adsorbierte Proteinschicht. Bei gleichzeitiger Bedampfung mehrerer Präparate aus verschiedenen Spreitungs-Präparationen erhält man einen brauchbaren Vergleich der Fäden in ihrer Breite. Voraussetzung ist jedoch, daß auch die Folien aus einer gemeinsamen Ferti-  
gung stammen.

### Schlußfolgerungen

Die Befunde seitheriger morphologischer und biochemischer Untersuchungen waren für die Fragen der Anordnung und des Verhaltens der intrazellulären Bakterien-DNS z. T. nur indirekt beweiskräftig. Ebenfalls indirekt wurde durch ihr Verhalten bei der Reduplikation und durch ihre Genfunktion auf die Anordnung der DNS geschlossen. Auf Grund unserer Versuche fügen wir diesem Problemkreis die folgenden Schlüsse hinzu:

a) Die intrazelluläre DNS-Ansammlung ist ein dicht zusammenhängendes, in der Regel zentral liegendes Knäuel, das stufenweise präparativ aufgelockert werden kann. Ihr räumlicher Ordnungsgrad ist höher als bei einer verdünnten DNS-Lösung. Stärkere Ansammlungen von cytoplasmatischem Material in der Nuclearregion treten bei wachsenden und sich vermehrenden Bakterien auf.

b) In der protoplastischen Einheit der Bakterienzellen im „Ruhezustand“, d. h. in den einzelnen Protoplasten befinden sich mit Sicherheit nur sehr wenige, wahrscheinlich aber nur *ein* sehr langer DNS-Faden. Es wurden in keinem Fall echte Verzweigungen dieses DNS-Fadens gefunden.

c) Beim Zerfall, wie durch DNS-Isolierung *in vitro*, oder bei Protoplasten-Präparaten unter ungünstigen Bedingungen, treten Fadenbruchstücke auf, die unterschiedliche Längen aufweisen. Etwa gleich lange Fadenstücke sind nie gefunden worden, die gemessenen Längensverteilungen weisen erhebliche Streuungen auf. Morphologisch gibt es weder im DNS-Zellinhalt vorgebildete noch durch Präparation freilegbare einheitliche DNS-Anteile, denen einheitliches Mol.-Gew. zuzuordnen wäre.

<sup>64</sup> S. SPIEGELMAN, A. I. ARONSON u. P. C. FITZ-JAMES, J. Bacteriol. **75**, 102 [1958].

<sup>65</sup> C. E. HALL u. P. DOTY, J. Amer. chem. Soc. **80**, 1269 [1958].

<sup>66</sup> P. DOTY, J. MARMUR, J. EIGNER u. C. SCHILDKRAUT, Proc. nat. Acad. Sci. USA **46**, 461 [1960].