

especially the ribonucleoprotein, outweighs the variation which is at first sight to striking. Pathogenicity for the chick embryo is not related to any particular form of the particle, nor to the ease of disruption by ether, at least in the strains studied. It is clear from these findings that if it is desired to prepare

any one particular component of the particle, e.g. the disrupted outer coat (haemagglutinin) or the ribonucleoprotein helix, the strain of virus and the length of ether treatment must be selected carefully.

We are indebted to the Medical Research Council for a grant in aid of this work.

## Studien über die uv-induzierte Mutabilität des Serratia-Phagen KAPPA durch Versuche mit uv-bestrahltem Indikator und Phagenkreuzungen

VON ULRICH WINKLER \*

Aus dem California Institute of Technology, Division of Biology, Pasadena/Calif.

(Z. Naturforschg. 18 b, 118—123 [1963]; eingegangen am 8. August 1962)

UV inactivated KAPPA can be reactivated like other temperate phages by plating on uv-irradiated host cells (indicator). The capacity of the indicator Serratia HY for multiplication of unirradiated KAPPA was about 0.1% survivors (colony formers). The induction of clear plaque (c-) mutants by irradiating extracellular KAPPA and plating on untreated indicator can be increased further about 2 to 4 times by using UV irradiated indicator. The increase of the number of c mutants under the latter conditions, with increasing UV dose given to the phage, was never a first-order reaction. The highest frequency of c mutants obtained was about 4.5 per cent. Plating of unirradiated KAPPA on irradiated indicator (lowest survival fraction was 0.01%) never increased the spontaneous mutation rate to c. Two c mutants studied in detail belong to two different cistrons as shown in a complementation test (map distance about 5.3%). Only one of both was revertible to the phenotype c<sup>+</sup> spontaneously and with a higher rate by UV. However, as shown in crossing experiments with the wild type, the backmutants do not have the original genotype but originated from mutations in at least two different intragenic suppressor loci; the map distances between them and the original c mutation were 0.64% and 0.13 per cent. Host range (h) and virulent (v) mutants could not be induced by irradiation of the free phage and plating on untreated indicator. This indicates that the UV induced high mutability of the c loci in KAPPA represents an exceptional case of behavior (UV-hot spot). Some unstable h mutants could be isolated by plating irradiated phage on irradiated indicator.

Der aus dem lysogenen Serratia-Stamm K gewonnene<sup>1</sup> DNS-haltige<sup>2</sup> Phage KAPPA bildet auf dem rot pigmentierten Stamm HY im allgemeinen trübe Plaques mit violettem Hof. Gelegentlich findet man aber auch Klarplaques (c Plaques)\*\*. Ihre Häufigkeit wächst mit der auf den freien Phagen eingestrahlten UV- oder Röntgendosis, ohne daß Selektion dafür verantwortlich gemacht werden kann<sup>1, 3</sup>.

Versuche mit KAPPA und uv-bestrahlten Wirts-(Indikator-)Zellen waren von Interesse, weil bei dem am besten untersuchten temperierten Phagen, nämlich LAMBDA von *E. coli*, und auch anderen

nur dann c-Mutanten durch UV ausgelöst werden können, wenn nicht nur die Phagen, sondern auch die Wirtszellen bestrahlt worden sind<sup>4</sup>. Bei KAPPA dagegen erhält man 1—2% c-Mutanten von bestrahltem Phagen auch auf unbestrahlten Wirtszellen. Die erste Frage war also, ob die Häufigkeit der c-Mutanten von KAPPA durch Wirtsbestrahlung noch zu erhöhen ist oder nicht. Wie später gezeigt werden kann, liegt die Mutantenhäufigkeit auf bestrahltem Indikator höher als auf unbestrahltem.

Bei den Phagenkreuzungen sollte insbesondere ermittelt werden, ob die von einigen c-Mutanten isolierbaren c<sup>+</sup>-Rückmutanten mit dem Wildtyp gene-

\* Gegenwärtige Anschrift: Institut für Mikrobiologie der Universität Frankfurt/M.

\*\* Sie werden im folgenden aus Gründen der sprachlich einfacheren Darstellung als c-Mutanten bezeichnet, auch wenn ihre mutative Entstehung noch nicht sicher bewiesen ist.

<sup>1</sup> H. ELLMAUER, Diss., Univ. Frankfurt/M. 1959.; H. ELL-

MAUER u. R. W. KAPLAN, Naturwissenschaften 46, 150 [1959].

<sup>2</sup> H. STEIGER u. D. POHL, persönl. Mittlg. 1962.

<sup>3</sup> R. W. KAPLAN, U. WINKLER u. H. ELLMAUER-WOLF, Nature [London] 186, 330 [1960].

<sup>4</sup> J. J. WEIGLE, Proc. nat. Acad. Sci. USA 39, 628 [1953].

tisch identisch sind oder nicht. Sollte diese Identität zutreffen, wäre die denkbare Annahme homologer Austausche zwischen Phagen- und Bakteriengenom-Abschnitten zur Erklärung der c-Mutantenentstehung kaum zu halten, da es sehr unwahrscheinlich ist, daß in demselben Bakterienstamm sowohl das c als auch das c<sup>+</sup>-Allel enthalten ist. Die Versuche ergaben, daß alle geprüften Rückmutanten noch das c-Allel enthielten und nur infolge Suppressor-Mutationen den c<sup>+</sup>-Phänotyp hatten.

Schließlich wurde noch die UV-Mutabilität der Virulenz(v)- und Wirtsbereich(h)-Loci von KAPPA untersucht, da ein Vergleich der durch Nitrit<sup>5</sup>, Hydroxylamin<sup>6</sup> und uv-induzierten Mutantenspektren dieses Phagen folgern lassen, daß die hohe UV-Mutabilität der c-Loci eine Ausnahme darstellt. Die unten geschilderten Ergebnisse bestätigen diese Annahme.

### Material und Methoden

**Bakterien:** Rot pigmentierter, KAPPA-sensibler Wildtyp von *Serratia marcescens*, Stamm HY; farblose („weiße“) Mutante HY/w, besonders zur Anreicherung von KAPPA verwendet; KAPPA-resistente, farblose Mutante HY/2/w, die mit Hilfe der KAPPA-Mutante c2 direkt selektioniert wurde; dieser Bakterienstamm ist adsorptionsresistent für den Phagen c2 und setzt weder spontan noch nach UV-Bestrahlung Phagen frei; KAPPA-lysogener HY-Stamm (ELLMAUER); rot pigmentierte *Serratia*-Stämme BF, EQ und CN, die unter 61 herkunftsverschiedenen wegen ihrer KAPPA-Sensibilität ausgewählt wurden.

**Phagen:** KAPPA-Wildtyp; uv-induzierte Klarplaque-Mutanten c1 und c2, von denen letztere etwas klarere Plaques bildet als c1; spontane, von c1 entstandene Doppelmutante c1mi mit kleinerer Plaquegröße als der Wildtyp; durch getrennte UV-Bestrahlung von c2 und Indikator HY gewonnene Doppelmutante c2h54, die HY/2/w lysieren kann; uv-induzierte, trübe Plaques bildende Rückmutanten von c1 und c1mi, die durch ein nachgesetztes su (= Suppressor) gekennzeichnet sind.

**Sonstiges:** Die Bakterien wurden stets auf DIFCO-Nutrient Broth Agar oder in 1-proz. Bacto Tryptone Nährlösung mit 0,5% NaCl und 1 µg/ml CaCl<sub>2</sub> bei 30 °C kultiviert. Hochtitrige Phagensuspensionen wurden mit der Agargußschicht-Methode<sup>7</sup> gewonnen. Phagen und Bakterien (log Zellen) wurden in p<sub>H</sub> 7 Phosphatpuffer (enthaltend 0,05% MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O) mit einer

General Electric 15-W-Entkeimungslampe in einer Entfernung von 35 cm unter den üblichen Bedingungen (Gelblicht; Rühren der Suspension; Zimmertemperatur) bestrahlt. Die Häufigkeit der c-Mutanten wurde nur auf Gußplatten mit maximal 2500 Plaques pro Platte bestimmt. Die Phagenkreuzungen wurden nach APPELYARD und Mitarb.<sup>8</sup> durchgeführt (Adsorptionszeit 15 min; Entfernen der nichtadsorbierten Phagen durch Verdünnen 1 : 200 und Zentrifugieren; Zeit zum Lysieren der Komplexe in Hershey-Broth 70 min). Sofern nicht anders vermerkt, wurde nur HY als Indikator verwendet. Der mittlere Fehler  $\sigma$  wurde nach

$$\sigma = \sqrt{m(1-m)/Z}$$

errechnet, worin  $m$  die Häufigkeit der Mutanten oder Rekombinanten ist und  $Z$  die Anzahl berücksichtigter Plaques.

### Ergebnisse

#### 1. Allgemeines über die Klarplaque-Mutanten

Die Mutanten c1 und c1mi können auf unbestrahltem Indikator HY sowohl spontan als auch mit erhöhter Häufigkeit uv-induziert zum c<sup>+</sup>-Phänotyp rückmutieren, c2 kann dies dagegen nicht. Alle trübe Plaques bildenden c1mi-Rückmutanten haben ihren mi-Charakter beibehalten. Im Komplementierungstest<sup>9</sup> kooperieren c1 resp. c1mi und c2 miteinander; es sind also mindestens zwei Cistren in KAPPA vorhanden, in denen erbliche Veränderungen die Klarplaque-Bildung zur Folge haben. Die Kreuzung c1 × c2 ergab 2,66% c<sup>+</sup>-Rekombinanten in der Nachkommenschaft, wenn die mittlere Infektionsmultiplizität 6,6 pro Elter betrug. Keine der drei Mutanten kann KAPPA-lysogene HY-Zellen lysieren. Auf den neu isolierten Indikatorstämmen BF, CN und EQ bilden sie wie auch der Wildtyp unter den üblichen Versuchsbedingungen sehr kleine und ungleichgroße Plaques. Die Plaquebildungs-Chance EOP (= efficiency of plating) liegt auf BF, CN und EQ, verglichen mit derjenigen auf HY (= 1), zwischen 0,1 und 0,001.

Die Kapazität<sup>10</sup> von uv-bestrahltem Indikator HY zur Vermehrung von unbestrahltem Phagen ist für den Wildtyp, c1 und c2 gleich; sie ist unvermindert bis etwa 0,1% überlebenden Koloniebildnern. Die Plaques von KAPPA sind auf gering uv-bestrahltem

<sup>5</sup> R. W. KAPLAN u. S. K. BOSE, Z. allg. Mikrobiol. 1, 274 [1961].

<sup>6</sup> H. BECKMANN, persönl. Mittlg. 1962.

<sup>7</sup> M. H. ADAMS, Bacteriophages, Interscience Publ., New York 1959.

<sup>8</sup> R. K. APPELYARD, J. F. MCGREGOR u. K. M. BAIRD, Virology 2, 565 [1956].

<sup>9</sup> A. D. KAISER, Virology 3, 42 [1957].

<sup>10</sup> T. F. ANDERSON, J. Bacteriol. 56, 403 [1948].

HY stets größer und gleichmäßiger als auf unbestrahltem.

Mittlere Multiplizität $\cdot 3.3$	Häufigkeit der c-Mutanten $m \pm \sigma m$ [%]
$10^{-4}$	$0,93 \pm 0,12$
$10^{-3}$	$0,87 \pm 0,13$
$10^{-2}$	$0,81 \pm 0,12$
$10^{-1}$	$0,90 \pm 0,12$
$10^0$	$0,22 \pm 0,06$
2,7	$0,11 \pm 0,03$
7,1	$0,20 \pm 0,03$

Tab. 1. Die Ausprägung uv-induzierter c-Mutanten in Abhängigkeit von der mittleren Multiplizität.  $7 \cdot 10^8$  uv-bestrahlte log-Zellen von HY (2% Überlebende) wurden mit uv-bestrahltem KAPPA-Wildtyp (1% Überlebende) und Bouillon (Endkonzentration 0,8%) vermischt. Nach einer Adsorptionszeit von 30 min bei 30 °C wurde ausgeplattet.

Werden HY-Zellen mit uv-bestrahltem KAPPA mehrfach infiziert, so können sich nicht alle bei Einfachinfektion bestimmbareren uv-induzierten c-Mutationen phänotypisch ausprägen. Die unter optimalen Versuchsbedingungen feststellbare Klarplaque-Häufigkeit nimmt etwa um den Faktor 4,5 oder mehr ab, wenn die mittlere Multiplizität größer als 0,33 wird (Tab. 1). Da einerseits bei einem  $m$  von 0,33 entsprechend dem Poisson-Term  $p(\geq 2) = 1 - e^{-m}(1 + m)$  im Mittel nur etwa 4% mehrfach-infizierte Zellen zu erwarten sind, andererseits die c-Mutantenhäufigkeit auf etwa 25% des maximal möglichen Wertes herabgesunken ist, muß angenommen werden, daß weit mehr Zellen infiziert werden, als auf Grund des Plaquetiters üblicherweise gefolgert wird. Daß die c-Mutantenhäufigkeit bei weiterer Steigerung von  $m$  nicht entsprechend abnimmt, zeigt, daß keine einfache umgekehrte Proportionalität zwischen der Infektionsmultiplizität und der c-Mutantenhäufigkeit besteht.

## 2. Die UV-Reaktivierung und die c-Mutanten-Häufigkeit von bestrahltem KAPPA auf bestrahltem Indikator

Die Überlebenskurve von bestrahltem KAPPA ist auf gering bestrahltem Indikator HY (etwa 10% Überlebende) weniger geneigt als auf unbestrahltem (Abb. 1, Kurven a und b). Dieser Phage wird also, ähnlich wie viele andere temperierte, „uv-reaktiviert“<sup>4</sup>. In dieser Hinsicht verhalten sich der Wildtyp und die Mutanten c1 und c2 gleich. Der unter optimalen UV-Reaktivierungsbedingungen erhält-

liche Dosisreduktionsfaktor beträgt etwa 0,57 und ist somit dem für den LAMBDA-Phagen ermittelten<sup>4</sup> von etwa 0,52 sehr ähnlich.

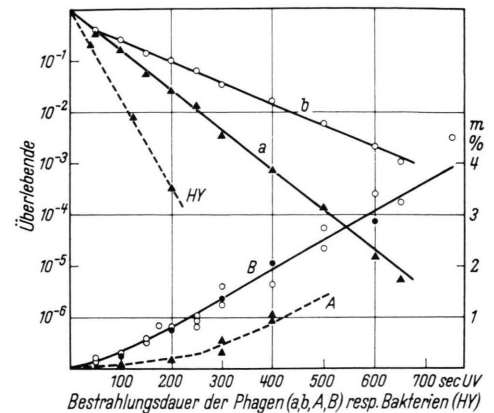


Abb. 1. Überlebende und c-Mutantenhäufigkeit ( $m$ ) von KAPPA-Wildtyp in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer der Phagen. A und a: Auf unbestrahltem Indikator HY, B und b: Auf uv-bestrahltem Indikator HY. Kurve B besteht aus den Ergebnissen von drei Versuchen, in denen der Indikator entweder 50 sec (●) oder 100 sec (■) bestrahlt worden war. Zum Vergleich sind die c-Mutations-Induktionskurve von ELLMAUER<sup>1</sup> und die UV-Überlebenskurve des Indikators HY auf Komplettagar gestrichelt eingezeichnet worden.

Die relative Häufigkeit der c-Mutanten in bestrahlten Phagensuspensionen ist auf gering bestrahltem Indikator HY zwei- bis vierfach höher als auf unbestrahltem (Abb. 1, Kurven A und B). Während die Auslösung der c-Mutationen auf unbestrahltem HY bei Variieren der UV-Dosis annähernd einer Zweitreffereaktion entspricht<sup>1</sup>, liegt die Kurvenkrümmung auf bestrahltem HY zwischen der einer Zwei- und der einer Eintreffereaktion.

Vor den eben geschilderten Versuchen wurde diejenige UV-Dosis ermittelt, die bei Einstrahlung auf den Indikator HY diesen befähigt, die Häufigkeit von c-Mutationen maximal zu steigern. Sie liegt im Bereich von etwa 1–10% überlebenden Koloniebildnern (Abb. 2).

Obwohl bei dem LAMBDA-Phagen gelegentlich alleinige UV-Bestrahlung der Wirtsbakterien genügt, um bei anschließender Infektion mit unbestrahlten Phagen eine erhöhte Mutabilität des einen oder anderen Phagens hervorzurufen<sup>11</sup>, kann bei KAPPA die Häufigkeit von c- resp. c<sup>+</sup>-Mutanten in unbestrahltem Wildtyp, c1- oder c2-Suspensionen durch alleinige Bestrahlung des Indikators HY mit 50 bis 200 sec UV nicht gesteigert werden.

<sup>11</sup> F. JACOB, C. R. hebdomadaire Séances Acad. Sci. **238**, 732 [1954].

Auch uv-bestrahlte Zellen der Stämme BF, EQ und CN können uv-inaktivierte KAPPA-Phagen uv-reaktivieren. Diese Versuche wurden mit der Mutante c2 durchgeführt, da analog zu Experimenten

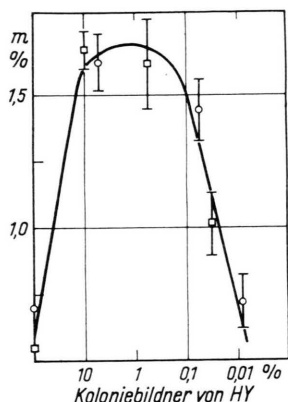


Abb. 2. Die relative Häufigkeit ( $m$ ) der  $c$ -Mutanten unter den Überlebenden von 350 sec uv-bestrahltem KAPPA-Wildtyp in Abhängigkeit von der Koloniebildungsfähigkeit der zur Adsorption verwendeten uv-bestrahlten Indikatorzellen (HY). Ergebnis von zwei gleichartigen Versuchen.

mit dem Phagen T3<sup>12</sup> nach einem Wirt gesucht wurde, auf dem c2 vielleicht doch zu c<sup>+</sup> rückmutieren kann. Das bisher negative Ergebnis ist wegen der sehr kleinen und variablen Plauegröße von KAPPA auf diesen Wirten fraglich.

### 3. Die Nichtidentität von Wildtyp- und c<sup>+</sup>-Rückmutanten

Drei willkürlich ausgewählte c<sup>+</sup>-Rückmutanten des Stammes c1 wurden mit dem Wildtyp gekreuzt, um ihre genetische Identität zu prüfen. Alle drei (su80, su81 und su83) enthalten noch das c1-Allel, das nun in den Kreuzungen herauspaltet (Tab. 2). Somit muß der c<sup>+</sup>-Phänotyp in den drei Rückmutanten durch Suppressor-Mutationen zustande gekommen sein. Da bei den Kreuzungen keine anderen als die c- und c<sup>+</sup>-Phänotypen herausgespalten sind, wird die Entstehung der c-Plaques ursprünglich wohl auf „Punktmutationen“ zurückzuführen sein.

Durch Vergleich der Rekombinanten-Häufigkeiten in den Kreuzungen Nr. 1 und 2, die etwa um den Faktor 4,8 differieren, wird ersichtlich, daß es mindestens zwei funktionsgleiche oder -ähnliche Sup-

Nr.	Kreuzung a x b	Multiplizität		c-Rekombinanten $R \pm \sigma R$ [%]
		M <sub>a</sub>	M <sub>b</sub>	
1	Wildtyp c1su80	8,3	7,6	0,320 ± 0,045
2	Wildtyp c1su81	8,3	7,7	0,067 ± 0,022
3	Wildtyp c1su83mi	6,3	7,3	0,038 ± 0,017
4	c1su80 c1su81	7,6	7,6	0,005 ± 0,005

Tab. 2. Kreuzung von c1-Rückmutanten mit dem Wildtyp und untereinander. Die Häufigkeit spontaner c-Plaques lag in den Kontrollen unter 0,0057%, wobei etwa 18 000 Plaques pro Elter geprüft wurden.

pressor-Loci für den c1-Locus im KAPPA-Genom gibt. Da die Häufigkeit der infolge Rekombination entstandenen Klarplaques mit etwa 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-4</sup> sehr gering ist, ist es wahrscheinlich, daß es sich um intragenische Suppressoren handelt.

Alle Versuchsergebnisse wurden in Wiederholungen bestätigt. Die Adsorptionskonstante  $k^7$  ist für den Wildtyp, c1su80 und c1su81 etwa dieselbe (ca. 1,9 · 10<sup>-9</sup> ml/min), so daß die verschiedenen Rekombinanten-Häufigkeiten in den Kreuzungen Nr. 1, 2 und 4 nicht durch unterschiedliche Adsorption der Mutanten vorgetäuscht sein können.

Das Ergebnis der Kreuzung Nr. 4 entspricht nicht der Additivität der Rekombinationsraten\*. Nach herkömmlichen Vorstellungen wäre, je nach der Lage der Suppressoren su80 und su81 zueinander und zum c1-Locus, mit einer Häufigkeit von entweder 0,39% oder 0,25% zu rechnen gewesen.

### 4. Die uv-induzierte Mutabilität der Virulenz- und Wirtsbereich-Loci

Weder in unbestrahlten noch extrazellulär uv-bestrahlten KAPPA-Suspensionen (0,002 bis 4,5% Überlebende) waren nach Präadsorption an HY-Bakterien Virulenz(v)-Mutanten nachweisbar, die auf einem Rasen von KAPPA-lysogenen HY Bakterien Plaques bilden können. Auch wenn uv-bestrahlte Zellen zur Präadsorption verwendet wurden, blieben die Versuche dennoch erfolglos. Bei der Nachprüfung einer früher mit Hilfe eines Tropftestes isolierten anscheinenden v-Mutante<sup>1</sup>, verhielt sich diese wie eine normale c-Mutante.

Dagegen waren Wirtsbereich(h)-Mutanten, die den adsorptionsresistenten Stamm HY/2/w lysieren können, unter bestimmten Bedingungen in größerer

<sup>12</sup> D. K. FRASER, Carnegie Inst. Wash. Year Book 53, 210 [1954].

\* Von einer eingehenden Kreuzungsanalyse wurde abgesehen, da sie z. Z. von H. WOLF-ELLMAYER vorgenommen wird.

Anzahl durch UV-Bestrahlung zu gewinnen. Bei diesen Versuchen wurde nicht vom Wildtyp, sondern der Klarplaque-Mutante c2 ausgegangen, weil c2h-Plaques infolge reduzierter Lysogenisierfähigkeit auf HY plus HY/2/w-Mischindikator sicherer aufzufinden sind als c2<sup>+</sup>h-Plaques, und weil c2h-Doppelmutanten für Kreuzungsversuche benötigt wurden.

Eine h-Mutantenhäufigkeit von  $1 \cdot 10^{-7}$  pro überlebende Phagen ergab sich folgendermaßen: uv-bestrahlte c2-Phagen (0,2% Überlebende) wurden mit einer mittleren Multiplizität von 0,8 an uv-bestrahlte HY-Zellen (7% Überlebende) präadsorbiert und nach 20 min Bebrütung mit HY/2/w-Indikator ausgeplattet. Bei drei derartigen Versuchen wurden insgesamt 38 h-Mutanten isoliert. Jedoch wurden keine h-Mutanten durch UV-Bestrahlung nur des Phagen oder nur der zur Präadsorption verwendeten HY-Bakterien erhalten.

Der Stabilität des Wildtypallels des h-Locus (oder der h-Loci) in KAPPA steht eine bemerkenswerte spontane Instabilität des mutierten Allels gegenüber: Von HY/2/w-Indikator wurden 24 noch nicht ausgewachsene c2h-Plaques abgeimpft; in ihren getrennten Nachkulturen auf HY waren im Durchschnitt etwa 4% c2h<sup>+</sup>-Plaques, die von den c2h-Plaques durch ihren größeren Durchmesser deutlich zu unterscheiden sind. Diese Unterscheidungsmöglichkeit ist in entsprechender Weise auch beim LAMBDA-Phagen gegeben<sup>13</sup>. Obiger Wert von 4% liegt wahrscheinlich etwas höher als der tatsächlichen c2h<sup>+</sup>-Häufigkeit entspricht, denn auf HY/2/w gezogene h-Phagen haben auf HY eine Plaquebildungschance (EOP) von nur etwa 35 Prozent.

Die soeben erwähnte Instabilität des h-Allels macht sich nicht nur auf HY bemerkbar; denn auch in Nachkulturen von einzelnen, infolge Mutation neu entstandenen h-Mutanten auf HY/2/w finden sich oft zwei verschiedene,  $\pm$  erbkonstante h-Phänotypen.

### Diskussion

Der bemerkenswerteste Unterschied zwischen KAPPA und allen anderen mutationsgenetisch bisher untersuchten temperierten Phagen besteht wohl darin, daß nur KAPPA bei alleiniger UV-Bestrahlung des freien Phagen stark mutiert, während bei den ande-

ren in der Regel zusätzliche Wirtsbestrahlung notwendig ist. Diese Verschiedenheit beruht eventuell weniger auf ungleicher primärer UV-Mutabilität der Phagen als auf Unterschieden in der enzymatischen Ausstattung ihrer Wirtszellen. So wurde daran gedacht, ob vielleicht in den Wirtszellen der Phagen LAMBDA, P22 und anderer, nicht aber dem Wirtsbakterium HY von KAPPA, ein dem photoreaktivierenden Enzym<sup>14</sup> ähnliches existiert, welches im freien Phagen uv-induzierte „Prämutationen“ im Dunkeln stets revertiert, sofern es nicht durch Wirtsbestrahlung zerstört oder durch UV-Läsionen im Wirt kompetitiv blockiert wird. Jedoch widerspricht dieser Anschauung der vorliegende Befund, daß uv-bestrahlte KAPPA-Phagen auf bestrahlten Wirtszellen stärker nach c mutieren als auf unbestrahlten, wenn nicht Zusatzannahmen gemacht werden sollen. Andererseits wird sie von der Tatsache gestützt, daß uv-bestrahlter KAPPA auf dem unbestrahlten Wirtstamm CN praktisch nicht nach c mutiert<sup>15</sup>.

Eine andere Deutung der unterschiedlichen UV-Mutabilität zumindest der c-Loci von KAPPA und LAMBDA wäre die in Anlehnung an Hypothesen anderer Autoren<sup>16</sup> formulierte Ansicht, daß die Phagen-„Mutanten“ gar nicht durch Mutation, sondern infolge von Rekombination zwischen Phagen- und Bakterien-Genomabschnitten entstanden sind, wobei der KAPPA-Wirt Serratia HY vielleicht auf Grund seiner eigenen hohen Mutabilität<sup>17</sup> ein besserer Rekombinationspartner ist als der LAMBDA-Wirt K12. Bei dieser Annahme ist es zunächst unbedeutend, ob bei den Rekombinationen in den Phagen seinem Genom homologe (hypothetische) bakterielle Genomabschnitte einverleibt werden oder wie bei der Transduktion<sup>18</sup> inhomologe („Translokation“). Letzterer Fall ist etwas unwahrscheinlicher, da bisher Phagen durch Einbau von Bakteriengenomen stets defektiv wurden, was ja bei KAPPA bei der Genotypänderung c<sup>+</sup> nach c nicht zutrifft. Daß die Häufigkeit der c-Mutanten (alias „Rekombinanten“) von bestrahltem KAPPA auf bestrahltem Indikator höher ist als auf unbestrahltem, ließe sich in Einklang mit der soeben erwähnten „Rekombinations-Hypothese“ unschwer erklären; denn für Phagen ist schon seit 1955 bekannt<sup>19</sup>, daß die Rekombina-

<sup>13</sup> R. S. EDGAR, *Virology* **7**, 347 [1959].

<sup>14</sup> C. S. RUPERT, S. H. GOODGAL u. R. M. HERRIOTT, *J. gen. Physiol.* **41**, 451 [1958].

<sup>15</sup> H. STEIGER, persönl. Mittlg. 1962.

<sup>16</sup> A. GAREN u. N. D. ZENDER, *Virology* **1**, 347 [1955].

<sup>17</sup> E. L. LABRUM u. M. I. BUNTING, *J. Bacteriol.* **65**, 394 [1953].

<sup>18</sup> W. ARBER, *Arch. des Sci.* **11**, 259 [1958]; P. STARLINGER, *Z. Naturforschg.* **13b**, 489 [1958].

<sup>19</sup> F. JACOB u. E. WOLLMAN, *Ann. Inst. Pasteur* **88**, 724 [1955].

tionsrate durch geringe UV-Bestrahlung der Eltern gesteigert werden kann, und zwar durch Bestrahlung beider Eltern mehr als bei Bestrahlung nur des einen. In Zweifaktorkreuzungen ( $c2h54 \times ++$ ) konnte auch bei KAPPA nachgewiesen werden, daß die Rekombinantenhäufigkeit ( $+h54$ ) durch UV-Bestrahlung der Eltern zu erhöhen ist (WINKLER, unveröffentlicht).

Die genetische Instabilität der Wirtsbereich-Mutanten von KAPPA und ihre UV-Induzierbarkeit nur in uv-bestrahlten Wirtszellen erinnert an Befunde am Phagen T3<sup>20</sup>. Inwieweit echte Parallelen bestehen, kann bisher nicht gesagt werden.

Abschließend sollen noch einige vorwiegend methodische Probleme kurz diskutiert werden.

a) In einer früheren Arbeit<sup>3</sup> wurde nur ein einziges c-Cistron in KAPPA gefunden; nunmehr sind zwei bekannt. Die Ursache für das frühere Resultat wird darin liegen, daß damals nur mittelklare Plaques bildende Mutanten, also wahrscheinlich vom c1-Typ, untersucht worden sind.

b) Das Ergebnis, daß uv-induzierte c-Mutationen durch gleichzeitige Mischinfektion der Wirtszellen mit  $c^+$  an der Perfektierung oder auch nur der phänotypischen Ausprägung gehindert werden können (Tab. 1), hat seine Parallele z. B. in Untersuchungen mit dem Phagen P22<sup>21</sup>.

Da bei Versuchen mit KAPPA und unbestrahltem Indikator bei Inaktivierung der Phagen unterhalb 0,01% Überlebende häufige Mehrfachinfektionen kaum zu vermeiden sind, ist es wahrscheinlich, daß bisher derart bestimmte Mutationshäufigkeiten bei hohen UV-Dosen oft zu gering sind.

c) Daß bei früheren Untersuchungen von Klarplaque-Mutanten des Phagen LAMBDA weder spon-

tan noch uv-induziert  $c^+$ -Rückmutanten gefunden wurden<sup>4</sup>, während bei KAPPA solche isolierbar sind, ist wohl nur methodisch bedingt; denn prinzipiell gibt es auch bei LAMBDA echte Rückmutationen vortäuschende Suppressor-Mutationen, z. B. in der Wirtsbereich-Region<sup>13</sup>.

d) Der früher für LAMBDA mitgeteilte Befund, daß auf konstant bestrahltem Indikator die c-Mutantenhäufigkeit mit der auf den Phagen eingestrahlten UV-Dosis linear zunimmt<sup>4</sup>, konnte später nicht bestätigt werden<sup>22</sup>. Somit entspricht unser Ergebnis über den nicht-linearen Anstieg der c-Mutantenhäufigkeit bei KAPPA auf bestrahltem Indikator den bei LAMBDA erzielten Resultaten.

e) Die mit einer bestimmten UV-Dosis in KAPPA ausgelösten c-Mutationen werden in gering bestrahltem Indikator mit zwei- bis vierfach höherer Chance perfekturiert als in unbestrahltem. Dieses Ergebnis macht Vergleiche der primären UV-Mutabilität des freien Phagen mit der des zugehörigen Prophagen<sup>23</sup> unsicher, da bei Bestrahlung lysogener Zellen neben dem Prophagen bisher unbekannt ist, ob auch Prophagen-Mutationen für die oben beschriebene perfektierende Fähigkeit bestrahlter Zellen empfänglich sind oder nicht.

Diese Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie der Universität Frankfurt/M. mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft begonnen und am California Institute of Technology, Pasadena/USA, beendet. Den Herren Professoren Dr. M. DELBRÜCK (Pasadena) und Dr. R. W. KAPLAN (Frankfurt/M.) habe ich für anregende Kritik und besonders ersterem für die Gastfreundschaft in der Division of Biology zu danken. Weiterhin danke ich Fräulein GISELA DITTRICH (Frankfurt/M.) für wertvolle technische Assistenz. Der Aufenthalt in Amerika war durch ein Stipendium der NATO ermöglicht worden.

<sup>20</sup> D. K. FRASER, *Virology* **3**, 527 [1957].

<sup>21</sup> H. PRELL u. H. M. PRELL, *Arch. Mikrobiol.* **34**, 211 [1959].

<sup>22</sup> G. KELLENBERGER, persönl. Mittlg. 1961.

<sup>23</sup> H. WOLF-ELLMAUER, *Z. allg. Mikrobiol.* **1**, 150 [1961].