Über die Rezeptorsubstanz für den Phagen T 5

VII. Mitt.¹: Elektronenoptische Darstellung und Längenbestimmung der aus T5/R5-Komplexen freigesetzten DNS

Von HERMANN FRANK, MARIE LUISE ZARNITZ und WOLFHARD WEIDEL

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Weidel, Tübingen

(Z. Naturforschg. **18 b**, 281—284 [1963]; eingegangen am 20. November 1962)

Receptor-triggered DNA-ejection of T 5-phage is made directly visible. The DNA leaves the phage particle through its tail and emerges from the narrow gap between tailtip and receptor particle, appearing as a single thread of $34 \pm 1,7 \mu$ length, equivalent to a molecular weight of 66×10^6 .

Der Mechanismus der Phageninfektion ist durch die grundlegenden Untersuchungen von ANDERSON² sowie HERSHEY und CHASE³ im wesentlichen geklärt worden. Die mit ihrer Schwanzspitze an die Bakterienoberfläche adsorbierten Phagen entleeren ihre infektiöse DNS in das Zellinnere. Die leeren Proteinhüllen bleiben außen zurück. Die sich daraus ergebende Vorstellung, die DNS gelange durch den engen Phagenschwanz hindurch in das Bakterium, war jedoch experimentell nicht belegt worden. WEIDEL und KELLENBERGER⁴ stellten elektronenmikroskopisch fest, daß sich T 5-Phagen mit ihrer Schwanzspitze an die aus Colibakterien isolierten Rezeptorpartikel anheften und ihre DNS abgeben können. An diesem vereinfachten System wird im folgenden gezeigt, daß die DNS aus Rezeptor-Phagen-Komplexen als ein zusammenhängender Faden an der Schwanzspitze des Phagen austritt. Der Ejektionsvorgang konnte durch Anwendung der von KLEINSCHMIDT^{5,6} entwickelten Methode der Spreitung in einem filmbildenden Protein elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Material und Methoden

In der vorhergehenden Mitteilung¹ dieser Reihe war gezeigt worden, daß Adsorption von T 5-Phagen an ihre Rezeptorteilchen und Ejektion der DNS

zeitlich voneinander getrennt werden können. Jeder der beiden Infektionsschritte kann im Elektronenmikroskop demonstriert werden, wenn man die Präparation nach der Agarfiltrations-Methode von KELLENBERGER und ARBER⁷ bei niedriger Temperatur vornimmt und vor der Fixierung die Ejektion durch Temperaturerhöhung auslöst. Die Austrittsstelle der DNS eindeutig sichtbar zu machen, war jedoch nicht möglich, da es auf dem trockenen Kollodiumfilm stets zu einer seitlichen Aneinanderlagerung von Abschnitten der aus den Phagenteilchen hinausgeschobenen DNS-Fäden kam.

Bei Anwendung der von KLEINSCHMIDT^{5,6} ausgearbeiteten Methode (Einbettung der Nucleinsäure in einen durch Spreitung erzeugten Proteinfilm) wird diese Aggregation vollständig unterdrückt. Gewisse Abänderungen der Technik waren in unserem Falle jedoch notwendig, um zu verhindern, daß freie Phagen bzw. noch nicht entleerte T 5/R 5-Komplexe im Verlauf der Präparation zerstört werden, d. h. ihre DNS durch Platzen der Kopfhüllen und Zerreißen der Schwänze verlieren. Im folgenden wird gezeigt, auf welche Weise der Zeitpunkt der „physiologischen“ Entleerung nach der Spreitung festgelegt werden kann und wie sich die freien Phagen und die noch vollen T 5/R 5-Komplexe stabilisieren lassen.

Rezeptor und T 5-Phagen wurden wie beschrieben^{1,8} präpariert. Herstellung der T 5/R 5-Komplexe: 0,2 ml R 5 (15 E/ml) in $10^{-2} M$ Na-Phosphatpuffer pH 7 mit Zusatz von $2 \cdot 10^{-3} M$ $MgSO_4$ wurden mit

¹ M. L. ZARNITZ u. W. WEIDEL, Z. Naturforschg. **18 b**, 276 [1963].

² T. F. ANDERSON, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. **18**, 197 [1953].

³ A. D. HERSHEY u. M. CHASE, J. gen. Physiol. **36**, 39 [1952].

⁴ W. WEIDEL u. E. KELLENBERGER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **17**, 1 [1955].

⁵ A. KLEINSCHMIDT, D. LANG u. R. K. ZAHN, Z. Naturforschg. **14 b**, 770 [1959].

⁶ A. KLEINSCHMIDT, D. LANG u. R. K. ZAHN, Z. Naturforschg. **16 b**, 730 [1961].

⁷ E. KELLENBERGER u. W. ARBER, Virology **3**, 245 [1957].

⁸ W. WEIDEL, G. KOCH u. K. BOBOSCH, Z. Naturforschg. **9 b**, 573 [1954].

0,2 ml T 5-Phagen ($9 \cdot 10^{11}$ /ml) bei 4°C vermischt und 30 Min. bei dieser Temperatur gehalten. Der DNS-Abschußmechanismus ist bei 4°C „eingefroren“¹. 0,1 ml dieser Mischung wurden mit 0,9 ml Cytochrom c-Lösung (0,011-proz. in 1-m. (NH_4) -Acetat p_{H} 5,5) von ebenfalls 4°C verdünnt und sofort bei Zimmertemperatur auf der Hypophase (0,1-m. Ammoniumacetat) in der von KLEINSCHMIDT⁹ beschriebenen Weise gespreitet. Nach 5 Min. wurde mit einer IR-Lampe (Osram, Sicca-therm 250 W) im Abstand von 40 cm von der Flüssigkeitsoberfläche 4 Min. erwärmt. Der gespreitete Proteinfilm wurde zu verschiedenen Zeiten sowohl unmittelbar nach der Spreitung, als auch vor und nach dem Erwärmen in der beschriebenen Weise⁹ auf befilmte Objektblenden (Formvarfilm, nach Verstärkung durch Kohlebedampfung auf Platin-Objektblenden ϕ 2,4 mm mit 7 Bohrungen von je 70μ , aufgebracht) aufgenommen. Fixiert wurde während 10 Min. in geschlossener Kammer über 40-proz. Formol. Der an der Objektblende haftende Tropfen (nicht die ganze Objektblende!) wurde anschließend 30 Sek. in absoluten Alkohol getaucht und sofort mit Filtrierpapier abgesaugt. Nur die kombinierte Anwendung von Formoldampf und Alkohol verhindert das Platzen der vollen Phagen.

Bedampfung: Kegelbedampfung unter einem Winkel von 10° wie beschrieben⁹.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Siemens Elmiskop I auf Perutz-Kontrast-Platten $6,5 \cdot 9$ cm angefertigt. Bei einer Vergrößerung von 8000 kann in der Regel das gesamte von einem DNS-Faden bedeckte Areal (Ausdehnung etwa $3 \cdot 3$ cm) auf den Mittelteil der Photoplatte eingestellt werden. Die absolute Vergrößerung bei dieser Einstellung (Projektivpolschuh I, Zwischenlinse mit Objektiv gekoppelt) wurde durch Ausmessen von Latexkugeln verschiedener Größe (260 und $511 m\mu$) zu 7300 ermittelt. Als zusätzliche Kontrolle wurden identische Stellen einer Lochfolie sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch vermessen. Die Reproduzierbarkeit der ermittelten Vergrößerung ist mit $\pm 3\%$ anzunehmen.

Die bei Verwendung von Projektivpolschuh I auftretende kissenförmige Verzeichnung ergibt in den Ecken der Photoplatte eine radiale Verzerrung von $+10$ Prozent. Die tatsächliche Verzeichnung im Mittelteil der Platte wurde auf $+2\%$ geschätzt, so daß sich die absolute Vergrößerung um den Faktor 1,02 erhöht.

Die für die Längenbestimmung der DNS ausgewählten Aufnahmen wurden 20-fach photographisch nachvergrößert. Die Gesamtvergrößerung ergibt sich somit aus $7300 \cdot 20 \cdot 1,02$ zu 149 000. Der Fadenverlauf wurde auf Transparentpapier nachgezeichnet und von jeweils drei Beobachtern mit dem Kurvenmesser nachgefahren. Der mittlere Fehler des Mittelwertes der Längenbestimmung eines DNS-Fadens durch verschiedene Beobachter wurde zu $\pm 0,7\%$ errechnet.

Ergebnisse

In den Abb. 1 – 3*** ist der Verlauf der DNS-Ejektion aus T 5/R 5-Komplexen wiedergegeben. Abb. 1 zeigt einen an ein Rezeptorteilchen angehefteten T 5-Phagen, der gerade begonnen hat, seine DNS abzugeben. Sein Kopf ist noch prall gefüllt. Man erkennt deutlich, daß die Nucleinsäure durch den Phagenschwanz hindurch am Rezeptorteilchen austritt. In Abb. 2 ist der T 5/R 5-Komplex im Bereich des Schwanzteiles von einem Knäuel Nucleinsäure umgeben. Die Füllung des T 5-Kopfes hat schon deutlich abgenommen. Morphologische Veränderungen am Schwanz des T 5-Phagen sind in keinem Falle zu entdecken, im Gegensatz zu Beobachtungen an Phagen vom Typ T 2¹⁰. Einen vollständig entleerten Phagen, dessen Nucleinsäure als einzelner, langer Faden gut sicht- und ausmeßbar ist, gibt Abb. 3 wieder.

In Präparaten, die ohne Erwärmung sofort nach dem Spreiten fixiert worden waren, fanden wir neben einzelnen freien Phagen und Rezeptorpartikeln sehr viele an Rezeptorteilchen gebundene, aber überwiegend volle T 5-Phagen. Der Abschuß der Nucleinsäure erfolgt erst beim vorsichtigen Erwärmen, bzw. bei längerem Stehen bei Zimmertemperatur. Dabei verläuft die Ejektion eines einzelnen Nucleinsäurefadens offenbar sehr schnell, denn wir finden nur selten T 5/R 5-Komplexe, die lediglich einen Teil ihrer DNS abgegeben haben. Dies wird vor allem aus dem Ergebnis der Längenmessung ausgestoßener Nucleinsäurefäden deutlich (Tab. 1). Sechs verschiedene DNS-Knäuel, die, wie z. B. der in Abb. 3 wiedergegebene, auf Grund ihrer über-

Nr.	Gemessene Länge [cm]	Absolute Länge in μ	
		Gem. Länge Vergr.	$= \frac{\text{cm}}{149.000}$
1	485	32,6	
2	522	35,1	
3	525	35,3	
4	477	32,0	
5	483	32,4	
6	521	35,0	
Mittelwert	$502 \pm 1,9\% *$	$33,7 \pm 1,7 \mu **$	

Tab. 1. Längenmessung von T 5-DNS, mit T 5/R 5-Komplex verbunden. * Mittlerer Fehler vom Mittelwert. ** Mittlerer Fehler vom Mittelwert + Vergrößerungsfehler von ± 3 Prozent.

⁹ A. K. KLEINSCHMIDT, D. LANG, D. JACHERTS u. R. K. ZAHN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **61**, 857 [1962].

¹⁰ L. M. KOZLOFF, Rec. Chem. Progr. **21**, 49 [1960].

*** Abb. 1–5 s. Tafel S. 284 a.

sichtlichen Anordnung zur Längenbestimmung geeignet waren, wurden von mehreren Beobachtern vermessen. Die gefundenen Mittelwerte streuen mit einem mittleren Fehler von $\pm 1,9\%$ um den Durchschnittswert von 502 cm, scheinen also die maximale Länge für einen mit einem T 5/R 5-Komplex noch verbundenen Nucleinsäurefaden darzustellen. Daneben wurden aber auch DNS-Knäuel vermessen, die diese Verbindung verloren hatten. Sie liegen meist in der Nähe von völlig entleerten T 5/R 5-Komplexen, stellen also offenbar die Gesamtnucleinsäure eines Phagen dar. Ihre mittlere Länge von 509 cm $\pm 1,9\%$ (Tab. 2) ist in guter Übereinstimmung mit

Nr.	Gemessene Länge [cm]	Absolute Länge in μ $\frac{\text{Gem. Länge}}{\text{Vergr.}} = \frac{\text{cm}}{149000}$
1	538	36,1
2	506	34,0
3	498	33,4
4	482	32,4
5	520	34,9
Mittelwert	509 $\pm 1,9\%$ *	34,2 $\pm 1,7 \mu$ **

Tab. 2. Längenmessung von T 5-DNS, von T 5/R 5-Komplex abgelöst. * Mittlerer Fehler vom Mittelwert. ** Mittlerer Fehler vom Mittelwert + Vergrößerungsfehler von ± 3 Prozent.

dem im ersten Fall gefundenen Wert, so daß angenommen werden kann, daß auch die mit einem Ende noch am T 5/R 5-Komplex hängenden DNS-Fäden (Tab. 1) praktisch vollständig aus dem Phagen ausgetreten sind. Die Umrechnung nach Tab. 1 und 2 ergibt eine absolute Länge der T 5-DNS von $34 \pm 1,7 \mu$. Unter der Voraussetzung, daß die B-Struktur nach WATSON und CRICK¹¹ (10 Nucleotide einer DNS-Spirale entsprechen 34 Å) auch für T 5-DNS im Proteinfilm zutrifft, und bei einem durchschnittlichen Mol.-Gew.¹² der T 5-Nucleotide von 331,2 (= Mol.-Gew. des Mononatriumsalzes - H₂O), errechnet sich das Mol.-Gew. der T 5-DNS zu $66 \cdot 10^6 \pm 3,3 \cdot 10^6$.

Diskussion

Das aus der Längenbestimmung der T 5-DNS ermittelte Mol.-Gew. von 66 Millionen liegt um 18%

unter dem von HERSHEY et al.¹³ mit Sedimentations- und Viskositätsmessungen gefundenem Wert (81 Millionen). Eine ähnliche Differenz ergibt sich, wenn man die mit den entsprechenden Methoden ermittelten Mol.-Gew. für die T 2-DNS vergleicht. CAIRNS¹⁴ bestimmte die Länge der T 2-DNS autoradiographisch mit 52μ , KLEINSCHMIDT gibt für gespreitete DNS aus osmotisch geschockten T 2-Phagen 49μ an. Die daraus errechneten Mol.-Gew. liegen um 15% bzw. 21% unter den aus Sedimentationsläufen^{13, 15} oder ³²P-Zerfall¹⁶ ermittelten Werten. Es muß vorläufig offen bleiben, welcher Wert dem tatsächlichen Mol.-Gew. am nächsten kommt.

Eine Heterogenität in der DNS-Fadenlänge, wie sie KLEINSCHMIDT⁹ bei T 2-DNS diskutiert hat, konnte im Falle der T 5-DNS nicht beobachtet werden.

Über den Adsorptions- und Ejektionsmechanismus lassen sich auf Grund der morphologischen Befunde einige weitere Aussagen machen. Häufig kann man an der Schwanzspitze von T 5-Teilchen 1–3 kurze, abgespreizte Fortsätze sehen (Abb. 4). Es liegt nahe anzunehmen, daß diese die Bindung zwischen Phagen- und Rezeptorteilchen herstellen, indem sie sich um dieses herumlegen und dort durch geeignete chemische Bindungen, die vielleicht covalenter Natur sind¹, fixiert werden.

Die Phagen-DNS kann dann nur aus dem verbleibenden, engen Spalt zwischen Rezeptorteilchen und äußerer Öffnung des kanalisierten Phagenschwanzes austreten. Dies scheint wirklich so zu sein (Abb. 5). Das Rezeptorteilchen wird also nicht etwa von der Phagenschwanzspitze durchbohrt, wie es auf manchen Aufnahmen wegen ungünstiger Lage der Austrittsstelle scheinen könnte. Es dürfte auch schwerfallen, hierfür einen plausiblen Mechanismus anzugeben.

Ein Schnäppermechanismus zwecks aktiver Durchbohrung der Bakterienzellwand, wie er für T 2-Phagen wahrscheinlich gemacht wurde¹⁰, kommt für T 5 demnach nicht in Betracht. So ist auch in keiner Phase der rezeptor-ausgelösten DNS-Ejektion bei T 5 irgendeine Kontraktion des Schwanzes zu beobachten, der hier nur die passive Funktion einer Ka-

¹¹ J. D. WATSON u. F. H. C. CRICK, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. **18**, 123 [1953].

¹² G. R. WYATT u. S. S. COHEN, Biochem. J. **55**, 774 [1953].

¹³ A. D. HERSHEY, E. BURGI, H. J. CAIRNS, F. FRANKEL u. L. INGRAHAM, Carnegie Institution of Washington, Yearbook 1960/61, Cold Spring Harbor.

¹⁴ J. CAIRNS, J. molecular Biol. **3**, 756 [1961].

¹⁵ A. D. HERSHEY u. E. BURGI, J. molecular Biol. **2**, 143 [1960].

¹⁶ I. RUBENSTEIN, C. A. THOMAS, A. D. HERSHEY, Proc. nat. Acad. Sci. **47**, 113 [1961].

nüle zu besitzen scheint. Daß bei T 5, im Gegensatz zu Phagen mit Schnäppermechanismus, kein ATP gefunden wurde¹⁷, unterstützt diese Auffassung.

Unter den gegebenen Umständen stellt die Einschleusung der T 5-DNS durch die Zellwand hindurch in das Zellinnere ein besonderes Problem dar, dessen Bewältigung ohne aktive Hilfe von seiten der Zelle kaum vorstellbar erscheint. Es ist interessant, daß LANNI¹⁸ tatsächlich deutliche Hinweise

darauf fand, daß aktive Stoffwechselleistungen der Zelle zum erfolgreichen Abschluß des Infektionsvorganges unentbehrlich sind.

Wir sind Herrn Dr. KLEINSCHMIDT zu besonderem Dank dafür verpflichtet, daß er uns persönlich in seine Methodik einführte. Fräulein UTE MÖSCHLER und Fräulein KÄTHE VOLL danken wir für geschickte technische Hilfe.

Das Siemens Elektronenmikroskop ist eine Leihgabe der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

¹⁷ R. WAHL u. L. M. KOZLOFF, J. biol. Chemistry **237**, 1953 [1962].

¹⁸ Y. TH. LANNI, Virology **15**, 127 [1961].

Selektive Hydrierung von Steroidhormonen durch Clostridien unter anaeroben Bedingungen

VON KURT SCHUBERT, JOSEF SCHLEGEL und CLÄRE HÖRHOLD

Aus der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena (Direktor: Prof. Dr. med. H. KNÖLL)
(Z. Naturforsch. **18 b**, 284—286 [1963]; eingegangen am 15. November 1962)

Kulturen von *Clostridium paraputrificum* und *Clostridium tertium* hydrierten unter anaeroben Bedingungen Δ^4 -3-Ketosteroide der C 19- und C 21-Reihe stereospezifisch zu den 5β -3 α -Hydroxy-tetrahydro-Derivaten. Als Zwischenprodukte wurden die 5β -3-Keto-dihydro-Derivate nachgewiesen. Sauerstoff-Funktionen an C 11, C 17 oder in der Seitenkette wurden hierbei nicht verändert und waren ohne Einfluß auf den Hydrierungsverlauf. 21-Acetate wurden bei der Hydrierung nicht verseift.

Der Hydrierungsverlauf bei 17-Ketosteroiden mit Darmbakterien wurde in einer früheren Arbeit beschrieben¹. Es wurde nun die Selektivität des Hydrierungsablaufes im Ring A bei Testosteron, Progesteron, Desoxycorticosteron und Cortison sowie einiger Acetate bei anaerober Inkubation mit *Clostridium paraputrificum* und *Clostridium tertium* untersucht. Die erhaltenen Tetrahydro-Derivate vom $5\beta/3\alpha$ -Typ entsprechen den beim Menschen bekannten Stoffwechselprodukten. Die Ergebnisse sind sowohl für die Aufklärung der bestimmten Mikroorganismen der Darmflora innewohnenden Möglichkeiten der Steroidumwandlung als auch für die präparative Herstellung von Steroidmetaboliten von Interesse.

Material und Methoden

1. Fermentation

Zu 24 Stdn. alten Kulturen von *Clostridium paraputrificum* bzw. *Clostridium tertium* in Gesamtanaeroben-Medium² wurden je 800 ml Kulturlösung 25 mg

Steroid, gelöst in 2,5 ml Aceton, unter sterilen Bedingungen zugegeben. Die Kulturen wurden weiterhin 4–6 Tage unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C bebrütet. Nach 2–3 Tagen erfolgte erstmalig eine Probenentnahme, um den Hydrierungsverlauf papierchromatographisch zu kontrollieren. Die Abwesenheit von Fremdkörpern wurde vor der Steroidzugabe und bei Beendigung des Versuches überprüft.

2. Aufarbeitung

Nach beendeter Inkubation wurden die Kulturen jeweils 3-mal mit Äther bzw. Chloroform ausgeschüttelt. Die Lösungen wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Die getrockneten Extrakte wurden über Aluminiumoxyd bzw. Kieselgel chromatographiert. Die einzelnen Substanzen wurden 2- bis 3-mal umkristallisiert.

3. Papierchromatographie

Die Extrakte der Testosteron- und Progesteronansätze wurden auf Schleicher-Schüll-Papier 2040 bm untersucht. Für die Desoxycorticosteron-, Cortison- und die 21-Acetat-Ansätze wurde 2043 bm-Papier verwandt. Die Progesteron- und Desoxycorticosteron-21-acetat-An-

¹ K. SCHUBERT, J. SCHLEGEL u. C. HÖRHOLD, Z. Naturforsch. **17 b**, 84 [1962].

² H. HAENEL u. CH. KUNDE, Zbl. Bakteriell., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., I. Abt., Orig. **165**, 107 [1956].