ten uns zu der Hypothese, daß die Synthese von ribosomaler RNS und messenger-RNS in Säugetierzellen unabhängig voneinander reguliert werden¹². Für diese Hypothese sprechen auch die in der folgenden Arbeit mitgeteilten Befunde, die zeigen, daß durch Actinomycin in geringen Konzentrationen die Synthese der ribosomalen RNS vollständig unterbunden wird, während die Synthese der messenger-RNS noch weiterläuft.

Die Speicherung von hochmolekularer messenger-RNS in Zellen unter ungünstigen Bedingungen könnte durch einen Versuch der Zellen bedingt sein,

¹² G. KOCH u. H. KUBINSKI, 6th Intern. Congr. Biochem. New York, 1964.

durch Synthese von spezifischen RNS-Arten den Wachstumsblock zu überwinden. Die RNS-Akkumulation könnte aber auch durch Ausnutzung noch verfügbarer Synthesekapazitäten für RNS zustandekommen, und die synthetisierte RNS könnte bei Überführung der Zellen in bessere Wachstumsbedingungen dann ihre biologische Aktivität entfalten. In weiteren Untersuchungen wird versucht, darüber Auskunft zu erhalten.

Frau M. PAUL und Frä. I. VOLLERTSEN danken wir für gewissenhafte technische Assistenz. Die Arbeit wurde durchgeführt mit Unterstützung des Bundesministeriums für wissenschaftliche Forschung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Versuche zur Anreicherung von Hefe-Mangelmутanten, insbesondere mit Penicillin

O. OLTMANNS und F. LINGENS

Biochemische Abteilung des Chemischen Institutes der Universität Tübingen

(Z. Naturforschg. **21 b**, 266—273 [1966]; eingegangen am 30. September 1965)

Bei der Suche nach einem Anreicherungsverfahren für biochemische Mangelmутanten von Hefen wurden mehrere Agenzien ausgetestet. Nur mit Penicillin konnten Anreicherungs-effekte erzielt werden. Der Anteil der Mutanten stieg durch die Penicillinbehandlung von 10% nach der Methansulfonsäureäthylester-Induktion auf 20—50 Prozent. Veränderungen in der Häufigkeit der Mutantentypen mindern den Nutzeffekt des Anreicherungsverfahrens.

Biochemische Mangelmутanten werden für genetische und biochemische Untersuchungen in großer Zahl benötigt. Um den Arbeitsaufwand zu ihrer Isolierung klein zu halten, bedient man sich möglichst hochwirksamer Mutagene, oder man reichert die durch Mutagene induzierten Mutanten in einem besonderen Verfahren an. Bei Bakterien wird meistens das Verfahren von LEDERBERG und ZINDER¹ und DAVIS² verwendet, bei dem die Wildstammzellen in Minimalmedium selektiv durch Penicillin abgetötet werden, während die Mutanten am Leben bleiben. Schimmelpilz-Mutanten lassen sich durch die Sporen-Filtrationstechnik (z. B. für *Neurospora*³) und durch Inosit-Verarmung Inosit-bedürftiger Stämme⁴ anreichern. Mit letzterer Methode („inositless

death“) hat kürzlich MEGNET⁵ auch bei *Schizosaccharomyces pombe* Erfolg gehabt. Für *Saccharomyces* konnte noch kein Anreicherungsverfahren entwickelt werden, obwohl es an Versuchen dazu nicht gefehlt hat⁶.

Wir hatten in einer früheren Arbeit die Wirksamkeit verschiedener Mutagene bei *Saccharomyces* geprüft und Mutationsraten von etwa 4—5% gefunden⁷. Das Ziel der hier zu beschreibenden Untersuchungen war es, eine weitere Steigerung der Mutantenausbeute durch Anwendung von Anreicherungsverfahren zu erreichen. Es lag nahe, entsprechend der Penicillin-Methode Pilzantibiotika an den Hefen auszutesten. Diese Versuche führten jedoch schon früher nicht zu dem gewünschten Er-

¹ J. LEDERBERG u. N. ZINDER, J. Amer. chem. Soc. **70**, 4267 [1948].

² B. D. DAVIS, J. Amer. chem. Soc. **70**, 4267 [1948].

³ V. W. WOODWARD, J. R. DEZEEUW u. A. M. SRB, Proc. nat. Acad. Sci. USA **40**, 192 [1954].

⁴ H. E. LESTER u. S. R. GROSS, Science [Washington] **129**, 572 [1959].

⁵ R. MEGNET, Experientia [Basel] **20**, 320 [1964].

⁶ A. G. MOAT, N. PETERS, JR. u. A. M. SRB, J. Bacteriol. **77**, 673 [1959].

⁷ F. LINGENS u. O. OLTMANNS, Z. Naturforschg. **19 b**, 1058 [1964].

folg⁶, und auch wir konnten, wie gezeigt werden soll, keine Anreicherung nach Einwirkung von Pilz-antibiotika und einigen anderen Stoffen beobachten. Dagegen schienen Versuche mit Penicillin überraschenderweise auch bei Hefen erfolgversprechend zu sein⁸.

Methodik

Wir verwendeten für alle Versuche den haploiden, wenig klumpenden Stamm S 288 C von *Sacch. cerevisiae*, den wir Herrn Dr. R. K. MORTIMER, Berkeley, Kalifornien, verdanken und einige daraus gewonnene Mangelmутanten.

Dieser Stamm enthielt in früheren Versuchen vermutlich auch diploide Zellen. Fräulein Dr. I. MÜLLER, Institut für Entwicklungsphysiologie der Universität Köln, konnte in unserer Kultur diploide neben haploiden Zellen nachweisen, die beide gleich schnell wachsen. Wir danken Fräulein Dr. I. MÜLLER für die Isolierung eines nicht sporulierenden, allem Anschein nach rein haploiden Klones. Es läßt sich nicht mehr feststellen, wann die Teildiploidisierung unserer Kultur eingetreten ist. Vermutlich durch Verwendung des rein haploiden Stammes konnten jetzt höhere Mutationsraten als in früheren Versuchen⁷ erzielt werden.

Als Komplettmedium diente ein Hefeextrakt-Peptonglucose-Medium, als Minimalmedium eine Nährsalzlösung mit 1% Glucose und 100 γ Biotin/Liter. Zum Waschen wurde eine Salzlösung (0,5% NaCl,

0,012% $MgSO_4 + 7 H_2O$) benutzt. Alle Versuche wurden bei 30 °C durchgeführt. Weitere methodische Einzelheiten sind in der früheren Arbeit⁷ aufgeführt bzw. werden unten bei den Versuchsbeschreibungen angegeben.

Ergebnisse

Versuche mit verschiedenen Hemmstoffen

Zunächst testeten wir in Modellversuchen eine Reihe von Antibiotika und anderen Stoffen, bei denen auf Grund von Angaben in der Literatur eventuell Anreicherungs-effekte zu erwarten waren (Tab. 1). Über Versuche mit ³H-Thymidin und Penicillin wird in den darauf folgenden Abschnitten berichtet.

Für die Versuche wurden der Wildstamm und eine Tryptophan-Mangelmутante über Nacht in je 5 ml Komplettmedium angezogen, 2-mal gewaschen und in 5 ml Salzlösung suspendiert. Entweder 0,5 oder 0,05 ml der Hefesuspension wurden in 5 ml Minimalmedium mit Zusätzen der zu prüfenden Substanz gegeben. Nach meist eintägiger Inkubation wurde auf Komplettagar plattiert, und die Abtötungsraten von Wildstamm und Mutanten wurden verglichen.

Von den untersuchten Stoffen (Tab. 1) hat keiner zu einer Anreicherung von Hefemutanten geführt, d. h. zu einer bevorzugten Abtötung des Wildstam-

Verbindung	Herkunft	Lit.	Bemerkungen	Wirkung
4-Androsten-3.17-dion	Fluka A.G. Chem. Fabrik Buchs.	9	Steroid	ohne Befund
„Moronal“ (Nystatin)	Chem. Fabrik Von Heyden, München	6, 10	Polyen-Antibiotikum aus <i>Streptomyces noursei</i>	Hemmung durch 10–100 γ /ml
„GM 83“	Farbwerke Hoechst	—	Polyen-Antibiotikum	Hemmung durch 1 γ /ml
Actidion (Cycloheximid)	Upjohn Co., Kalamazoo, USA.	11	Antibiotikum aus <i>Strept. griseus</i>	Hemmung durch 100 γ /ml
Xanthocillin	Chemie Grünenthal, Stollberg, Rhld.	12	Antibiotikum aus <i>Penic. notatum</i>	ohne Befund
Novobiocin	Farbwerke Hoechst	13	Antibiotikum aus <i>Strept. niveus</i>	ohne Befund
Phyllomycin	Dr. G. Schmidt-Kastner, Bayer-Elberfeld	14	Antibiotikum aus <i>Strept. umbrosus</i>	Hemmung durch 1 γ /ml
Bacimethrin	Synthese nach ¹⁵	16	Antibiotikum aus <i>Bac. megatherium</i>	ohne Befund
8-Azaguanin	Sigma, Chemical Co., St. Louis, USA.	17	—	ohne Befund

Tab. 1. Wirkung verschiedener Verbindungen auf *Saccharomyces cerevisiae*.

⁸ F. LINGENS u. O. OLTSMANN, Naturwissenschaften **50**, 232 [1963].

⁹ E. S. MAXWELL, J. S. MCGUIRE u. G. M. TOMKINS, J. Bacteriol. **80**, 1 [1960].

¹⁰ ST. C. KINSKY, Proc. nat. Acad. Sci. USA **48**, 1049 [1962].

¹¹ K. GUNDERSSEN u. T. WADSTEIN, J. gen. Microbiol. **28**, 325 [1962].

¹² R. BEIERSDORF u. W. AHRENS, Pharmazie **8**, 796 [1953].

¹³ TH. D. BROCK, J. Bacteriol. **84**, 779 [1962].

¹⁴ Patentschrift DBP Nr. 1061964/(1959).

¹⁵ H. C. KOPPEL, R. H. SPRINGER, R. K. ROBINS u. C. C. CHENG, J. org. Chemistry **27**, 1492 [1962].

¹⁶ F. TANAKA, S. TAKEUCHI, N. TANAKA, H. YONEHARA, H. UMEZAWA u. Y. SUMIKI, J. Antibiotics [Tokyo], Ser. A, **14**, 161 [1961].

¹⁷ J. T. WACHSMAN u. R. MANGALO, J. Bacteriol. **83**, 35 [1962].

mes. Dieses negative Resultat wird durch inzwischen von anderen Autoren veröffentlichte Befunde über die Wirkungsweise einzelner Antibiotika¹⁸ z. T. verständlich.

Versuche mit Tritium-Thymidin

Von LUBIN¹⁹ ist eine weitere Methode zur Anreicherung von Bakterien-Mutanten beschrieben worden. Sie beruht auf der Aufnahme von Tritium-Thymidin durch in Minimalmedium wachsende Wildstammzellen und der Letalwirkung des Tritium-Zerfalles. Wegen der geringen Reichweite des vom Tritium emittierten β -Teilchens (maximal 6μ in Wasser) werden vermutlich nur die Zellen geschädigt, die Tritium inkorporiert haben, nicht aber benachbarte Zellen¹⁹. Wir haben diese Methode auch bei Hefen angewandt.

Im ersten Versuch wurden der Wildstamm und eine try^- -Mutante 2 Stdn. in Minimalmedium mit 3H -Thymidin-Zusatz inkubiert. Die spezifische Aktivität des Thymidins betrug $1,9\text{ C/mMol}$, die Aktivität im Ansatz $40\mu\text{C/ml}$. Nach der zweistündigen Inkubation wurden die Suspensionen im Eisschrank bei $+4^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Von Zeit zu Zeit wurden Proben entnommen und die Überlebensraten ermittelt. Parallel zu dem Versuch mit Hefen wurde ein ganz entsprechender Versuch mit *E. coli* 15 und einer try^- -Mutante dieses Stammes durchgeführt.

In einem zweiten Versuch mit Hefen wurde der Wildstamm nach der Methode von MOAT, PETERS und

SRB⁶ mit einer rotgefärbten, Adenin-bedürftigen Mutante gemischt und die Mischpopulation wie oben mit Tritium-Thymidin inkubiert. In wöchentlichen Abständen wurden Proben entnommen und auf Komplettagar plattiert. Durch Auszählen der weißen und roten Kolonien lassen sich leicht Abtötungs-raten von Wildstamm und Mutante und der Anreicherungseffekt ermitteln.

Die Ergebnisse des ersten Versuches sind in Abb. 1 dargestellt: Der Wildstamm von *E. coli* stirbt während der mehrwöchigen Aufbewahrungszeit bei $+4^\circ\text{C}$ bedeutend schneller ab als die Mutante. Bei *Saccharomyces* beobachtet man dieses Phänomen nicht. — Im zweiten Versuch sank die Zahl der überlebenden Hefezellen im Zeitraum von 8 Wochen auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes, jedoch bei dem Wildstamm und der ad^- -Mutante in gleicher Weise.

Da bei Bakterien mit der Tritium-Thymidin-Methode Mutanten angereichert werden konnten¹⁹ und auch in dem von uns durchgeführten Vergleichsversuch (Abb. 1) der Wildstamm von *E. coli* mehr geschädigt wurde als die Mutante, stellt sich die Frage, warum ein gleicher Effekt bei Hefen nicht zu erzielen ist. Eine Erklärung dafür könnte darin liegen, daß Hefen wie andere Pilze²⁰ Thymin und Thymidin schlecht aufnehmen bzw. verwerten²¹. Es wäre in diesem Falle angebracht, statt 3H -Thymidin z. B. 3H -Leucin zu verwenden, das von LUBIN²² ebenfalls mit Erfolg zur Anreicherung von *E. coli*-Mutanten benutzt wurde. Wir haben derartige Versuche nicht durchgeführt, weil wir inzwischen in Vorversuchen mit Penicillin aussichtsreichere Ergebnisse erhalten hatten⁸.

Versuche mit Penicillin

In einer früheren Arbeit⁸ konnten wir den Befund von STRUTZ und KUNTZE²³ bestätigen, daß hohe Penicillin-Konzentrationen *Saccharomyces cerevisiae* abtöten. Wir hatten ferner gewisse Anreicherungseffekte nachgewiesen: Eine in Modellversuchen eingesetzte Tryptophan-Mangelmutante und eine Adenin⁻-Mutante wurden durch Penicillin langsamer abgetötet als der Wildstamm⁸.

Im folgenden Experiment wird untersucht, welchen Einfluß die Penicillin-Konzentration auf die Abtötungsraten hat.

Abb. 1. Überlebensraten von *Sacch. cerevisiae*-Wildstamm und -Mutante und von *E. coli*-Wildstamm und -Mutante während einer mehrwöchigen Aufbewahrungszeit bei $+4^\circ\text{C}$ nach 2-stgd. Inkubation mit 3H -Thymidin.

¹⁸ G. D. SHOCKMAN u. J. O. LAMPEN, J. Bacteriol. **84**, 508 [1962].

¹⁹ M. LUBIN, Science [Washington] **129**, 838 [1959].

²⁰ C. C. GORDON u. O. L. STEIN, Radiat. Botany **2**, 7 [1962].

²¹ D. H. WILLIAMSON, Biochem. J. **90**, 25 P [1964].

²² M. LUBIN, J. Bacteriol. **83**, 696 [1962].

²³ I. STRUTZ u. C. KUNTZE, Naturwissenschaften **42**, 464 [1955].

Abb. 2. Abtötung von *Saccharomyces cerevisiae*-Wildstamm (a) und ad^{-} -Mutante (b) durch Penicillin-G-Kalium-Lösung verschiedener Konzentration und (c) Verhältnis der Überlebensraten von Mutante und Wildstamm („Anreicherung“).

Der Wildstamm und die rote Adenin-Mutante E 188 wurden 2 Tage auf Komplettagar angezogen. Je zwei große Platinösen voll Hefezellen wurden in je 5 ml Salzlösung suspendiert, 2-mal gewaschen, in 5 ml Salzlösung resuspendiert und im Verhältnis 30 : 1 (Wildstamm : Mutante) gemischt. Je 0,05 ml dieser Mischsuspension wurden in 3 50-ml-Kolben mit 5 ml Minimalmedium gegeben, so daß eine Zellkonzentration von ca. 10^6 Zellen/ml resultierte. Die 3 Kolben wurden mit 50, 75 bzw. 100 mg Penicillin-G-Kalium versetzt (entsprechend 10, 15 bzw. 20 mg/ml) und in einem Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen, auf Komplettagar plattiert und die Überlebensraten von Wildstamm und Mutante festgestellt.

Abb. 2 bringt die Ergebnisse: Nicht nur die Abtötungsrate des Wildstammes (Abb. 2 a), sondern auch die der Mutante (Abb. 2 b) nimmt mit der Penicillin-Konzentration zu. Für jede Konzentration scheint es einen bestimmten Prozentsatz von überlebenden Mutantenzellen zu geben, er liegt für die angegebenen Konzentrationen bei 10%, 4% bzw. 0,1 Prozent. Der Anreicherungseffekt (% überlebende Zellen der ad^{-} -Mutante: % überlebende Wildstammzellen, Abb. 2 c) ist bei einer Konzentration von 15 mg Penicillin/ml nach 48 Std. Inkubationsdauer am größten (490-fache Anreicherung, Abb. 2 c). Diese Konzentration von 15 mg/ml wählen wir für die weiteren Versuche, denn bei einer Konzentration von 10 mg/ml werden zu wenig Wildstammzellen abgetötet, bei 20 mg/ml zuviel Mutantenzellen.

Es war von Interesse zu sehen, ob und wie stark andere Hefe-Mutanten durch Penicillin abgetötet würden. Im nächsten Versuch wurden daher nach der oben angegebenen Methode mehrere *Sacch. cerevisiae*-Mutanten mit 15 mg Penicillin/ml behandelt (Abb. 3). Von 2 Tryptophan-Mutanten war die eine (E 40) unempfindlicher gegen Penicillin als der Wildstamm, die andere (HK 145) wurde ebenso wie eine Lysin-bedürftige Mutante (G 47) sogar noch schneller als der Wildstamm abgetötet. Eine weitere Mutante (KP 400, mit Adenin- und Argininbedarf) war relativ resistent gegen Penicillin. Das konnte in diesem Fall erwartet werden, denn diese Mutante war in einem Anreicherungsversuch nach 48-stdg. Penicillin-Einwirkung isoliert worden (s. u.). — Zum Vergleich haben wir einen Versuch mit *E. coli* durchgeführt (Abb. 4): Die Tryptophan-Mutante wurde durch 15 mg Penicillin/ml nur bis auf 50% abgetötet, und sie starb erst ab, nachdem sie durch eine Gabe von Tryptophan zum Wachsen gebracht worden war.

Die bisher geschilderten Versuche zeigen, daß in Minimalmedium mit 15 mg Penicillin/ml relativ gute Anreicherungseffekte zu erzielen sind. Bei dieser Konzentration bleiben jedoch nicht alle Hefemutanten am Leben. Die Überlebensrate der Mutanten scheint nicht von ihrem Nährstoffbedarf abhängig zu sein, wie die verschieden große Empfindlichkeit der beiden Tryptophanmutanten zeigt.

Anreicherung Methansulfonsäureäthylester-induzierter Mutanten

Bei der Penicillin-Anreicherung von Mutanten werden meistens mehrere Schritte ausgeführt²⁴:

1. Induktion von Mutanten durch ein mutagenes Agens, 2. Inkubation der behandelten Zellen in Kompletmedium zur genotypischen Ausprägung

Abb. 3. Abtötung von *Saccharomyces cerevisiae*-Mutanten durch 15 mg Penicillin/ml.

Abb. 4. Abtötung von *E. coli*-Wildstamm und *try*⁻-Mutante durch 15 mg Penicillin/ml. Nach 24 Std. Inkubation in Minimalmedium wurden 20 γ 1-Tryptophan/ml zugegeben.

²⁴ B. D. DAVIS, Experientia [Basel] 6, 41 [1950].

der Mutationen, 3. Inkubation in N-freiem Minimalmedium zur phänotypischen Ausprägung, 4. Behandlung der Population in Minimalmedium mit Penicillin, 5. Isolierung der Mutanten.

In unseren Versuchen mit Hefen konnten wir keinen besonderen Vorteil der Aushungerung in N-freiem Minimalmedium bemerken. Nach einigen Vorversuchen benutzten wir schließlich folgende Versuchsanordnung zur Anreicherung induzierter Hefemutanten:

Der Wildstamm S 288 C wurde 2 Tage lang auf Komplettagar vorgezchtet. Dann wurden mit einer Platinöse Hefezellen entnommen, in 5 ml Salzlösung suspendiert, 2-mal gewaschen und in 5 ml Salzlösung aufgeschwemmt. Die Zellen von 2,5 ml dieser Suspension wurden mit einer 2-proz. Lösung von Methansulfonsäureäthylester-MSÄ-(Fa. Th. Schuchardt, München) in Phosphatpuffer bei pH 7,3–7,0 im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Nach 2 Std. (Versuch 1) bzw. 1,5 Std. (Versuch 2) Inkubation (ca. 10% Überlebende) wurden Proben 1 : 10 verdünnt und auf Komplettagar plattiert. Es wuchsen in 3 Tagen ca. 15 000 Kolonien je Platte. Die Zellen wurden mit Salzlösung von einer Platte abgeschwemmt, 2-mal gewaschen und auf eine Konzentration von 10⁸ Zellen/ml verdünnt. 0,05 ml dieser Suspension wurden mit 5 ml Minimalmedium und 75 mg Penicillin-G-Kalium im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und nach der früher angegebenen Methode⁷ die Mutanten isoliert und identifiziert.

Aus Tab. 2 ist das Ergebnis zweier Versuche ersichtlich: Nach der Methansulfonsäureäthylester-Behandlung erhält man bei Überlebensraten zwischen 6,5 und 49% ungefähr 5–15% Mutanten unter den Überlebenden. Die 3-tägige Inkubation der MSÄ-behandelten Zellen auf Komplettagar vermindert im Versuch 2 die Mutationsrate von 17 auf 9%, was darauf hindeutet, daß sich die Wildstammzellen auf der Komplettagarplatte etwas stärker vermehrt haben als die mutierten Zellen.

Die Behandlung mit Penicillin führte zu einer Zunahme des Mutantenanteiles von 12 auf 50% im 1. Versuch und von 9 auf 20% im 2. Versuch. Die Mutantenausbeute läßt sich also durch die Penicillinbehandlung merklich steigern.

Wie die Untersuchung des Nährstoffbedarfes der isolierten Mutanten zeigt (Tab. 2), treten nach der Penicillin-Anreicherung kaum weniger Mutantentypen auf als in Versuchen ohne Penicillin-Einwirkung. Auffallend ist dagegen der große Anteil Adenin-bedürftiger Mutanten, die im 1. Versuch 71%, im 2. Versuch 22% aller Mutanten ausmachen.

Behandlung mit	Methansulfonsäureäthylester (MSÄ)					MSÄ, Kom- plett- agar	MSÄ, Komplettagar, Penicillin				
Behandlungsdauer [Std.n.]	1	1,5	2	2,5	Σ		10	24	30	48	Σ
Versuch 1											
Überlebende [%]	49	21,6	7,2	2,8	—	100	0,17	0,02	0,019	0,026	—
Kolonien getestet	60	40	—	10	110	180	140	160	120	140	560
Mutanten gefunden	3	2	—	4	9	22	42	84	50	41	217
Mutanten [%]	5	5	—	40	8	12,2	30	52,5	41,7	29,3	38,8
Versuch 2											
Überlebende [%]	34,4	18,7	6,5	—	—	100	2,48	0,23	0,27	0,31	—
Kolonien getestet	100	120	22	—	242	140	120	120	120	112	472
Mutanten gefunden	17	22	3	—	42	13	16	21	24	12	73
Mutanten [%]	17	18,3	13,6	—	17,3	9,3	13,3	17,5	20	10,8	15,5
Versuch Mutanten mit Bedarf an	1 + 2	1 + 2	2	1	1 + 2	1 + 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 + 2
Methionin	4	4	—	—	8	4	2 1	3 4	1 2	— 1	14
Serin	—	—	—	—	—	—	— 1	— —	— —	— —	1
Glycin	—	—	—	—	—	—	— —	— —	— 1	— 1	2
Leucin	1	1	—	—	2	2	— —	— —	— —	— —	—
Isoleucin	—	—	—	1	1	1	— —	— —	— —	— 1	1
Threonin	—	—	—	—	—	—	1 —	— —	— —	— —	1
Lysin	1	—	—	1	2	2	1 1	— 1	— —	1 —	4
Tyrosin	—	—	—	—	—	—	— —	— —	— —	— 1	1
Phenylalanin	—	1	—	—	1	—	— 3	— 1	— —	— —	4
Tryptophan	2	—	—	—	2	8	— —	— 4	— —	— —	4
Pyridoxin-HCl	—	2	—	—	2	3	— —	1 —	— —	— —	1
Nicotinsäureamid	—	—	—	—	—	—	— 1	— 1	— —	— —	2
Glutaminsäure	—	—	—	1	1	1	— —	— —	— —	— —	—
Asparaginsäure	—	1	—	—	1	—	— —	— —	— —	— —	—
Thiamin	3	7	—	—	10	5	3 2	— —	1 1	— 1	8
Ca-Pantothenat	—	—	—	—	—	1	1 1	— —	— —	— 1	3
Inosit	1	1	1	1	4	1	1 —	1 2	— 2	1 —	7
Adenin	1	—	—	—	1	—	26 4	69 3	37 3	23 6	171
Uracil	1	2	1	—	4	—	— —	1 1	— 1	— —	3
Arginin	2	1	—	—	3	3	4 —	4 —	2 2	1 —	13
Histidin	1	—	—	—	1	2	— —	— 1	— 2	1 —	4
Tyr + Phe	—	—	—	—	—	—	— —	— —	— 3	— —	3
Tyr + Phe + Try + pAbs	1	2	—	—	3	1	2 1	— 3	5 4	4 —	19
Meth + Threo	—	—	—	—	—	1	— —	— —	— —	— —	—
Meth + Lys	1	—	—	—	1	—	— —	— —	— —	— —	—
Meth + Ade	—	—	—	—	—	—	— —	— —	— 1	— —	1
Arg + Ade	—	—	—	—	—	—	— —	3 —	3 —	10 —	16
nicht identifiziert	1	2	1	—	4	—	1 1	2 —	1 2	— —	7
Summe	20	24	3	4	51	35	42 16	84 21	50 24	41 12	290

Tab. 2. Anzahl und Art der vor und nach Penicillineinwirkung isolierten Mutanten.

Diskussion

Zur Anreicherung von Mangelmutanten. — Von allen untersuchten Agenzien hatte nur Penicillin die Eigenschaft, biochemische Mangelmutanten von *Saccharomyces cerevisiae* anzureichern. Die Penicillinbehandlung vermehrte den Anteil der Methansulfonsäureäthylester-induzierten Mutanten in unseren

Versuchen auf das 2–4-fache. Diese Erhöhung des Mutantenanteiles ist nicht besonders groß, selbst wenn man bedenkt, daß wegen der hohen Mutationsrate bei Verwendung von MSÄ nur noch eine etwa 10-fache Erhöhung des Mutantenanteiles möglich ist.

Nach der Penicillin-Anreicherung wurden relativ viele Adenin-bedürftige Mutanten gefunden. Eine

gleichmäßigere Verteilung der Mutantentypen ist im allgemeinen erwünscht, denn oft wird nicht gerade der häufig auftretende Typ untersucht werden. Es kommt hinzu, daß die zahlreichen Mutanten eines Typs nicht unbedingt unabhängig voneinander entstanden sein müssen. Die durch ein mutagenes Agens induzierten Mutanten werden in Anreicherungsversuchen zur genotypischen Ausprägung des Merkmales in Kompletmedium vermehrt. Daher können Zellen mit gleichem genetischen Defekt aus einem Klon stammen und mehrmals isoliert werden. ADELBERG und MYERS²⁵ haben aus diesem Grunde eine Modifikation der Penicillin-Technik entwickelt, bei der die Anreicherungsprozedur auf festen Nährböden durchgeführt wird. Mit dieser Technik werden Mutanten eines Klones nur einmal isoliert. Sie ist jedoch mit einigem Arbeitsaufwand verbunden, und Verluste an Mutanten sind nicht auszuschließen.

In welchem Ausmaß in unseren Versuchen Mehrfachisolierungen von Mutanten eine Rolle spielen, läßt sich nur abschätzen. Auf der einen Seite kommen Einfach-Isolierungen sicher häufiger vor als die Tabelle erkennen läßt (z. B. unterscheiden sich die vier Tryptophan-Mutanten und die zwei Nicotinsäure-Mutanten in Wachstumstests mit den entsprechenden Vorstufen). Andererseits gehen die 16 Mutanten mit Arginin- und Adenin-Bedarf wohl auf eine Zelle zurück, denn Mutanten dieses Typs haben wir vorher weder in eigenen Versuchen gefunden noch wurden sie in der Literatur beschrieben.

Da biochemische Zusammenhänge zwischen der Arginin- und der Adenin-Biosynthese nicht bestehen, liegt bei den arg^- , ad^- -Mutanten eventuell sogar der seltene Fall einer gleichzeitigen Induktion von zwei Mutationen in einer Zelle vor. Eine mehrmalige Induktion solcher Mutanten in einem Versuch wäre äußerst unwahrscheinlich.

Die zahlreichen Adenin-Mutanten haben sicher nicht nur in einer einzigen Mutation ihren Ursprung, denn im Versuch 1 wurden unter ihnen zwei rote Mutanten gefunden, im Versuch 2 eine rote Mutante. Wegen der großen Häufigkeit dieser Mutanten liegt jedoch trotzdem der Verdacht nahe, daß ein Teil davon Mehrfachisolierungen zuzuschreiben ist.

Das gehäufte Auftreten von Mutanten eines Typs und die Möglichkeit von mehrmaligen Isolierungen von mutierten Zellen eines Klones mindern den praktischen Wert des hier beschriebenen Anreicherungsverfahrens erheblich. Man könnte nun versuchen, die modifizierte Technik von ADELBERG und MYERS²⁵ auch bei den Hefen anzuwenden. Wir halten es aber für besser, auf Anreicherungsverfahren ganz zu verzichten, da man durch die Anwendung hochwirksamer Mutagene, wie z. B. Methansulfonsäureäthylester oder auch 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin*, leicht Mutationsraten von über 10% erreichen kann. Die Penicillinmethode und andere Anreicherungsverfahren mögen eine gewisse Bedeutung haben in Fällen, in denen es darauf ankommt, Mutanten nach Induktion mit wenig wirksamen Mutagenen zu isolieren.

Zur Wirkung des Penicillins auf *Saccharomyces cerevisiae*. Penicillin greift in die Biosynthese der Bakterienzellwand ein, wie Untersuchungen verschiedener Autoren gezeigt haben. Nach Versuchen an grampositiven Bakterien nahm man an, daß der Einbau des Muropeptides in die Zellwand durch Penicillinwirkung unterbunden und dieses daher in Form eines Uridinnucleotides akkumuliert würde. Experimente mit gramnegativen Organismen ließen jedoch Zweifel an der allgemeinen Gültigkeit dieser speziellen Vorstellungen aufkommen^{26, 27}.

Die Zellwand der Hefe ist nach den bisherigen Vorstellungen²⁸ ganz anders aufgebaut als die der Bakterien, insbesondere ist keine Muropeptidstruktur gefunden worden. Da Penicillin trotzdem abtötend auf Hefen wirkt, müssen entweder die ursprünglichen Vorstellungen vom Penicillin-Wirkungsmechanismus (Verhinderung des Muropeptideinbaues) oder die von der Zusammensetzung der Hefezellwand ergänzt werden.

Es soll kurz diskutiert werden, ob nicht das Penicillin selbst, sondern eine Verunreinigung des Penicillins die Wirkung auf Hefen hervorrufen könnte. Zwei Beobachtungen sprechen gegen eine solche Verunreinigung: Erstens haben wir Penicillin verschiedener Chargen, nämlich Penicillin als Kalium- und als Natriumsalz verwendet. Die hypothetische Verunreinigung müßte also ganz allgemein in jedem Penicillinpräparat enthalten sein und übrigens auch in dem Penicillin, das STRUTZ und KUNTZE 1955 ver-

²⁵ E. A. ADELBERG u. J. W. MYERS, J. Bacteriol. **65**, 348 [1953].

* Versuche an Hefen mit diesem Agens: F. LINGENS u. O. OLTMANN, Z. Naturforschg., in Vorbereitung.

²⁶ R. PLAPP u. O. KANDLER, Arch. Mikrobiol. **50**, 171 [1965].

²⁷ R. PLAPP u. O. KANDLER, Arch. Mikrobiol. **50**, 282 [1965].

²⁸ W. J. NICKERSON, Bacteriol. Rev. **27**, 305 [1963].

wendet haben. Zweitens wird interessanterweise eine *E. coli*-Mutante in Minimalmedium, in dem sie nicht wachsen kann, auch durch die von uns verwendeten hohen Penicillin-Konzentrationen nicht abgetötet. Die im Penicillin enthaltene hypothetische Verunreinigung müßte also für *Saccharomyces cerevisiae* giftig sein, nicht aber für *E. coli*. Wir halten die Existenz einer solchen Verunreinigung deshalb für unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Bakterien wirkt Penicillin in Minimalmedium nicht nur auf den Hefewildstamm abtötend, sondern auch auf die Mutanten, die nicht wachsen. Das würde gegen einen Wirkungsmechanismus sprechen, der in den Zellwand-Aufbau-Mechanismus eingreift. Jedoch ist es durchaus vorstellbar, daß die Hefezellwand auch in nicht wachsenden Zellen ständig auf- und abgebaut würde und dabei dem Angriff des Penicillins ausgesetzt wäre. Die Empfindlichkeit der Mutanten gegen Penicillin reicht demnach nicht aus als Beweis für eine andersartige Wirkung des Penicillins bei Hefen.

Die Synthese der Bakterienzellwand läßt sich nicht nur durch Penicillin, sondern auch durch Novobiocin und D-Cycloserin hemmen. Novobiocin hatte in unseren Versuchen keinen Effekt auf *Saccharomyces*. Da Novobiocin im sauren Hefe-Minimalmedium nur schlecht löslich ist, lassen sich aus seiner Unwirksamkeit keine weitreichenden Schlüsse ziehen. Das gut lösliche D-Cycloserin wirkte in einem kürzlich angestellten Experiment in hohen Konzentra-

tionen abtötend, jedoch sind von diesem Antibiotikum neben dem Eingreifen in den Zellwand-Aufbau-Mechanismus noch andere Wirkungsmechanismen bekannt, z. B. die Hemmung von Transaminasen^{29, 30}.

Bei Bakterien führt die Einwirkung von Penicillin auf wachsende Zellen zur Auflösung der Zellwand und zur Lyse. Die durch Penicillin abgetöteten Hefe-Zellen unterscheiden sich im mikroskopischen Bild nicht von lebenden Zellen. Auch diese Beobachtung schließt noch nicht eine Hemmung des Zellwand-Aufbaumechanismus durch Penicillin aus: Wenn nur eine der Schichten der Hefezellwand gegen Penicillin empfindlich wäre, könnten doch die anderen Schichten ausreichen, um der Penicillin-behandelten Zelle die Form zu erhalten.

Die Frage, ob das Penicillin bei Hefen ebenso wie bei Bakterien in den Zellwand-Aufbaumechanismus eingreift, kann also auf Grund der hier geschilderten Versuche nicht entschieden werden. Muraminsäure ließ sich aus Hefezellwänden nicht isolieren³¹.

Fräulein G. TRIBBENSEE und Fräulein U. SCHUSTER danken wir für fleißige und sorgfältige Mitarbeit. Dem Bundesministerium für wissenschaftliche Forschung und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für Unterstützung dieser Arbeit. Von der Bayer AG, W.-Elberfeld, erhielten wir dankenswerterweise eine größere Menge Penicillin und ein weiteres Antibiotikum, von den Farbwerken Hoechst, Frankfurt, und der Chemie Grünenthal, Stollberg, verschiedene Antibiotika.

²⁹ A. E. BRAUNSTEIN, R. M. AZARKH u. Hsu Ting SENG, *Biochimija* **26**, 882 [1961]; zit. n. F. C. NEUHAUS u. J. L. LYNCH, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **8**, 377 [1962].

³⁰ P. OEHME, *Naturwissenschaften* **50**, 20 [1963].

³¹ F. LINGENS u. J. DAUM, unveröffentlicht.