

Phagen, Colicine und makroregulatorische Phänomene (Nobel-Vortrag)^[**]

Von S. E. Luria^[*]

Die frühen Arbeiten über das Wachstum, die Mutationen und die Rekombination von Phagen hatten das glückliche Schicksal, beim Errichten des inzwischen intellektuell befriedigenden Gebäudes der Molekularbiologie als Säulen zu dienen. Es ist unnötig, jetzt die Geschichte jener frühen Arbeiten zu wiederholen, die mir das Glück einer freundschaftlichen und anregenden Zusammenarbeit mit Max Delbrück und Alfred Hershey brachten. Schwieriger noch wäre der Versuch, hier die Entwicklungslinien nachzuzeichnen, die von den ersten Arbeiten an den Phagen zur derzeitigen Kenntnis der Virusreproduktion, der Genreplikation, der Genfunktion sowie ihrer Regulation führen. Die größte Befriedigung allerdings verschaffen mir die Rolle meiner Studenten und Mitarbeiter bei diesen Entwicklungen sowie meine Erinnerungen an die persönliche Zusammenarbeit mit vielen der Pioniere dieses großen intellektuellen Abenteuers.

Die Phagenforschung hat sich inzwischen weit verzweigt; jeder Teil hat in gewissem Maße zum Aufbau der Molekularbiologie beigetragen. Eine der bemerkenswertesten Forschungsrichtungen betraf die Genfunktion und ihre Regulation. Die Hauptbeiträge der Phagenforschung auf diesem Gebiet waren die Arbeiten von André Lwoff und François Jacob über die Lysogenie, die François Jacob und Jacques Monod die Formulierung der Operon-Theorie ermöglichten. Die regulatorischen Phänomene, mit denen sich diese Theorie beschäftigt, betreffen die Funktionen von Genen oder Gen-Gruppen. In diesem Vortrag möchte ich mich mit Möglichkeiten des Zuganges zu bestimmten Aspekten der zellulären Regulation beschäftigen, die „makroregulatorische Phänomene“ einschließen. Damit meine ich solche Phänomene, bei denen die beobachteten funktionellen Änderungen einige der Hauptprozesse der lebenden Zelle betreffen, z. B. die DNA- oder die RNA- oder die Proteinsynthese oder den Energiestoffwechsel oder die Funktion der selektiven Permeabilität der zellulären Membranen.

Das Studium von Antibiotika wie Penicillin oder Streptomycin, Reagentien, die auf „molare“ Art in den zellulären Prozeß eingreifen, hat wesentlich zur Aufklärung von Vorgängen wie dem Aufbau und der Biosynthese der Bakterienzellwand oder der Proteinsynthese beigetragen. Wird dagegen eine der Hauptfunktionen der Zelle durch ein Agens verändert wie etwa einen Bakteriophagen oder ein anderes Makro-

molekül, das sozusagen „quantenhaft“ wirkt, als einzelne Partikel, so ist die Situation noch viel aufregender, weil irgendeine Art von Verstärker zwischen dem Agens-Individuum und den angegriffenen Elementen der Zelle eingeschaltet sein muß. Bei einem Virus als Agens mag die Replikation des Agens oder die Realisierung seines genetischen Potentials als Verstärker dienen. Bei einem Proteinagens, z. B. einem Bakteriocin, muß die Verstärkung auf einer Veränderung der Geschlossenheit einer zellulären Struktur oder der Funktion eines zellulären Kontrollsystems beruhen. In beiden Fällen gibt das Verständnis der Wirkungsweise solcher Agentien wahrscheinlich interessante Einblicke in die funktionelle Organisation der zellulären Maschinerie.

In meinem Laboratorium benutzen wir zur Zeit Bakteriophagen und Bakteriocine als Sonden auf makroregulatorische Phänomene der Bakterienzelle. Bis jetzt gibt es noch nicht allzu viele Fortschritte auf diesem Gebiet, außer beim Studium der Regulation der genetischen Transkription, doch hätte eine Beschreibung unserer derzeitigen Bemühungen vielleicht wenigstens den Wert zu verdeutlichen, welchen Dingen wir auf der Spur sind.

Bakteriophagen und makroregulatorische Phänomene

Ein früher Hinweis auf die mögliche Fähigkeit der Phagen, zelluläre Funktionen zu kontrollieren, war die Beobachtung, daß bestrahlte T2-Phagen den Wirtsorganismus weiterhin töten und schädigen konnten, nachdem sie die Fähigkeit zur Reproduktion verloren hatten^[1]. Die Bakterien wurden nicht brutal zerbrochen, aber sie starben. Es brauchte Jahre und die Entwicklung der biochemischen Untersuchungsmöglichkeiten der Phageninfektion, bis die mordende Tätigkeit der Phagen mit Hilfe physiologischer Begriffe erklärt werden konnte, d. h., über spezifische Hemmungen auf der Ebene der Synthese von Makromolekülen. Wir wissen heute, daß bestimmte virulente Phagen, darunter die T-even-Coliphagen^[*], einen plötzlichen Abbruch der Protein-, RNA- und DNA-Synthese ihrer Wirtszellen verursachen. Andere Phagen beeinflussen diese Prozesse viel weniger drastisch oder nur vorübergehend. Unser Wissen über die Art dieser Hemmungen hat sich aber überraschend langsam entwickelt.

[1] S. E. Luria u. M. Delbrück, Arch. Biochem. I, 207 (1942).

[*] Mit T-even-Coliphagen wird eine Gruppe von Coliphagen bezeichnet, die übereinstimmende Eigenschaften haben und gerade Kennzeichnungsnummern (T2, T4, T6) tragen (Anm. des Übersetzers).

[*] Prof. Dr. S. E. Luria
Department of Biology,
Massachusetts Institute of Technology,
Cambridge, Massachusetts 02139 (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation. – Wir danken der Nobelstiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

Phageninfektion und Synthese von Wirts-DNA

Nehmen wir z. B. den Effekt der Phageninfektion auf die Wirts-DNA. Der Fall der T-even-Phagen scheint der einfachste. Diese Phagen enthalten in der DNA [2] Hydroxymethylcytosin (HMC) anstelle von Cytosin und bestimmen unter anderem die Produktion eines Enzyms, Desoxycytidin-Triphosphatase, das dCTP zerstört, einen spezifischen Vorläufer der Wirts-DNA (siehe Zusammenfassung von Cohen [3]). Die Bakterien-DNA wird nach der Infektion ziemlich rasch abgebaut und in säurelösliche Fragmente und schließlich in einfache Nucleotide umgewandelt. Daß Doppelstrangbrüche der Bakterien-DNA deren Replikation verhindern sollten, ist verständlich [4], aber wie der Phage solche Brüche bewirkt, läßt sich noch nicht erklären. Bestimmte Mutanten des Phagen T4 sind nicht mehr in der Lage, die Wirts-DNA in säurelösliche Produkte umzuwandeln [5], es kommen aber noch Primärbrüche vor, bei denen die Wirts-DNA in große Fragmente zerlegt wird. Die Nuclease, die für diese Brüche verantwortlich ist, muß spezifisch für dCTP-haltige DNA sein, doch ist bisher kein Phagen gefunden worden, dessen Mutationen den Abbau der Wirts-DNA verhindern.

Wesentlich verwickelter ist die Situation beim Phagen Φe von *Bacillus subtilis*, den David Roscoe und Menashe Marcus in unserem Laboratorium untersuchten. Es handelt sich um einen der wenigen Phagen, die in der DNA Hydroxymethyl-uracil (HMU) anstelle von Thymin enthalten. Die Infektion verursacht eine Änderung des Enzymbestandes und damit eine Umstellung der DNA-Synthese: statt DNA vom Bakterientyp entsteht DNA vom Phagentyp [6]. An neuen Enzymen treten eine dUMP-Hydroxymethylase, eine Thymidyltriphosphat-Nucleotidhydrolase (dTTPase), ein Hemmstoff der Thymidylat-Synthetase, eine dTMP-Nucleotidase, eine dCMP-Desaminase und möglicherweise auch eine Desoxynucleotid-Kinase auf. Die Synthese von Wirts-DNA bricht einige Minuten nach der Infektion mit dem Phagen Φe ab. Roscoe [7] konnte zeigen, daß die Wirts-DNA intakt bleibt oder daß wenigstens Doppelstrangbrüche nicht in erkennbarer Anzahl vorkommen.

Die enzymatische Beeinflussung der dTTP-Synthese kann durch Verwendung von Thymin-Mangelmutanten der Wirtsbakterien in Gegenwart von Thymin und durch Verwendung von Phagenmutanten ohne dTTPase umgangen werden. Unter diesen Bedingungen entstandene Phagen enthalten mindestens 10%, möglicherweise 20% Thymin statt HMU. Trotzdem unterbleibt die Synthese von Wirts-DNA. Wir müssen also die Existenz eines etwas spezifische-

ren Mechanismus postulieren, der für den Abbruch der Synthese verantwortlich ist. Möglicherweise handelt es sich nicht um eine Hemmung der die Wirts-DNA synthetisierenden Enzyme durch HMU-Nucleotide, denn die Synthese der bakteriellen DNA kann auch durch eine Phagenmutante abgebrochen werden, der die Information für entweder die dUMP-Hydroxymethylase oder die dTTPase fehlt. Voraussetzung für den Abbruch der Synthese von Wirts-DNA ist jedenfalls eine Proteinsynthese nach der Phageninfektion; folglich gibt es irgendeine spezifische Phagenfunktion, die die Synthese der bakteriellen DNA hemmt. Wir versuchen derzeit, diese Phagenfunktion zu identifizieren. Sie äußert sich entweder auf der Ebene des Replikationsprozesses selbst oder auf einer bisher noch unbekannten regulatorischen Ebene.

Wirtsproteine und RNA

Lassen Sie mich nun auf den Einfluß der Phageninfektion auf die RNA-Synthese und die Proteinsynthese übergehen. Mindestens bei den T-even-Phagen scheint der Abbruch der Synthese von Wirtsprotein eine sekundäre Folge des Abbruches der Messenger-RNA-Synthese zu sein [8]. Direkte Wirkungen auf die Translation bereits bestehender Messenger mögen ebenfalls vorkommen, wie es sie sicher bei manchen Virusinfektionen bei Tieren gibt.

Die Art des Abbruchs der RNA-Synthese blieb im Dunkeln, bis vor kurzem die wichtige Entdeckung gelang [9], daß mindestens einige Phagen, darunter die T-even- und T7-Coliphagen [10], die RNA-Polymerase modifizieren, so daß sich ihre Spezifität ändert. Ein Faktor σ , eine Komponente der Polymerase, die für die Transkription der „sehr frühen“ Gruppe von Phagengenen (nämlich derjenigen, die unmittelbar nach der Infektion transkribiert werden [11]) und möglicherweise auch für die Transkription von Bakteriengenen benötigt wird, ist nach der Phageninfektion verändert oder zerstört. Die Transkription anderer Phagengene wird dann durch einige neu auftretende Faktoren ermöglicht, die die Spezifität eines „Rumpf“-Proteins der Wirtspolymerase verändern [12]. Es ist vernünftig anzunehmen, daß der σ -Faktor der Polymerase die Fähigkeit zum Erkennen eines Promoters verleiht, der den Start der mRNA-Synthese an spezifischen Stellen der DNA ermöglicht.

In diesem Fall kommt das „makroregulatorische“ Phänomen nicht auf der Ebene eines rein regulatorischen Mechanismus zustande, sondern auf der Ebene der zellulären Maschinerie selbst. Der Phage verhindert die Realisierung eines ganzen Satzes von Genen, indem er die Spezifität eines Enzyms, der RNA-Polymerase, verändert.

- [2] G. R. Wyatt u. S. S. Cohen, *Nature* 170, 1072 (1952).
[3] S. S. Cohen: *Virus-induced enzymes*. Columbia University Press, New York 1961.
[4] J. Cairns u. C. I. Davern, *J. Mol. Biol.* 17, 418 (1966).
[5] E. M. Kutter u. J. S. Wiberg, *J. Mol. Biol.* 38, 395 (1968).
[6] H. V. Aposhian in *H. Fraenkel-Conrat: Molecular Basis of Virology*. Reinhold, New York 1968, S. 497.
[7] D. H. Roscoe, *Virology* 38, 527 (1959).

- [8] R. O. R. Kaempfer u. B. Magasanik, *J. Mol. Biol.* 27, 453 (1967).
[9] R. R. Burgess, A. A. Travers, J. J. Dunn u. E. K. F. Bautz, *Nature* 221, 43 (1969).
[10] W. C. Summers u. R. B. Siegel, *Nature* 223, 1111 (1969).
[11] J. Hosoda u. C. Levinthal, *Virology* 34, 709 (1968).
[12] A. A. Travers, *Nature* 223, 1107 (1969).

Daß diese Art von Regulation kein Spezifikum der Phageninfektion ist, hat *R. Losick* (Harvard) zusammen mit meinem Schüler *A. L. Sonenshein* gezeigt. Ausgehend von der Beobachtung von *Sonenshein* und *Roscoe*^[13], daß der *Subtilis*-Phage Φ nicht in der Lage ist zu wachsen und seine Funktionen zu realisieren, wenn er Bakterien während der Sporenbildung infiziert, stellten *Losick* und *Sonenshein* folgende Hypothese auf: Da die Sporenbildung mit dem Abbruch der Synthese vieler Proteine und dem Erscheinen mehrerer neuer Proteine einhergeht, könnte der kritische Schritt eine Veränderung der Spezifität der RNA-Polymerase sein, und zwar analog zur Veränderung, die man bei *E. coli* nach der Infektion durch T-even-Phagen beobachtet^[9]. *Losick* und *Sonenshein* konnten dies tatsächlich demonstrieren^[14]: Ein σ -ähnlicher Faktor, ein Teil der RNA-Polymerase der vegetativen Bakterienzellen, wird während der Sporenbildung verändert oder eliminiert, und dieses hat eine Veränderung der Matrizen spezifität der Bakterienpolymerase zur Folge. Es ist bemerkenswert genug, daß die in-vitro-Zugabe des σ -Faktors von *E. coli* zum Rumpfprotein der *B.-subtilis*-Polymerase deren ursprüngliche Aktivität wieder herstellt!

Es sei darauf hingewiesen, daß der Phage in dieser Arbeit über die Sporenbildung nicht verwendet worden ist, um irgendeine phageninduzierte Veränderung in der Zelle zu erforschen, sondern als Sonde zur Aufklärung regulatorischer Phänomene, die für eine wichtige Differenzierung im Zellzyklus eines Bakteriums verantwortlich sind: für den Umschlag von der vegetativen zur sporulatorischen Synthese. Die mögliche Relevanz der Veränderung der RNA-Polymerase und viel allgemeiner der makroregulatorischen Veränderungen für Probleme der Differenzierung in höheren Organismen ermutigt zu interessanten Spekulationen^[12, 15] und wird wahrscheinlich neue Wege zum Studium der zellulären Differenzierung eröffnen.

Makroregulation und Colicine

Als nächstes möchte ich mich mit einem anderen Zugang zur Makroregulation beschäftigen, dem wir uns kürzlich zugewandt haben, um neue Einblicke in die funktionelle Organisation der Bakterienzelle zu bekommen. Hier geht es um das Studium der Aktionsweise bestimmter Colicine. Obwohl die Geschichte der Colicinforschung sehr eng mit der Geschichte der Phagenforschung verbunden ist, mag es lehrreich sein, die Umwege zu schildern, auf denen ich zu meinem jetzigen Interesse an den Colicinen gekommen bin. Der Ausgangspunkt war wieder ein Phagenproblem, nämlich die von *Iseki* und *Sakai* entdeckte Konversion der somatischen *Salmonella*-Antigene durch temperierte Phagen^[16]. Dr. *Hisao*

[13] *A. L. Sonenshein u. D. H. Roscoe*, Virology 39, 205 (1969).

[14] *R. Losick u. A. L. Sonenshein*, Nature 224, 35 (1969).

[15] *R. J. Britten u. E. H. Davidson*, Science 165, 349 (1969).

[16] *S. Iseki u. T. Sakai*, Proc. Japan Acad. 29, 121 (1953).

Uetake kam 1956 in mein Laboratorium; wir arbeiteten gemeinsam über die Konversion des Antigens 10 zum Antigen 15 durch den Phagen ϵ^{15} ^[17]. Diese Zusammenarbeit setzte sich fort, als Dr. *Takahiro Uchida* 1960 von *Uetakes* Laboratorium zu mir an das Massachusetts Institute of Technology kam. Glücklicherweise konnten wir meinen Kollegen Dr. *Phillips Robbins* auf das Problem der Antigenkonversion aufmerksam machen. Wie *Robbins* und seine Mitarbeiter^[18] das Problem auf biochemischer Ebene lösten und wie sie in der Folge die Rolle der Carrier-Lipide bei der Polysaccharidsynthese entdeckten und aufklärten, braucht hier nicht ausgeführt zu werden. Immerhin weckte meine Beteiligung an dieser Arbeit mein Interesse an Membranproblemen, besonders an bestimmten bemerkenswerten Eigenschaften der cytoplasmatischen Bakterienmembran.

In Bakterienzellen ist diese Membran die einzige Organelle. Sie enthält Enzyme und andere Bestandteile, die nicht nur bei der Permeation und beim aktiven Transport, sondern auch bei der Biosynthese der makromolekularen Komponenten der Bakterienzellwand eine Rolle spielen, z.B. Peptidoglykan und andere Polysaccharide einschließlich der Lipopolysaccharide der Enterobakterien. Außerdem befindet sich die Maschinerie der terminalen Respiration in der cytoplasmatischen Membran, die vermutlich auch entscheidend bei der DNA-Replikation und bei der Trennung der DNA-Kopien während der Zellteilung mitwirkt^[19]. Und trotzdem ist die funktionelle Organisation dieser bemerkenswerten Struktur noch nicht bekannt. Man kann annehmen, daß für jede Gruppe von Enzymen und Carrier-Molekülen, die an einem gegebenen biochemischen Prozeß beteiligt sind, eine ganz präzise räumliche Anordnung zueinander die Voraussetzung für volle Wirksamkeit ist. Wir wissen nicht, ob solche „supramolekularen Strukturen“ allein durch die Eigenschaften der individuellen Komponenten determiniert werden, was dann auch den Selbstaufbau der funktionellen Struktur in vitro ermöglichen würde (man denke an das „self-assembly“ von Virushüllen oder von Bakteriengeißeln aus monomeren Proteinen) oder ob ein vorgegebener Muster molekularer Organisation eine Rolle beim geordneten Einbau neuer funktioneller Elemente in die Membran einer wachsenden Zelle spielt. In Frage käme eine „primer“- oder sogar eine katalytische Rolle, z.B. die Umwandlung einer inaktiven Vorstufe in eine aktive Komponente. Es gibt Hinweise für die Beteiligung solcher enzymatischen Schritte beim Aufbau der Proteinhülle bestimmter komplexer Viren^[20]. Wesentlich verwinkelster ist die Möglichkeit, daß die Membranstruktur nicht nur an der Anordnung, sondern auch an der Funktion ihrer

[17] *H. Uetake, S. E. Luria u. J. W. Burrous*, Virology 5, 68 (1958).

[18] *A. Wright, M. Dankert u. P. W. Robbins*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 54, 235 (1965).

[19] *A. Ryter, Y. Hirota u. F. Jacob*, Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 33, 669 (1968).

[20] *W. B. Wood, R. S. Edgar, J. King, I. Lielauis u. M. Henninger*, Federation Proc. 27, 1160 (1968).

aktiven Bestandteile beteiligt ist, z.B. durch Übertragung von Signalen durch Konformationsänderungen. Dadurch entstünde eine zusätzliche Regulationsebene für die zelluläre Funktion.

An dieser Stelle kommen nun die Colicine ins Bild. Sie sind Proteinantibiotika, die für manche Bakterienstämme vom Colityp tödlich sind, und die von anderen Bakterienstämmen des Colityps produziert werden, die die entsprechenden genetischen Determinanten oder „colicinogenen Faktoren“ besitzen. Es ist schon lange bekannt, daß einige Colicine die Synthese makromolekularer Komponenten colicinempfindlicher Zellen stoppen^[21]. Ein wesentlicher Fortschritt war die Entdeckung, daß verschiedene Colicine verschiedene biochemische Änderungen hervorrufen^[22] und daß die letale Wirkung einiger Colicine dadurch aufgehoben werden kann, daß man das Colicin von den Zellrezeptoren mit Trypsin „abdaut“^[22, 23]. Dieser Angriff von außen zusammen mit der Ein-Treffer-Kinetik der tödlichen Wirkungen der Colicine ließ vermuten, daß ein einziges Colicinmolekül, das an irgendeine Oberflächenkomponente der Zellwand gebunden ist, nach Verstärkung einen bakteriostatischen oder baktericiden Effekt hervorrufen könnte. Die Verstärkung sollte dabei in der Zellwand selbst vor sich gehen. Nomura^[22] postulierte deshalb, daß ein an einen Rezeptor gebundenes Colicin auf ein spezifisches „biochemisches Target“ einwirkt, indem es eine funktionelle Änderung irgend eines spezifischen Elementes der cytoplasmatischen Membran hervorruft. Nomura^[22] und ich^[24] erwogen die Möglichkeit, daß die Verstärkung durch Konformationsänderungen der Zellwand als Ganzes übermittelt werden könnte. Changeux und Thiery^[25] haben die gleiche Idee auf der Basis allosterischer Wechselwirkungen zwischen den Membranproteinen weiterentwickelt.

Nomura^[22] zog folgende drei Typen von Colicinwirkungen in Betracht: 1. den Abbruch der DNA-Synthese und den Abbau der DNA (typisch für Colicin E2); 2. die Hemmung der Proteinsynthese (typisch für Colicin E3), die auf eine spezifische Veränderung einer Komponente der 30S-Ribosomen-Untereinheit zurückgeführt werden konnte^[26]; 3. den Abbruch der Synthese aller Makromoleküle (typisch für viele Colicine (E1, K, A, I)). Bei den Colicinen E2 und E3 ist der biochemische Effekt streng multiplikativ, während die tödliche Wirkung (definiert durch die Unfähigkeit zu wachsen) eine strikte Ein-Treffer-Wirkung ist. Es ist aber noch nicht ganz klar, ob die beobachteten Effekte, so spezifisch wie sie sind, primär oder sekundär sind. Für Colicin K und E1 entsprechen sich die tödende und die hemmende Wir-

[21] F. Jacob, L. Siminovitch u. E. Wollman, Ann. Inst. Pasteur 83, 295 (1952).

[22] M. Nomura, Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 28, 315 (1963).

[23] B. L. Reynolds u. P. R. Reeves, Biochem. Biophys. Res. Commun. 11, 140 (1963).

[24] S. E. Luria, Ann. Inst. Pasteur 107, 67 (1964).

[25] J. P. Changeux u. J. Thiery, J. Theor. Biol. 17, 315 (1967).

[26] J. Koniskey u. M. Nomura, J. Mol. Biol. 26, 181 (1967).

kung sehr gut, so daß die beobachteten biochemischen Phänomene sehr viel enger mit den Primäreffekten zusammenhängen könnten.

Auf welche Weise nun hemmt ein einziges Colicinmolekül die Synthese aller Makromoleküle? Ein wichtiges Ergebnis^[26a] war die Beobachtung, daß die Hemmung der Protein- oder Nucleinsäuresynthese ausblieb, wenn Colicin E1 mit *E.-coli*-Zellen reagierte, die strikt anaerob wuchsen. Der Zutritt von Luft brachte eine schnelle, aber reversible Hemmung. Diese Beobachtung und die Tatsache, daß die Hemmung der RNA- und der Proteinsynthese eher gleichzeitig als nacheinander erfolgten, führte die Levinthal^s zur Vermutung, daß der Primärangriff des Colicins E1 auf die oxidative Phosphorylierung gerichtet sein könnte – eine Funktion der cytoplasmatischen Membran. Der ATP-Spiegel wurde drastisch gesenkt, jedoch nicht bis auf Null.

Auf der Basis dieses Wissens und unseres Interesses an makroregulatorischen, in der bakteriellen Membran lokalisierten Mechanismen versuchten meine Mitarbeiter und ich, Beziehungen zwischen Colicinwirkung und Änderungen von Membraneigenschaften wie Permeabilität und Transport zu finden. Ich möchte hier nur über die Arbeiten mit Colicin E1 und K berichten, bei denen wir in gewissem Maße Erfolg hatten.

Kay Fields und ich untersuchten zuerst den Einfluß dieser Colicine auf den Transport und die Anhäufung von β-D-Galaktosiden durch colicin-behandelte *E.-coli*-Zellen^[27]. Unsere Ergebnisse zeigten, daß die energieabhängige Anhäufung drastisch abgenommen hatte, während die Transportgeschwindigkeit von o-Nitrophenylgalaktosid (ONPG) (gemessen als Geschwindigkeit der Hydrolyse durch die Galaktosidase der intakten Zelle) kaum beeinträchtigt war. Diese Zellen hatten also kein „Leck“ für ONPG bekommen. Die Anhäufung von α-Methylglucosid, für die die Energie eher durch Phosphoenolpyruvat als durch ATP geliefert wird^[28], ließ sich durch Colicin E1 und K nicht beeinflussen – ein Hinweis darauf, daß die Glykolyse in colicin-gehemmten Zellen weiterging.

Als wir das Schicksal der von den colicin-behandelten Zellen aufgenommenen Glucose weiter verfolgten, fanden wir unerwartet einen Hinweis auf das, was wir suchten: eine spezifische Änderung der Membranpermeabilität^[29]. Die behandelten Zellen schieden ungefähr ein Drittel des Glucose-Kohlenstoffes als Glucose-6-phosphat, Fructose-1,6-diphosphat, Di-hydroxyacetonphosphat und 3-Phosphoglycerat in das Medium aus. Andere Intermediärprodukte wurden nicht in meßbaren Mengen ausgeschieden. Außerdem trat fast nur noch Pyruvat statt Acetat und CO₂ als kurzkettiges Abbauprodukt der Glucose auf. Dies beruhte nicht auf einer Durchlässigkeit für

[26a] F. Levinthal u. C. Levinthal, persönliche Mitteilung.

[27] K. L. Fields u. S. E. Luria, J. Bacteriol. 97, 57 (1969).

[28] W. Kundig, S. Ghosh u. S. Roseman, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 52, 1067 (1964).

[29] K. L. Fields u. S. E. Luria, J. Bacteriol. 97, 64 (1969).

Pyruvat, da diese Substanz in Lactat umgewandelt werden konnte, sofern die colicin-behandelten Zellen signifikante Mengen Lactat-Dehydrogenase enthielten. Die Produktion von Pyruvat anstelle von Acetat läßt vielmehr den Schluß auf eine spezifische, direkte oder indirekte, Hemmung der Pyruvatoxidation zu. Auch die Wirkung auf den Energiestoffwechsel erwies sich als komplizierter als nur als eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung. Läßt man *E.-coli*-Zellen fermentativ auf Glucose unter annähernder, aber nicht strikter Anaerobiose wachsen, so ist die Protein- und Nucleinsäuresynthese fast so empfindlich gegenüber Hemmung durch Colicine wie in aeroben Zellen. Sogar Hämin-Mangelmutanten, die durch Luftsauerstoff strikt gehemmt werden, waren empfindlich gegenüber Colicinen, sobald die Anaerobiose nicht vollständig war.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß einer der Primäreffekte dieser Colicine eine (reversible) Änderung der cytoplasmatischen Membran sein könne. Voraussetzung ist die Anwesenheit von etwas Sauerstoff; die Änderung der Membran bewirkt eine Hemmung ATP-abhängiger Prozesse, weil die Verfügbarkeit von ATP eingeschränkt ist. Dies mag eine Folge verringelter ATP-Produktion oder vermehrten ATP-Abbaus sein. Die Tatsache, daß biosynthetische Prozesse trotz signifikanter Restkonzentrationen an ATP blockiert sind, mag zum Teil auf die Akkumulation von AMP zurückgehen und auf das resultierende Anwachsen des AMP/ATP-Verhältnisses^[30]. Tatsächlich verhält sich eine *E.-coli*-Mutante mit einer hitzeempfindlichen AMP-Kinase bei hohen Temperaturen ganz ähnlich wie colicin-gehemmte Zellen^[31].

Auf der Suche nach weiteren Colicineffekten auf Membranen hat *David Feingold*, der das letzte Jahr als Gast in unserem Laboratorium verbrachte, den Einfluß von Colicin E1 auf die Protonenaufnahme von Bakterien in Gegenwart von Carbonyldicyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) erforscht, einem hochaktiven Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, der die H⁺-Permeation verbessert^[32]. Das Colicin selbst steigert die Permeabilität für Protonen nicht, sondern es verhindert den schwachen pH-Anstieg, den man bei normalen gewaschenen Zellen beobachtet. Aber die Colicinbehandlung macht die Bakterien sogar bei sehr niedrigen Dosen empfindlich gegenüber CCCP, so daß sich der Gleichgewichtszustand fast augenblicklich auf die Zugabe von nur 10⁻⁶ mol/l CCCP zur Zellsuspension einstellt. Die Wirkung von Colicin E1 auf *E. coli* gleicht also dem Effekt von Valinomycin auf gram-positive Bakterien^[32]. Unabhängig von uns sind ähnliche Beobachtungen von *Hirata* und Mitarbeitern^[33] gemacht worden. In Dr. *Feingolds* Laboratorium sind Versuche im Gange, die entscheiden sollen, ob diese Wirkung des Colicins eine sekundäre Folge der Hemmung des Energiestoffwechsels ist oder ob das

[30] D. E. Atkinson, Ann. Rev. Biochem. 35, 85 (1966).

[31] D. Cousin, Ann. Inst. Pasteur 113, 309 (1967).

[32] F. M. Harold u. J. R. Baarda, J. Bacteriol. 96, 2025 (1969).

[33] H. Hirata, S. Fukui u. S. Ishikawa, J. Biochem. 65, 843 (1969).

Colicin spezifisch die Permeabilität z.B. der K⁺-Ionen beeinflußt, so daß sie gegen H⁺-Ionen ausgetauscht werden können, wenn das CCCP diesen den Zutritt verschafft.

Colicin-tolerante „Membran“-Mutanten

Andere Beobachtungen ermöglichten es, zwischen den Folgen der Colicinwirkung und funktionellen Eigenschaften der Bakterienzellwand Beziehungen zu finden. *Rosa Nagel de Zwaig* und ich^[34] haben Bakterienmutanten einer Klasse, die „tolerant“ gegenüber bestimmten Colicinen ist, untersucht; sie binden die Colicine, ohne durch sie beeinträchtigt zu werden. Ähnliche „tol“- oder „ref“- („refraktoriische“) Mutanten sind auch in mehreren anderen Laboratorien untersucht worden. Wir wurden mit der Entdeckung beglückt, daß übereinstimmend mit den Erwartungen über die Rolle der Membran bei der Colicinwirkung alle geprüften tol-Mutanten irgendwelche Membrandefekte aufwiesen. Die Mutanten einiger Klassen sind labil, so daß viele Zellen spontan während des Wachstums lysieren, gerade als wenn die Synthese der Zellwand beeinträchtigt wäre. Wie andere Mutanten von Enterobakterien mit Zellwanddefekten sind diese tol-Mutanten sehr empfindlich gegenüber Desoxycholat, möglicherweise weil die Membran für dieses oberflächenaktive Reagens zugänglich geworden ist. Noch interessanter war, daß eine ganze Klasse von tol-Mutanten sich als sehr empfindlich gegenüber einer Reihe organischer Farbstoffe erwies, meist kationischen wie Acridinen, Äthidiumbromid und Methylenblau. Wir konnten nachweisen, daß die Empfindlichkeit gegenüber den Farbstoffen eine Folge der raschen Aufnahme des Farbstoffes durch die mutierten Zellen war, während die normalen Zellen fast impermeabel sind. Auf diese Weise war nun eine Beziehung zwischen der Colicintoleranz und einer spezifischen Änderung der Membranpermeabilität hergestellt^[*].

Einige vorläufige analytische Untersuchungen über die Zusammensetzung der Zellwand normaler Bakterien und toleranter Mutanten haben keine signifikanten Unterschiede zwischen ihnen erbracht. Die Chemie der Zellwand von Enterobakterien ist extrem komplex und bisher nur spärlich bekannt. Selbst wenn man chemische Änderungen findet, ist es nicht leicht zu entscheiden, ob sie für das untersuchte Phänomen relevant sind oder nicht. Ein solcher Fall ist z.B. die Veränderung der Phospholipid-Zusammensetzung bei colicin-behandelten Bakterien^[35].

[34] R. Nagel de Zwaig u. S. E. Luria, J. Bacteriol. 94, 1112 (1967).

[*] Die naive Idee einer Verstärkung der Colicinwirkung durch Änderung der Gesamtkonformation der Bakterienmembran wird durch einige neuere Ergebnisse mit wärmeempfindlichen tol-Mutanten nicht gestützt; die Zellwand verhält sich dabei wie ein Mosaik von empfindlichen und toleranten Regionen je nach der Temperatur während ihrer Synthese [36].

[35] D. Cavard, C. Rampini, E. Barba u. J. Polonovski, Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 1455 (1968).

[36] R. Nagel de Zwaig u. S. E. Luria, J. Bacteriol. 99, 78 (1969).

Ermutigend ist immerhin, daß sowohl die Untersuchung der Wirkung bestimmter Colicine als auch die Untersuchung colicin-toleranter Mutanten auf den Zusammenhang zwischen dem Ort der Colicinwirkung und der Funktion der Bakterienmembran hinführt. Die Beziehung ist zur Zeit allerdings noch recht dünn und indirekt. Aber die Beobachtungen sind ermutigend genug, um uns hoffen zu lassen, daß die Untersuchung der Colicinwirkung Organisationszusammenhänge innerhalb der Membran aufdecken wird, durch welche einige der entscheidenden Funktionen der Bakterienzelle bestimmt werden.

Nachwort

Es gibt interessante Analogien zwischen dem jetzigen Stand der Colicinforschung und dem Stand der Bakteriophagenforschung anfangs der vierziger Jahre. In beiden Fällen wurden Phänomene, die von den Pionieren dieser Gebiete beschrieben worden waren, von kleinen Forschergruppen unter neuen Aspekten bearbeitet. In der Phagenforschung war es das Ziel, Aufschlüsse über die elementaren Phänomene der Reproduktion zu erlangen, und man hoffte, daß die Virusreproduktion helfen würde, die Replikation des genetischen Materials aufzudecken. In der Colicinforschung ist das neue Ziel die Kenntnis der Funktionen der cytoplasmatischen Bakterienmembran in

der Annahme, daß die Ergebnisse auch ein Licht auf das allgemeine Problem der funktionellen Organisation zellulärer Membranen werfen. In beiden Fällen bedeutet die Verwendung der einfachen bakteriellen Systeme einen Abschied von den traditionellen Materialien der betreffenden Disziplinen, der Genetik und der „Membranologie“.

Wie bei der Bakteriophagenforschung vor 25 Jahren gibt es heute in der Colicinforschung nur wenige Praktiker; sie stehen miteinander in Verbindung, und sie sind nur recht mäßig von ihrem Erfolg überzeugt – und sie fürchten ein wenig, daß der Erfolg wiederum ein ruhiges Forschungsgebiet in eine „monströse akademische Disziplin“^[37] umwandeln könnte. Wie bei der Phagenforschung wissen wir, daß wir befriedigende Antworten erst dann erwarten dürfen, wenn die untersuchten Probleme so weit vorangetrieben sind, daß ein direkter biochemischer Zugang möglich ist. Dies mag sich dann als eine Art von Biochemie erweisen, so neu wie die der Genfunktion und -replikation zu ihrer Zeit. Möglicherweise setzen auch wir bedeutungsvolle und anregende Dinge in Gang.

Die Arbeiten des Autors und seiner Mitarbeiter wurden von der National Science Foundation und den National Institutes of Health unterstützt.

Eingegangen am 25. Februar 1970 [A 786]
Übersetzt von Dr. Thomas Höpner, Heidelberg

[37] G. S. Stent, Science 166, 479 (1969).

ZUSCHRIFTEN

Das Photoelektronenspektrum des Cyclobutans^[1]

Von Peter Bischof, Edwin Haselbach und Edgar Heilbronner^[*]

In Tabelle 1 sind die vertikalen Ionisationspotentiale I_V des Cyclobutans C₄H₈ angegeben, die dem Photoelektronenspektrum (PE-Spektrum) dieser Verbindung entnommen wurden^[2]. Die Zuordnung zu Orbitalen bestimmten Symmetrieverhaltens kann hier — unter der Voraussetzung der Gültigkeit des Theorems von Koopmans^[3] — anhand derselben Orbitalenergien $\epsilon = -I_V$ vorgenommen werden, die man für Cyclobutan nach einem SCF-ab-initio-Verfahren^[4], nach dem MINDO/2-Verfahren^[5] oder dem verallgemeinerten Hückel-Modell (EHT)^[6] erhält (siehe Tab. 1).

Tabelle 1. Vertikale Ionisationspotentiale und Orbitalenergien des Cyclobutans.

Orbital D _{4h} D _{2d}	I _V (eV) ± 0.1 eV	Berechnete Orbitalenergien (eV)	Orbital-Charakter		
		ab initio [a]	MINDO/2	EHT [a]	
3e _u 4e	10.7 [b]; 11.3 (JT) [c]	-10.50	- 9.88	-12.83	gemischt; Walsh-Typus
1b _{1g} 4a ₁	11.7	-11.82	-10.35	-13.92	CH ₂ (π)
1b _{1g} 1b ₁	12.5	-12.47	-11.93	-14.09	CC (σ)
1e _g	13.4; 13.6 (JT) [c]	-14.38	-13.17	-15.36	CH ₂ (π)
3a _{1g} 3a ₂	15.9	-16.05	-15.23	-15.68	CH ₂ (σ) + CC (σ)
3a _{2u} 3b ₁	18.2	-17.53	-17.94	-16.81	CH ₂ (π)

[a] Siehe [4]. [b] Electron-Impact-Wert: 10.58 eV, vgl. [13].

[c] Jahn-Teller-Aufspaltung.

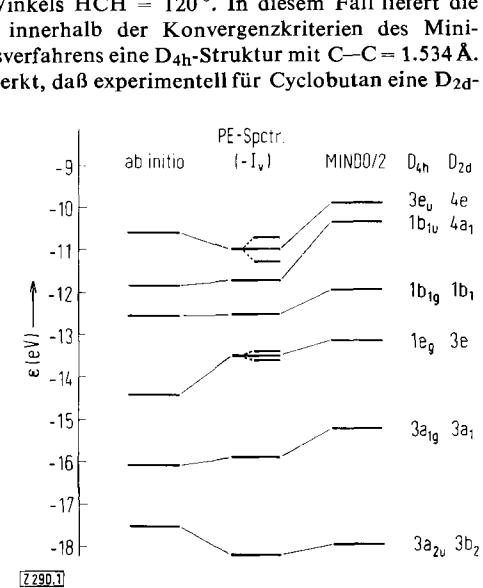


Abb. 1. Vergleich der berechneten SCF-Orbitalenergien ϵ mit den vertikalen Ionisationspotentialen $I_V = -\epsilon$ des Cyclobutans.