

Mitochondrien nach Desoxyribonucleaseeinwirkung erklärt werden. Ferner hat diese Hypothese den Vorteil, den oben angeführten Widerspruch unserer Resultate zur Ansicht von BOURNE zu beheben, d.h. die Oberflächenmembran der Mitochondrien besteht nach dieser Annahme wohl aus Protein- und Fettsubstanzen, doch liegt statt Ribonucleoprotein vermutlich Desoxyribonucleoprotein vor.

H. U. ZOLLINGER

Pathologisches Institut der Universität Zürich, den 1. Oktober 1949.

Summary

The effect of desoxyribonuclease and ribonuclease on suspended mitochondria is examined phase-microscopically, making use of secondary mitochondrial swelling in distilled water. The ribonucleoprotein is localized only in the mitochondrial body. The latter disappears completely under the effect of ribonuclease. The membrane possibly contains very small amounts of desoxyribonucleoprotein next to lipid substances. The mitochondrial body on the other hand appears to be free of these substances.

Zur Morphologie der Mitochondrien

(Elektronenmikroskopische Untersuchungen)

In einer früheren Mitteilung haben wir über phasenmikroskopische Beobachtungen an Mitochondrien berichtet¹. Hier soll vor allem untersucht werden, ob sich die von uns angewandte künstliche Schwellung der Mitochondrien in destilliertem Wasser auch bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen bewährt. Insbesondere interessierte uns die Frage der Darstellung der Mitochondrienmembran. Die technische Schwierigkeit liegt vor allem darin, daß im Elektronenmikroskop nur solide Körper untersucht werden können, d.h., daß die Suspension der Mitochondrien zuerst getrocknet werden muß. Die Technik der Mitochondriengewinnung für diese Versuche war folgende²: Die Nieren (3 g) von zwei mittelschweren Albinoratten wurden nach Entfernung der Kapsel im Apparat von POTTER und ELVEHJEM³ mit 6 cm³ isotonischem KCl homogenisiert, dann 15 Minuten bei 2000 g zentrifugiert, der Rückstand in 3 cm³ isotonischem Mannit (5,75%) aufgenommen und unter den gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert. Der vor allem Gewebstrümmer, Zellkerne, Erythrozyten und Mitochondrien enthaltende Rückstand wurde 5 Minuten mit 1 cm³ isotonischem Mannit zentrifugiert (2000 g). Das Überstehende, eine weiß-gelbliche homogene Suspension, enthielt vorwiegend die Mitochondrien. Zur besseren Reinigung zentrifugierten wir sie nochmals zusammen mit den restlichen Mitochondrien, die aus dem Rückstand durch zweimaliges Auswaschen gewonnen wurden und entfernten den kleinen, rotbraunen, festsitzenden Rückstand. Ein Tropfen dieser Mitochondriensuspension wurde auf dem Objektträgerfilm angetrocknet und nach der Methode von WILLIAMS und WYCKOFF⁴ mit Chrom beschattet.

Die Abb. 1 und 2 lassen ein sehr ähnliches Bild erkennen, wie wir es in den phasenmikroskopischen Untersuchungen festgestellt haben, d.h. die künstlich ge-

schwellten Mitochondrien weisen erstens einen kontrastreichen Mitochondrienkörper auf, welcher in beiden Abbildungen exzentrisch gelegen ist und ferner erkennt man eine deutliche Mitochondrienmembran. Der Mitochondrienkörper wird infolge seiner Dicke von den

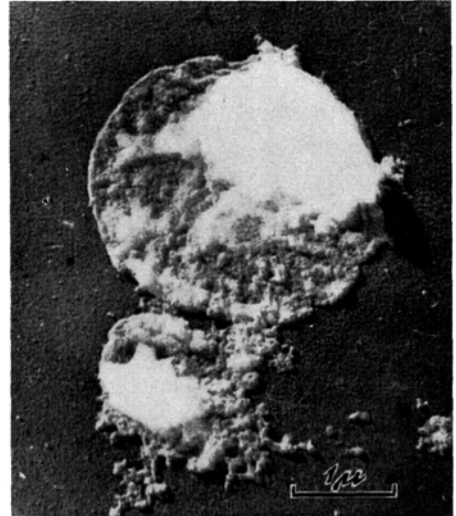


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondrions: Die Membran ist teilweise durch den daraufliegenden Körper zugeeckt. Vergrößerung 14800mal.

Elektronen nicht mehr durchgestrahlt. Vereinzelte Überreste des Körpers auf der Membran (Abb. 1) zeigen nur, daß das Eiweiß eine im Elektronenmikroskop amorphe Struktur aufweist. Vermutlich ist dies auf seinen hohen Lipidgehalt zurückzuführen. Im Gegen-

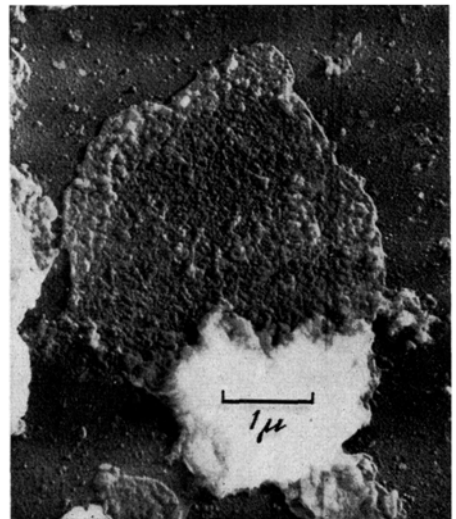


Abb. 2. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Mitochondrions: Der Körper (helle Zone) liegt am Rande der fein strukturierten Membran. Vergrößerung 12400mal.

satz zum Mitochondrienkörper zeigt die Membran eine deutliche Struktur. Besonders schön sichtbar ist sie in Abb. 2, wo wir sowohl ein Geflecht aus kurzfasrigen Eiweißfibrillen als auch globuläre Eiweißmoleküle erkennen können. Da die Elektronen die Membran ohne starke Absorption passieren, können wir ihre Dicke auf ca. 200 Å schätzen.

¹ H. ZOLLINGER, Exper. 6, 14 (1950).

² F. LEUTHARDT und A. F. MÜLLER, Exper. 4, 478 (1948).

³ V. R. POTTER und A. ELVEHJEM, J. Biol. Chem. 114, 195 (1936).

⁴ R. C. WILLIAMS und R. W. G. WYCKOFF, J. Appl. Phys. 17, 23, (1946).

Neben der Bestätigung unserer im Phasenmikroskop erhobenen Befunde haben somit diese Untersuchungen gezeigt, daß durch die künstliche Schwellung in destilliertem Wasser mittels des Elektronenmikroskops Befunde erhoben werden können, die an nichtgeschwellten, kompakten Körpern eventuell nicht sichtbar sind.

K. MÜHLETHALER, A. F. MÜLLER und H. U. ZOLLINGER

Pflanzenphysiologisches Institut der ETH., Physiologisch-chemisches und Pathologisches Institut der Universität Zürich, den 1. Oktober 1949.

Summary

It is shown that mitochondria suspended in distilled water are particularly well adapted to electron-microscopic examination, since the membrane can be loosened from the mitochondrial body by this method. The membrane is composed of short protein fibrils and globular protein molecules, and has a thickness of approximately 200 Å. The body cannot be further illuminated, but parts of the periphery show that the protein is here much more compact. It is assumed that this is dependent upon its lipid contents.

SH Poisoning and Mutation

BACQ¹ includes mustard gas in his list of "substances thioloпрives", that is of substances whose toxic effects are caused primarily by action on –SH groups. British workers², although recognizing an action of mustard gas on –SH groups, nevertheless consider that this is not its main-effect, and find that it does not in general affect –SH enzymes. It is, however, extremely effective in its action on one particular –SH enzyme, hexokinase, and on a number of related phosphate transferring –SH enzymes, the so-called phosphokinases. These are readily inactivated by small amounts of mustard gas. Lewisite, like other arsenical vesicants, reacts strongly, but reversibly, with –SH groups, including those of hexokinase. The observation that lewisite does, not like mustard gas, produce mutations in *Drosophila*³ suggests that neither –SH poisoning in general, nor phosphokinase inhibition in particular are the primary cause of the mutagenic action of mustard gas. In view of the somewhat exceptional position of the arsenicals, confirmation with a typical –SH poison and inhibitor of phosphokinases seemed desirable. Chloropicrin was chosen because, together with bromopicrin, it heads the list of –SH poisons arranged by BACQ¹ in order of efficiency. According to BACQ¹, N/100 chloropicrin at 37°C destroys 50% of all –SH groups in denatured ovalbumen in less than one minute, it blocks irreversibly the masked –SH groups in native ovalbumen, and it rapidly inactivates papaine. No experiments with hexokinase or other phosphokinases are reported; but it seems very probable—and is assumed also by BACQ—that phosphokinases will be inactivated by chloropicrin.

Three series of tests were carried out. In the first young males of *Drosophila melanogaster* were kept in an exsiccator together with a small open dish of chloropicrin. The longest exposure tolerated by a minority of

the flies was three minutes. A test for sex-linked lethals was carried out on the survivors from exposures for 2, 2½, and 3 minutes: only 1 lethal was found in 1318 X-chromosomes. As the period of exposure may have been too short to ensure penetration to the chromosomes of the germ cells, a second series of tests was carried out in such a way that exposures could be prolonged to at least 5 minutes, a time which is amply sufficient for the production of mutations by mustard gas. The flies were exposed to air which had passed through a mixture of chloropicrin and liquid paraffin. By altering the proportion of the two fluids, the tolerance threshold of exposure could be shifted at will. In all tests, the dose was near the threshold of tolerance and lethal to a proportion of the males. Only 2 sex-linked lethals were found in 463 chromosomes from males which had been exposed for periods from 6 to 9 minutes. The results of these two series confirm the findings with lewisite and show that –SH poisoning does not produce mutations in mature sperm.

Frequency of sex-linked lethals in successive broods of males after treatment with

Brood	(A) Chloropicrin			(B) Mustard Gas		
	No. tested chromosomes	lethals		No. tested chromosomes	lethals	
		No.	%		No.	%
1	1226	4	0.3	465	10	3.9
2	1206	1	0.1	458	21	4.6
3	1205	0	0.0	386	36	9.3
4	817	2	0.3	566	31	5.5
Total	4454	7	0.2	1875	98	5.2

It still seemed possible that inhibition of enzymes, especially of phosphokinases, might affect the chromosomes in younger, more actively metabolizing and dividing germ cells. This, in fact, has been suggested as a possible interpretation of the observation that the male germ cells of *Drosophila* exhibit their greatest sensitivity to the genetical effects of mustard gas before they have reached maturity¹. In order to test this possibility, a third series of tests was carried out, using the same method as in the second. After treatment, the males were given a succession of fresh virgin females every 3–4 days, and lethals were scored separately in successive broods representing germ cells of successively younger ages at the time of exposure. The Table presents the pooled results of four such tests; exposures were given for periods of 5–7 minutes. For comparison data are shown from a similar experiment with mustard gas.

In all broods mutation frequencies after treatment with chloropicrin are those usually found in untreated laboratory stocks. No lethal at all was obtained in the third brood which, as shown in the right half of the Table, represents germ cells treated during their most sensitive stage to mustard gas. All attempts, therefore, to show a mutagenic action of –SH poisoning have failed. Moreover, if it can be assumed that chloropicrin inactivates phosphokinases *in vivo*, these experiments suggest that phosphokinase inhibition is not concerned in the production of mutations by mustard gas. C. AUERBACH

Institute of Animal Genetics, University of Edinburgh, October 8, 1949.

¹ Z. M. BACQ, Exper. 2, 1 (1946).

² M. DIXON and D. M. NEEDHAM, Nature 158, 432 (1946). – A. WORMALL et al., Biochem. J. 40, 734 (1946). – R. A. PETERS, Nature 159, 149 (1947).

³ C. AUERBACH and J. M. ROBSON, Proc. Roy. Soc. Edinburgh, 62, 284 (1947).

¹ C. AUERBACH, Proc. Eighth Int. Congr. Gen. 1948, 128 (1949).