

detergents act on the lipids both in the cell walls and in the cytoplasmic membranes⁷⁻⁹. Electron micrographs of cell walls treated by these compounds also present a picture of 'corroded' membranes deprived of the cement substance. The extraction of lipoproteins proceeds gradually. Higher concentration and/or temperature cause deeper disintegration of the membranes and a more effective denudation of lower layers.

From our results conclusions can be drawn concerning especially the composition of the spheroplast membrane. It appears that it is very similar to that in normal cell wall. Thus it is substantially more complicated than was generally assumed. It corresponds to our previous views based on the cytochemical study of spheroplasts and protoplasts of bacteria¹⁰. The attempt to isolate the basal membrane (R layer) was not successful with spheroplasts.

It is interesting to note that boiling the cells in 1% LS after pretreatment with potassium tellurite or fixation by formaldehyde did not cause the total destruction of cells as was reported by SHAFI and SALTON¹¹. In this case very fine, web-like, rod-shaped membranes were found besides round or oval smooth membranes of lipopolysaccharide nature^{9,12}.

The surface of penicillin spheroplasts is thus a considerably complex structure, which differs from the normal cell wall by the loss of a part of mucopolysaccharides and

elasticity thus acquired. Similar results have been described after the action of a cationic detergent, 'Septonex'¹³.

Zusammenfassung. Unter Einwirkung von Natriumlaurylsulfat oder Desoxycholat zerfallen die Oberflächenmembranen von Penicillinsphäroplasten in globuläre Gebilde verschiedener Grösse (500 bis zu 900 Å d). Isolierte Zellwände von *Proteus* verhalten sich ähnlich. Protoplastenmembranen von *B. megaterium* werden durch beide Stoffe rasch lysiert.

M. V. NERMUT

Institute of Microbiology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (Czechoslovakia), December 30, 1963.

⁷ A. BOLLE and E. KELLENBERGER, Schw. Z. Path. Bakt. 21, 714 (1958).

⁸ R. G. E. MURRAY, Canad. J. Microbiol. 9, 381 (1963).

⁹ S. RAZIN and M. ARGAMAN, J. gen. Microbiol. 30, 155 (1963).

¹⁰ M. V. NERMUT, Folia biol. (Praha) 8, 239 (1960).

¹¹ F. SHAFI and M. R. J. SALTON, J. gen. Microbiol. 22, 137 (1960).

¹² W. WEIDEL, H. FRANK, and W. LEUTGE, J. gen. Microbiol. 30, 127 (1963).

¹³ M. V. NERMUT, Z. allgem. Mikrobiol. 4, 92 (1964).

Zur Genese hepatozellulärer Kerneinschlüsse bei Colchicinvergiftung

Bei Colchicinvergiftung treten in Leberepithelien Kerneinschlüsse auf¹⁻⁴, bei denen es sich um Plasmaklusionen handelt, die von einer echten Kernmembran umzogen sind⁴. Sie werden auf eine Eindellung des Ruhekernes zurückgeführt, kommen jedoch auf andere Weise zustande.

Colchicin (4 · 30 j/d i.p.) löst bei weissen Mäusen in der Leber Mitosen aus⁵, vornehmlich in der von dem anflutenden Pharmakon zuerst getroffenen Lappchenperipherie. Ihr Ablauf wird in der bekannten Weise⁶ vielfältig abgewandelt. So findet man unter anderem unipolare, lockere «Sterne», die sich aus Prophasen entwickeln, wenn die weniger empfindlichen Chromosomenfasern noch ausgebildet werden können⁷⁻⁹ und eine Zentrierung der Kernschleifen ermöglichen. In ihrer Mitte ist dann bisweilen das wenig oder gar nicht ausgestaltete Zytozentrum nachweisbar: Es besteht aus Zentriolen, die kaum auseinander gewichen sind¹⁰ und höchstens von wenig Zentroplasma umgeben werden. Häufiger sind «Versprengungen», bei denen die überkontrahierten Chromosomen keine Fasern mehr ausbilden und daher ohne Ordnung im Zelleib verstreut werden. Das Zytozentrum bleibt gänzlich inaktiviert; von Spindelsubstanz ist nichts zu sehen, allenfalls ist ein kleiner PAS-negativer Eiweiss tropfen («hyaline globule»¹¹) mitten unter den durcheinander liegenden Chromosomen und Mitochondrien anzutreffen. Colchicin unterbindet also nicht nur die Organisation eines an sich vorhandenen Spindelmateriales, es vermag sogar, wohl durch unmittelbaren Angriff an den Zentriolen¹², die Bereitstellung von (Zentral-) Spindelsubstanz vollständig zu unterdrücken.

Besonders bei ungeordneter «Versprengung», aber auch in lockeren «Sternen» verquellen die weiter voneinander entfernten Chromosomen später zunächst zu eigenen kleinen Bläschen (Karyomeren bzw. Karyomeriten). Wenn auch das eine oder andere den Anschluss verlieren oder zugrundegehen kann – die meisten von ihnen treten, während ihrer Umwandlung oder erst darnach, zu grösseren Teilkernen zusammen. Oft entstehen auch einheitliche, polyploide, gegebenenfalls auch aneuploide Grosskerne, die ihrem Werdegang entsprechend^{5,11-13} recht polymorph sein können. Sie werden oft von kürzeren oder längeren «Kernkanälen» durchzogen, deren Wände die Grenzen nicht völlig vereiniger Karyomeriten markieren⁶. In gleicher Weise entstehen derartige «Einfaltungen der Kernmembran» auch bei Tumor- oder Hodgkinzellen. Bei dem Verschmelzungsprozess werden mitunter kleinere oder grössere Plasmaportionen eingeschlossen und dann, von Teilen der primären Karyomeritenmembranen weiterhin begrenzt, in den sekundären

¹ H. HAMPERL, Klin. u. Prax. 1, 186 (1946).

² K. LAMBERS, Virchows Arch. 321, 88 (1951/52).

³ H. H. BUCHMANN, Zbl. Path. 92, 328 (1954).

⁴ W. WESSEL, Virchows Arch. 331, 314 (1958).

⁵ B. MISZURSKI und L. DOLJANSKI, Am. J. Anat. 85, 523 (1949).

⁶ O. J. EIGSTI und P. DUSTIN JR., Colchicine – in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry (Iowa State Coll. Press, 1955).

⁷ J. J. PETERS, J. exp. Zool. 103, 33 (1946).

⁸ S. A. INOUE, Exp. Cell Res. Suppl. 2, 305 (1952).

⁹ W. SIEBS, Z. Zellforsch. 51, 535 (1960).

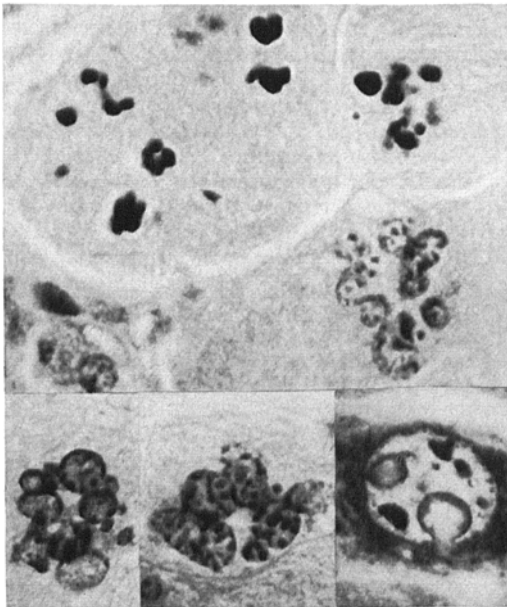
¹⁰ E. DE HARVEN und W. BERNHARD, Z. Zellforsch. 45, 378 (1956).

¹¹ M. E. GAULDEN und J. G. CARLSON, Exp. Cell Res. 2, 416 (1951).

¹² A. M. BRUES und E. B. JACKSON, Am. J. Cancer 30, 504 (1937).

¹³ P. SENTEN, Path. et Biol. 9, 445 (1961).

Einheitskern aufgenommen. Bisweilen kommunizieren sie mit dem übrigen Zytoplasma, sei es unmittelbar (Figur), sei es durch einen schmalen Verbindungsgang, der dann später noch «obliterieren» oder völlig verschwinden kann. Die colchicinbedingten nuclearen Plasmakclusionen sind also keine Bildung des Ruhekernes, sondern ein postmitotisch entstandenes Phänomen. Dasselbe gilt für viele andere membranumzogene («indirekte»)



Postmitotische Entstehung cytoplasmatischer Kerneinschlüsse (rechts unten) bei der Verschmelzung von Chromosomenbläschen. Leberzellen Maus. 24 h nach der letzten von 4 Colchicininjektionen.

Kerneinschlüsse, insbesondere in menschlichen und tierischen Tumorzellen.

In den Plasmakclusionen ist oft Glykogen und Fett vorhanden. Mitochondrien sind dagegen, obwohl elektronenoptisch nachgewiesen⁴, lichtoptisch nur selten darstellbar. Sicher sind sie von den aufquellenden Chromosomenbläschen grossenteils beiseite gedrängt worden. Doch können sie, eingeschlossen, auch bis zur Unkenntlichkeit verändert werden, da die Stoffwechselverhältnisse in den vom übrigen Zelleib mehr oder weniger abgeschnürten Arealen unzureichend sind. Aus dem gleichen Grunde wird das gesamte eingelagerte Plasma häufig sekundär verändert und, ganz oder teilweise, entweder hyalinisiert oder verflüssigt. Ebenso kann die zunächst stets vorhandene Membran zugrunde gehen¹⁴⁻¹⁷. Darnach liegt die denaturierte Plasmaportion unmittelbar im Karyoplasma; sie ist damit sekundär zu einem «freien» oder «direkten» Kerneinschluss geworden.

Summary. The colchicin-induced nuclear inclusions are a postmitotic phenomena. Fusing chromosome vesicles often include a portion of cytoplasm, surrounded by persisting parts of the vesicle membranes ('indirect' or 'membraned' n.i.). This membrane sometimes degenerates; the n.i. then lies free in the karyoplasm (secondarily 'direct' or 'free' n.i.).

H.-W. ALTMANN und J. HAUBRICH

Pathologisches Institut der Universität
Würzburg (Deutschland), 12. März 1964.

¹⁴ F. EHRENBRAND und E. LINDNER, Ref. Dtsch. Ges. Elektronenmikrosk. 9, 12 (1959).

¹⁵ E. H. LEDUC und J. W. WILSON, J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 427 (1959).

¹⁶ H.-W. ALTMANN, Virchows Arch. 334, 286 (1961).

¹⁷ W. THOENES, J. Ultrastruct. Res. im Druck (1964).

A Method for the Selection of Auxotrophic Mutants of the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*

The methods reported^{1,2} for the concentration of auxotrophic mutants in yeast are only of limited value for the isolation of mutants occurring at a frequency of 10^{-8} to 10^{-6} .

In order to develop an efficient concentration technique, a method analogous to the penicillin method for bacteria³ was tried. 2-Desoxyglucose, glucosamine and fluoride were used to block cell wall biosynthesis by inhibiting the enzyme phosphoglucomutase. With this method it was possible to enrich auxotrophic mutants in reconstruction experiments. Because of the high rate of mutation to resistance to these inhibitors, experiments along this line were not reproducible and were discontinued.

The method finally adopted for the concentration of spontaneous mutants is based on the inositol requirement of the wild type of *Schizosaccharomyces pombe* and is fashioned after the method of LESTER and GROSS⁴ for

the isolation of auxotrophic mutants in *Neurospora*. This method involves inositol-less death of growing, prototrophic cells and the preservation of non-growing mutant cells on inositol-less minimal medium.

Inositol-less plates are prepared by pouring 30 ml of minimal agar medium⁵, lacking inositol, in standard petri dishes which contain a sterile, analytical grade filter paper disc. The filter paper serves only a mechanical purpose: it prevents the cracking of the agar when the plates are supplemented with inositol and growth factors.

Wild-type cells are grown in liquid minimal medium⁵ supplemented with L-malate at a concentration of 0.01 M to a density of 10^8 cells/ml, centrifuged and resuspended

¹ A. G. MOAT, N. PETERS JR., and A. M. SRB, J. Bacteriol. 77, 673 (1959).

² D. PITTMAN, E. SHULT, A. ROSHANMANESH, and C. C. LINDEGREN, Can. J. Microbiol. 9, 103 (1963).

³ L. GORINI and H. KAUFMAN, Science 131, 604 (1960).

⁴ H. E. LESTER and S. R. GROSS, Science 129, 572 (1959).

⁵ R. MEGNET, Arch. Jul. Klaus-Stiftung 33, 299 (1959).