

Summary. The Robertsonian polymorphism of *Pitymys subterraneus* involves only 1 pair of metacentric autosomes. The crosses of forms with 52, 53 and 54 chromosomes do not show any differences in their reproductive rate. So a single autosome trivalent does not affect the fecundity. Many hybrids have been obtained between *P. subterraneus* ($2N = 52$ or 54) and *P. multiplex* ($2N = 48$) with 50 or 51 chromosomes, respectively. Even with a heterogenous karyotype they are not entirely sterile. 2 progeny were produced from back-crosses. The 2 parental species seem to result from recent speciation. Only

fecundation or embryogenesis occurs in crossing *P. duodecimcostatus* with *P. subterraneus* or *P. multiplex*. The chromosome complement of 1 hybrid embryo of *P. duodecimcostatus* ($2N = 62$) \times *P. multiplex* ($2N = 48$) has been studied showing 55 chromosomes. *P. duodecimcostatus* appears to belong to a more distant evolutionary group.

A. MEYLAN

Service de Zoologie des Vertébrés
Station fédérale de Recherches agronomiques,
CH-1260 Nyon (Suisse), 14 juin 1972.

Zikadenendosymbiose: Eucyten-Struktur-, -Funktions- und -Evolutions-Modell

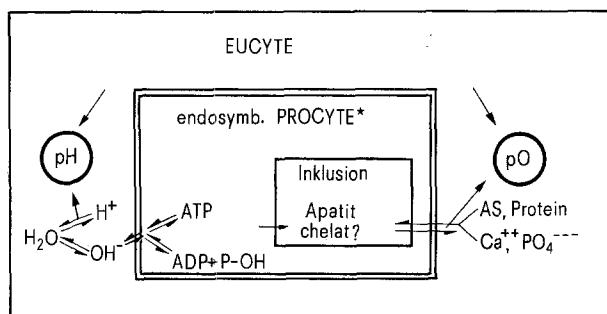
Über die Entstehung der Eucyten gibt es heute eine weitgehend akzeptierte Theorie¹: Amöboide, heterotrophe, anaerobe Procyten sollen vor ca. 1000 Mill. Jahren zuerst bakterioide, dann blaualgenartige, autotrophe, aerobe Procyten aufgenommen und eingebaut haben. Aus den algenartigen Mikroorganismen entwickelten sich so die Plastiden, aus den bakterioiden die Mitochondrien. Beide Eucytenorganellen stellen nach dieser Theorie heute extrem adaptierte Endosymbionten dar.

Zikaden weisen ebenfalls extrem angepasste, allerdings jüngere, bakterioide Endosymbionten auf². Sogenannte Hauptsympionen wurden aller Wahrscheinlichkeit nach bereits von Zellen der Hemipterenstammform vor ca. 500 Mill. Jahren, sogenannte Nebensympionen von solchen der Zikadenstammformen vor ca. 250 Mill. Jahren phagocytiert und integriert³. Haupt- und Nebensympionen können als Vertreter einer besonderen Mikroorganismen-Gruppe, der sogenannten «Protoplastoiden», aufgefasst werden⁴. Später gingen die Zikaden noch Begeleitsymbiosen mit Rickettsien und dann mit klassischen Bakterien ein².

Die Mitochondrien sowie die protoplastoiden, rickettsien- und bakterienartigen Zikadenendosymbionten weisen gemäß ihrem mutmasslichen Entstehungsalter einen unterschiedlichen Abhängigkeitsgrad von der Eucyte auf⁵. Die Mitochondrien sind permanent, Protoplastoiden und Rickettsien mit kurzen Unterbrechungen z.B. zur Einfektion und Bakterien mehr oder weniger nur temporär an die Eucyte gebunden. Mitochondrien lassen sich folglich in vitro nicht, Protoplastoiden und Rickettsien in der Regel in Gewebekulturmedien unter Zusatz gewisser Zellmetabolite begrenzt (Methode siehe^{5, 6}) und Bakterien unbegrenzt kultivieren. Die Bakterien können als

auto-, Protoplastoiden und Rickettsien als semiauto- und Mitochondrien als xenoreproduktiv bezeichnet werden. Die Bakterien weisen ein DNA-Molekulargewicht ab ca. 10^{10} dalton, Rickettsien von ca. 10^9 , Protoplastoiden nach vorläufigen, allerdings unzureichenden Schätzungen an ultradünnen Schnitten von wahrscheinlich ca. 10^8 und Mitochondrien von ca. 10^7 auf. So codiert das Bakterien-Genom die Enzyme von Krebszyklus und Atmungskette vollständig, das der Mitochondrien liefert jedoch in keinem der beiden Fälle die komplette Enzymausstattung. Rickettsien und Protoplastoiden sind auf Grund ihres in vitro-Verhaltens wohl zwischen Bakterien und Mitochondrien einzuordnen, d.h. ihr Genom codiert möglicherweise nur die Enzyme für den Krebszyklus vollständig.

Mitochondrien und Protoplastoiden stehen sich nach mutmasslichem Alter, Art und Abhängigkeitsgrad von der Eucyte folglich am nächsten. Sie verhalten sich physiologisch ähnlich. Beide vermögen den pH der Eucyte gezielt zu beeinflussen^{7, 8}. Im symbiontenfreien Zikadenei des Invaginationsstadiums wurde z. B. nach einer bereits publizierten Methode⁶ eine pH-Senkung von $7,5 \pm 0,2$ auf $7,0 \pm 0,2$ festgestellt. Die pH-Veränderung sollte direkt oder indirekt im Zusammenhang mit dem Symbiontenverlust stehen. Der Regulationsmechanismus verläuft möglicherweise nach der unter anderem auch auf die Mitochondrien anwendbaren chemiosmotischen Theorie⁹ (s. Figur). Danach spalten transfore ATPasen der inneren Membran der Mitochondrien aus ihrem Plasma herangeführte ATP unter Aufnahme je eines OH⁻ aus dem Eucytenplasma, das dadurch angesäuert wird. Das Ausmass der protonenbewegenden Potentialdifferenz entspricht mit 250 mV der theoretischen Erwartung. Der Vorgang ist reversibel. Mitochondrien und Protoplastoiden beeinflussen ebenfalls das Ionen- bzw. Molekül-Milieu und damit den osmotischen Druck (pO) der Eucyte^{7, 8}. Im symbiontenfreien Zikadenei des obigen Stadiums tritt z. B. eine nach der schon veröffentlichten Methode⁶ ermittelte, direkt oder indirekt durch den Endo-



Hypothetisches Schema des Mechanismus der pH- und pO-Regulation durch Mitochondrien bzw. protoplastoide Endosymbionten in der Eucyte. *Die intrazelluläre Form der symbiotischen Protoplastoiden besitzt 3 Membranen. AS = Aminosäuren.

¹ L. MARGULIS, Science 225, 48 (1971).

² P. BUCHNER, *Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen* (Birkhäuser, Basel und Stuttgart 1953).

³ W. SCHWEMMLER, Naturw. Rdsch., Braunschwe. 25, 350 (1972).

⁴ W. SCHWEMMLER, Cytobiologie 3, 427 (1971).

⁵ W. SCHWEMMLER, Dissertation, Universität Freiburg 1972.

⁶ W. SCHWEMMLER, J.-M. QUOT und A. AMARGIER, Annls Soc. ent. Fr. 7, 423 (1971).

⁷ K. MENGE, in *Die Zelle: Struktur und Funktion* (Ed. H. METZNER; Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2. Aufl. 1971).

⁸ W. SCHWEMMLER, J.-L. DUTHOT, G. KUHE und C. VAGO, Z. Morph. Oekol. Tiere, im Druck (1972).

⁹ P. MITCHELL und J. MOYLE, Europ. J. Biochem. 7, 471 (1969).

symbiontenverlust bedingte pO-Senkung von 8.3 ± 0.2 auf 7.8 ± 0.2 auf. Parallel zu pO-Veränderungen ist die Bildung mitochondrialer Granuale bzw. protoplastoider Einschlussskörper zu beobachten. Beide enthalten organische Moleküle wie Aminosäuren bzw. Proteine und/oder anorganische Ionen wie Ca^{2+} , PO_4^{3-} , und andere mehr, die aus der Eucyte aufgenommen werden (Figur). Die Ionen liegen in den Inklusionen als Hydroxylapatite ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$) vor oder sind möglicherweise chelatartig an freie Carboxyl- bzw. Phosphatgruppen der Aminosäuren oder Proteine gebunden^{8, 10}. Die Bildung weniger, grosser Teilchen aus vielen kleinen sollte dabei für die Senkung des pO verantwortlich sein. Da die Inklusionen, zumindest bei den Protoplastoiden, an die Eucyte wieder abgegeben und von ihr aufgelöst werden können, wäre dieser Vorgang reversibel.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Verhältnis der protoplastoiden, rickettsien- und bakterienartigen Zikadenendosymbionten mit der Eucyte sich von dem der Mitochondrien nach Grad und Art graduell unterscheidet. Das der Mitochondrien und Protoplastoiden differiert dabei am wenigsten. Mitochondrien und Protoplastoiden zeigen entsprechendes physiologisches Verhalten. Beide beeinflussen nach einem möglicherweise gleichen Mechanismus pH und pO der Eucyte. Die protoplastoiden Endosymbionten stellen quasi ein «missing link» zwischen den permanent an die Eucyte gebundenen Mitochondrien und den temporär symbiotischen Bakterien dar. Die Zikadenendosymbiose ist ein geeignetes Modell zur Struktur-, Funktions- und Evolutionsanalyse der Eucyte.

Summary. The mitochondria can be considered as extremely integrated endosymbionts, according to the theory of the endosymbiotic origin of eucytes. Leafhoppers show also very integrated endosymbionts. Their protoplastoid-, rickettsia- and bacteria-like endosymbionts differ, according to grade, kind and supposed age of the relation, from the hypothetical type of mitochondria. Mitochondria and protoplastoids differ the least and show corresponding physiological behavior. Both have a regulatory influence on pH and osmotic pressure of the eucyte and use probably the same mechanism of regulation. The protoplastoid endosymbiosis of leafhoppers can be regarded as a 'missing link' between the temporary endosymbiosis of the bacteria and the permanent hypothetical one of the mitochondria. The leafhopper endosymbiosis is a suitable model for the analysis of structure, function and evolution of the eucyte.

W. SCHWEMMLER¹¹

Arbeitsgruppe Prof. Gottschewski am MPI für Immunbiologie, Stefan-Meier-Strasse 8, und Biologisches Institut II, Mikrobiologie, Schänzle-Strasse 9, D-78 Freiburg i. Br. (Deutschland), 29. Mai 1972.

¹⁰ H. NEURATH, *The Proteins: Composition, Structure and Function*, 2. Aufl. (Academic Press, New York 1970), vol. 5.

¹¹ Herrn Prof. Dr. P. SITTE danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Keratinases: Hydrolysis of Keratinous Substrates by Three Enzymes of *Trichophyton mentagrophytes*

Action of keratinolytic enzymes on such widely distributed structures as hair, wool, feather, horn, hoof, claw, beak, scale and the stratum corneum of the epidermis has not been studied extensively. NICKERSON et al.¹ purified a keratinase from *Streptomyces fradiae* which solubilized wool keratin at pH 9.0. An extracellular keratinase (keratinase I), of a zoophilic dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*, rapidly digests guinea pig hair at neutral pH². The mycelium of this fungus also yields 2 cell-bound keratinases (keratinases II and III) under the same growth conditions³. The following report describes the hydrolysis of various keratins by these three enzymes of *T. mentagrophytes*.

In our experiments, all keratins were neither autoclaved nor sterilized. They were washed with water, extracted with chloroform-methanol⁴ and soaked several times in 0.05 M phosphate buffer, 1 mM Mg^{++} , pH 7.0, then rinsed with water, methanol, and air-dried at room temperature. The keratins, except hoof and powdered hair, were either cut with scissors to a length of 3–5 mm or cut with a knife to pieces of 1–3 mm long. The assay was carried out as follows. Keratin (50 mg) was suspended in 0.05 M phosphate buffer containing 1 mM MgSO_4 , pH 7.0, to which 50 μg of enzyme material was added; final volume 5.0 ml. Controls included enzyme material in buffer and the substrate in buffer. Toluene (0.1 ml) was

Table I. Digestion (%)^a of keratinous materials by keratinases I, II and III of *T. mentagrophytes*

| | Keratinase I | | Keratinase II | | Keratinase III | |
|--|--------------|--------------------|---------------|-------------------|----------------|--------------------|
| | 3 h | 16 h | 3 h | 16 h | 3 h | 16 h |
| 1. Calf hoof (40–100 mesh) | 0.7 (1.6) | 4.7 (6.0) [11.7] | 1.4 (0.8) | 4.3 (4.0) [3.8] | 3.8 (4.1) | 14.4 (10.4) [20.0] |
| 2. Goat hair | 0.3 (0.5) | 2.9 (2.8) [<2.0] | 0.3 (0.2) | 1.9 (2.2) [<2.0] | 1.3 (0.6) | 3.0 (3.4) [<2.0] |
| 3. Guinea-pig hair | 4.4 (4.6) | 13.8 (8.9) [19.7] | 5.8 (2.8) | 15.2 (8.0) [14.8] | 6.9 (5.0) | 15.8 (8.8) [20.0] |
| 4. Guinea-pig hair powder (200–400 mesh) | 15.2 (7.9) | 18.2 (11.7) [30.7] | 13.0 (7.1) | 21.4 (7.5) [23.0] | 14.4 (8.1) | 21.8 (10.6) [24.0] |
| 5. Horse hair (white) | 0.5 (0.7) | 3.0 (2.7) [<2.0] | 0.4 (0.4) | 2.7 (2.3) [<2.0] | 1.5 (0.9) | 5.9 (4.0) [6.0] |
| 6. Rabbit hair | 1.6 (0.8) | 3.8 (3.8) [8.5] | 1.3 (0.5) | 2.7 (2.2) [<2.0] | 1.6 (0.7) | 6.5 (3.4) [4.0] |
| 7. Rat hair | 1.4 (0.5) | 5.0 (2.8) [5.4] | 1.2 (0.4) | 3.8 (3.6) [2.6] | 1.8 (1.0) | 2.1 (2.0) [2.0] |
| 8. Silk ^b (coarse) | 1.7 (1.2) | 1.7 (1.0) [<2.0] | 0.2 (0.0) | 0.7 (0.4) [<2.0] | 0.6 (0.6) | 1.5 (0.8) [2.0] |
| 9. Silk ^c (fine) | 1.2 (1.1) | 1.7 (1.4) [2.9] | 0.3 (0.3) | 0.7 (0.6) [<2.0] | 1.0 (0.7) | 1.9 (1.8) [<2.0] |
| 10. Wool ^d | 0.2 (0.7) | 1.2 (1.3) [<2.0] | 0.2 (0.1) | 0.8 (1.4) [<2.0] | 0.3 (0.3) | 1.7 (2.4) [<2.0] |

^a Values were obtained by ninhydrin assay, those by keratinase assay and by weight loss of substrate are indicated in parentheses and brackets, respectively. ^b Diameter 245–280 μm . ^c Diameter 35–40 μm . ^d Merino wool kindly supplied by Morris Fishman and Sons, Philadelphia, Pa., USA.