

found in the cytoplasmic serum in trace quantities, or in very small amounts, come from the degradation of the lutoids during the manipulations. If this is so, the differences between the 2 fractions would not only be quantitative but also qualitative.

The above results set the problem of distinct metabolic pathways in each of 2 compartments, as well as that of the selective permeability of the lutoidic membranes to the amino acids.

<sup>11</sup> Acknowledgments. The authors are greatly indebted to Professor C. LIORET of the University of Paris, who kindly accepted to read and criticize the manuscript.

Résumé. Les études des acides aminés libres ont été effectuées sur deux compartiments du latex d'*Hevea brasiliensis*: les serums cytoplasmique et lutoidique. La majeure partie des acides aminés est localisée dans le cytoplasme dans lequel dominent Glu et son amide, Asp et Ala. La fraction particulière se distingue par une dominante des composés basiques.

J. BRZOZOWSKA, P. HANOWER and R. CHEZEAU<sup>11</sup>

Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Centre d'Adiopodoumé, Laboratoire de Physiologie Végétale, B.P. 20, Abidjan, (Côte d'Ivoire), 20 December 1973.

### Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Fusion myogener Zellen bei *Antheraea polyphemus* (Lepidoptera)

Von verschiedenen Untersuchungen an Wirbeltieren und Insekten ist bekannt, dass während der Muskelentwicklung Zellfusionen auftreten können. Während bei Vögeln die Verschmelzung von myogenen Zellen (in vitro) elektronenoptisch schon seit längerem gezeigt werden konnte<sup>1,2</sup>, fehlte der ultrastrukturelle Beweis bei Insekten bis vor kurzem. PEREZ<sup>3</sup> vermutete als erster eine Inkorporation von Myoblasten in die dedifferenzierten larvalen Muskelfasern (bei *Calliphora*). Verschiedene Au-

toren haben diese Annahme an anderen Insekten lichtmikroskopisch bestätigt<sup>4-7</sup>. Ultrastrukturelle Untersuchungen bei *Lucilia*<sup>8</sup> zeigten, dass sich Myoblasten während der Metamorphose an die aus der Larve stammenden entdifferenzierten Muskelfasern eng anlagern; in späteren Stadien werden dann mehrkernige Zellen beobachtet, deren mosaikartige Feinstruktur auf eine erfolgte Zellfusion schließen lässt. Erst kürzlich gelang es CROSSLEY<sup>9</sup>, den Verschmelzungsprozess bei *Calliphora* im elektro-

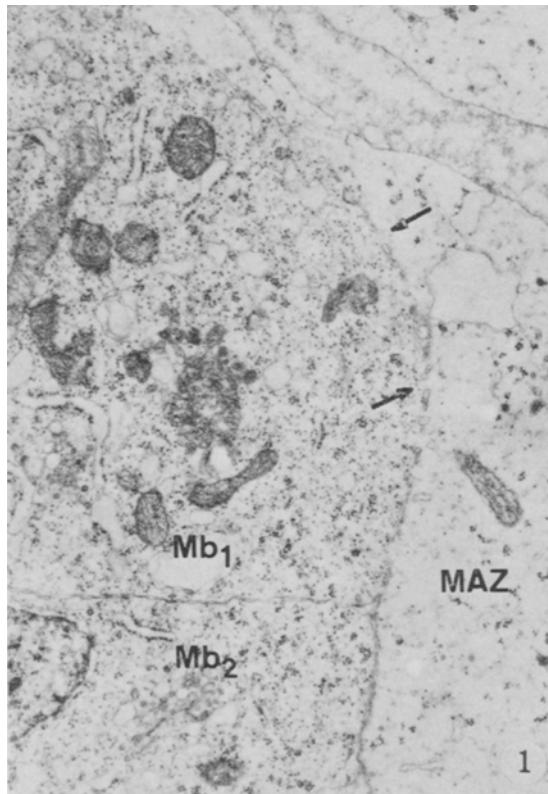


Fig. 1. Fusion eines Myoblasten ( $Mb_1$ ) mit einer Muskelanlagezelle (MAZ) über verschiedene Zytoplasmabrücken (Pfeile). Sarkolemm und Myoblastenmembran zum 2. Myoblasten ( $Mb_2$ ) sind noch intakt.  $\times 18000$ .

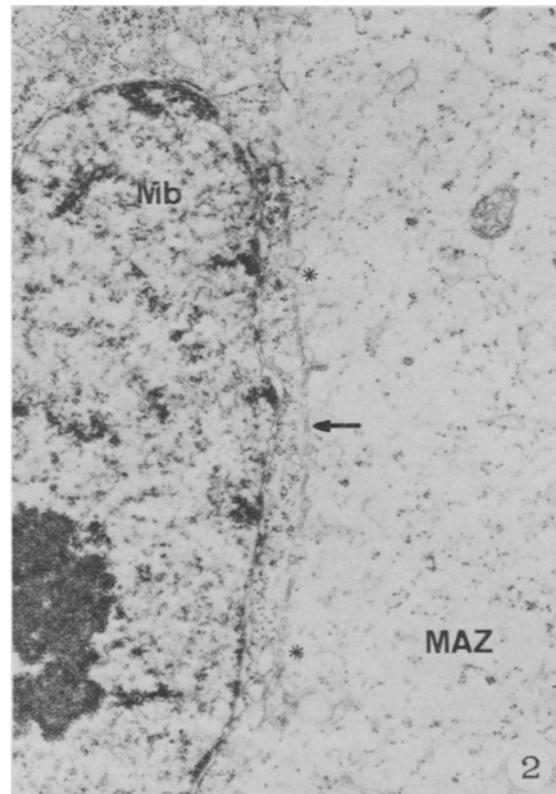


Fig. 2. Myoblast mit Interphasekern in Fusion mit einer Muskelanlagezelle. Man beachte das hantelförmige Anschwellen der Membranreste (Pfeil) und deren Umwandlung in Vesikel (\*).  $\times 18000$ .

nenmikroskopischen Bild festzuhalten. Ein ähnlicher Befund – wenn auch etwas weniger beweiskräftig – wurde schon früher bei *Rhodnius* beschrieben<sup>10</sup>.

Die Fusion myogener Zellen im metamorphosierenden Dorsolongitudinalmuskel von *Antheraea polyphemus*, die im folgenden geschildert werden soll (Methoden bei STOCKER<sup>11</sup>), zeigt einige Unterschiede gegenüber *Rhodnius* und *Calliphora*. Früh in der Imaginalentwicklung besteht die Anlage der Dorsolongitudinalmuskeln aus zwei Zelltypen. Diese wurden von BIENZ-ISLER<sup>12</sup> an der nahe verwandten *Antheraea pernyi* eingehend beschrieben: «Der eine Zelltyp ist langgestreckt und mit Kernreihen versehen, der andere Typ wesentlich kleiner, spindelförmig, einkernig und sehr stark mit Ribosomen durchsetzt.» Bei der ersten Gruppe handelt es sich vermutlich um dedifferenzierte larvale Muskelfasern (im folgenden Muskelanlagezellen (MAZ) genannt). Die Zellen der zweiten Gruppe entsprechen den oben genannten Myoblasten. Über deren Herkunft bestehen verschiedene Auffassungen, die andernorts bereits diskutiert wurden<sup>8</sup>. Solche Myoblasten lagern sich häufig auf ihrer ganzen Länge MAZ an. Die benachbarten Membranen können stellenweise durch Desmosomen<sup>12</sup> vom Fasciae-adhaerens-Typ<sup>2</sup> verbunden sein, wobei unklar bleibt, ob dies eine Voraussetzung für die nachfolgende Zellfusion ist. Der Interzellulärraum hat eine relativ konstante Weite von ca. 300 Å, wie sie zwischen beliebigen benachbarten Membranen gefunden wird «Fuzzy coated vesicles»<sup>13</sup> oder sonstige Erweiterungen des Interzellulärspaltes wurden nicht beobachtet.

Etwas später in der Entwicklung treten in den aneinanderliegenden Membranen derartiger Zellpaare deutliche Lücken auf, durch welche MAZ und Myoblast zytoplasmatische Verbindung erlangen (Figuren 1 und 2).

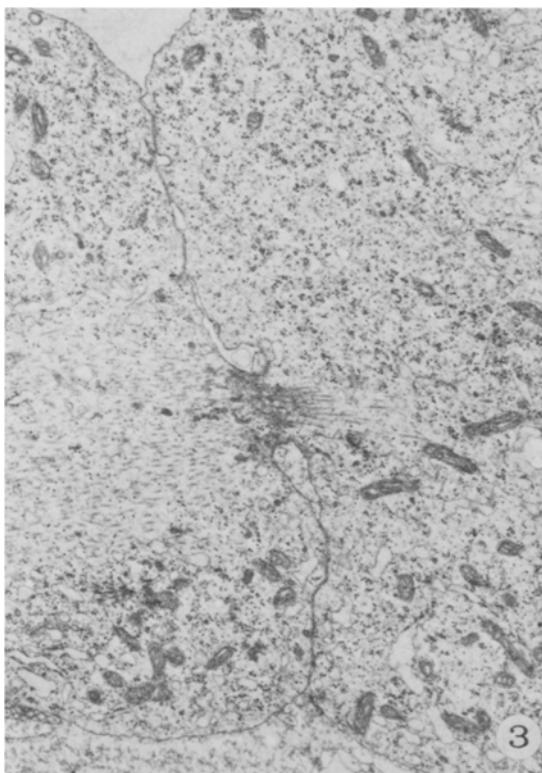


Fig. 3. Späte Telophase einer Myoblastenmitose, als Vergleich mit einer Zellfusion.  $\times 12000$ .

Es scheint, dass Sarkolemm und Myoblastenmembran an diesen Stellen durch einen im Detail unbekannten Vorgang aufbrechen und an den Rändern miteinander verschmelzen. Artefakte können als ausgeschlossen betrachtet werden, da die von LIPTON und KONIGSBERG<sup>13</sup> postulierten Bedingungen für den Nachweis zytoplasmatischer Kontinuität erfüllt sind, nämlich: a) die Areale gemeinsamen Zytoplasmas sind links und rechts von Membranen begrenzt, die mit den Membranen beider Zellen zusammenhängen, und b) der Extrazellulärraum kann beidseitig der Brücke nach aussen verfolgt werden. Diese zweite Forderung hat in unserem Fall zwar nur beschränkt Gültigkeit, weil die Membranlücken stets in Mehrzahl auftreten.

Die Zytoplasmabrücken sind recht schmal (durchschnittliche Breite 0,1  $\mu\text{m}$ ) und verteilen sich ziemlich regelmässig über die ganze Länge der Kontaktregion. Der Verschmelzungsprozess beginnt anscheinend gleichzeitig über den grössten Teil der Kontaktzone. Dieser Fusionsmodus steht mit den Beobachtungen von SHIMADA<sup>2</sup> an Hühnchenmuskelkulturen in Einklang. Er widerspricht aber anderen Befunden an Vogelmyoblasten (in vitro)<sup>13</sup> sowie den bisherigen Feststellungen bei Insekten<sup>9,10</sup>. In diesen gegensätzlichen Fällen wurden jeweils nur vereinzelte Zytoplasmabrücken gefunden, die je nach dem Grad der Zellverschmelzung eine verschiedene Breite aufwiesen. Bei *Calliphora* z.B. scheint die Fusion nur von wenigen Stellen auszugehen<sup>9</sup>. Allerdings lagern sich hier die Myoblasten nur entlang einer schmalen Zone den MAZ an.

Nach CROSSLEY<sup>9</sup> richten sich bei *Calliphora* vor oder während der Verschmelzung die Mikrotubuli beider Komponenten parallel aus. Die Beobachtungen bei *Antheraea* lassen im Myoblasten wohl Mikrotubuli erkennen, jedoch zu keinem Zeitpunkt eine parallele Anordnung derselben (Figur 2). Eine Ausrichtung vorhandener Mikrotubuli scheint somit nicht eine Voraussetzung zur Membranfusion zu sein. Sind aber wie bei *Calliphora* auf beiden Seiten bereits parallel geordnete Reihen vorhanden, so gleichen sich die Zellachsen (wohl im Hinblick auf die Synthese der Myofilamente) gegenseitig an. Die unterschiedliche Mikrotubuliversorgung in den Myoblasten der beiden Insektenarten hängt vermutlich mit der Herkunft dieser Zellen zusammen: Bei *Calliphora* wandern sie durch eigene Bewegungsaktivität aus weit entfernten Imaginal scheiben ein; dazu benötigen sie organisierte Mikrotubuli als Stützskelett. In unserem Fall hingegen, wo die Myoblasten aus der larvalen Muskulatur stammen sollen<sup>5</sup>, befanden sie sich seit ihrer Entstehung am Ort ihrer zukünftigen Verwendung.

Das weitere Schicksal der zwischen den Zytoplasmabrücken liegenden Membranreste wurde nicht genauer verfolgt. Einzelnen Beobachtungen zufolge werden sie zunächst gegen die Lücken hin aufgetrieben (hantelförmig im Schnitt, Figur 2) und schwelen dann zu einem Bläschen

<sup>1</sup> I. R. KONIGSBERG, Science 140, 1273 (1963).

<sup>2</sup> Y. SHIMADA, J. Cell Biol. 48, 128 (1971).

<sup>3</sup> CH. PEREZ, Archs Zool. exp. gén., Ser. V, 4, 1 (1910).

<sup>4</sup> W. BLAUSTEIN, Z. Morph. Ökol. Tiere 30, 333 (1935).

<sup>5</sup> R. EIGENMANN, Revue suisse Zool. 72, 789 (1965).

<sup>6</sup> F. J. EDWARDS, J. Insect Physiol. 15, 1591 (1969).

<sup>7</sup> N. M. G. BHAKTHAN, K. K. NAIR and J. H. BORDEN, Can. J. Zool. 49, 85 (1971).

<sup>8</sup> G. C. PERISTANIS and D. W. GREGORY, J. Insect Physiol. 17, 1005 (1971).

<sup>9</sup> A. C. CROSSLEY, J. Embryol. exp. Morph. 27, 43 (1972).

<sup>10</sup> P. A. TOSELLI and F. A. PEPE, J. Cell Biol. 37, 462 (1968).

<sup>11</sup> R. F. STOCKER, Revue suisse Zool. 80, 971 (1973).

<sup>12</sup> G. BIENZ-ISLER, Acta ant. 70, 524 (1968).

<sup>13</sup> B. H. LIPTON and I. R. KONIGSBERG, J. Cell Biol. 53, 348 (1972).

an, das bald nicht mehr von den übrigen kleinen Vesikeln im Zytoplasma der fusionierten Zelle zu unterscheiden ist.

Welcher Art die Wirkung auf Sarkolemm und Myoblastenmembran ist, kann mit strukturellen Befunden allein kaum erklärt werden. Höchstens über die Lokalisation des postulierten Einflusses ist eine gewisse Aussage möglich. Auf Figur 1 fällt auf, dass nur einer der Myoblasten durch Zytoplasmabrücken mit der MAZ verbunden ist, während die beiden Membranen gegen den zweiten Myoblasten hin auf der ganzen Länge intakt sind. Dies lässt vermuten, dass der Ursprung der «membranauflösenden» Wirkung auf der Myoblastenseite zu suchen ist. «Fuzzy coated vesicles», denen eine mögliche Funktion bei der Membranfusion zugesprochen wird<sup>13</sup>, konnten bei *Antheraea* nicht beobachtet werden. Hingegen enthalten Myoblasten vor der Fusion oftmals Gruppen von transparenten Vesikeln von ca. 500 Å Durchmesser, die direkt unter der Membran gegen die MAZ liegen können. Es ist nicht auszuschliessen, dass diese gewisse Stoffe enthalten, die eine Wirkung auf die Zellmembran ausüben.

Der Verschmelzungsvorgang scheint nur kurze Zeit zu beanspruchen. Darauf lässt die Seltenheit schliessen, mit der dieser Prozess beobachtet wird. Auffällig ist hingegen, dass die Myoblastenzahl im Laufe der Entwicklung sukzessive zurückgeht, ohne dass Degenerationsspuren festzustellen sind. Doch findet man gelegentlich mehrkernige Zellen, die eine mosaikartige Feinstruktur aufweisen: ein

Teil des Zytoplasmas ist reich an Ribosomen; er entspricht dem ehemaligen Myoblasten<sup>2, 8, 13</sup>.

LIPTON und KONIGSBERG<sup>13</sup> haben intensiv Verwechslungsmöglichkeiten zwischen Zellfusionen und Mitoseprozessen diskutiert. Ihre Beobachtungen an Myoblasten konnten sie danach nur als Fusionen interpretieren, da die Kerne stets im Interphasezustand vorlagen und nie Spindelstrukturen festzustellen waren. Dasselbe gilt auch für *Antheraea* (vgl. Figur 2). Mikrotubuli des Spindelapparates konnten nur in sich teilenden Myoblasten (Figur 3) nachgewiesen werden. Auch in der übrigen Feinstruktur unterscheidet sich diese Art Zellkontakt von der oben beschriebenen.

*Summary.* The fusion of both myoblasts and 'Muskelanlagezellen' during development of the dorsolongitudinal muscles in *Antheraea polyphemus* (Lep.) is shown at the ultrastructural level. Several cytoplasmic bridges are formed simultaneously between the two cells. It is supposed that the effect of breakdown of both myoblast membrane and sarcolemma originates from the myoblast.

R. F. STOCKER

Zoologisches Institut der Universität Basel,  
Rheinsprung 9,  
CH-4051 Basel (Schweiz), 3. Januar 1974.

## The Effect of Cysteine on the Sedimentation Profiles of DNA of *E. coli* Cells in Alkaline Sucrose

A relationship is suspected between the mortality (reproduction integrity) of the cells and the incidence and recovery of breaks in cellular DNA. Therefore some authors have studied the correlation between the effects of chemical radioprotectors on the reproduction integrity and on the incidence and recovery of breaks in DNA, respectively<sup>1-5</sup>. The activity of cysteamine, which is one of the most effective radioprotector, was investigated most intensively in this respect. It was established that the cysteamine protected the cells not only against the lethal effects, but also against the single-strand break inducing activity of ionizing irradiation. A complicating factor in the investigation of protection against radiation-induced DNA breaks by cysteamine was the fact that due to the compound itself during the lysis of the cells on alkaline sucrose gradients, breaks in DNA were induced<sup>2, 3</sup>. This effect of cysteamine was found to be dose-dependent<sup>2</sup>.

Investigating the protective activity of cysteine (another good radioprotector from the same chemical group) we found also difficulties in establishing its radioprotective effect against radiation induced breaks<sup>6</sup>. Therefore it was decided to study the single-strand breaks inducing effect of cysteine (at various concentrations) in *E. coli* K12 rec<sup>+</sup> cells. These experiments are described in the present paper.

*E. coli* K12 (AB2497) rec<sup>+</sup> bacteria<sup>7</sup> were labelled in their DNA by inoculating stationary-phase cells into prewarmed 'GS' medium<sup>8</sup> containing <sup>3</sup>H-methyl-thymine (20 µCi/ml medium). The size of the inoculum was adjusted to allow 3 to 4 generations of growth in the label-containing media before harvesting the cells in exponential growth (at 2 × 10<sup>8</sup> cells/ml). To some of the cultures, cysteine and cysteamine (at various concentrations) were added 30 min before the end of cultivation.

Experimental procedures employed for sedimentation are essentially the same as those described by MCGRATH

and WILLIAMS<sup>9</sup>. A minor modification used was published elsewhere<sup>6</sup>.

Part A) of the Figure indicates the changes in sedimentation profile of DNA, as plotted against concentrations of cysteine. The above effect of cysteine was tested at concentrations of 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 and 50 mM, respectively. Part B) of the Figure shows the effect of cysteamine as a control at concentrations of 30 and 50 mM, respectively, known to induce breaks. For the quantitative analysis of the curve we have used the 'S 1/2' values as described by VEATCH and OKADA in 1969<sup>10</sup>. From this value the molecular weight of DNA can be calculated on the basis of the given equation. 'S 1/2' is the distance beyond which 1/2 of mass of DNA sediments. It is expressed in 'fraction number' from the top.

No changes in the sedimentation patterns and in 'S 1/2' of cysteine-treated cells at concentrations 0.5 mM (curve 2), 10 mM (curve 3) and 50 mM (curve 4) could be observed as compared to that of the untreated cells (curve 1). 'S 1/2' values are as follows: curve 1: 17.0; curve 2: 17.8;

<sup>1</sup> D. M. GINSBERG and H. K. WEBSTER, Radiation Res. 39, 421 (1969).

<sup>2</sup> S. SAWADA and S. OKADA, Radiation Res. 44, 116 (1970).

<sup>3</sup> P. H. M. LOHMAN, O. VOS, C. A. VAN SLUIS and J. H. COHEN, Biochim. biophys. Acta 224, 339 (1970).

<sup>4</sup> H. G. MODIC and M. R. EDGREN, Studia biophys. 29, 117 (1971).

<sup>5</sup> O. DJORDJEVIC and L. J. KOSTIC, IX. Annual Meeting of the Eur. Soc. for Radiation Biol. 1972, Book of Abstr., p. 44.

<sup>6</sup> F. HERNÁDI, Cs. KARI, Zs. NAGY and J. CSONGOR, Mikrobiologija, in press.

<sup>7</sup> D. S. KAPP and K. C. SMITH, Int. J. Radiat. Biol. 14, 567 (1969).

<sup>8</sup> A. K. GANESAN and K. C. SMITH, J. Bact. 96, 365 (1968).

<sup>9</sup> R. A. MCGRATH and R. W. WILLIAMS, Nature, Lond. 212, 534 (1966).

<sup>10</sup> W. VEATCH and S. OKADA, Biophys. J. 9, 330 (1969).