

Genetische und papierchromatographische Untersuchungen an einer letalen Mutante von *Culex pipiens*

VON HANNES LAVEN und PEI SHEN CHEN *

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Kühn, Tübingen,
und dem Zoologisch-vergl. anatomischen Institut der Universität Zürich

(Z. Naturforschg. 11 b, 273—276 [1956]; eingegangen am 20. Februar 1956)

Spontan aufgetretene, stark pigmentierte Larven in einem Stamm „Prag“ von *Culex pipiens* sterben überwiegend kurz vor der Verpuppung ab. Die genetische Analyse ergibt, daß Pigmentierung und Absterben durch einen in einem Autosom gelegenen rezessiven Letalfaktor bedingt sind, der im homozygoten Zustand sich ausprägt. Papierchromatographische Untersuchung ergab ein typisches Bild der Verarmung an freien Aminosäuren und Peptiden bei den letalen Larven gegenüber den normalen.

Bei der Aufzucht von Larven des Stammes „Prag“ der Stechmücke *Culex pipiens* (autogene Form) fiel schon bei der ersten Generation ein gehäuftes Auftreten dunkelpigmentierter Larven auf. Während die normalen Larven völlig unpigmentiert blieben (Abb. 1 a), ihr Fettkörper im Vergleich zu anderen Stämmen auch keine deutliche Eigenfärbung aufwies, waren die dunklen Larven (Abb. 1 b) vom ersten Stadium an auffallend dunkel. Diese Dunkel-färbung wird hervorgerufen durch ein dunkles Pigment, das in körniger Verteilung epidermal gelagert ist. Der Kürze halber seien die dunklen Larven melanotisch genannt, der verursachende Faktor *mel*.

Früher waren vereinzelt ähnliche Larven auch in anderen Zuchtstämmen aufgetreten, doch wurden sie als Ausnahmereischeinungen nicht weiter beachtet, zumal sie ausnahmslos als späte Larven IV oder als eben verpuppte Individuen abstarben. Das zahlreiche Auftreten solcher Tiere im Stamm „Prag“ ließ eine genetische Analyse aussichtsreich erscheinen. Außerdem schien es interessant, die abnormale Pigmentbildung wie die daraus eventuell sich ergebende Letalität dieser Larven einer Untersuchung zu unterziehen. Die vorliegende vorläufige Mitteilung bringt einerseits die Ergebnisse der Erbanalyse, andererseits erste Ergebnisse über die papierchromatographische Untersuchung der freien Aminosäuren und Peptide in diesen Tieren.

Wie die früher beobachteten melanotischen Larven, so starben auch die des Stammes „Prag“ ohne Ausnahme vorwiegend im IV. Larvenstadium (98%), vereinzelt als Puppen (2%) ab. Nur ganz selten bleibt ein Individuum, das die Verpuppung über-

standen hat, noch bis zu 24 Std. am Leben, in den meisten Fällen sterben solche Tiere aber während der Verpuppung oder kurz danach ab. Wie die weitere Untersuchung zeigt, ist diese Melanisierung und das Absterben erblich. Wir haben es demnach mit einem Letalfaktor mit scharf ausgeprägter Phasenspezifität¹ zu tun.

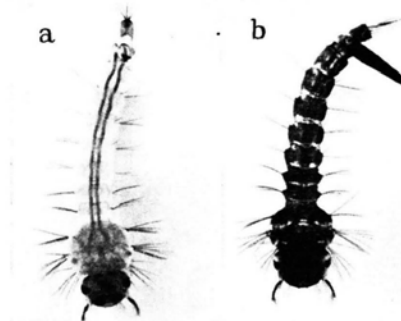


Abb. 1. a: normale Larve des IV. Stadiums von *Culex pipiens*, Stamm „Prag“; b: letale, melanotische Larve gleichen Alters und gleicher Herkunft.

Vier Befunde zeigen, daß dieser Letalfaktor rezessiv ist und im homozygoten Zustand sich ausprägt:

1. Aus Zuchten ohne letale Larven spalten bei der Nachkommenschaft wiederum melanotische, letale Larven heraus.
2. Aus den miteinander in Massenzucht verpaarten normalen Imagines, die aus Zuchten mit melanotischen Larven stammen, erhält man Nachzuchten mit bzw. ohne letale Larven im

* Ausgeführt mit Unterstützung der Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

¹ E. Hadorn u. P. S. Chen, Arch. Julius-Klaus-Stiftung 27, 147 [1952].

Verhältnis von 5 : 4 (Beobachtung 69 : 56 Zuchten = 5 : 4,06).

3. Kreuzt man mutmaßlich heterozygote ♂♂ oder ♀♀ mit Partnern eines nichtverwandten Stammes, dann treten melanotische Larven erst nach Inzucht der F_1 in der F_2 wieder auf.
4. In den Zuchten mit melanotischen Larven ist das Verhältnis der melanotischen zu normalen Larven im Durchschnitt wie 1 : 3 (Beobachtung: 42 Zuchten mit insgesamt 2017 Larven im IV. Stadium, davon 1555 normal, 462 melanotisch; $462 : 1555 = 1 : 3,36$).

Um in Zukunft die Massenzucht zu vermeiden und nur Nachkommenschaften mit letalen Larven zu erzielen, wurde versucht, die Lage des Letalfaktors auf einem der Chromosomen festzustellen und durch Koppelung mit einem dominanten Gen ein Indikatorgen für das Vorhandensein des Letalfaktors zu gewinnen. Dieser Teil der Untersuchung ist noch nicht abgeschlossen, doch scheint es, daß der Letalfaktor in dem Autosom liegt, auf dem bisher neben einem rezessiven Faktor (*kps*) drei dominante Faktoren (*Pfl*, *Sch*, *Kuf*) festgestellt wurden, unter denen sich der für Kurzflügeligkeit (*Kuf*) ausgezeichnet als Indikator eignen dürfte, falls nicht zu häufiges crossing-over die Koppelung wieder unterbricht. Es dürfte dann auch möglich sein, die bisher gewonnenen und im folgenden mitgeteilten Erhebungen über die in den letalen Larven vorhandenen freien Aminosäuren und Peptide mittels Papierchromatographie weiter auszubauen.

In ihren Untersuchungen über die biochemische Auswirkung von Letalfaktoren bei *Drosophila* zeigten H a d o r n und seine Mitarbeiter, daß mutierte Gene direkt oder indirekt tiefgreifende Störungen im Eiweißstoffwechsel auslösen (Zusammenfassung: H a d o r n 1955, S. 258)². Bei dem Faktor *letal-translucida* (*ltr*) wird sowohl die Quantität der ninhydrinpositiven Substanzen pro Tier wie auch die Stoffkonzentration in der Hämolymphe durch die Mutation erhöht³. Bei der Mutante *letal-meander* (*lme*) ist dagegen ein gegenüber dem normalen stark verarmtes Stoffinventar charakteristisch⁴. In beiden Fällen beeinflussen die Erbfaktoren die in den mutier-

ten Individuen frei vorkommenden Aminosäuren und Peptide nicht gleichmäßig. Einzelne Substanzen sind infolge der Mutation vermehrt, während andere in ihrer Konzentration entweder konstant bleiben oder abnehmen⁵. Für die *lme*-Mutante gelang es C h e n und H a d o r n⁴ zu zeigen, daß eine herabgesetzte Protease-Aktivität für die aufgetretene Störung des Eiweißstoffwechsels verantwortlich ist.

Um weitere Einblicke in die zur Letalität führende Mutationswirkung zu gewinnen, haben wir die freien ninhydrin-positiven Stoffe der vorliegenden letalen Mutante papierchromatographisch untersucht. Durch die Arbeiten von M i c k s und E l l i s⁶ wurde bereits angedeutet, daß der Stoffgehalt der Mücken je nach dem Entwicklungsstadium und den benutzten Arten verschieden ist. Da die letalen Individuen überwiegend kurz vor der Verpuppung absterben, wurden unsere Untersuchungen ausschließlich an Larven durchgeführt. Wir bestimmten die freien Aminosäuren und Peptide teils in Körperextrakten, teils in der Hämolymphe. Normale Tiere des entsprechenden Entwicklungsalters dienten als Kontrollen. Der vorliegende Bericht ist als vorläufige Mitteilung zu werten. Endgültige Schlußfolgerungen lassen sich nur ziehen, wenn zahlreichere quantitative Meßwerte vorliegen.

Es wurden zuerst Körperextrakte der Larven des IV. Stadiums untersucht. 14 normale bzw. letale Larven wurden je in einem Glastubus zerquetscht und mit 80-proz. Methanol versetzt. Nach Abzentrifugieren des Körperrückstandes wurde die überstehende Flüssigkeit auf das Filterpapier gebracht und zweidimensional chromatographiert (1. Lösungsmittel: 70-proz. *n*-Propanol, aufsteigend; 2. Lösungsmittel: wasser-gesättigtes Phenol, absteigend). Zur Entwicklung der Farbreaktion wurde das Papier mit einer 1-proz. äthanolischen Ninhydrinlösung besprüht und kurz auf 90° C erhitzt.

In den Körperextrakten der normalen *Culex*-Larven haben wir die folgenden Stoffe identifiziert: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Cystin, Serin, Glycin, Threonin, Tyrosin, α -Alanin, Glutamin, β -Alanin, Arginin, Lysin, Valin, Leucin, Prolin, γ -Aminobuttersäure, Histidin und 3 Peptide (Abb. 2 a). M i c k s und E l l i s fanden in den von ihnen untersuchten Mückenarten im Gegensatz zu uns Taurin und Tryptophan, während bei ihnen Cystin und γ -Aminobuttersäure fehlen. Methionin und Valin lassen sich mit den von uns verwendeten Lösungsmitteln nicht tren-

² E. H a d o r n, Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung, Stuttgart 1955.

³ E. H a d o r n u. E. S t u m m - Z o l l i n g e r, Rev. suisse Zool. **60**, 506 [1953].

⁴ P. S. C h e n u. E. H a d o r n, Rev. suisse Zool. **62**, 338 [1955].

⁵ E. S t u m m - Z o l l i n g e r, Z. Vererbungslehre **86**, 126 [1954].

⁶ D. W. M i c k s u. J. P. E l l i s, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **78**, 69 [1951]; **79**, 191 [1952].

Stoffgruppe	Konzentration (Extinktion/ 2µl Hämolymphe)	
	normale Larven	letale Larven
Peptide	2,2	1,2
Glutaminsäure	2,0	1,9
Alanin	1,5	1,4
Valin-Leucin	1,8	0,5
Total	7,6	5,4

Tab. 1. Konzentration an ninhydrin-positiven Stoffen in der Hämolymphe von normalen und letalen Larven bei *Culex pipiens*. (Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus je 4 einzelnen Bestimmungen. Die Totalzahlen stammen aus gesonderten Messungen.)

nen. Es bleibt vorläufig unentschieden, ob der hier als Valin bezeichnete Fleck auch Methionin enthält, da bis jetzt noch kein spezifischer Test hierfür durchgeführt wurde. Prolin tritt in den untersuchten Extrakten in sehr hoher Konzentration auf. (Da Prolin eine gelbe Farbe mit Ninhydrin bildet, ist die hohe Konzentration dieses Stoffes auf der Photographie nicht ersichtlich.)

Der Unterschied zwischen letalen und normalen Larven in ihrer Stoffzusammensetzung ist überraschend groß. Die letalen Larven sind viel ärmer an ninhydrin-positiven Substanzen (Abb. 2b) als die Kontrollen. β -Alanin, α -Aminobuttersäure und Peptid 3 fehlen. Ihr Gehalt an Tyrosin ist in auffallender Weise vermindert. Da die letalen Individuen stark pigmentiert sind, wird wahrscheinlich ein großer Teil dieser Aminosäuren für die Pigmentbildung verwendet.

Weiter wurde die Stoffkonzentration der Hämolymphe aus letalen und normalen Tieren des IV. Larvenstadiums verglichen. Das Blut wurde aus den Larven herausgesogen und in einem Glasröhrchen gesammelt. Nach Denaturierung der Proteine durch kurzes Eintauchen in siedendes Wasser und Abzentrifugieren wurden je 2 µl der überstehenden Flüssigkeit auf das Filterpapier gebracht und in *n*-Propanol (70%) eindimensional chromatographiert. Die Intensität der Ninhydrinfarbe wurde mit einem Extinktions-Schreiber kurvenmäßig registriert und der Extinktionswert durch Planimetrieren des Flächeninhaltes bestimmt ⁷.

Tab. 1 faßt die Mittelwerte der Meßzahlen zusammen. Die Totalkonzentration der ninhydrin-positiven Stoffe in den letalen Larven ist bis auf etwa 70% des normalen Gehaltes reduziert. Für die einzelnen Stoffgruppen ergab die Bestimmung das folgende Verhältnis: Einerseits ist der Gehalt an Glutamin-

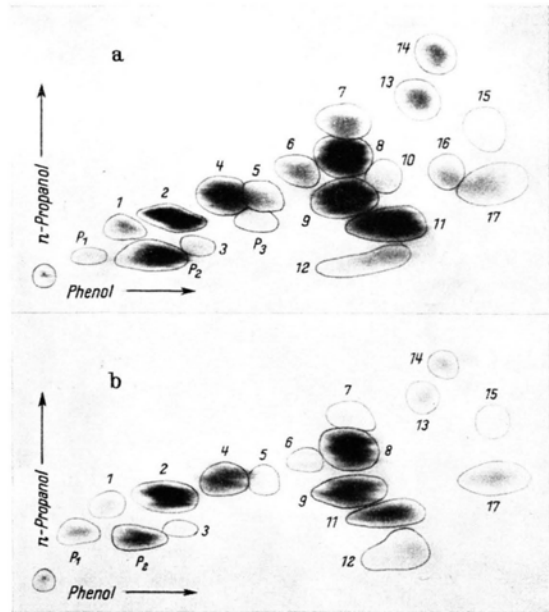


Abb. 2. Vergleich der freien Aminosäuren, Peptide und Amide in Körperextrakten von normalen (a) und letalen (b) Larven des IV. Larvenstadiums von *Culex pipiens*. 1 Asparaginsäure, 2 Glutaminsäure, 3 Cystin, 4 Serin, 5 Glycin, 6 Threonin, 7 Tyrosin, 8 α -Alanin, 9 Glutamin, 10 β -Alanin, 11 Arginin, 12 Lysin, 13 Valin, 14 Leucin, 15 Prolin, 16 γ -Aminobuttersäure, 17 Histidin, P 1—3 Peptide.

säure und Alanin bei beiden Larventypen nahezu gleich groß, andererseits enthalten die normalen Larven etwa zweimal soviel Peptide und dreimal soviel Valin-Leucin-Stoffe als die letalen. Es zeigt sich also das gleiche Ergebnis wie bei den Untersuchungen an Letalfaktoren von *Drosophila*: Das mutierte Gen beeinflusst ungleichmäßig die in den Larven frei vorkommenden Aminosäuren und Peptide.

Von welchem Entwicklungsstadium an dieser unterschiedliche Stoffgehalt in Erscheinung tritt, läßt sich noch nicht sicher aussagen. Einige vorläufige Messungen an der gesamten Stoffmenge im Körperextrakt deuten darauf hin, daß im II. und III. Larvenstadium die beiden Larventypen noch gleich reich an ninhydrin-positiven Stoffen sind (Verhältnis von normal zu letal, Extinktion/Larve: II. Larvenstadium 1,1 : 1,0; III. Larvenstadium 2,3 : 2,4). Wahrscheinlich treten die oben angeführten Stoffunterschiede erst in einer relativ späten Entwicklungsstufe auf. Wie nach diesen letzten Befunden an jüngeren Larven die bereits auf dem I. Larvenstadium sichtbare Pigmen-

⁷ Darstellung der Untersuchungsmethoden bringen A. Kühn u. P. S. Chen in einer demnächst in dieser Zeitschrift erscheinenden Arbeit.

tierung dem erst im IV. Stadium festgestellten deutlichen Unterschied in der Konzentration der Aminosäuren zuzuordnen ist, bleibt vorerst ungewiß.

Vorläufig wissen wir nicht, ob der vorliegende Letalfaktor primär oder sekundär störend in den Eiweißstoffwechsel eingreift. Es soll die Aufgabe spä-

terer Untersuchungen sein, die Stoffzusammensetzung und das Eiweißfermentsystem der letalen Larven in möglichst jungen Stadien zu analysieren. Erst dann läßt sich die Beziehung der Proteinstoffwechselstörung zu der zur Letalität führenden Mutationswirkung aufklären.

Struktur des Tuberkulose-Erregers in ultradünnen Schnitten nach Fixierung bei verschiedenen p_H -Werten

VON FRIEDRICH J. BASSERMANN

Aus dem Westdeutschen Tuberkulose-Forschungsinstitut, Honnef a. Rh. (Chefarzt: Medizinaldirektor Dr. W. Ohm) und dem Zentral-Laboratorium für Angew. Übermikroskopie der Universität Bonn (Leiter: Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann)

(Z. Naturforschg. **11 b**, 276—277 [1956]; eingegangen am 23. November 1955)

Eugonisch gewachsene Kulturen pathogener Stämme von *Mycobacterium tuberculosis*, var. hominis, werden bei verschiedenen p_H -Werten fixiert, ultradünn geschnitten und übermikroskopisch untersucht. Der p_H -Wert bei der Fixierung hat keinen erkennbaren Einfluß auf die Ultrastruktur.

Lichtoptische Schnittuntersuchungen an *Mycobacterien*-Kulturen sind selten durchgeführt worden. Die Fragestellungen betrafen den architektonischen Aufbau der Kulturen, die Existenz einer intermikrobiellen Substanz sowie das Verhältnis und die Topographie der säurefesten und nicht-säurefesten Bazillen im Kolonieverband.

Unsere an anderer Stelle¹ vorgelegten elektronenoptischen Untersuchungen an ultradünnen Schnitten eugonisch gewachsener Kulturen pathogener und infektiöser Stämme von *Mycobacterium tuberculosis*, var. hominis, sind eine Ergänzung und Erweiterung früherer Arbeiten über die mikromorphologischen Organisationsprinzipien gerichtet wachsender *Mycobacterien*.

Das Studium ultradünner Schnittbilder von TB diente uns ferner zur besseren Auffindung und Erkennung des Erregers in Schnitten spezifisch infizierten, in vivo entnommenen, menschlichen Lungengewebes. Ferner wurden weitere Einblicke in die cytoplasmatische Feinstruktur und die zellspezifischen Partikelpopulationen der Mikrobenezelle möglich.

Bezüglich des Artefaktproblems wurde der Einfluß

der Wasserstoffionen-Konzentration bei der Fixierung besonders untersucht. Lediglich über die dabei gemachten Beobachtungen wird nachfolgend kurz referiert.

Es wurden 6 eugonisch gewachsene TB-Stämme im Alter von 10 Tagen bis zu 21 Monaten, gewachsen auf Hohn-Substrat 4, untersucht.

Die Fixierung erfolgte in 1%iger, gepufferter Osmiumtetroxydlösung mit einem p_H -Wert von: 7,2 — 6,12 — 2,62.

Das extrazelluläre p_H -Optimum für menschenpathogene *Mycobakterien* liegt trotz der Schwankungen im Laufe der logarithmischen Vermehrungsphase im sauren Bereich bei p_H 6,5 (6,4) 6,2. Das intrazelluläre p_H -Optimum ist unbekannt.

Auf Grund von Elektrophorese- und Färbeversuchen darf vermutet werden, daß der IEP des TB-Cytoplasmas bei einem p_H unter 4,0 liegt [Freund: 2,8—3,0 (1925)²; Moyer: 4,0 (1936)³; Petuely und Holasek: 2,8 bis 3,4 (1950)⁴].

Alle präparativen Partialakte wurden bei einer Temperatur von —1 bis +2° C zur Hemmung der enzymatischen Autolyse durchgeführt.

Die Autolyse ist bei den *Mycobakterien* nach Bloch⁵ ein progressives Phänomen, welches bei 37° C und einem p_H von 5,2—7,0 am stärksten auftritt. Nach Laporte (1942)⁶ sowie Baisden und Yegian (1943)⁷ hem-

Parasitenkunde, Infektionskrankh., Hyg. I. Abt. Orig. **155**, 207 [1950].

⁵ H. Bloch, J. exp. Medicine **91**, 197 [1950].

⁶ R. Laporte, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales **214**, 887 [1942].

⁷ L. Baisden u. D. Yegian, J. Bacteriol. **45**, 163 [1943].

¹ Fr. J. Bassermann, Beitr. Klin. Tuberkul., **115**, 173 [1955].

² J. Freund, Amer. Rev. Tuberkul. **12**, 124 [1925].

³ L. S. Moyer, J. Bacteriol. **31**, 531 [1936].

⁴ F. Petuely u. A. Holasek, Zbl. Bakteriolog.,