

Die Hemmung von *Agrobacterium tumefaciens* durch D-Aminosäuren

MARTIN BOPP

Institut für Botanik der Technischen Hochschule Hannover

(Z. Naturforschg. 20 b, 899—905 [1965]; eingegangen am 6. Februar 1965)

The growth of *Agrobacterium tumefaciens* in nutrient solution can be inhibited by all D-amino acids used in these experiments. The degree of inhibition is of different in magnitude; in some cases the inhibition is complete. The inhibition is dependent on the concentration of D-amino acid and can not be counteracted by addition of L-amino acid or glycine; it is increased by  $K_2CO_3$ . After 28 transfers, all D-amino acid used in these experiments lead to reduction or complete loss of virulence. It can be assumed that D-amino acids induce independently loss of virulence and inhibition of growth.

Bereits seit den Untersuchungen von VAN LANEN und Mitarbb.<sup>1-3</sup> ist bekannt, daß *Agrobacterium tumefaciens* die Fähigkeit verliert, an höheren Pflanzen Tumoren hervorzurufen, wenn es über mehrere Passagen in Aminosäure-haltiger Nährlösung kultiviert wird<sup>4</sup>. BEARDSLEY<sup>6</sup> nimmt an, daß dies auf der Selektion eines einfachen genetischen Mechanismus beruht; aber als eindeutige Erklärung dafür, daß die verschiedenen Aminosäuren dabei dieselbe Wirkung haben, kann dies nicht angesehen werden<sup>5, 6</sup>. Die Beobachtung könnte aber, worauf auch BEARDSLEY<sup>5</sup> hingewiesen hat, für die Klärung des Tumor-induzierenden Prinzips (TIP) Bedeutung haben.

In diesem Zusammenhang ist es nun interessant, daß seit etwa 20 Jahren Arbeiten publiziert wurden, nach denen das Wachstum einer ganzen Reihe anderer gram-positiver und gram-negativer Bakterien durch D-Aminosäuren gehemmt wird<sup>5-13</sup>. In neuerer Zeit wurden außerdem nachhaltige Beeinflussun-

gen von Form, Wachstumsverhalten und Zellwandbildung der Bakterien beschrieben<sup>14-19</sup>.

Diese Befunde, besonders die letzten, führen zu der Annahme, daß D-Aminosäuren auch für den Virulenzverlust von *Agrobacterium tumefaciens* direkt verantwortlich sein könnten, zumal in Untersuchungen von VAN LANEN und Mitarbb.<sup>3</sup> im allgemeinen die Razemate effektiver waren als die L-Aminosäuren. Um diese Frage anzugehen, ist es nötig, die Wirkung einer größeren Anzahl von D-Aminosäuren zu testen, da die Resultate an anderen Bakterien und mit wenigen D-Aminosäuren<sup>6</sup> aus folgenden Gründen nicht zu verallgemeinern sind: 1. *Agrobacterium* wächst im Unterschied zu den meisten bisher untersuchten Bakterien in einem völlig Aminosäure-freien Medium<sup>20</sup>. 2. Es sind eine Reihe von Bakterien und anderen Organismen bekannt, die D-Aminosäuren z. T. als einzige Stickstoffquelle verwenden können<sup>21-26</sup>. Dabei werden die D-Aminosäuren entweder transaminiert<sup>27, 28</sup> oder

<sup>1</sup> J. M. VAN LANEN, J. L. BALDWIN u. A. J. RIKER, Science [New York] **92**, 512 [1940].

<sup>2</sup> J. M. VAN LANEN, J. L. BALDWIN u. A. J. RIKER, J. Bacteriol. **63**, 715 [1952].

<sup>3</sup> J. M. VAN LANEN, A. J. RIKER u. J. L. BALDWIN, J. Bacteriol. **63**, 723 [1952].

<sup>4</sup> M. BOPP, Naturwiss. Rundschau **16**, 349 [1963].

<sup>5</sup> R. E. BEARDSLEY, J. Bacteriol. **83**, 6 [1962].

<sup>6</sup> R. E. BEARDSLEY, J. Bacteriol. **84**, 1237 [1962].

<sup>7</sup> S. W. FOX, M. FLING u. C. N. BOLLENBACK, J. biol. Chemistry **155**, 465 [1944].

<sup>8</sup> M. FLING u. S. W. FOX, J. biol. Chemistry **160**, 329 [1945].

<sup>9</sup> R. J. DUBOS, Amer. Rev. Tubercul. **60**, 385 [1949].

<sup>10</sup> B. D. DAVIS u. W. K. MAAS, J. Amer. chem. Soc. **71**, 1865 [1949].

<sup>11</sup> K. E. YAW u. J. C. KAHAYAS, J. Bacteriol. **63**, 263 [1952].

<sup>12</sup> S. W. FOX u. C. WARNER, J. biol. Chemistry **210**, 119 [1954].

<sup>13</sup> E. A. TEERI, J. Bacteriol. **76**, 686 [1954].

<sup>14</sup> G. S. COLEMAN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **31**, 55 [1959].

<sup>15</sup> A. L. TUTTLE u. H. GEST, J. Bacteriol. **79**, 213 [1960].

<sup>16</sup> C. LARK u. R. SCHICHEL, J. Bacteriol. **84**, 1241 [1962].

<sup>17</sup> C. LARK u. K. G. LARK, Bact. Proc. **108** [1958].

<sup>18</sup> E. A. GRULA, J. Bacteriol. **80**, 375 [1960].

<sup>19</sup> C. LARK u. K. G. LARK, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **49**, 308 [1961].

<sup>20</sup> M. BOPP, Z. Naturforschg. **19 b**, 64 [1964].

<sup>21</sup> J. R. MARTIN u. N. N. DURHAM, Arch. Biochem. Biophysics **96**, 190 [1962].

<sup>22</sup> ST. A. KOSER u. J. C. THOMAS, J. Bacteriol. **73**, 477 [1957].

<sup>23</sup> M. N. CAMIEN u. M. S. DUNN, J. biol. Chemistry **179**, 935 [1949].

<sup>24</sup> M. N. CAMIEN, J. biol. Chemistry **197**, 687 [1952].

<sup>25</sup> M. N. CAMIEN u. M. S. DUNN, J. biol. Chemistry **217**, 125 [1955].

durch D-Aminosäureoxydase desaminiert<sup>26, 29-31</sup>.  
 3. D-Aminosäuren spielen als Bestandteile der Bakterienwand und als Baustein einer ganzen Reihe von Antibiotica aus Bakterien eine Rolle, wozu sie von den Bakterien synthetisiert werden<sup>32-34</sup>.

Wir prüften deshalb quantitativ die Wirkung einer größeren Anzahl D-Aminosäuren im Vergleich zu den entsprechenden L-Aminosäuren auf das Wachstum und daran anschließend auf die Virulenz von *Agrobacterium tumefaciens*. Im folgenden soll über die wesentlichen Ergebnisse berichtet werden.

**Methoden**

1. Nährboden: *Agrobacterium tumefaciens* Stamm B 6 wird in einer vollsynthetischen Nährlösung kultiviert (Zusammensetzung Tab. 1). Bei Zugabe von

	[g]		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	Citronensäure	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5	Weinsäure	1 g
KNO <sub>3</sub>	0,25	Äpfelsäure	1 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	auf 1000 ml H <sub>2</sub> O mit	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	KOH auf pH 7,2	
MgSO <sub>4</sub>	0,25	einstellen	
Saccharose	5		
Glucose	2,5		

Tab. 1. Nährlösung für *Agrobacterium tumefaciens*.

D-Aminosäure wachsen die Bakterien nach einiger Zeit schlechter und verlieren ihre Virulenz. Das Wachstum der Bakterien wird außerdem stark beeinträchtigt, wenn bei gleichzeitiger Zugabe von Aminosäuren der pH-Wert mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eingestellt wird. Das beruht zu einem kleinen Teil darauf<sup>2</sup>, daß sich nach mehrmaligem Sterilisieren einer mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> neutralisierten Nährlösung der pH-Wert auf 8,7 verschiebt (vgl. Tab. 2).

pH-Wert eingestellt mit	pH-Wert		Bakterienmenge nach 72 Std.
KOH	7,2	ohne	100
KOH	8,5	Methionin	100
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	8,7		45,5
KOH	7,2	mit	15,5
KOH	8,5	Methionin	13,0
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	8,7	10 µMol/ccm	7,0

Tab. 2. Der Einfluß von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in Kombination mit Aminosäuren auf das Bakterienwachstum.

2. Bakterienwachstum: Zu Versuchsbeginn wurden jeweils in 20 cm<sup>3</sup> Nährlösung 9·10<sup>4</sup> Bakterien/mm<sup>3</sup> eingesetzt. Den Zuwachs maßen wir nach 24 und 48 Std. mit einem Zeiss-Elko II mit Trübungsmeß-Einrichtung, nachdem die etwas klumpig wachsenden Bakterien mit einem Ultraturax gleichmäßig verteilt worden waren. Die Meßwerte im Elko sind dann sehr gut reproduzierbar.

Um die absoluten Bakterienzahlen zu erhalten, benutzten wir die Eichkurve Abb. 1. Diese Kurve enthält die bei gegebenem Elko-Wert mit einer Zählkammer ermittelten Bakterienzahlen. Im Bereich zwischen 9·10<sup>4</sup> und 3·10<sup>5</sup> Bakterien/mm<sup>3</sup> ergibt sich eine gute Linearität zwischen den Elko-Werten und dem Logarithmus der Bakterienzahl (Abb. 1).

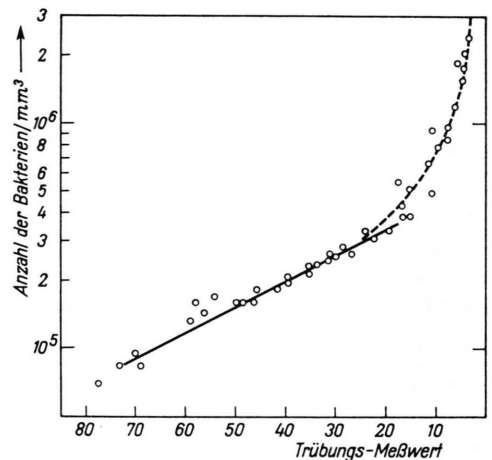


Abb. 1. Eichkurve für die Trübungsmeßwerte und die absoluten Bakterienzahlen.

Jeder Versuch wurde mit 3 Parallelen angesetzt und 3-mal wiederholt. Bei unsicheren Resultaten erfolgten mehrere Wiederholungen. Die 3 Parallelen einer Serie wichen nicht mehr als ± 1,5% voneinander ab.

Um mehrere Passagen von schwach wachsenden Kulturen zu erhalten, kultivierten wir die Bakterien in Zentrifugengläsern, in denen sie dann abzentrifugiert und mit neuer Nährlösung überschichtet wurden.

3. Versuchsbedingungen und normale Wachstumskurve: Die Standard-Versuchsbedingungen für das Bakterienwachstum waren: 20 cm<sup>3</sup> Nährlösung in 100-cm<sup>3</sup>-Erlenmeyer-Kolben, 25 °C, Dauerdunkel. Unter diesen Bedingungen ergibt sich die in Abb. 2 dargestellte Zuwachskurve, deren Verdoppelungszeit 6 1/2 Std. beträgt. Bei 35 °C verkürzt sich diese Zeit etwa auf 3 Stunden. Unter Stan-

<sup>26</sup> CHR.-V. PAPE, Diss., T.H. Hannover 1962.  
<sup>27</sup> C. B. THORNE, C. G. GOMEZ u. R. D. HOUSEWRIGHT, J. Bacteriol. **69**, 357 [1954].  
<sup>28</sup> C. B. THORNE u. D. M. MOLNAR, J. Bacteriol. **70**, 420 [1955].  
<sup>29</sup> J. R. KLEIN, J. biol. Chemistry **205**, 725 [1953].  
<sup>30</sup> J. SCHORMÜLLER u. G. WESTERS, Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch. **11**, 229 [1960].

<sup>31</sup> K. YAGI u. T. OZAWA, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **39**, 304 [1960].  
<sup>32</sup> H. K. KURAMITZU u. J. E. SNOKE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **62**, 114 [1962].  
<sup>33</sup> Zusammenfassung bei F. A. HOMES, Chem. Weekblad **54**, 645 [1958].  
<sup>34</sup> M. BROCKMANN, Angew. Chem. **72**, 939 [1960].

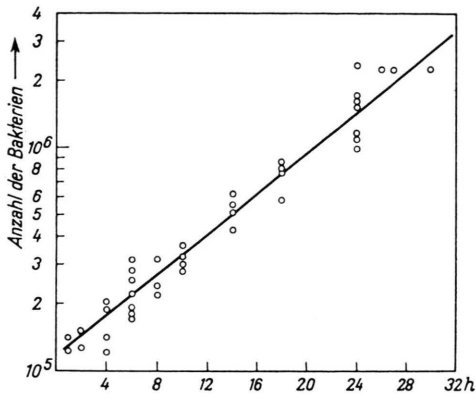


Abb. 2. Zuwachskurve einer ungehemmt wachsenden Bakterien-Suspension unter Standardbedingungen.

Standardbedingungen ist das Wachstum ungehemmter Kulturen nach 28–32 Std. beendet. Bei gehemmt wachsenden Kulturen setzt sich das Wachstum manchmal noch einige Zeit fort, so daß schließlich derselbe Endwert wie in der Kontrolle erreicht wird. Dieser liegt bei einem Elkovert von 3,2, was einer Bakterienzahl von  $3,7 \cdot 10^6$  Bakterien/mm<sup>3</sup> entspricht.

4. Virulenzprüfung: Zur Bestimmung der Virulenz infizierten wir Pflanzen von *Kalanchoë daigremontiana* mit entsprechend vorbehandelten Bakterien. Es wurden jeweils gleich große Wundstellen auf den Blättern infiziert und nach 4–6 Wochen das Trockengewicht der herangewachsenen Tumoren bestimmt und auf die Kontrollen bezogen, deren Bakterien Aminosäure-frei herangezogen worden waren<sup>14</sup>. Die Bakterien-Suspensionen wurden vor der Infektion auf gleiche Bakterienzahl gebracht. Somit sind die Tumoren direkt vergleichbar.

## Ergebnisse

### 1. Wachstumshemmung durch D-Aminosäuren

In Tab. 3 ist die Wachstumshemmung der Bakterien nach 24 und 48 Std. zusammengestellt, die durch jeweils  $10 \mu\text{Mol/cm}^3$  Zusatz von L- bzw. D-Aminosäuren zur Nährlösung erzielt wurden.

Die Werte in % der Kontrolle geben die zum Zeitpunkt der Messung bestehende Hemmung an. Ein Wert von 50% bedeutet, daß gerade eine Zellgeneration weniger gewachsen ist; 75% 2 Generationen weniger etc. Wird nach 24 Std. ein 50-proz. Wachstum gemessen, so liegt eine stärkere Wachstumsverzögerung vor, als wenn nach 48 Std. der gleiche Wert gemessen wird. Da das Wachstum in der Kontrolle und in vielen Versuchen schon vor 48 Std. eingestellt wird, setzt sich dieser Wert aus Wachstumsverzögerung und absoluter Hemmung der Bakterienkultur zusammen. Prozentwerte nach 24 und 48 Std. sind darum nicht direkt vergleichbar, beide zusammen erlauben jedoch eine Aussage über die Art der Hemmung.

Es lassen sich auf diese Weise 4 Gruppen von D-Aminosäuren in ihrer Wirkung auf *Agrobacterium* unterscheiden (Tab. 3).

	Hemmung durch			
	L-Aminosäure		D-Aminosäure	
	nach 24 Std.	nach 48 Std.	nach 24 Std.	nach 48 Std.
Isoleucin	0	0	19	0
Asparagins.	0	0	26	0
Leucin	0	0	38	30
Glutamins.	0	0	49	44
Alanin	0	0	52	42
Threonin	14	0	69	76
Histidin	0	0	77	81
Valin	0	0	78	82
Serin	34	0	78	84
Methionin	0	0	92	97
Phenylalanin	0	0	96	100
Tryptophan	24	0	98	100

Tab. 3. Hemmung des Bakterienwachstums durch D- und L-Aminosäuren, Konzentration  $10 \mu\text{Mol/cm}^3$ . Die Hemmung ist angegeben in % des jeweiligen Kontrollwachstums. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 Versuchen mit je 3 Parallelen.

A. Isoleucin und Asparaginsäure, beide verzögern das Wachstum schwach; die Kulturen haben nach 48 Std. den Kontrollwert erreicht.

B. Leucin, Glutaminsäure und Alanin, sie erzeugen ebenfalls nur eine relativ schwache Hemmung, der Kontrollwert wird aber nach 48 Std. nicht mehr erreicht, obwohl dies nach den nach 24 Std. gemessenen theoretisch noch gut möglich wäre.

C. Threonin, Histidin, Valin und Serin hemmen bereits stark. Diese schwach wachsenden Kulturen stellen ihr Wachstum außerdem bereits vor Ablauf von 24 Std. ein. Nach 24 und 48 Std. werden deshalb  $\pm$  gleiche Bakterienzahlen gemessen (vgl. Tab. 4 a, b).

D. Tryptophan, Methionin und Phenylalanin hemmen das Wachstum von *Agrobacterium tumefaciens* vollständig. Die Trübungsmessung ergibt nach 48 Std. sogar immer eine geringere Bakterienzahl als nach 24 Std., was eine Folge der Veränderung der Bakterien-Suspension ist.

Die entsprechenden L-Aminosäuren hemmen das Wachstum der Bakterien gar nicht bzw. in 3 Fällen nur unbedeutend. Nach 48 Std. wird immer der Kontrollwert erreicht. Es liegen daher nur Wachstumsverzögerungen vor.

In keinem Falle führte die Hemmung zum Absterben aller Bakterien. Auch die am stärksten ge-

hemmten Bakterien wuchsen nach Übertragung auf Nähragar (1% Glucose, 1% Witte Pepton, 1% Bacto-beef, 1,5% Agar) normal und ungestört.

### 2. Die Abhängigkeit der D-Aminosäurehemmung von einer gleichzeitigen L-Aminosäurezugabe

Durch Kombination mit den natürlichen Aminosäuren ist es möglich zu klären, ob die D-Aminosäuren als Wachstumsinhibitoren oder als Antagonisten zu den L-Aminosäuren wirken<sup>13</sup>. In den Tabn. 4 a und 4 b sind die gemessenen Bakterienzahlen und

Aminosäure	$\mu\text{Mol}/\text{ccm}$	Bakterienzahl [ $\cdot 10^5$ ] nach 24 Std.	Hemmung [%]	Bakterienzahl [ $\cdot 10^5$ ] nach 48 Std.	Hemmung [%]
L-Serin	20	12,0	20	26,0	10
D-Serin	20	2,6	83	2,8	92
D-Serin + L-Serin	20 20	2,3	85	2,5	93
D-Serin + L-Serin	20 10	2,4	84	2,5	93
D-Serin + L-Serin	10 20	3,9	74	4,1	89
D-Serin + L-Serin	10 10	4,0	73	—*	—
Kontrolle	—	15	0	37,0	0

Tab. 4 a. Hemmung des Bakterienwachstums durch D-Serin bei gleichzeitiger Gabe des wenig hemmenden L-Serins. Bakterienzahl/mm<sup>3</sup>. Hemmung in % der jeweiligen Kontrolle. \* nicht gemessen.

Aminosäure	$[\mu\text{Mol}/\text{ccm}]$	Bakterienzahl [ $\cdot 10^5$ ] nach 24 Std.	Hemmung [%]	Bakterienzahl [ $\cdot 10^5$ ] nach 48 Std.	Hemmung [%]
D-Valin	20	1,7	86	1,0	97
D-Valin + L-Valin	20 20	1,8	85	1,2	96
D-Valin + L-Valin	20 10	1,6	87	1,1	96
D-Valin + L-Valin	10 20	3,3	72,5	3,3	89
D-Valin + L-Valin	10 10	3,5	71	—	—*

Tab. 4 b. Hemmung des Bakterienwachstums durch D-Valin bei gleichzeitiger Gabe des nicht hemmenden L-Valins. Hemmung in % der jeweiligen Kontrolle. \* nicht gemessen.

die Prozentwerte für Kombinationsversuche von L- und D-Valin und L- und D-Serin enthalten. Im ersten Falle handelt es sich um eine Aminosäure, bei der die L-Form ohne Einfluß war, im zweiten um eine solche, bei der auch die L-Form schwach hemmte. In beiden Fällen hängt die Hemmung in der Kombination immer nur von der Konzentration der D-Aminosäure ab. Die gleichzeitige L-Aminosäure ist auch dann ohne Einfluß, wenn sie in höherer Konzentration zugegeben wird. Folglich wirken die beiden Isomeren nicht antagonistisch, was in Übereinstimmung mit den Befunden von TEERI<sup>13</sup> und BEARDSLEY<sup>6</sup> steht. Allerdings erhielten wir in unseren Versuchen auch keine Addition der Hemmung, wie TEERI<sup>13</sup> gefunden hat.

Die Hemmung wird auch durch die gleichzeitige Zugabe nicht isomerer L-Aminosäuren nicht beeinflusst (Tab. 5), wie es DAVIS und MAAS<sup>7</sup> bei verschiedenen Aminosäure-Kombinationen gefunden haben. Die D-Aminosäuren scheinen demnach das Wachstum der Bakterien direkt und nicht über den normalen Aminosäurestoffwechsel zu hemmen.

Aminosäure	$[\mu\text{Mol}/\text{ccm}]$	Hemmung nach 24 Std.	Bakterienzahl [ $\cdot 10^5$ ]
D-Threonin	20	86	1,92
D-Threonin + L-Serin	20 20	84	2,20
D-Threonin + L-Serin	20 10	84	2,25
D-Threonin + L-Serin	10 20	50	7,00
D-Threonin + L-Serin	10 10	56	6,20
Kontrolle	—	0	14,0

Tab. 5. Hemmung durch D-Threonin bei gleichzeitiger Gabe von L-Serin. Das L-Serin ist ohne Einfluß auf die Threonin-Hemmung. Hemmung in % der Kontrolle.

### 3. Konzentrationsabhängigkeit der D-Aminosäurehemmung

Bei verschiedenen Bakterien, die nur in Aminosäure-haltigem Nährmedium wachsen, kann eine Wachstumshemmung auch durch eine sehr hohe Konzentration einer einzigen Aminosäure bedingt sein<sup>13, 35</sup>. Das gilt aber nicht für *Agrobacterium*

<sup>35</sup> V. T. SCHUHARDT, L. J. RODE u. G. OGLESBY, J. Bacteriol. **58**, 665 [1949].

*tumefaciens* (Tab. 6). Auch bei geringen Konzentrationen von D-Aminosäuren, in diesem Falle von D-Phenylalanin, tritt immer noch eine Hemmung auf, die proportional dieser D-Aminosäure-Konzentration

D-Phenylalanin [ $\mu$ Mol/ccm]	Glycin [ $\mu$ Mol/ccm]	Hemmung nach 24 Stdn.	Hemmung nach 48 Stdn.
10	10	97	100
	2	99	100
	1	98	100
	0	97	100
2	10	65	86
	2	72	89
	1	65	88
	0	60	83
1	10	50	78
	2	60	82
	1	58	82
	0	48	74

Tab. 6. Hemmung des Wachstums durch D-Phenylalanin bei gleichzeitiger Gabe von Glycin in der Nährlösung.

ist. Entsprechende Verhältnisse für D-Leucin fanden YAW und KAKAVAS<sup>11</sup>. Bei hohen Konzentrationen wird das stark verzögerte Wachstum auch früher eingestellt.

Um auszuschließen, daß die Hemmung durch die Anwesenheit einer einzigen Aminosäure hervorgerufen wird, fügten wir in diesem Falle Glycin hinzu. Dieses hat nur eine schwache Wirkung, denn in den beiden mittleren Konzentrationen ist die Hemmung etwas verstärkt. Der Hauptteil der Hemmung ist jedoch eindeutig durch die D-Tryptophan-Konzentration bestimmt (Tab. 6).

#### 4. Die Virulenz vorbehandelter Bakterien

LIPETZ<sup>36</sup> hat neuerdings darauf aufmerksam gemacht, daß die Entwicklung der durch *Agrobacterium tumefaciens* hervorgerufenen Tumoren entscheidend von der Wachstumsfähigkeit der Bakterien abhängt. Entsprechend ist es möglich, durch sehr stark hemmende D-Aminosäuren, wie z. B. D-Tryptophan, die Tumoren zu hemmen, wenn die Aminosäure gleichzeitig oder kurz nach der Infektion in die Pflanzen injiziert wird (Tab. 7). Die Tumoren wurden um so größer, je später die Aminosäure appliziert wurde. Hierbei handelt es sich nicht um Virulenzverlust, sondern um den direkten Ein-

Behandlung mit D-Tryptophan Stunden nach Injektion	Frischgewicht der Tumoren [g]	Trockengewicht der Tumoren [g]	Trockengewicht in % der Kontrolle
24	2,37	0,19	43,2
48	3,17	0,25	56,8
72	4,07	0,31	70,4
120	4,44	0,34	77,2
Kontrolle	4,94	0,44	100,0

Tab. 7. Wachstum von Tumoren an *Kalanchoe daigremontiana* bei Injektion von D-Tryptophan in die Blattspreite verschiedener Zeit nach der Infektion.

fluß auf die Bakterienvermehrung in der Wirtspflanze. Die kontinuierliche Abnahme der Hemmung bei späteren Aminosäuregaben unterscheidet sich charakteristisch von der durch Fluordesoxyuridin erzeugten Hemmung des Tumorenwachstums<sup>37</sup>.

Grundsätzlich ist von dieser Wirkung zu unterscheiden der nach mehreren Passagen eintretende Virulenzverlust. Wir wählten verhältnismäßig schwach hemmende D-Aminosäuren, so daß eine große Anzahl von Passagen hergestellt werden konnte. In den stark hemmenden D-Aminosäuren war hingegen schon nach wenigen Passagen überhaupt kein Wachstum der Bakterien mehr zu messen. Es kann demnach keine Selektion resistenter Bakterien vorliegen<sup>6</sup>.

Bei den 3 Aminosäuren, D-Glutaminsäure, D-Leucin und D-Alanin, hat nach 28 Passagen die Bakterienvirulenz stark abgenommen, bei D-Glutaminsäure und D-Leucin kam es zum völligen Virulenzverlust (Tab. 8). Auch nach anschließend 2·48-stdg.

Nach 28 Passagen in Aminosäuren	Tumoren		
	Frischgewicht [g]	Trockengewicht [g]	Trockengewicht in % der Kontrolle
D-Leucin	0	0	0
D-Alanin	0,306	0,022	11
D-Glutamins.	0	0	0
Kontrolle	3,170	0,207	100

Tab. 8. Größe der nach Infektion mit vorbehandelten Bakterien entstandenen Tumoren.

Wachstum in Aminosäure-freier Nährlösung blieb der Virulenzverlust erhalten, so daß bei einer Infektion der Pflanzen mit diesen Bakterien die Tu-

<sup>36</sup> J. LIPETZ, persönliche Mitteilungen.

<sup>37</sup> M. BOPP, Nature [London] **207**, 83 [1965].



moren deutlich gehemmt waren. Aber auch durch L-Aminosäuren allein läßt sich ein — wenn auch wesentlich schwächerer und vorübergehender — Virulenzverlust herstellen. Nach 11 Passagen war dieser Verlust bei L-Alanin 33% und bei L-Leucin 35%. Nach weiteren 11 Passagen wird aber die volle Virulenz wieder erreicht. L-Glutaminsäure bewirkt im Vergleich mit der Kontrolle überhaupt keine Veränderung.

Man kann also einen dauernden Virulenzverlust nur durch D-Aminosäure erzielen, so daß die Wirkung der Razemate<sup>1-3</sup> wesentlich auf der Wirksamkeit der D-Aminosäure beruhen dürfte.

### Diskussion

Die Anzahl der Bakterien, bei denen eine Hemmung durch D-Aminosäuren gefunden wurde, ist recht beträchtlich. Neben dem von uns untersuchten *Agrobacterium tumefaciens*<sup>6</sup> sind dies u. a. *Alcaligenes faecalis*<sup>16, 17, 19</sup>, *Escherichia coli*<sup>10</sup>, mehrere *Lactobacillus*-Arten<sup>12, 13</sup>, *Staphylococcus aureus*<sup>4, 5</sup>, *Rhodospirillum rubrum*<sup>14, 15</sup>, *Brucella abortus*<sup>11</sup>, *Myobacterium tuberculosis*<sup>9</sup>, *Rhizobium spec.* und *Pseudomonas syringae*<sup>38</sup>. Dabei erwiesen sich D-Tryptophan<sup>38</sup> sowie D-Methionin<sup>6</sup> und D-Phenylalanin<sup>11</sup> stets am wirksamsten.

Man hat zunächst den Eindruck, daß die verschiedenen Aminosäuren nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ verschieden wirken müssen, da bei den stark hemmenden Aminosäuren das Wachstum der Bakterien frühzeitig eingestellt wird, und es zu nachträglichen Veränderungen der Bakterien-Suspensionen kommt (Zunahme der Meßwerte). Diesem Unterschied liegt aber vermutlich der gleiche Mechanismus zugrunde, da eine stark hemmende Aminosäure wie D-Phenylalanin in geringen Konzentrationen einen gleichen Wachstumsverlauf verursacht wie eine schwach wirkende Säure in höheren Konzentrationen.

Die Hemmung durch die Aminosäuren beruht sicher nicht auf einer kompetitiven Blockierung des Einbaues von L-Aminosäuren, denn es ist niemals möglich, durch gleichzeitige Zugabe von L-Aminosäuren die Hemmung<sup>3, 13</sup> oder Toxizität<sup>6</sup> der D-Aminosäuren aufzuheben. Der Mechanismus ist jedoch noch nicht klar. BEARDSLEY<sup>6</sup> nimmt auf Grund

seiner Ergebnisse an, daß die D-Aminosäuren genau wie das Glycin<sup>5</sup> toxisch wirken, und dadurch eine Selektion resistenter und gleichzeitig avirulenter Formen hervorrufen. Für die stark hemmenden Aminosäuren wäre dies mit unseren Resultaten durchaus vereinbar. Allerdings konnten wir keine Selektion von in D-Aminosäuren ungehemmt wachsenden Bakterien beobachten. Für schwach hemmende Aminosäuren jedoch ist ein solcher toxischer Effekt verbunden mit Selektion resistenter Mutanten auf Grund des Wachstumsverlaufes unwahrscheinlich. Da aber für stark und schwach hemmende D-Aminosäuren der gleiche Mechanismus angenommen werden kann, handelt es sich vielleicht eher um einen Einfluß auf die Zellwandbildung<sup>6, 16</sup>, der dann zu aberranten<sup>15</sup> und schlecht wachsenden Bakterien führt<sup>18</sup>.

In den Untersuchungen von LANEN und Mitarbb.<sup>3</sup> wird ein enger Zusammenhang zwischen Wachstumshemmung und Virulenzverlust aufgezeigt. Nach unseren Befunden können auch die schwach hemmenden D-Aminosäuren Virulenzverlust und die nicht hemmenden L-Aminosäuren zeitweilige Virulenzschwächung hervorrufen. Die Stärke der Virulenzverminderung ist dabei nicht mit dem Ausmaß der Wachstumshemmung korreliert. Genau wie der Wachstumsverlauf spricht auch diese nur lose Korrelation zwischen Wachstumshemmung und Virulenzverlust dafür, daß es sich nicht um die Selektion resistenter und gleichzeitig nicht virulenter Stämme handelt, sondern eine direkte Induktion des Virulenzverlustes vorliegt<sup>16, 19</sup>.

Ergänzt werden diese Resultate dadurch, daß eine Veränderung des Substrats den Virulenzverlust (und die Wachstumshemmung) verstärkt (Tab. 2). Früher von uns mitgeteilte Resultate<sup>4</sup> sind darauf zurückzuführen. Diese Abhängigkeit der Aminosäurewirkung von zusätzlichen Faktoren steht in Einklang mit Befunden anderer Autoren<sup>3</sup>, wobei aber dem  $p_H$ -Wert der Nährlösung<sup>2</sup> wahrscheinlich eine geringere Bedeutung als der Zusammensetzung der Nährsalze zukommt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Wachstumshemmung durch D-Aminosäuren und der Virulenzverlust wohl kaum direkt zusammenhängen. Der Virulenzverlust wird wahrscheinlich induziert und

<sup>38</sup> M. BOPP, unveröffentlicht.

<sup>39</sup> J. LIPETZ, Cancer Research, im Druck.

nicht infolge schlechten Wachstums selektioniert. Eine Aussage über das Tumor-induzierende Prinzip, dessen Charakter noch immer sehr hypothetisch ist<sup>39</sup>, kann daraus noch nicht abgeleitet werden.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Frau H. SCHMIDT danke ich für die Hilfe bei den Versuchen, Frau Dr. ZEDLER für wesentliche Unterstützung bei der Durchsicht der Literatur.

## Die Verteilung des Orthophosphates auf Plastiden, Cytoplasma und Vacuole in der Blattzelle und ihre Veränderung im Licht-Dunkel-Wechsel

W. ULLRICH, W. URBACH, K. A. SANTARIUS und U. HEBER

Botanisches Institut der Universität Würzburg, Arbeitsgruppe Landwirtschaft der Kernforschungsanlage Jülich und Institut für landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

(Z. Naturforschg. **20 b**, 905—910 [1965]; eingegangen am 16. März 1965)

The distribution of orthophosphate between chloroplasts and the nonchloroplast parts of leaf cells has been investigated. Upon illumination, the percentage of the total orthophosphate located in the chloroplasts decreases rapidly, while darkening results in a slow increase of that percentage to the original dark value. If, in the dark, comparable concentrations of orthophosphate in the chloroplasts and in the cytoplasm are assumed, the concentration of orthophosphate in the vacuole can be calculated from the available data. Values are then obtained, which are considerably lower than the corresponding values in the protoplasm; this indicates that a concentration gradient for orthophosphate is maintained between the cytoplasm and the vacuole.

Leaves of spinach and *Elodea*, which were fed <sup>32</sup>P for 2 to 4 hours and then left to stand for two or three days, showed higher specific activities of orthophosphate in the chloroplasts than in the nonchloroplast parts of the cells. Since there is reason to assume a fairly rapid exchange of orthophosphate between chloroplasts and cytoplasm, the differences in the specific activities which were observed several days after feeding with <sup>32</sup>P, point to a very slow exchange of orthophosphate across the tonoplast membrane.

Wegen der engen Beziehungen zwischen dem Phosphatstoffwechsel und der Photosynthese ist die Frage der Verteilung und der Verfügbarkeit des Orthophosphates innerhalb der Zelle in vivo von großem Interesse<sup>1, 2</sup>. Bisher wurde der Phosphat Spiegel in der Regel nur an ganzen Zellen untersucht. KANDLER<sup>3, 4</sup> sowie KANDLER und HABERER-LIESENKÖTTER<sup>5</sup> fanden, daß der Orthophosphatgehalt in *Chlorella* bei Belichtung stark absank, um nach

darauffolgender Verdunklung rasch wieder das alte Niveau zu erreichen.

Über die Verteilung des Orthophosphates innerhalb der Zelle liegen nur relativ wenige und meist indirekte Angaben vor, so bei der Hefezelle (Literatur bei LYNEN<sup>6</sup>). BIELESKI und LATIES<sup>7</sup> berechneten bei ihren Versuchen an Kartoffelgewebe auf Grund der niedrigen spezifischen Aktivität des Orthophosphates und der viel höheren in den aus Orthophos-

<sup>1</sup> W. SIMONIS u. W. URBACH, in: Studies on microalgae and photosynthetic bacteria, p. 597, Tokyo 1963.

<sup>2</sup> W. SIMONIS, Vortrag vor der Dtsch. bot. Ges. München 1964, Ber. dtsch. bot. Ges. **77**, 5 [1964].

<sup>3</sup> O. KANDLER, Z. Naturforschg. **5 b**, 423 [1950].

<sup>4</sup> O. KANDLER, Z. Naturforschg. **12 b**, 271 [1957].

<sup>5</sup> O. KANDLER u. I. HABERER-LIESENKÖTTER, Z. Naturforschg. **18 b**, 718 [1963].

<sup>6</sup> F. LYNEN, in: B. WRIGHT, Control mechanisms in respiration and fermentation, p. 289, New York 1963.

<sup>7</sup> R. L. BIELESKI u. G. G. LATIES, Plant Physiol. **38**, 586 [1963].