

Aus dem bakteriologischen Laboratorium der Arzneimittelfabrik
W. Spitzner GmbH, Ettlingen/Baden

Untersuchungen an *Myxococcus xanthus* I. Bildungsbedingungen, Isolierung und Eigenschaften eines bakteriolytischen Enzymsystems

Von
HANS BENDER

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. April 1962)

Seit den Untersuchungen von PINOY (1913, 1921) haben zahlreiche Autoren über die bakteriolytischen Fähigkeiten der Myxobakterien berichtet (Literaturzusammenstellung bei NORÉN 1953 a u. 1960 a). Während die Lyse erhitzter, Gram-negativer Bakterien (SALTON u. HORNE 1951) zu einem großen Teil durch proteolytische Exoenzyme katalysiert wird (OXFORD 1947; SINGH 1947; NORÉN 1953 a, 1955 a, 1960 a u. 1960 b), ist der Vorgang der Lyse lebender Zellen noch unklar. Wiederholt wurde gezeigt, daß Myxobakterien intakte Eubakterien nur in direktem Kontakt aufzulösen vermögen (IMSCHENETZKI u. KUSJURINA 1951; OETKER 1953; NORÉN 1960 b), wobei Gram-negative besser verwertbar sein sollen als Gram-positive (BEEBE 1941 a; SINGH 1947; OETKER 1953). Einige Autoren nehmen an, daß ein vor allem gegen Gram-positive Keime wirksames antibiotisches Prinzip die Zellen abtötet (OXFORD u. SINGH 1946; OXFORD 1947; IMSCHENETZKI u. KUSJURINA 1951; NORÉN 1953 b) und sie dadurch der Wirkung der Proteasen zugänglich macht.

Zellwandlytische Enzyme haben in den letzten Jahren viel zur Strukturaufklärung bakterieller Zellwände beigetragen, wobei vor allem die spezifische Spaltung durch Lysozym bzw. eine aus Streptomyceten isolierte „Actinolysopeptidase“ (F_1) eingehender untersucht wurde (SALTON 1956 a; GHUYSEN 1957; SALTON u. GHUYSEN 1957; WELSCH 1957 u. 1958; SALTON u. GHUYSEN 1960; SALTON u. PAVLIK 1960).

Auch in Hinsicht auf eventuelle Beiträge zur Strukturanalyse bakterieller Zellwände schien es gerechtfertigt, die Untersuchungen der bakteriolytischen Fähigkeiten von Myxobakterien erneut aufzugreifen und nach Möglichkeit die Existenz eines spezifischen Enzyms in zellfreiem Zustand exakt nachzuweisen. In dieser ersten Arbeit soll über die Isolierung, die Bildungsbedingungen und einige Eigenschaften des bakteriolytischen Systems berichtet werden.

I. Methodik

a) *Mikrobiologische Methoden.* Von den Stammkulturen auf einem Bakterienagar¹ wurden die Myxobakterien zur Anzucht einer maximalen Menge Impfmaterials auf einen peptonhaltigen Nähragar² überimpft, der reichliches vegetatives Wachstum gewährleistet (FRICK 1950). Für die Hauptkulturen verwendeten wir eine dem Medium für Stammkulturen entsprechende oder die von NORÉN (1955b) als IIIB- angegebene Nährlösung mit geringen Abänderungen³, als Kulturgefäße 1 l-Erlenmeyer- und große Fernbach-Kolben (100 ml bzw. 250 ml Lösung je Kolben). Je 100 ml Nährlösung wurde mit der 3–4 mg Trockenzellen entsprechenden Menge einer 4 Tage alten, bei 30° C bebrüteten Vorkultur beimpft. Die Bebrütung erstreckte sich bei 22° C je nach Wachstum und Enzymaktivität über 8–12 Tage, sie wurde bei bestimmten Fragestellungen auf 25 Tage ausgedehnt. Die als Substrat für das Myxokokkensystem verwendeten Eubakterien wurden auf einem zuckerfreien⁴ oder glucosehaltigen Fleischwasser-Pepton-Agar⁵ 16–18 Std bei 30° C kultiviert. Zur Anzucht größerer Mengen von *E. coli* diente ferner eine anorganische Nährlösung mit Maltose als Kohlenstoffquelle (WALLENFELS et al. 1959)⁶. Die Zellen wurden zweimal in dest. Wasser gewaschen und nach dem letzten Abzentrifugieren in Wasser resuspendiert.

Die Hitzedenaturierung der Bakterien erfolgte entweder durch Eingießen einer dichten Suspension in kochendes Wasser (SALTON u. HORNE 1951) oder durch 15minütiges Erhitzen auf 70° C (BECKER u. HARTSELL 1954). Für den Standardtest wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit Aceton über P₂O₅ im Vacuum getrocknet. 6 mg/ml dieses Trockenpulvers ergaben bei einer Verdünnung 1:50 die optische Ausgangsdichte 0,800. Die Suspension wurde für jeden Test neu hergestellt.

Folgende Bakterienstämme wurden auf ihre Empfindlichkeit gegen das Myxokokkensystem getestet: 1. *E. coli* ATCC 9637; 2. *E. coli* Laborstamm; 3. *Aerobacter* sp. Laborstamm; 4. *Prot. vulgaris* Laborstamm; 5. *Ps. aeruginosa* Laborstamm; 6. *B. subtilis* Laborstamm; 7. *B. mycoides* Laborstamm; 8. *M. lysodeiolicus* NCTC 2665; 9. *St. aureus* Laborstamm; 10. *Sarcina* sp. Laborstamm.

b) *Enzymgewinnung.* Zur Gewinnung des enzymhaltigen Kulturfiltrats wurden die Myxobakterienzellen abfiltriert, das Filtrat durch Zentrifugieren bei 5000 U/min geklärt und die Enzymaktivität entweder direkt in diesem oder einer auf folgende Weise erhaltenen Lösung getestet: Zu 100 ml des klaren Kulturfiltrats wurden bei 0° C unter Rühren 180 ml Aceton getropft. Nach 24 Std wurde der Niederschlag

¹ 1 g K₂HPO₄; 0,5 g KCl; 0,5 g MgSO₄ · 7 H₂O; 10 mg FeSO₄ · 7 H₂O; 20 ml Weizenkeimdekot (NOLTE 1958) [20 g Weizenkeime (Dr. Ritter u. Co., Köln) werden in dest. Wasser (100 ml) aufgekocht. Das Unlösliche wird nach dem Abkühlen abzentrifugiert]; erhitzte Trockenzellen (*E. coli*) 0,3 g bis 2,0 g; ad 1000 ml Aq. dest.; zur Verfestigung 2% Agar; pH-Wert 7,2.

² 5 g Witte-Pepton; 1 g K₂HPO₄; 0,5 g KCl; 0,5 g MgSO₄ · 7 H₂O; 10 mg FeSO₄ · 7 H₂O; 20 g Agar; 1000 ml Aq. dest.; pH-Wert 7,2.

³ 2,5 g Caseinhydrolysat (Casamin E, Mann Res. Lab.); 2,5 g Asparagin (Merck); 2 g K₂HPO₄; 1 g NaCl; 0,1 g MgSO₄ · 7 H₂O; 10 mg CaCl₂; 3 mg FeSO₄ · 7 H₂O; 1000 ml Aq. dest.; pH-Wert 7,2. Für spezielle Ansätze werden 0,03–0,2% erhitzte Trockenzellen zugesetzt.

⁴ 10 g Liebigs Fleischextrakt; 10 g Witte-Pepton; 2 g NaCl; 2 g K₂HPO₄; 20 g Agar; 1000 ml Aq. dest.; pH-Wert 7,2 bzw. 6,2.

⁵ 3 g Liebigs Fleischextrakt; 3 g Witte-Pepton; 0,7 g NaCl; 0,7 g K₂HPO₄; 6 g Glucose; 20 g Agar; 1000 ml Aq. dest.; pH-Wert 7,2 bzw. 6,2.

⁶ 13,6 g KH₂PO₄; 4 g (NH₄)₂SO₄; 0,2 g MgSO₄ · 7 H₂O; 0,5 mg FeSO₄ · 7 H₂O; 8 g Maltose; 1000 ml Aq. dest.; pH-Wert 7,0 (eingestellt mit 30%iger KOH).

bei 5000 U/min abzentrifugiert und mit 1,66 ml (60. Teil des Kulturfiltrats) m/40 Phosphatpuffer p_H 7,8 24 Std lang extrahiert. Der unlösliche Rückstand zeigte nach dem Abzentrifugieren des enzymhaltigen Überstandes bei einer weiteren Extraktion keine nennenswerte Aktivität mehr. Die klare Enzymlösung ist im Kühlschrank ohne wesentlichen Aktivitätsverlust längere Zeit haltbar. Für bestimmte Untersuchungen wurde sie bei 0° C 48 Std gegen m/60 Phosphatpuffer p_H 7,8 dialysiert.

Die intracelluläre Enzymaktivität untersuchten wir an einem bei -5° C hergestellten Acetontrockenpulver der Myxobakterien, das wir 24 Std mit m/40 Phosphatpuffer p_H 7,8 bei 0° C extrahierten.

c) *Enzymtest und Aktivitätsbestimmung.* Die enzymatische Aktivität des Kulturfiltrats bzw. der daraus erhaltenen Enzymlösung wurde sowohl an intakten, lebenden Bakterien als auch an hitzedenaturierten oder mit organischen Lösungsmitteln behandelten Zellen gemessen: 1 ml des Kulturfiltrats bzw. 0,1 ml der Enzymlösung wurden mit 4,0 ml bzw. 4,9 ml einer Bakteriensuspension in m/40 Trispuffer [Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Merck] p_H 8,0 oder 8,5 in einem Wasserbad bei 40° C inkubiert und der Verlauf der Trübungsabnahme bei 530 m μ im Durchlicht zeitlich verfolgt. Die prozentuale Abnahme — relativ zur Ausgangsdichte — errechnet sich nach

$$\frac{\text{Opt. Dichte } t_0 - \text{Opt. Dichte } t_t}{\text{Opt. Dichte } t_0} \cdot 100 .$$

Der Initialwert der optischen Dichte betrug in allen Fällen 0,800, die Ungenauigkeit der Durchlichtmessung bei dieser relativ starken Trübung wurde bei der Verwendung des noch unreinen Enzympräparates und der Länge der Inkubation zunächst vernachlässigt. Alle Meßwerte sind für die Trübungsänderung der Kontrolle während der Inkubation korrigiert.

Bei der Bestimmung der Enzymaktivität muß berücksichtigt werden, daß das zellfreie System mindestens zwei Enzyme, ein proteolytisches und ein zellwandlytisches, enthält. Es wurde deshalb darauf verzichtet, vor der Reinigung und Charakterisierung der Einzelenzyme Aktivitätseinheiten festzulegen.

Als Maß für die proteolytische Aktivität gilt die prozentuale Trübungsabnahme einer Suspension erhitzter *E. coli* nach 10 min bei 40° C. Nur solche Ansätze kamen zur weiteren Aufarbeitung, bei denen nach dieser Inkubationszeit die Abnahme der Trübung mindestens 50% betrug. Vergleichsweise wurde die Geschwindigkeit der Caseinolyse (Casein Hammerstein, Mann Res. Lab.) bestimmt (KUNITZ 1947; GHUYSEN 1957).

Als Maß für die zellwandspezifische Aktivität gilt die prozentuale Trübungsabnahme einer Suspension lebender, mit Alcianblau (McKINNEY 1953) gefärbter Zellen von *B. subtilis* in 30 min bei 40° C. [Zur Anfärbung wurden 5 ml der Bakterienstammuspension mit 1 ml einer 0,1%igen Farbstofflösung (1 Teil 1%ige Stammlösung in Äthanol, 9 Teile dest. Wasser) versetzt. Nach 40minütigem Stehen wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal mit Aq.dest. gewaschen.]

Eine gleichzeitige Bestimmung der proteolytischen und der zellwandlytischen Aktivität führten wir zusätzlich an lebenden Bakterien in einem System durch, welches außer den bei c) angegebenen Standardbedingungen noch 5% (v/v) n-Butanol enthielt (NOLLER u. HARTSELL 1960 u. 1961 a).

Bei speziellen Testen wurden neben anderen Enzymkonzentrationen andere Puffer¹, p_H -Werte und Inkubationstemperaturen verwendet. Als Zusätze zum

¹ Citratpuffer (LILLIE 1948), Phosphatpuffer (SØRENSEN 1909), Carbonat-Bicarbonatpuffer (DELOXY u. KING 1945), Veronalpuffer (MICHAELIS 1930), Puffer der Ionenstärke $\mu = 0,1$ (MILLER u. GOLDER 1950).

Standardtest verwenden wir in einigen Fällen Zephirol (Bayer), EDTA (Äthylendiaminotetraessigsäure, Idranal III, Riedel-de Haen) oder Tween 80. Die Lyse der Testorganismen unter verschiedenen Versuchsbedingungen wurde jeweils mit der durch Lysozym (Serva, Heidelberg, 3× krist.) oder Trypsin (Mann Res. Lab. 2× krist.) bzw. durch beide katalysierten verglichen. Alle Durchlichtmessungen wurden mit einem Kompensations-Photometer der Firma Leitz durchgeführt.

d) *Nachweis von Spaltprodukten.* Zur Anreicherung der Zellwandfraktion wurden intakte Zellen mit n-NaOH (1 Std bei 60° C, KANDLER et al. 1958) bzw. 5%iger Trichloressigsäure (5 min bei 100° C, HANCOCK u. PARK 1958) extrahiert und anschließend einer tryptischen Verdauung unterworfen. Der Test auf freie N-Acetylaminozucker erfolgte nach maximaler Lyse durch das Myxokokkenenzym mit einer modifizierten Morgan-Elson-Reaktion (AMINOFF et al. 1952) sowie nach eindimensionaler Papierchromatographie auf Schl. u. Sch. 2043b (Lösungsmittel n-Butanol-Eisessig-Wasser 3:1:1 v/v, Laufzeit 30 Std) mit der Methode von SALTON (1959). Als Lösungsmittel für die eindimensionale Papierchromatographie der Aminosäuren diente neben dem angegebenen noch das System n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1 v/v). Die Flecken wurden mit 0,2%igem Ninhydrin in 95% Butanol + 5% 2n Essigsäure (CRAMER 1954) entwickelt.

II. Charakterisierung der Myxobakterien

Für die Untersuchung der bakteriolytischen Aktivität standen uns drei Stämme von Myxobakterien zur Verfügung. Ein Stamm war aus

Tabelle 1. *Bakteriolytische Aktivität des Kulturfiltrats dreier Myxokokkenstämme (IIIB-Medium, 8 Tage bei 22° C. Zum Test 1 ml Kulturfiltrat, 4 ml der Bakterien-suspension in m/40 Trispuffer pH 8,0)*

Stamm	% rel. Trübungsabnahme		mg Trockenzellen/ 100 ml Kulturfiltrat
	erhitzte <i>E. coli</i> (10 min 40° C)	Alcianblau gef. <i>B. subt.</i> (30 min 40° C)	
<i>M. xanthus</i> (Komposterde)	55,3	47,0	12,6
<i>M. xanthus</i> (Wild- kaninchenmist)	55,0	49,2	12,0
<i>M. rubescens</i>	38,3	30,4	9,2

Komposterde, ein zweiter aus Wildkaninchenmist isoliert worden. Beide erwiesen sich bei der Bestimmung in morphologischer Hinsicht und auf Grund des gebildeten orangen Farbstoffes als identisch mit der von BEEBE (1941 b) zuerst beschriebenen Art *Myxococcus xanthus*, die nach KÜHLWEIN (1960) in die *M. virescens*-Gruppe einzugliedern ist. Das dritte untersuchte Myxobakterium — *M. rubescens* — stammte aus der Sammlung des Bot. Instituts der Techn. Hochschule Karlsruhe¹.

Alle drei Stämme lysieren die erhitzten Bakterien des Stammediums gut und bilden reichlich Fruchtkörper. In den Flüssigkeitskulturen wachsen sie filmartig am Boden der Kulturgefäße (OXFORD 1947), die Fruchtkörperbildung bleibt minimal. Während sich die Enzymaktivitäten

¹ Herrn Prof. Dr. H. KÜHLWEIN danke ich für die Überlassung des Stammes.

der zellfreien Kulturfiltrate beider *M. xanthus*-Stämme kaum unterscheiden, synthetisiert *M. rubescens* bei nur mäßigem Wachstum unter gleichen Bedingungen wesentlich weniger Enzym (Tab.1). Die mitgeteilten Ergebnisse beziehen sich zum großen Teil auf den aus Kompost-erde isolierten *M. xanthus*.

III. Abhängigkeit der Enzymbildung von den Kulturbedingungen

Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität des Kulturfiltrats vom Alter der Kultur — gemessen an der Lyse erhitzter *E. coli* — wird aus Abb. 1 ersichtlich: Nach einer lag-Phase von 2 Tagen im Bakterien- bzw.

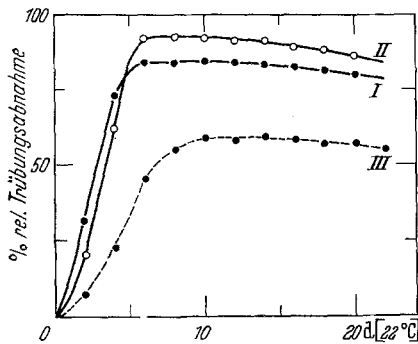


Abb. 1

Abb. 1. Lyse erhitzter Zellen von *E. coli* durch das Kulturfiltrat von *M. xanthus*. Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität vom Alter der Kultur (zum Test 1 ml Kulturfiltrat, 4 ml einer Zellsuspension in m/40 Trispuffer pH 8,0 [opt. Dichte t_0 0,800], 30 min bei 40° C).

I IIIB-Medium

II IIIB-Medium mit einem Zusatz von 0,02% Trockenzellen

III Bakterienmedium

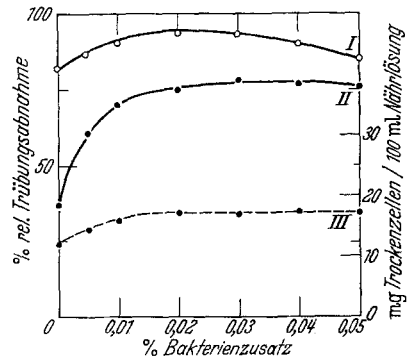


Abb. 2

Abb. 2. Abhängigkeit des Wachstums und der enzymatischen Aktivität des Kulturfiltrats von der Bakterienkonzentration in der IIIB-Lösung, 8 Tage bei 22° C (zum Test 1 ml Kulturfiltrat, 4 ml einer Zellsuspension in m/40 Trispuffer pH 8,0 [opt. Dichte t_0 0,800], 30 min bei 40° C).

I Lyse erhitzter Zellen von *E. coli*

II Lyse Alcianblau-gefärbter Zellen von *B. subtilis*

III Trockenzellen/100 ml Kulturlösung

1 Tag im IIIB-Medium beginnt gleichzeitig mit dem Wachstum die Synthese des Exoenzyms. Entsprechend der logarithmischen Wachstumskurve nimmt die Enzymaktivität zu und erreicht nach 10 bzw. 6 Tagen das Maximum. Bei etwas geringerem Wachstum wird in dem Norénschen Medium 2—3mal soviel Enzym gebildet wie in der bakterienhaltigen Salzlösung. Das System ist in der Kulturlösung relativ stabil: Bei verlängerter Bebrütung bleibt die Enzymaktivität zunächst konstant und sinkt dann nur langsam ab. In beiden Nährlösungen ist das Wachstum der Myxokokken von keinen größeren pH-Änderungen begleitet.

Obgleich die Bildung des Enzyms von der Anwesenheit eines hochmolekularen Substrates unabhängig ist, läßt sich das Wachstum und

zugleich die Enzymausbeute in einem bakterienhaltigen IIIB-Medium verbessern: Bei einem Zusatz von 0,02% erhitzter Trockenbakterien liegt die maximale Enzymkonzentration der größeren Zellmasse entsprechend 25–30% höher als in der Kulturlösung ohne Bakterien (Abb. 1). Ein Bakteriengehalt über 0,03% steigert jedoch das Wachstum nicht mehr und verringert die enzymatische Aktivität (Abb. 2).

Offensichtlich wird bei der Hitzedenaturierung von *E. coli* eine Substanz freigesetzt oder gebildet, welche die Enzymsynthese in starkem Maße hemmt (Tab. 2). Bei normalem Wachstum bildet *M. xanthus* in einer Nährlösung mit der gesamten erhitzten Suspension oder dem Überstand der Zellen zusammen mit Aceton-getrockneten Bakterien nur etwa $\frac{1}{3}$ der unter Standardbedingungen gefundenen Enzymmenge. Bei der Acetonbehandlung der hitzedenaturierten Zellen scheint der größte Teil des hemmenden Faktors verlorenzugehen, so daß seine Wirkung erst bei höheren Konzentrationen in Erscheinung tritt.

Tabelle 2. Abhängigkeit der Enzymbildung von der Behandlung des Bakterienzusatzes (Salzmedium, 12 Tage bei 22° C. Zum Test 3 ml Kulturfiltrat, 2 ml der Bakterien-suspension in m/40 Trispuffer pH 8,0)

Kohlen- und Stickstoffquelle	% rel. Trübungs- abnahme erhitzter <i>E. coli</i> (30 min 40°C)	mg Trockenzellen/ 100 ml Kulturfiltrat
Erhitzte, Aceton-getrocknete <i>E. coli</i> (0,03%)	80,0	16,2
Gesamte, erhitzte <i>E. coli</i> -Suspension ($T = 0,03\%$)	51,0	18,0
Erhitzte <i>E. coli</i> , zweimal gewaschen ($T = 0,03\%$)	65,4	16,0
Überstand der erhitzten Suspension, erhitzte, Aceton-getrocknete <i>E. coli</i> (0,03%)	48,5	17,4

Das zellfreie Kulturfiltrat bewirkt auch bei hoher proteolytischer Aktivität keine exakt meßbare Trübungsabnahme einer Suspension lebender, intakter Gram-negativer oder -positiver Keime.

Die Anwesenheit eines zellwandspezifischen Systems läßt sich nach genügend langer Inkubation der erhitzten Zellen mit dem Kulturfiltrat mikroskopisch feststellen. Diese mikroskopische Kontrolle des Lysevorgangs ist jedoch als Aktivitätstest unzulänglich.

Wie die Versuche einer eventuellen Sensibilisierung Gram-positiver Bakterien durch verschiedene Vorbehandlungen ergaben, werden die mit dem Polysaccharid-spezifischen Farbstoff Alcianblau (McKINNEY 1953; GRULA u. HARTSELL 1954 u. 1957) angefärbten Zellen von *B. subtilis* in Trispuffer durch das Kulturfiltrat lysiert. Da sie weitgehend trypsin-resistent sind und auch von dem proteolytischen Teil des Myxokokkensystems praktisch nicht angegriffen werden, war die Möglichkeit für eine spezifische Bestimmung der zellwandlytischen Aktivität gegeben.

Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität des Kulturfiltrats vom Alter der Kultur, gemessen an der Lyse der mit Alcianblau angefärbten Zellen von *B. subtilis*, wird in Abb.3 ersichtlich: Nach einer lag-Phase von 2—3 Tagen beginnt in den untersuchten Medien die Synthese des zellwandspezifischen Enzyms. Eine dem exponentiellen Wachstum entsprechende Aktivitätszunahme erfolgt in der IIIB-Lösung nur in Gegenwart des Substrates (erhitzte, Aceton-getrocknete *E. coli*). In der bakterienfreien Nährlösung bzw. in dem für die Bildung ungünstigeren bakterienhaltigen Salzmedium nimmt der extracelluläre Enzymgehalt nur langsam zu und erreicht nach 10 bzw. 11 Tagen die maximale Konzentration. Diese liegt jedoch 50% bzw. 83% unter der im bakterienhaltigen

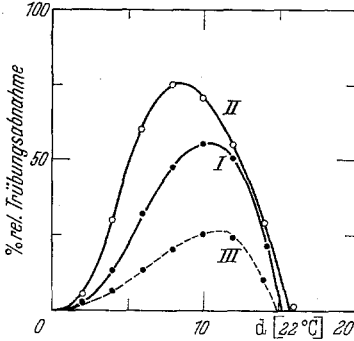


Abb. 3

Abb.3. Lyse Alcianblau-gefärbter Zellen von *B. subtilis* durch das Kulturfiltrat von *M. xanthus*. Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität vom Alter der Kultur (zum Test 1 ml Kulturfiltrat, 4 ml einer Zellsuspension in m/40 Trispuffer pH 8,0 [opt. Dichte t_0 0,800], 30 min bei 40° C).

- I IIIB-Medium
 II IIIB-Medium mit einem Zusatz von 0,02% Trockenzellen
 III Bakterienmedium

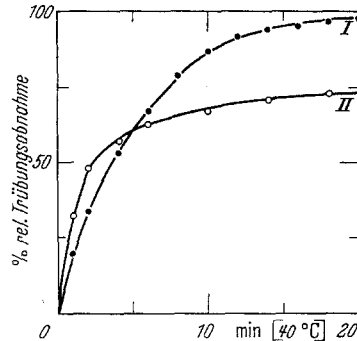


Abb. 4

Abb.4. Verlauf der Lyse erhitzter Zellen von *E. coli* durch das *M. xanthus*-System bzw. Trypsin (0,1 ml Enzymlösung [0,1 mg Trypsin], 4,9 ml einer Zellsuspension in m/40 Trispuffer pH 8,5 bzw. 7,6 [opt. Dichte t_0 0,800]).

- I *M. xanthus*-Enzym
 II Trypsin

IIIB-Medium gefundenen. Das Maximum der Stimulierung ist bei einem Zusatz von 0,03% erhitzter Trockenzellen erreicht; entsprechend der proteolytischen sinkt auch die zellwandlytische Aktivität bei höherem Bakteriengehalt wieder ab (Abb.2). Das zellwandspezifische System ist in der Kulturlösung nicht stabil: Bei längerer Bebrütungsdauer nimmt die Aktivität schnell ab, nach 14—16 tägiger Kultivierung katalysiert das Kulturfiltrat selbst bei zweistündiger Inkubation nur noch eine geringfügige Trübungsabnahme der Suspension angefärbter Zellen; die Zellwände bleiben intakt.

Der Verlauf der Aktivitätskurve während der logarithmischen Wachstumsphase spricht für den extracellulären Charakter des Systems. In der

Tat hat der Pufferextrakt Aceton-getrockneter Myxokokkenzellen keine nennenswerte proteolytische oder zellwandlytische Wirkung.

IV. Charakterisierung des Enzymsystems

Die für weitere Untersuchungen des Enzymsystems verwendeten Präparate wurden ausschließlich durch Acetonfällung aus dem Kulturfiltrat des IIB-Mediums mit einem Zusatz von 0,03% Trockenbakterien gewonnen. Bei dieser Präzipitation verliert man 20–25% der im Kulturfiltrat meßbaren Enzymaktivität.

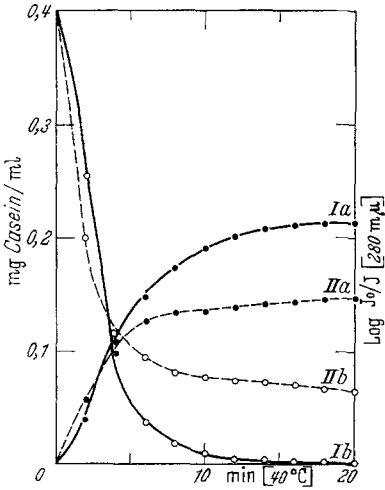


Abb. 5

Abb. 5. Verlauf der Caseinspaltung durch das *M. xanthus*-System bzw. Trypsin (0,2 ml Enzymlösung [0,2 mg Trypsin], 9,8 ml einer 0,04%igen Caseinlösung in m/40 Trispuffer pH 8,5 bzw. 7,6).

- | | |
|-----------------------------|----------------------------------------|
| Ia <i>M. xanthus</i> -Enzym | } Zunahme der Extinktion bei 280 μ |
| IIa Trypsin | |
| Ib <i>M. xanthus</i> -Enzym | } rückfällbares Casein |
| IIb Trypsin | |

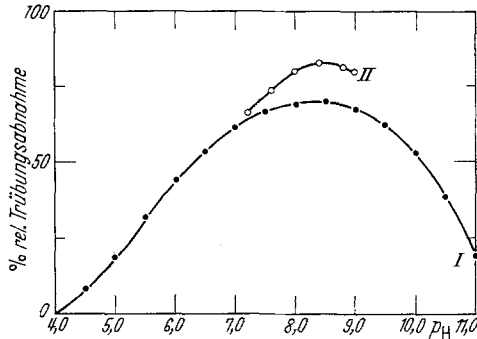


Abb. 6

Abb. 6. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Wasserstoffionenkonzentration. Lyse erhitzter Zellen von *E. coli* (0,1 ml Enzymlösung, 4,9 ml einer Zellsuspension in m/40 Puffer [opt. Dichte t_0 0,800]).

- I Puffer der Ionenstärke 0,1 (30 min bei 40° C)
 II m/40 Trispuffer (10 min bei 40° C)

gestellt: Die Trübung einer Suspension hitzedenaturierter Zellen in 4,9 ml m/40 Trispuffer pH 8,5 wird durch 0,1 ml unserer Enzymlösung bei 40° C in 10 min um 85% reduziert. Nach 20minütiger Inkubation ist keine meßbare Trübung mehr vorhanden. Mit Trypsin hingegen (20 μ g/ml) ist die Proteolyse praktisch nach 4 min beendet, jedoch sind auch nach 30 min immer noch 20% der ursprünglichen Trübung meßbar. Während sich nach der Einwirkung des Myxokokkenenzym kaum noch Zellstrukturen feststellen lassen, liegen bei tryptischer Verdauung gut erkennbare Zellwände vor.

Entsprechend der Colilyse verläuft die Caseinolyse (Abb. 5): Auch hier bewirkt das Myxokokkenenzym im Vergleich zu Trypsin — gemessen

a) Lyse erhitzter Bakterien. Der zeitliche Verlauf der Lyse erhitzter *E. coli* durch das Myxokokkensystem bzw. Trypsin ist in Abb. 4 dar-

an dem mit Trichloressigsäure rückfällbaren, unverdauten Casein und an der Zunahme der Extinktion bei 280 $m\mu$ — einen weitergehenden Abbau des Substrates. Allerdings scheint bis zur maximalen Hydrolyse eine gewisse Anlaufzeit notwendig zu sein.

Das pH -Optimum der Lyse erhitzter Zellen sowie der Caseinolyse liegt in einem Puffer der Ionenstärke 0,1 (MILLER u. GOLDBER 1950) bei pH 8,4 bis pH 8,6, die Toleranz gegenüber der Wasserstoffionenkonzentration ist relativ groß (Abb. 6). Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Gegenwart von Salzen ernied-

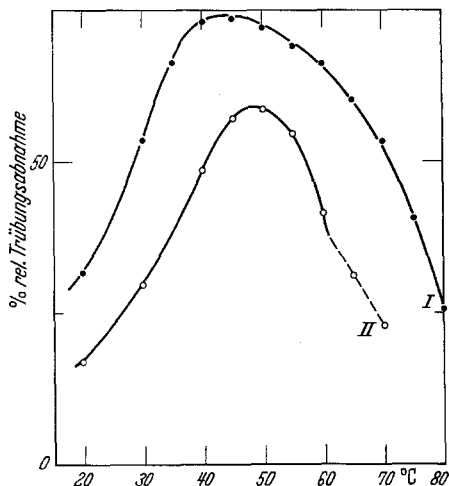


Abb. 7

Abb. 7. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationstemperatur (0,1 ml Enzymlösung, 4,9 ml einer Zellsuspension in $m/40$ Trispuffer pH 8,0 [opt. Dichte t_0 0,800], 10 min).

I Lyse erhitzter Zellen von *E. coli*

II Lyse Alcianblau-gefärbter Zellen von *B. subtilis*

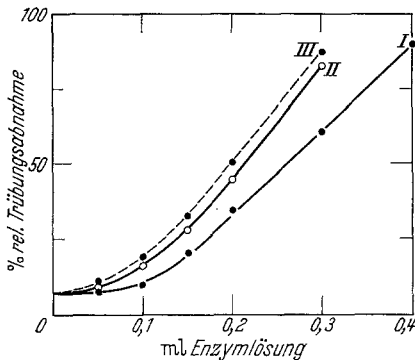


Abb. 8

Abb. 8. Abhängigkeit der Lyse lebender Zellen von *B. subtilis* von der Enzymkonzentration (0,1 bis 0,4 ml Enzymlösung, 4,9—4,6 ml einer Zellsuspension in $m/40$ Trispuffer pH 8,0 [opt. Dichte t_0 0,800], 10 min bei 40° C).

I *B. subtilis* bei pH 7,2 gewachsen

II *B. subtilis* bei pH 6,2 gewachsen

III *B. subtilis* bei pH 7,2 gewachsen, 20 Std in dest. Wasser suspendiert

rigt: Bei gleichem pH -Wert ist sie in Trispuffer viermal so groß wie in dem salzhaltigen Puffer.

Die Stabilität des Enzymsystems ist zwischen pH 5,0 und pH 8,0 gleich groß: Nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur trat nur ein geringer Aktivitätsverlust ein. Allerdings ist das Enzym in Trispuffer wesentlich instabiler als in Phosphatpuffer: Nach 24 Std konnten nur noch 50% der in salzhaltigem Puffer vorliegenden Aktivität gefunden werden.

Die Untersuchung der Abhängigkeit der Aktivität von der Inkubationstemperatur zeigt das Maximum bei 45° C. Bei höherer Inkubationstemperatur ist das Enzym erstaunlich thermostabil (SOLNTZJEVA 1939),

nach 5 min bei 70° C ist immer noch Enzymaktivität feststellbar (Abb. 7). Wahrscheinlich wird die Thermostabilität des Systems in der vorliegenden Form durch schützende höhermolekulare Verunreinigungen vergrößert.

Bei 48stündiger Dialyse im Cellophanschlauch bei 4° C gegen m/60 Phosphatpuffer p_H 7,8 verliert man etwa 15% der proteolytischen Aktivität.

b) *Lyse lebender Gram-positiver Bakterien*. 0,1 ml unserer Enzymlösung bewirkt bei 4,9 ml einer Suspension lebender, 16 Std alter *B. subtilis*-Zellen in m/40 Trispuffer p_H 8,0 eine Trübungsabnahme, die größer als

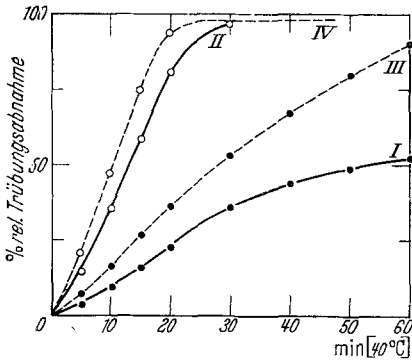


Abb. 9

Abb. 9. Verlauf der Lyse lebender Zellen von *B. subtilis* durch das *M. xanthus*-System (0,1 bzw. 0,2 ml Enzymlösung, 4,9 bzw. 4,8 ml einer Zellsuspension in m/40 Trispuffer p_H 8,0 [opt. Dichte t₀ 0,800]).

- I 0,1 ml Enzymlösung, *B. subtilis* bei p_H 7,2 gewachsen
- II 0,2 ml Enzymlösung, *B. subtilis* bei p_H 7,2 gewachsen
- III 0,1 ml Enzymlösung, *B. subtilis* bei p_H 6,2 gewachsen
- IV 0,2 ml Enzymlösung, *B. subtilis* bei p_H 6,2 gewachsen

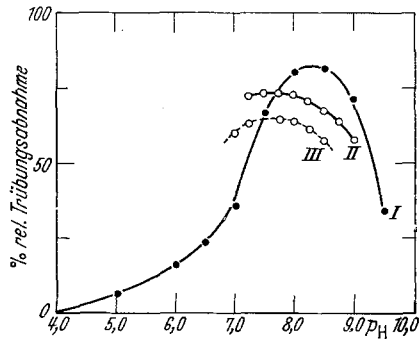


Abb. 10

Abb. 10. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Wasserstoffionenkonzentration. Lyse lebender Zellen von *B. subtilis* (0,2 ml Enzymlösung, 4,8 ml einer Zellsuspension in Puffer [opt. Dichte t₀ 0,800]).

- I Puffer der Ionenstärke 0,1 (60 min bei 40° C)
- II m/40 Trispuffer (10 min bei 40° C)
- III m/40 Veronalpuffer (10 min bei 40° C)

die der Kontrolle ist. Diese Feststellung legt die Vermutung nahe, daß ein durch Trübungsabnahme meßbarer Angriff von der Konzentration des zellwandlytischen Enzyms abhängt. In der Tat steigt die Lysegeschwindigkeit nicht proportional der Enzymkonzentration an (Abb. 8). Während 0,1 ml Enzymlösung die Trübung der Zellsuspension in 30 min bei 40° C um 36%, nach 60 min um 53% reduziert, lösen 0,2 ml die Zellen nach 30 min vollständig auf (Abb. 9). Entsprechend der Caseinolyse setzt die Reaktion, vor allem bei niederen Enzymkonzentrationen, nicht sofort mit maximaler Geschwindigkeit ein, sondern erreicht das Maximum erst nach einer kurzen Inkubationszeit.

Die Empfindlichkeit der Testorganismen hängt von der Wasserstoffionenkonzentration ihres Kulturmediums ab: Die Angreifbarkeit wird wesentlich größer, wenn man *B. subtilis* auf einem Medium mit dem Initial-pH 6,2 anzüchtet. In diesem Fall beträgt die Trübungsabnahme mit 0,1 ml Enzymlösung nach 30 min 52% und nach 60 min 90% (Abb. 8 u. 9). Die bei pH 7,2 kultivierten Zellen verhalten sich entsprechend, wenn sie 20 Std in dest. Wasser suspendiert waren (Abb. 8).

Die Vermutung einer Sensibilisierung lebender Zellen durch Alcianblau läßt sich mit der konzentrierten Enzymlösung erhärten: 0,1 ml der Lösung lysiert, im Gegensatz zu unbehandelten, angefärbte Zellen in 1 Std bei 40° C vollständig. Eine ähnliche Erhöhung der Empfindlichkeit erzielt man mit oberflächenaktiven Substanzen, z. B. Zephirol (0,1 mg/ml) oder Tween 80 (0,1 mg/ml). Allerdings wird auch das Zellinnere in Gegenwart solcher Verbindungen einem Angriff durch proteolytische Enzyme zugänglich.

Das pH-Optimum der Lyse lebender Gram-positiver Zellen liegt in dem Puffer der Ionenstärke 0,1 ähnlich dem der Proteolyse bei pH 8,3 (Abb. 10). Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Wasserstoffionenkonzentration ist jedoch wesentlich größer: Während die Trübung bei pH 7,0 in 60 min bei 40° C nur um 35% abnimmt, wird sie bei pH 7,5 um 68% reduziert. Oberhalb pH 9,0 fällt die Aktivität steil ab. In m/40 Tris- bzw. Veronalpuffer liegt das Optimum der Lyse, die im Vergleich zu der in salzhaltigen Puffern vier- bzw. dreimal so schnell verläuft, etwa bei pH 7,7 (Abb. 10). Inwieweit die Verschiebung des pH-Optimums in salzhaltigen Puffern nach dem Alkalischen auf einer primären Messung der proteolytischen Aktivität beruht, kann erst nach der Reinigung der Einzelenzyme entschieden werden.

Das zellwandlytische System ist nicht so thermostabil wie das proteolytische (Abb. 7): Das Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit ist bei 48° C erreicht. Über 50° C erfolgt ein steiler Abfall der Aktivität, wie er für Proteine charakteristisch ist. Da allerdings oberhalb 60° C die Zellen in zunehmendem Maße Protease-empfindlich werden, wird auch bei 70° C die Trübung der Testsuspension entsprechend der Colilyse noch zu einem Teil reduziert.

Im Gegensatz zum proteolytischen ist das zellwandspezifische System dialyseempfindlich: Eine 48stündige Dialyse der Enzymlösung mindert die Aktivität um 90%. Die etwa 50%ige Hemmung der Lyse lebender Zellen durch EDTA ($5 \cdot 10^{-4}$ M) läßt eine Aktivierung durch Metallionen vermuten. Bis jetzt war es jedoch nicht möglich, durch Zusatz von Metallen (Co^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} , Cu^{++} , K^+ , Na^+) eine Reaktivierung der dialysierten Lösung herbeizuführen.

Neben *B. subtilis* wurden vier weitere Vertreter Gram-positiver Organismen auf ihre Angreifbarkeit durch das Myxokokkensystem getestet

(Tab. 3). Während *M. lysodeicticus* und *Sarcina* sp. in entsprechender Weise von 0,2 ml Enzymlösung in 30 min bei 40° C restlos aufgelöst werden, vollzieht sich die Lyse von *B. mycoides* langsamer. Aber auch hier lassen sich nach dreistündiger Inkubation keine typischen Zellwandstrukturen mehr nachweisen. Dagegen scheint ein Stamm von *St. aureus* gegen das Enzymsystem weitgehend resistent. In allen Fällen der Lyse lebender Bakterien steigt die Viscosität der Reaktionslösungen, was auf freiwerdende Desoxyribonucleinsäuren schließen läßt (WEIBULL 1953; GRULA u. HARTSELL 1954).

c) *Lyse lebender Gram-negativer Bakterien*. Auch bei der Erhöhung der Enzymkonzentration werden lebende Gram-negative Zellen von dem

Tabelle 3

Lyse verschiedener, lebender Gram-positiver Bakterien durch das Myxokokkensystem
(Zum Test 0,2 ml Enzymlösung, 4,8 ml der Bakteriensuspension in m/40 Trispuffer
pH 8,0)

Stamm	% rel. Trübungsabnahme (40° C)		
	30 min	60 min	180 min
<i>M. lysodeicticus</i>	96,0	98,0	—
<i>Sarcina</i> sp.	94,3	97,4	—
<i>St. aureus</i>	2,6	4,5	8,4
<i>B. mycoides</i>	53,7	72,0	88,0

Myxokokkensystem nicht angegriffen. Kürzlich haben nun NOLLER u. HARTSELL (1960, 1961 a) über die Lyse solcher Bakterien durch Trypsin und Lysozym in Gegenwart von 5% n-Butanol berichtet. Nach diesen Autoren ist das auch bei Gram-negativen vorliegende Lysozymsubstrat (WEIDEL et al. 1960) durch eine Lipoproteinschicht maskiert und kann erst nach einer räumlichen Dissoziation der beiden Schichten angegriffen werden. Eine solche Dissoziation bewirkt z. B. Butanol.

Wie die Versuche zeigen, ist auch unsere Enzymlösung in der Lage, intakte Gram-negative Keime in Gegenwart von Butanol zu lysieren: 0,1 ml der Lösung reduziert die Trübung einer Suspension intakter *E. coli*, *Aerobacter* sp. oder *Prot. vulgaris* in 4,9 ml m/40 Trispuffer pH 8,5 in 60 min bei 40° C um mehr als 90%, wenn das System 5% n-Butanol enthält. Nur wenig resistenter ist *Ps. aeruginosa* (Tab. 4). Während lebende Gram-positive Keime restlos aufgelöst werden, bleiben bei den Gram-negativen jedoch kugel- bzw. stäbchenförmige „ghosts“ sichtbar.

In entsprechender Weise werden die Zellen lysiert, wenn man eine Dissoziation der Lipoproteinschicht durch Vorbehandlung mit n-Butanol bzw. Aceton oder 5%iger Trichloressigsäure herbeiführt. Ebenso steigt die Sensibilität in einem System, welches neben unserer Enzymlösung noch EDTA ($5 \cdot 10^{-4}$ M) enthält (REPASKE 1956 u. 1958). Allerdings ver-

läuft der Angriff in Gegenwart des Chelatbildners relativ langsam, was mit der festgestellten Aktivitätshemmung, aber auch einer für die Spaltung ungenügenden Dissoziation des Zellwandkomplexes erklärt werden kann.

Vergleichende Untersuchungen mit Trypsin zeigen, daß das Cytoplasma nach der experimentell herbeigeführten Dissoziation der Lipoproteinschicht einem proteolytischen Abbau zugänglich wird (NOLLER

Tabelle 4. Lyse verschiedener lebender, Gram-negativer Bakterien in Gegenwart von 5% n-Butanol durch das Myxokokkenenzym
(Zum Test 0,1 ml Enzymlösung, 4,65 ml der Bakteriensuspension in m/40 Trispuffer pH 8,5, 0,25 ml n-Butanol)

Stamm	% rel. Trübungsabnahme (40° C)	
	30 min	60 min
<i>E. coli</i> ATCC 9637	80,2	95,0
<i>E. coli</i> Laborstamm	83,8	96,4
<i>Aerobacter</i> sp.	78,0	93,0
<i>Prot. vulgaris</i>	79,4	92,6
<i>Ps. aeruginosa</i>	73,5	88,3

u. HARTSELL 1960, 1961 a). Es ist deshalb verständlich, daß die physikochemischen Daten wie pH-Optimum, Thermostabilität und Verhalten bei der Dialyse weitgehend mit denen der Lyse erhitzter Zellen übereinstimmen.

d) *Substratspezifität*. Eine genaue Spezifitätsangabe des Myxokokkensystems ist erst nach der Auftrennung und der Reinigung der Einzelenzyme möglich. Während die mit Trichloressigsäure behandelten und anschließend tryptisch verdauten Zellen von *B. subtilis* bzw. *M. lysodeicticus* von unserer Enzymlösung vollständig aufgelöst werden, sind die Zellreste nach der Extraktion mit Alkali offensichtlich nicht mehr angreifbar. Sowohl im Morgan-Elson-Test als auch mit der modifizierten Methode von SALTON (1959) lassen sich im Gegensatz zu den mit Lysozym lysierten Zellwänden keine N-Acetyl-aminozucker nachweisen. Dagegen sind die Ansätze mit dem Myxokokkenenzym sehr stark ninhydrinpositiv. Die papierchromatographische Analyse zeigt die Abspaltung von Alanin, Glutaminsäure und Lysin.

V. Diskussion

Wie die mitgeteilten Befunde zeigen, bildet *M. xanthus* ein extracelluläres Enzymsystem, welches neben der für Myxobakterien charakteristischen proteolytischen (OXFORD 1947; NORÉN 1953 a, 1955 a, 1960 a und b) eine spezifisch zellwandlytische Aktivität besitzt. Das System läßt sich durch Acetonfällung aus dem Kulturfiltrat abtrennen und lysiert empfindliche Gram-positive Zellen vollständig, Gram-negative zu einem

großen Teil, jedoch erst nach einer räumlichen Dissoziation der Lipoproteinschicht. Diese Feststellung steht im Einklang mit der von SALTON (1955) bzw. LOEBECK u. KLEIN (1956) gemachten Beobachtung, daß intakte, native Wände Gram-negativer Zellen gegenüber dem Myxokkokkensystem resistent sind.

Die Synthese erfolgt nur in der logarithmischen Wachstumsphase bzw. in der frühen stationären Phase, im Gegensatz zum proteolytischen ist das zellwandspezifische Enzym bei längerer Kultivierung nicht stabil (NORÉN 1955 a). Für die Enzymausbeute ist die Zusammensetzung des Nährmediums von Bedeutung (NORÉN 1955 a, 1955 b u. 1960 b), jedoch ist zur Bildung die Anwesenheit induzierender Substrate nicht erforderlich (NORÉN 1953 a). Wie aber auch bei einigen anderen Enzymen gefunden wurde (SCOTT u. HENDRICK 1952; REYNOLDS 1954), läßt sich die Synthese des zellwandlytischen Systems durch Zugabe des Substrates (erhitzte, Aceton-getrocknete *E. coli*) stimulieren. Da an sich adaptive Enzyme in Abwesenheit des Substrates in geringen Mengen synthetisiert werden können (MONOD 1947; COHN u. MONOD 1953), sollte die Frage der Induzierbarkeit des zellwandspezifischen Enzyms eingehender geprüft werden. Es ist anzunehmen, daß erhitzte Trockenzellen nicht die beste Induktorquelle darstellen, da sie einmal eine sehr komplexe Zusammensetzung (mit relativ geringem Anteil des spezifischen Substrates) besitzen, zum anderen bei höheren Konzentrationen die Enzymsynthese merklich hemmen.

Die Versuche mit der konzentrierten Enzymlösung zeigen, daß die Aktivität durch die Gegenwart von Salzen in starkem Maße herabgesetzt wird. Das Myxokkokkensystem verhält sich damit wie das von WELSCH (1947) bzw. McCARTY (1952) beschriebene von *Str. albus* (siehe auch REPASKE 1958). Offensichtlich liegen die Enzymmoleküle in salzhaltigem Milieu in einer weniger aktiven, aber stabilen Form vor (YON 1959). Erst bei der Abnahme der Salzkonzentration erfolgt der Übergang in einen aktiven, empfindlicheren Zustand, der eine optimale Lyse gewährleistet. Künftige Untersuchungen werden klären, ob der Verlust zellwandspezifischer Aktivität bei der Dialyse durch die Entfernung besonders schützender Ionen eintritt, oder ob eine tatsächliche Aktivierung durch einen dialysierbaren Faktor vorliegt. Der Versuch einer Reaktivierung mit verschiedenen Metallionen verlief bis jetzt negativ.

Für die Angreifbarkeit durch zellwandlytische Enzyme ist auch die physiko-chemische Beschaffenheit der bakteriellen Zellwände von Bedeutung. Die Lysozym-Lyse wird z. B. durch O-Acetylgruppen gehemmt (BRUMFITT et al. 1958). Eine Entfernung dieser Gruppierungen, aber auch eine Extraktion der Teichonsäure, erhöht die Sensibilität (SALTON u. PAVLIK 1960). Die Spaltung des Substrates mag deshalb nicht erfolgen, weil das basische Lysozym mit der oberflächlichen Schicht solcher nega-

tiv geladenen Gruppen sehr feste, inaktive Komplexe bildet (SALTON 1956 b). Für die optimale Lyse Gram-positiver Bakterien durch das *Mycococcus xanthus*-System ist eine bestimmte Enzymkonzentration erforderlich, geringe Enzymmengen bewirken keine oder nur eine sehr langsame Trübungsabnahme der Zellsuspension. Die Disproportionalität zwischen Enzymkonzentration und Lysegeschwindigkeit kann entsprechend der Saltonschen Auffassung mit der Bildung relativ stabiler, aber inaktiver Komplexe erklärt werden: Eine sichtbare Lyse ist erst dann festzustellen, wenn genügend ungebundenes, aktives Enzym vorliegt. Die Empfindlichkeit der Testorganismen läßt sich jedoch durch die Kulturbedingungen beeinflussen (WEIBULL 1953; LITWACK u. PRAMER 1956; REPASKE 1958). Die Erhöhung der Sensibilität Gram-positiver Zellen nach dem Wachstum in schwach saurem Milieu mag durch eine Modifizierung der Oberflächenstruktur (Änderung der Menge bzw. der Anordnung hemmender Gruppierungen) bewirkt werden. Eine solche Änderung läßt sich auch mit Alcianblau oder oberflächenaktiven Verbindungen erzielen. Im Gegensatz zu den anderen getesteten Zellen wird *St. aureus* durch eine Modifizierung der Kulturbedingungen nicht sensibilisiert. Dieser Organismus erwies sich jedoch auch gegenüber Lysozym als weitgehend resistent (SALTON u. PAVLIK 1960).

Wie die Untersuchungen mit Lysozym zeigten (Zusammenstellung NOLLER u. HARTSELL 1961 a und b), werden Gram-negative Bakterien erst nach einer räumlichen Dissoziation der Lipoproteinschicht dem Angriff zellwandlytischer Enzyme zugänglich. Alle bisher zur Freilegung des Lysozymsubstrates angewendeten Methoden, z. B. Erhitzen (BECKER u. HARTSELL 1954), Vorbehandlung mit Fettlösungsmitteln (BECKER u. HARTSELL 1955; NOLLER u. HARTSELL 1961 b) oder mit Säuren (HANCOCK u. PARK 1958; NOLLER u. HARTSELL 1961 b, Übersicht siehe SALTON 1958), führen auch mit unserer Enzymlösung zu einer Lyse der Zellwände. Ob die nach beendeter Reaktion übrigbleibenden „ghosts“ mit denen von GRULA u. HARTSELL (1957), NOLLER u. HARTSELL (1961 b) bzw. TUTTLE u. GHEST (1959) beschriebenen identisch sind, sollen weitere Untersuchungen klären.

Während die proteolytische Aktivität einer wachsenden Kultur von *M. xanthus* in vivo durch die Bildung eines Klärungshofes auf Bakterienagar ohne weiteres zu erkennen ist, werden lebende Zellen, auch die der empfindlichen Stämme von *B. subtilis* bzw. *M. lysodeiolicus*, ausschließlich nur in direktem Kontakt lysiert (IMSCHENETZKI u. KUSJURINA 1951; OETKER 1953). Die Ergebnisse der in vitro-Untersuchungen lassen für diese Feststellung folgende Deutungen zu: 1. Die Konzentration des diffundierenden zellwandspezifischen Enzyms erreicht im Medium nicht die für eine sichtbare Lyse notwendige Höhe. 2. Das Enzym wird von den wachsenden Zellen wohl in genügender Menge und in aktiver Form

ausgeschieden, geht aber bei der Diffusion in das salzhaltige Medium in einen wenig aktiven Zustand über (NORÉN 1960b). 3. Auch bei Gram-negativen Bakterien genügt allein ein direkter Zellkontakt, um das zur Spaltung notwendige zellwandlytische Enzym an den Ort der Wirkung zu bringen. 4. Entsprechend der Lyse Gram-negativer Zellen *in vitro* ist auch *in vivo* eine primäre räumliche Dissoziation der Lipoproteinschicht erforderlich. Diese wird durch ein zusätzliches, nicht diffundierendes enzymatisches System bzw. nichtenzymatisch durch eine spezifische Verbindung bewirkt. Die künftigen Untersuchungen werden zeigen, welche der Möglichkeiten den Tatsachen entspricht. Für die Lyse lebender Zellen durch die Myxobakterien kann jedoch nach unserer Auffassung die Annahme ausgeschlossen werden, daß als primärer Schritt die Abtötung durch ein antibiotisches Prinzip erfolgen muß.

Eine genaue Spezifitätsangabe der Myxokokkenenzyme ist mit dem ungereinigten Präparat noch nicht möglich. Wie orientierende Untersuchungen ergaben, werden bei der Lyse Gram-positiver Zellwände Aminosäuren freigesetzt, während der Nachweis auf N-Acetylaminozucker negativ blieb. Auf Grund der Abspaltung von Aminosäuren, sowie des Fehlens von freien Aminozuckern, nahm man für das bakteriolytische System von *Streptomyces* sp. zunächst Peptidase-Charakter an (GHUYSEN 1957). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß das *Streptomyces*-Enzym in gleicher Weise wie Lysozym eine $\beta(1-4)$ -N-Acetylhexosaminidase ist (SALTON u. GHUYSEN 1959 und 1960).

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Es wird ein extracelluläres Enzymsystem von *Myxococcus xanthus* beschrieben, welches neben proteolytischer eine spezifisch zellwandlytische Aktivität besitzt.

2. Die Bildung des Systems ist von extracellulären Induktoren unabhängig, die Ausbeute an zellwandlytischem Enzym läßt sich jedoch durch die Zugabe von erhitzten Gram-negativen Trockenzellen zum Kulturmedium erhöhen.

3. Eine erste Anreicherung und einige charakteristische Eigenschaften des Systems werden beschrieben.

4. Die *M. xanthus*-Enzyme katalysieren die vollständige Lyse einiger empfindlicher Gram-positiver Bakterien. Gram-negative Zellen werden ebenfalls weitgehend aufgelöst, jedoch erst nach einer experimentell herbeigeführten räumlichen Dissoziation der Lipoproteinschicht.

5. Die Spaltansätze Gram-positiver Zellwände enthalten einen relativ hohen Prozentsatz abgespaltener, zellwandcharakteristischer Aminosäuren, freie N-Acetylaminozucker können nicht nachgewiesen werden.

Herrn Prof. Dr. H. KÜHLWEIN danke ich für wertvolle Hinweise und anregende Diskussionen, Frau A. WIDMANN für ihre gewissenhafte und interessierte Mitarbeit.

Literatur

- AMINOFF, D., W. T. J. MORGAN and W. M. WATKINS: *Biochem. J.* **51**, 379 (1952).
 BECKER, M. E., and S. E. HARTSELL: *Arch. Biochem.* **53**, 402 (1954); **55**, 257 (1955).
 BEEBE, J. M.: *Iowa St. Coll. J. Sci.* **15**, 319 (1941a).
 BEEBE, J. M.: *J. Bact.* **42**, 193 (1941b).
 BRUMFITT, W., A. C. WARDLAW and J. T. PARK: *Nature (Lond.)* **181**, 1783 (1958).
 COHN, M., and J. MONOD: *Adaption in Micro-organisms*, p. 132. London: Cambridge Univ. Press 1953.
 CRAMER, F.: *Papierchromatographie*, 3. Aufl. Weinheim: Verlag Chemie 1954.
 DELORY, G. E., and E. J. KING: *Biochem. J.* **39**, 245 (1945).
 FINCK, G.: *Arch. Mikrobiol.* **15**, 358 (1950).
 GHUYSEN, J. M.: *Arch. int. Physiol.* **65**, 173 (1957).
 GRULA, E. A., and S. E. HARTSELL: *J. Bact.* **68**, 171 (1954).
 GRULA, E. A., and S. E. HARTSELL: *Canad. J. Microbiol.* **3**, 13 (1957).
 HANCOCK, R., and J. T. PARK: *Nature (Lond.)* **181**, 1050 (1958).
 IMSCHENETZKI, A. A., u. L. A. KUSJURINA: *Microbiologija* **20**, 3 (1951).
 KANDLER, O., A. HUND u. C. ZEHENDER: *Arch. Mikrobiol.* **30**, 355 (1958).
 KÜHLWEIN, H.: *Zbl. Bakt., II. Abt.* **113**, 480 (1960).
 KUNTZ, M.: *J. gen. Physiol.* **30**, 291 (1947).
 LILLE, R. D.: *Histopathologic Technique*. Blakiston, Philadelphia and Toronto 1948.
 LITWACK, G., and D. PRAMER: *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **91**, 290 (1956).
 LOEBECK, M. E., and H. P. KLEIN: *J. gen. Microbiol.* **14**, 281 (1956).
 MCCARTY, M.: *J. exp. Med.* **96**, 555 (1952).
 MCKINNEY, R. E.: *J. Bact.* **66**, 453 (1953).
 MICHAELIS, L.: *J. biol. Chem.* **87**, 33 (1930).
 MILLER, G. L., and R. H. GOLDBER: *Arch. Biochem.* **29**, 420 (1950).
 MONOD, J.: *Growth* **11**, 223 (1947).
 NOLLER, E. C., and S. E. HARTSELL: *Bact. Proc.* **1960**, 39.
 NOLLER, E. C., and S. E. HARTSELL: *J. Bact.* **81**, 482 (1961a); **81**, 492 (1961b).
 NOLTE, E. M.: *Arch. Mikrobiol.* **28**, 191 (1957/58).
 NORÉN, B.: *Svensk bot. Tidskr.* **47**, 309 (1953a); **47**, 402 (1953b); **49**, 282 (1955a); **54**, 550 (1960b).
 NORÉN, B.: *Bot. Not. (Lund)* **108**, 81 (1955b); **113**, 320 (1960a).
 OETKER, H.: *Arch. Mikrobiol.* **19**, 206 (1953).
 OXFORD, A. E.: *J. Bact.* **53**, 129 (1947).
 OXFORD, A. E., and B. N. SINGH: *Nature (Lond.)* **158**, 745 (1946).
 PINOY, M. E.: *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **157**, 77 (1913).
 PINOY, M. E.: *Ann. Inst. Pasteur* **35**, 487 (1921).
 REPASKE, R.: *Biochim. biophys. Acta* **22**, 189 (1956); **30**, 225 (1958).
 REYNOLDS, D. M.: *J. gen. Microbiol.* **11**, 150 (1954).
 SALTON, M. R. J.: *J. gen. Microbiol.* **12**, 186 (1955); **18**, 481 (1958).
 SALTON, M. R. J.: *Biochim. biophys. Acta* **22**, 495 (1956a); **34**, 308 (1959).
 SALTON, M. R. J.: *Bact. Anatomy*, p. 96. Ed. by E. T. C. Spooner and B. A. D. Stocker. London: Cambridge Univ. Press 1956b.
 SALTON, M. R. J., et J. M. GHUYSEN: *Biochem. biophys. Acta* **24**, 160 (1957); **36**, 552 (1959); **45**, 355 (1960).
 SALTON, M. R. J., and R. W. HORNE: *Biochim. biophys. Acta* **7**, 19 (1951).
 SALTON, M. R. J., and J. G. PAVLIK: *Biochim. biophys. Acta* **39**, 398 (1960).
 SCOTT, D., and L. R. HENDRICK: *J. Bact.* **63**, 795 (1952).

- SINGH, B. N.: J. gen. Microbiol. **1**, 1 (1947).
SOLNTZEVA, L.: Mikrobiologija **8**, 700 (1939).
SØRENSEN, S. P. L.: Biochem. Z. **21**, 131 (1909).
TUTTLE, A. L., and H. GHEST: Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 1261 (1959).
WALLENFELS, K., M. L. ZARNITZ, G. LAULE, H. BENDER u. M. KESER: Biochem. Z. **331**, 459 (1959).
WEIBULL, C.: J. Bact. **66**, 696 (1953).
WEIDEL, W., H. FRANK and H. H. MARTIN: J. gen. Microbiol. **22**, 158 (1960).
WELSCH, M.: Gembloux (Belgien). J. Duculot 1947.
WELSCH, M.: Ergebn. Mikrobiol. Immunitätsforsch. exp. Ther. **30**, 217 (1957).
WELSCH, M.: J. gen. Microbiol. **18**, 491 (1958).
YON, J.: Biochim. biophys. Acta **31**, 75 (1959).

Dr. H. BENDER,

7505 Ettlingen/Baden, i. Fa. W. Spitzner, Arzneimittelfabrik, Bunsenstr. 6—10