

## Der Einfluss von Giften auf die zur Meiose führenden Stoffwechsel- vorgänge bei *Sabellaria spinulosa*

Zum Studium der Auslösung der Zellteilung sind tierische Eier gut geeignet. Wachstum und Zellteilung sind bei ihnen scharf voneinander getrennt. Durch experimentell regelbare Induktion wird aus der bis dahin wachsenden Oozyte eine Zelle, die ohne weiteres Wachstum eine grössere Anzahl schnell hintereinander ablaufende Teilungen durchführt. Mit zytochemischer Technik und der Anwendung spezifischer Zellgifte wurde versucht, einen Einblick in diese Prozesse zu gewinnen. Wie aus den physiologischen und zytochemischen Untersuchungen von BULLOUGH<sup>1</sup> und STICH<sup>2</sup> ersichtlich ist, setzen die eine Mitose vorbereitenden Vorgänge schon in der Interphase ein, eine beträchtliche Zeit vor den an Zellstrukturen morphologisch erfassbaren Änderungen in der Prophase. Aus diesem Grunde wurde gerade dieser durch verschiedene mit der Mitose zusammenhängende Syntheseprozesse ausgezeichneten Phase, die man im Gegensatz zur Interphase sich nicht teilender Kerne als *Synthesephase* (STICH<sup>3</sup>) bezeichnen sollte, eine eingehende Bearbeitung gewidmet.

Als Untersuchungsobjekt dienten Eier des Polychäten *Sabellaria spinulosa*. Sie werden auf dem Oozytenstadium von den aus ihren Röhren isolierten Weibchen in das Seewasser abgelegt. Bereits ohne Befruchtung setzt die Bildung der Meiosespindel ein. Die unbefruchteten Eier sistieren dann ihre Entwicklung auf dem Metaphasestadium der 1. Reifeteilung. Für die Anaphase und die weitere Entwicklung ist der Befruchtungsvorgang notwendig. Eine Berücksichtigung fanden die mit der Perjodsäure-Leukofuchsin-Reaktion bzw. mit der Bauer-Reaktion nachweisbaren Polysaccharide und die Ribonukleinsäure, die mit Hilfe basischer Farbstoffe, kombiniert mit einer Verdauung mit kristalliner Ribonuklease oder der spezifischen Extraktion mit Perchlorsäure oder Salzsäure, nachgewiesen wurde.

Der Kernsaft des Oozytenkerns ist frei von zytochemisch nachweisbaren Mengen von Polysacchariden und Ribonukleinsäuren. Erst nach der Eiablage beginnt eine Ansammlung von Polysacchariden im Kernsaft. Später erscheint dann in ihm auch noch Ribonukleinsäure (siehe auch STICH<sup>4</sup>). Dieser Vorgang fällt zusammen mit der Auflösung des Nucleolus sowie der Kontraktion der Chromosomen. Der Eintritt dieser Prozesse scheint, wie bei *Cyclops strenuus* wahrscheinlich gemacht werden konnte, von der geänderten Zusammensetzung des Kernsaftes abhängig zu sein. Aus den Substanzen des Kernsaftes bildet sich dann die ribonukleinsäure- und polysaccharidhaltige Spindel aus.

Von Giften wurden vorläufig einige ausgewählt, deren Angriffspunkte als bekannt gelten dürfen. 2,4-Dinitrophenol und  $NaN_3$ , welche die Bildung von energiereichen Phosphaten ( $\sim pH$ ) unterbinden bzw. ihre Wirkung aufheben, die Atmung hierbei unbeeinflusst lassen oder sogar steigern, Monojodessigsäure, die mit den SH-Gruppen der Dehydrasen reagiert, wodurch sowohl die aerobe als auch anaerobe Glykolyse ohne Störung der Atmung gehemmt wird, Kaliumzyanid, das durch Vergiftung der Atmungsfermente die Atmung unterbindet, und Trypaflavin, das mit Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure salzartige Verbindungen eingehet. Ob diese

Gifte ausschliesslich die hier aufgezählte Wirkung in der Zelle besitzen, erscheint zur Zeit wahrscheinlich, darf jedoch nicht als eine gesicherte Tatsache angenommen werden. Eine genaue Angabe der verwendeten Konzentrationen ist nicht möglich, da die Gifte zum Teil im Seewasser ausfallen. Besonderer Wert wurde auf die Erhaltung des für das Seewasser normalen pH gelegt, da bereits eine leichte Verschiebung die Entwicklung blockiert, wodurch dann die spezifische Wirkung der Gifte überdeckt wird.

1. 2,4-Dinitrophenol (etwa  $1-3 \cdot 10^{-3}$ ) und  $NaN_3$  (etwa  $1-5 \cdot 10^{-3}$ ) blockieren die Polysaccharid- und Ribonukleinsäureeinlagerung in den Kernsaft des Oozytenkerns. Alle die Prophase charakterisierenden Prozesse bleiben aus. Die Hemmung ist vollkommen reversibel, wenn die Eier in normales Seewasser zurückgebracht werden.

2. KCN ( $1-3 \cdot 10^{-3}$ ) und  $CH_3COOH$  (etwa  $1 \cdot 10^{-3}$ ) haben keinen Einfluss auf den Eintritt der Oozyte in die Reifeteilung. Die Einlagerung von Polysacchariden und Ribonukleinsäure in den Kernsaft, die Ausbildung der Spindel und die Einordnung der Chromosomen in die Metaphaseplatte laufen ohne sichtbare Schädigung ab. Die weitere, normalerweise von der Befruchtung abhängige Entwicklung zeigt zum Teil einige Anomalien. Die erste und zweite Reifeteilung finden statt, und die Eier treten auch grösstenteils noch in die Vorkernstadien ein. Dann allerdings sistiert die Weiterentwicklung vollkommen.

3. In einer Trypaflavinkonzentration von etwa  $2 \cdot 10^{-3}$  erfolgt eine anomale starke Polyspermie (bis zu 25 Spermien konnten in einem Ei gezählt werden), die wiederum Anlass zu einer pathologischen Entwicklung gibt. In schwächeren Konzentrationen wird eine normale Meiosespindel ausgebildet. Auch die Einordnung der Chromosomen in die Äquatorialplatte zeigt keine Besonderheiten. Erst später verkleben die Chromosomen und sind zu einer normalen Polwanderung in der Anaphase nicht befähigt.

Aus der verschiedenen Wirkung der die Entwicklung hemmenden Gifte lassen sich einige allgemeine Schlussfolgerungen ziehen. Die Hemmbarkeit der Polysaccharideinlagerung in den Kernsaft durch 2,4-Dinitrophenol und Natriumazid lässt erkennen, dass bereits die ersten eine Meiose einleitenden Vorgänge das Vorhandensein von energiereichen Phosphorverbindungen benötigen. Da in der reifen Oozyte von *Sabellaria* die Chromosomenvermehrung bereits abgeschlossen ist, kann man den Energiebedarf des Kerns allein auf die Vorgänge der Spindelbildung zurückführen. Deshalb darf bei der Berechnung der Energieverhältnisse der Mitose nicht nur, wie es LANG<sup>1</sup> annahm, die Chromosomenverdoppelung berücksichtigt werden, sondern auch die Synthesevorgänge des extrachromosomalen Teilungsapparates müssen in Rechnung gestellt werden.

In der Reaktion des Eies von *Sabellaria* gegenüber Kaliumzyanid und Monojodessigsäure lassen sich eindeutig zwei Phasen unterscheiden: 1. eine unempfindliche, die in der Ausbildung der Spindel und der Metaphaseeinordnung der Chromosomen besteht, und 2. eine anschliessende empfindliche. Der Befund, dass der Kern bei Anwesenheit von KCN und Monojodessigsäure, bei des Gifte der Atmungskettenphosphorylierung, in die Teilung einzugehen vermag, gestattet wohl den Schluss, dass die Kernteilung der Atmung direkt nicht bedarf. Dies deckt sich vollkommen mit den Ergebnissen von LETTRÉ<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> K. LANG in *Mikroskopische und chemische Organisation der Zelle* (Springer-Verlag, Berlin 1952).

<sup>2</sup> H. LETTRÉ, *Naturwissenschaften* 38, 490 (1951).

<sup>1</sup> W. BULLOUGH, *J. Exp. Biol.* 26, 83 (1949). – W. BULLOUGH und E. EISA, *J. Exp. Biol.* 27, 257 (1950).

<sup>2</sup> H. STICH, *Chromosoma* 4, 429 (1951).

<sup>3</sup> H. STICH, *Chromosoma* 6, 199 (1954).

<sup>4</sup> H. STICH, *Z. Naturforsch.* 6b, 259 (1951).

der auf Grund gänzlich andersartiger Versuche zu der gleichen Annahme kam. Hiermit in Einklang stehen auch Messungen an Seeigeleiern von LINDAHL und HOLTER<sup>1</sup>, die eine starke Verminderung der O<sub>2</sub>-Aufnahme fanden, wenn die Oozyten in die Reifeteilung eingehen, also in der Phase, die bei *Sabellaria* gegen KCN und Monoiodessigsäure unempfindlich ist. Ebenfalls nicht in Widerspruch zu obiger Ansicht sind die von ZEUTHEN<sup>2</sup> genau gemessenen Rhythmen in der O<sub>2</sub>-Aufnahme während einzelner Furchungsschritte. Wie aus seinen neuen Untersuchungen hervorgeht, fällt die starke Atmung in die Interphase, während bei den eigentlichen Mitosephasen eine starke Reduktion der O<sub>2</sub>-Aufnahme erfolgt.

Die hier gemachte Annahme scheint auf den ersten Blick den Befunden zu widersprechen, dass Teilungen unter anaeroben Bedingungen nicht ablaufen können und dass durch Steigerung der Atmung, zum Beispiel bei *Actinophrys sol*<sup>3</sup>, die Meiose verfrührt ausgelöst werden kann. Auch die Blockierung der Furchungsmitosen von *Sabellaria* und anderen Objekten<sup>4</sup> durch KCN demonstriert die Bedeutung der Atmung für den Eintritt der Zelle in die Mitose. Nimmt man jedoch an, dass die Bedeutung dieser aeroben Glykose für die Zellteilung in der Bildung energiereicher Phosphorverbindungen liegt, von deren Anwesenheit der Mitoseeintritt abhängig ist, so hebt sich der Widerspruch auf. Die Annahme liegt nahe, dass sehr viele der gegensätzlichen Befunde auf verschiedenen Ausgangssituationen im Energiehaushalt der Zellen beruhen: Zellen mit einer grossen Menge gespeicherten ~ph werden eine oder mehrere Mitosen unter anaeroben Bedingungen ausführen können, während anderseits Zellen ohne wesentliche Mengen an ~ph diese erst synthetisieren müssen, um überhaupt in die Teilung eintreten zu können. Diese Synthesen sind offenbar von der Atmungskettenphosphorylierung abhängig. Ihre Hemmung wird einen Mitosestopp herbeiführen, ihre Förderung eine schnelle Bildung von ~ph und hierdurch den frühzeitigen Mitoseeintritt.

In diesem Zusammenhang sind von besonderem Interesse Versuche von HÄMMERLING<sup>5</sup> an *Acetabularia med.*: die Transplantation eines Hutes auf junge Zellen und Kerne löst verfrührt eine Vielzahl von Kernteilungen aus. Ebenso können sogenannte Sekundärkerne, die sich normalerweise nicht mehr teilen würden, hierdurch zu zahlreichen Teilungen gebracht werden. Es wäre denkbar, dass diese Teilungen dadurch zustande kommen, dass den Kernen durch das Transplantat energiereiche Phosphate (vielleicht Metaphosphate) zugeführt werden, die in jüngeren Stadien in nicht ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen oder für Wachstumsprozesse in der Zelle verwendet werden (STICH<sup>6</sup>). Es soll versucht werden, unter diesem Gesichtspunkt diese Frage experimentell zu prüfen, um hierdurch einen weiteren Einblick in die eine Mitose auslösenden Faktoren zu erlangen.

H. STICH

Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Wilhelmshaven, den 23. November 1953.

#### Summary

The metabolic processes leading to meiosis in *Sabellaria spinulosa* were investigated with cytochemical

methods (PAS-reaction for polysaccharides, and basic dyes in combination with ribonuclease applied for the detection of ribonucleic acid) and the use of specific inhibitors. Before the beginning of meiotic prophase, polysaccharides and later ribonucleic acid appear in the nuclear sap and become incorporated into the spindle. 2,4-dinitrophenol and NaN<sub>3</sub>, which inhibit the formation of energy-rich phosphates, prevent the accumulation of polysaccharides and RNA in the nucleus and the formation of the meiotic spindle. KCN and mono-iodoacetic acid are without influence on polysaccharide and RNA metabolism of the nucleus. The first and second meiotic division are normal, but cleavage is completely suppressed. From these results the following conclusions may be drawn: (1) the division of the nucleus is dependent on the presence of energy-rich phosphate, (2) the division occurs without respiration, and (3) respiration is important for cell division only in so far as it provides the synthesis of energy-rich phosphates.

#### A Biliverdin-like Pigment in the Skull and Vertebrae of the Ocean Skipjack, *Katsuwonus pelamis* (Linnaeus)<sup>1</sup>

The occurrence of blue-green pigments in the skeleton of teleosts such as *Cottus*, *Belone*, *Zoarces*, *Strongylura* and others, has been reported by several workers<sup>2</sup>. The pigments have not been identified, although their similarity to bile pigments has been demonstrated. CAGLAR<sup>3</sup> believes that the skeletal pigment of *Belone* is biliverdin.

On rare occasions, the catches of skipjack in waters of Baja California include individuals whose endoskeletons, especially the skull and vertebrae, are strikingly green or blue-green. Such an individual was sent for our examination through the courtesy of the Van Camp Sea Food Company and M. B. SCHAEFER of the International Tropical Tuna Commission. Four years earlier, one of us (D.L.F.) had studied the pigment from the bony parts of a similarly coloured individual of the same species, made available through the kindness of HARRY C. GODSIL, of the California State Fisheries Laboratory.

Since the properties of such a pigment occurring in the *Katsuwonidae* have not been described, we have taken the opportunity of examining them. Unfortunately, both of the specimens which became available had been cooked, so that we cannot describe the distribution of the pigment except in the axial skeleton which was of a pea-green color.

In the vertebral column, it appeared especially abundant in the centra, neural arches and in the base of the haemal arches. Less appeared in the neural spines, and none in the notochord. In the skull, it appeared in both dermal and cartilage bones, being especially conspicuous in the prefrontals, pre-maxillae, maxillae, dentaries, median ethmoid, supra-orbitals, vomers, exoccipitals, articulars, quadrates and in the otic series. It was conspicuous in parts of the parietals, hyomandibulars, the opercular series, the branchial arches and in the sclerotic of the eye. Less was present in the

<sup>1</sup> Contribution from the Scripps Institution of Oceanography, New Series No. 677.

<sup>2</sup> M. CAGLAR, Nature 155, 670 (1945). – D. L. FOX, *Animal Biochromes and Structural Colours* (Cambridge University Press, 1953), p. 279. – H. WILLSTAEDT, *Enzymologia* 9, 260 (1941) (Chem. Abstr. 36, 842).

<sup>3</sup> M. CAGLAR, Nature 155, 670 (1945).

<sup>1</sup> E. LINDAHL und H. HOLTER, C. R. Labor. Carlsberg 24, 49 (1941).

<sup>2</sup> E. ZEUTHEN, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 23, 47 (1951).

<sup>3</sup> J. STRAUB, Biol. Zbl. 70, 24 (1951).

<sup>4</sup> O. WARBURG, Z. physiol. Chem. 66, 305 (1910).

<sup>5</sup> J. HÄMMERLING, Biol. Zbl. 59, 158 (1939); Int. Rev. Cytology 2, 475 (1953).

<sup>6</sup> H. STICH, Z. Naturforsch. 8b, 36 (1953).