

Über die Entstehung spezifischer bioaktiver Stoffe in der frühembryonalen Entwicklung der Tiere

Das Wesentliche in der Biochemie der frühesten embryonalen Entwicklung der Tiere ist die allmähliche Umwandlung des Eidotters in stoffwechselaktives Protoplasma¹. Mit der zur Zeit angewandten Methodik ist es sehr schwierig, den Mechanismus dieser Umwandlung aufzuklären².

Seit 1954 arbeiten wir an einer Methode³⁻⁵, die der Erforschung der Embryogenese dienen soll. Es hat sich gezeigt, dass nach der Entfernung der Gallert- und Dotterhülle und bei Verletzung der Zellenmembran des in Entwicklung begriffenen Keimes von *Triturus cristatus* in genau bestimmten Momenten in der Lösung bestimmte chemische Stoffe entstehen; ich nenne sie Stadiumontogenine. Diese Stoffe üben eine spezifische ontogenetische Wirkung aus: Hemmung der Entwicklung von Keimen, die jünger sind als das Verletzungsstadium, Stimulierung gleich alter Keime. Die Entwicklung von Stadien, die älter als das Verletzungsstadium sind, wird gar nicht beeinflusst. Unsere Untersuchungen in den Jahren 1959/60 ergaben, dass Ontogenine nicht nur in ganzen Keimen, sondern auch in Keimteilen gebildet werden. In solchen Fällen bezeichnen wir das Ontogenin mit der Stadiumsnummer und dem Namen des Keimteils.

Die vorliegende Arbeit dient der Untersuchung des Wirkungsmechanismus der verschiedenen Ontogeninstadien. Wir verfolgten die Reaktionen der Stadienontogenine mit verschiedenen Proteiden, die aus den Keimen im Augenblick des Auftretens der entsprechenden Ontogenine isoliert wurden. Wegen der Stellung, die die Ontogenine Nr. 3, 10 und 10a in der embryonalen Entwicklung der Säugetiere einnehmen, richteten wir unser Hauptaugenmerk auf sie⁶.

Es wurden jeweils Gruppen von je 10 Embryonen (bzw. die gleiche Anzahl Teile derselben) im gleichen Entwicklungsstadium und Moment der Ontogeninabscheidung nach einer modifizierten Methode nach MIRSKY⁷ verarbeitet (10 Keime in 1 ml 0,14 M NaCl-Lösung). In einer Versuchsserie trennten wir die DNS vom Protein ab⁸. Alle Fraktionen wurden in der Holtfreterlösung dialysiert und soweit aufgefüllt, dass 0,2 ml Lösung auf einen Keim entfallen. 0,4 ml dieser Fraktionen mischten wir bei 19°C mit 1 ml Ontogeninlösung und prüften die Wirksamkeit der Ontogenine. Die Mischung wurde bei Zimmertemperatur 2 h geschüttelt und dann dekantiert. Hierauf wurden zwei

Embryonen in die Lösung gebracht, der eine jünger, der andere älter als der Embryo, der das Ontogenin lieferte hatte. Als Kontrolle dienten entsprechende reine Fraktionen bzw. reine verdünnte Ontogeninlösungen.

Wie die Tabelle zeigt, binden nicht alle Fraktionen die Ontogenine, die im Moment in den Zellen gebildet werden. Im Sinne einer Arbeitshypothese nehmen wir an, dass die nichtbindende Fraktion die Bildungsstätte der Ontogenine ist. Am häufigsten bilden sich Ontogenine in der Fraktion III, also im Dotter, während sie am häufigsten durch DNS-Proteide gebunden werden. In 72% der Fälle stellten wir fest, dass eine solche Mischung (Ontogenin und bindende Proteide) neue Eigenschaften gewinnt: sie stimuliert spezifisch, beschleunigt die Entwicklung der betreffenden Stadien (Verkürzung der Entwicklungszeit um 20-62%), erzeugt Hypertrophie der entsprechenden Embryonalteile. Das aus einem bestimmten Embryonalteil gewonnene Ontogenin hemmt dagegen vor allem die Entwicklung eben dieses Teiles (Fig. 1).

Mit chromatographischen Methoden wurden chemisch reine Ontogenine erhalten, mit denen einige physico-chemische Veränderungen während dieser Reaktion verfolgt werden konnten. Das Mischen und Schütteln der Lösung wurde in Quarzküvetten ausgeführt, so dass mehrmals das UV-Spektrum aufgenommen werden konnte. Gleichzeitig wurden jeweils Proben entnommen, die nach Entfernung der Proteide zur chromatographischen Analyse verwendet wurden (Lösung: Isopropanol:HCl).

Die Veränderungen der UV-Spektren in Ontogenin-Proteid-Mischungen zeigten (Fig. 2), dass schon 45 min nach Mischung das Ontogenin aus der Lösung verschwindet (das charakteristische UV-Spektrum ist nicht mehr vorhanden, der chromatographische Streifen, der die Ontogeninaktivität trägt, wird inaktiv). Reagiert das Ontogenin mit DNS-Proteid aus jüngeren Stadien, so bleibt nur das Proteid mit gebundenem Ontogenin in der

¹ E. J. BOELL, Ann. New York Acad. Sci. 49, 773 (1948).

² K. WADDINGTON, in *The Physics and Chemistry of Life* (New York 1958).

³ G. K. RUSSEW, C. R. Acad. Bulg. Sci. 9, 97 (1956).

⁴ G. K. RUSSEW, Exper. 16, 329 (1960).

⁵ G. K. RUSSEW, J. obstei biologii 21, 130 (1960).

⁶ G. K. RUSSEW, C. R. Acad. Bulg. Sci. 10, 415 (1957).

⁷ A. E. MIRSKY and A. W. POLLISTER, J. gen. Physiol. 30, 117 (1946).

⁸ I. M. GULLAND, D. JORDON, and C. THREFFALL, J. chem. Soc. London 1947, 1129.

Reaktion zwischen Ontogenin 10 und den Proteiden im Zeitpunkt der Ontogenin-Abscheidung

Ontogenin	Zeit der Ontogeninabscheidung (h Embryonal- alter)	Reaktion der Ontogenine mit Proteiden, die aus den Keimen im Augenblick des Auftretens der entsprechenden Ontogenine isoliert werden											
		äußeres Keimblatt			Dotterzellen			dorsale Lippe des Urmunds					
		RNP DNS	DNP Pr	Frak- tion III	RNP DNS	DNP Pr	Frak- tion III	RNP DNS	DNP Pr	Frak- tion III			
10 ^a Dotterzellen	40.00-42.30	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
10 ^a äußeres Keimblatt	40.50-41.30	x	+	+	-	+	-	+	-	x	+	-	x
10 ^a dorsale Lippe des Urmunds	41.00-42.15	-	-	-	x	+	-	-	-	+	-	x	+
10 ^a Dotterzellen	44.30-45.30	-	-	-	-	x	+	+	-	-	-	-	-
10 ^a dorsale Lippe des Urmunds	48.40-49.10	-	-	-	-	-	-	-	-	x	+	+	-
10 ^a Dotterzellen	49.00-49.35	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	x	+
10 ^a äußeres Keimblatt	49.30-50.00	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-

1,0 ml Ontogeninlösung (20 biologische Einheiten) + 0,4 ml Lösung der Fraktionen (Menge 2 Keimen entsprechend). RNP Ribonucleinsäureproteide, DNP Desoxyribonucleinsäureproteide, DNS Desoxyribonucleinsäure, Pr entsprechende Proteine. Fraktion III Dotterteil, in Salzlösung unlöslich. + Bindung des Ontogenins (Verschwinden der Wirkung des Ontogenins in der Mischung). - keine Bindung. Das Ontogenin wirkt in der Mischung. x das Gemisch stimuliert spezifisch (Ontogenbildung).



Fig. 1. Spezifisch embryogenetische Wirkung von Stadium-Ontogeninen und Ontogenen, 125 h Embryonalalter. a) Kontrolle, normal entwickelt. b) Als Neurula in Ontogenin 16 Kopf gebracht, Entwicklung gestoppt, Kopf nicht entwickelt. c) Beschleunigte und hypertrophierte Kopfentwicklung in Ontogenin 16 Kopf. d) Als Neurula in Ontogenin 16 Neuralrohr gebracht, nicht entwickelt. e) Hypertrophische Entwicklung der Axialorgane in Ontogenin 16 Neuralrohr.

Lösung. Nach Reaktion des Ontogenins mit Proteid des gleichen Stadiums tritt 75 min nach Mischung in der Lösung eine neue Substanz auf, die wir Ontogenen nennen, charakterisiert durch Rf-Wert und UV-Spektrum⁹. Gleichzeitig erhält die Lösung neue biologische Stimulationseigenschaften.

Die Ontogenine wirken nicht nur in den Zellen, in welchen sie gebildet werden, sondern dringen auch in die benachbarten Zellen ein. Diese Beeinflussung der Umgebung ist besonders stark im Anfang der Gastrulation (Tab.).

Die Tatsache, dass die Ontogenine am häufigsten im Dotter gebildet werden, ausserdem der Umstand, dass fast immer eine Abgabe der Ontogenine aus den dotterreichen vegetativen, entodermalen Teilen an die übrigen Keimteile festzustellen ist, sprechen dafür, dass der Ontogenin-Austausch sehr wahrscheinlich als Ausdruck der Mobilisierung des inerten Dotters und seiner Einbeziehung in die Struktur der aktiven Proteide zu werten ist.

Summary. The autor studied the reaction of stage ontogenins with different proteids, isolated from the embryos at the moment of formation of the respective ontogenin. Not all fractions (least of all the yolk) fix the ontogenins. The DNA-proteids fix them; such a mixture specifically stimulates the development. In these mixtures, new substances are discovered: Ontogens.

G. K. Russew

Medizinisches Forschungsinstitut und Institut für Morphologie an der Bulgarischen Akademie der Wissenschaften, Sofia (Bulgarien), 27. September 1960.

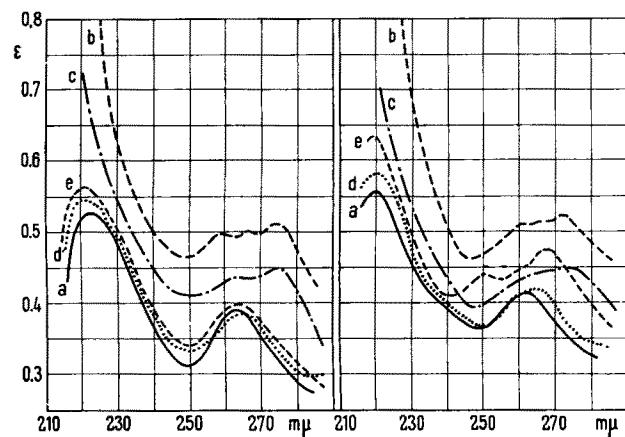


Fig. 2. UV-Spektren bei der Reaktion zwischen Ontogenin 3 und DNS-Proteiden (19°C). Links: a) Reine DNS-Proteide vom Stadium 2/2. b) Reine DNS-Proteide + Ontogenin 3 im Moment der Mischung, Rf bei Ontogenin-Wirkung = 0,59. c) Das gleiche nach 15 min (Rf = 0,59). d) Das gleiche nach 45 min (wird inaktiv). e) Das gleiche nach 75 min (bleibt inaktiv). Rechts: a) Reine DNS-Proteide vom Stadium 3. b) Reine DNS-Proteide + Ontogenin 3 im Moment der Mischung, Rf bei Ontogenin-Wirkung = 0,59. c) Das gleiche nach 15 min (Rf = 0,59). d) Das gleiche nach 45 min (wird inaktiv). e) Das gleiche nach 75 min (Rf bei stimulierender Aktivität von Ontogen 3 = 0,13).

⁹ G. K. RUSSEW, C. R. Acad. Bulg. Sci. 13, 459 (1960).

Artbastarde in der Gattung *Tilapia* (Cichlidae, Teleostei) und ihr Verhalten

Unlängst hat WHITEHEAD¹ in Kenia Tilapien gefunden, die er als Bastarde von *T. zillii* und *T. nigra* anspricht. TREWAVAS und GREENWOOD² bezweifeln die Bastardnatur dieser Formen und halten sie für *T. leucostica*. Wir selbst haben nach eingehenden Vorstudien eine Methode der künstlichen Kreuzung entwickelt und mit dieser von mehreren *Tilapia*-Arten voll lebensfähige Bastarde erhalten. *Tilapia*-Hybriden sind für die Verhaltensforschung besonders in den Fällen von Interesse, in denen sich die Stammformen ethologisch sehr weitgehend unterscheiden: ein Elternteil etwa Substratlaicher, der andere Maulbrüter ist. Wir beschränken uns im folgenden auf einige Bemerkungen über das Verhalten von Bastarden

T. mossambica (Maulbrüter) ♂ × *T. tholloni* (Substratlaicher) ♀ im Jugendstadium, im Vergleich zu dem Verhalten der Elternarten.

Bei den substratlaichenden Tilapien behüten beide Eltern gemeinsam die Jungbrut, die längere Zeit mit ihnen umherwandert. Bei den Maulbrütern nimmt ein Elterntier, und zwar bei den meisten Arten das Weibchen, das Gelege in die Mundhöhle auf. Zu Ende der Embryonalzeit

¹ P. J. WHITEHEAD, Nature 187, 878 (1960).

² E. TREWAVAS und P. H. GREENWOOD, Nature 188, 868 (1960). – Bezuglich der Mitteilung von A. YASHOV und J. CHERVINSKY, *Hybrids of Tilapia nilotica and T. galilaea*, Nature 184, 1739 (1959) ist zu sagen, dass es Herr Dr. YASHOV nachträglich doch für nicht genügend gesichert hält, dass tatsächlich Bastarde vorgelegen haben (persönliche Auskunft).