

Über das Verhalten der Nucleinsäure bei der Furchung des Seeigeleis.

Von
Ernst Masing.

(Aus der Zoologischen Station Neapel, beendigt in der Medizinischen Klinik Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 4. Juni 1910.)

Das unbefruchtete reife Seeigelei ist eine Kugel von annähernd 0,1 mm Durchmesser; der Durchmesser des Kernes ist 8—10mal kleiner, also etwa $\frac{1}{100}$ mm groß. Die Volumina von Kern und Protoplasma verhalten sich, wie Godlewski¹⁾ fürs Echinusei berechnet hat, wie 1 : 550. Bei der Befruchtung vergrößert sich die vorhandene Kernmasse um den Betrag des Spermatozoenkopfes, die Chromatinmenge verdoppelt sich.

Aus Boveris bekannten Arbeiten²⁾ geht hervor, daß die Größe der Kerne und der Chromosomen während der Furchungsperiode sich nicht wesentlich ändert, daß also die sichtbare Kernmasse sich etwa proportional der zunehmenden Kernzahl vermehren muß. Spätere Beobachtungen zeigen allerdings, daß die Kerngröße,³⁾ vielleicht auch die Chromosomengröße⁴⁾ mit fortschreitender Furchung abnimmt (Godlewski, Rh. Erdmann) und von der Temperatur,⁵⁾ der Alkalinität und dem

¹⁾ «Plasma und Kernsubstanz in der normalen und der durch äußere Faktoren veränderten Entwicklung der Echiniden», Archiv f. Entwicklungsmechanik, Bd. XXVI, S. 284.

²⁾ «Zellenstudien», Heft 5, Jena 1905.

³⁾ Godlewski, l. c., S. 289.

⁴⁾ Rh. Erdmann, «Exp. Untersuchung der Massenverhältnisse von Plasma, Kern und Chromosomen in dem sich entwickelnden Seeigelei», Archiv f. Zellforschung, Bd. II, S. 89.

⁵⁾ Marcus, «Über die Wirkung der Temperatur auf die Furchung bei Seeigeleiern», Archiv f. Entw.-Mechanik, Bd. XXII, S. 445; siehe ferner Godlewski und Rh. Erdmann.

osmotischen Druck des umgebenden Mediums, d. i. des Seewassers, abhängig ist.

Sicher ist jedenfalls eins, daß auch trotz aller Einschränkungen, die das Boverische Gesetz vielleicht erfahren muß, während der Furchung das Gesamtvolumen der Kerne und die Chromatinmenge sehr erheblich wachsen muß. Im Blastulastadium macht die Kernmasse etwa $\frac{1}{6}$ der des Keimes aus (Godlewski), die «Kernplasmarelation» (R. Hertwig) ist 1:6, hat sich also gegen das Ruhestadium des Eis fast ver Hundertfach. Es liegt natürlich nahe, zu fragen, woraus sich diese Kernmassen bilden.

Wenn auch meines Wissens keine direkten Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung des Eikernes bekannt geworden sind, so ist doch immer mit gutem Grunde angenommen worden, daß sie der des Spermakerns mindestens ähnlich ist. Nach den Miescher-Schmiedeberg'schen¹⁾ Analysen bestehen die Spermatozoenköpfe des Lachses nach Abzug des etwa 1% betragenden Alkohol-Ätherextraktes zu 96% aus Nucleinsäure (60,5%) und Protamin (35,5%).

Es darf somit mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß das abgefurchte Ei nucleinsaures Protamin oder ähnliche Verbindungen der Nucleinsäure gebildet hat.

Andererseits scheinen alle bisherigen Untersuchungen darauf hinauszulaufen, daß das reife, ungefurchte Ei nur äußerst wenig Nucleinsäure enthalten könne, schätzungsweise entsprechend der Größe des relativ so kleinen Eikerns.

Miescher²⁾ glaubte seinerzeit freilich im Dotter des unbebrüteten Hühnereis Nucleinverbindungen in größerer Menge gefunden zu haben; doch hat er selbst diese Ansicht aufgegeben,³⁾ als Kossel⁴⁾ zeigte, daß die «Albuminphosphorsäure» des Dotters von den «echten Kernnucleinen» scharf zu trennen sei. Am befruchteten und gefurchten Insektenei (Seiden-

¹⁾ Die histochemischen und physiol. Arbeiten von F. Miescher, Leipzig 1897, Bd. II, S. 407.

²⁾ l. c. S. 29.

³⁾ l. c. S. 309.

⁴⁾ «Weitere Beiträge zur Chemie des Zellkerns», Diese Zeitschrift, Bd. X, S. 246 ff.

spinner) konnte Tichomirow¹⁾ nur Spuren von Nucleinbasen nachweisen. Vermißt wurden sie in Fischeiern von Walter,²⁾ Hugounenq³⁾ sowie neuerdings von Linnert.⁴⁾

Aus neuerer Zeit liegen ferner Untersuchungen von Plimmer und Scott⁵⁾ vor, die die einzelnen Phosphorverbindungen von Fischrogen und Hühnereiern bestimmten. Im Caviar gelang es nicht, Nucleoproteide nachzuweisen, wenn auch die Autoren ihr Vorhandensein für sehr wahrscheinlich halten.⁶⁾ Im Hühnerei fand sich nach Entfernung des Vitellinphosphors noch ein geringer P-Rest, der als Nuclein-P angesehen werden mußte.

In einer weiteren Arbeit von Plimmer und Scott⁷⁾ wird der Nuclein-P des unbebrüteten Hühnereis mit 1,9% des Gesamt-P berechnet. Etwas Adenin und Guanin in Fischeiern wiesen Levene und Mandel⁸⁾ nach.

Die bisherigen Untersuchungen legen also den Schluß nahe, daß das ungefurchte Ei Nucleinsäure in irgendwie beträchtlicher Menge nicht enthalten kann; die positiven Befunde am Hühnerei (Plimmer und Scott) sprechen deswegen nicht dagegen, weil das unbebrütete Hühnerei bekanntlich schon befruchtet und gefurcht ist.

Wenn wir diesen Ergebnissen die Tatsache gegenüberstellen, daß die sichtbare Kernmasse des Seeigeleis im Laufe von 16—24 Stunden ums hundertfache wächst, so wird uns die Sicherheit verständlich, mit der Jacques Loeb⁹⁾ als

¹⁾ «Chem. Studien über die Entwicklung der Insekteneier», Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 518.

²⁾ «Zur Kenntnis des Ichtulins und seiner Spaltungsprodukte», Diese Zeitschrift, Bd. XV, S. 477.

³⁾ Comptes rendus, Bd. CXXXVIII, S. 1062, zitiert nach Linnert.

⁴⁾ «Enthält der Caviar Purinbasen?» Biochem. Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 209.

⁵⁾ «A Reaction distinguishing Phosphoprotein from Nucleoprotein and the Distribution of Phosphoprotein in Tissues.» Transactions of the Chem. Society, 1908, Vol. XCIII, II, S. 1699.

⁶⁾ Die Angabe, daß im Wasserextrakt nach Abzug des anorg. P sich Nucleinsäure- («Nucleic Acid») Phosphor vorfand, bezieht sich wohl auf Inosinsäure, Glycerinphosphorsäure und ähnliche wasserlösliche organische P-Verbindungen.

⁷⁾ «The Transformations in the Phosphorus compounds in the Hen's egg during Development.» Journ. of physiology, Bd. XXXVIII, S. 247.

⁸⁾ «Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren.» Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 262.

⁹⁾ «Dynamik der Lebenserscheinungen», Leipzig 1906, S. 100. —

chemisches Korrelat für die morphologischen Veränderungen eine Nucleinsynthese bei der Furchung des Eis postuliert, und zwar stellt sich Loeb weiter vor, daß das Lecithin des Cytoplasmas einen Teil der Bausteine für diese Synthese liefert.

Abgesehen von den Sauerstoffmessungen O. Warburgs¹⁾ wissen wir aber nichts Tatsächliches über die chemischen Umsetzungen bei der Furchung.

Angaben über Verschiebungen der chemischen Zusammensetzung bei der Entwicklung von Hühner- und Insektenembryonen machen Tichomiroff,²⁾ Kossel,³⁾ Plimmer und Scott.⁴⁾ Während das unbebrütete Hühnerei nach Kossel keine Nucleinbasen, nach Plimmer und Scott etwa 1,9% des Gesamt-P als Nuclein-P enthält, waren im 30 g schweren Embryo schon Basen sicher nachweisbar und das ausgekrochene Hühnchen enthielt 12% als Nuclein-P. Analoge Zahlen fand Tichomiroff²⁾ für die Entwicklung des Seidenspinners. Diese Resultate erstrecken sich allerdings nicht auf die Periode der Furchung, da die Autoren es schon mit gefurchten Eiern zu tun hatten, sind aber doch geeignet, Loeb's Ansicht von der Nucleinsynthese zu stützen.

Ich hatte mir die Aufgabe gestellt, nachzuweisen, aus welchen Substanzen des sich furchenden Eis sich die Kerne bilden. Da nun der chemisch am besten charakterisierte Kernbestandteil die Nucleinsäure ist, so mußte die Frage zunächst lauten: woher kommt die Nucleinsäure der neugebildeten Kerne?

Gab es dabei eine Nucleinsynthese, so mußte das abgefurchte Ei mehr Nucleinsäure enthalten als das ungefurchte. Aus der dann zu erwartenden Abnahme anderer Substanzen — es kamen in erster Linie phosphorhaltige in Betracht — müßten sich auch Hinweise auf die Herkunft der Nucleinsäure ergeben.

Ich habe größere Mengen von Seeigeleiern (*Arbacia pustulosa*) befruchtet und einen Teil unmittelbar nach der

«Über den chem. Charakter des Befruchtungsvorgangs und seine Bedeutung für die Theorie der Lebenserscheinungen.» Vorträge über Entw.-Mechanik, Heft 2, Leipzig 1908. — «Die chem. Entwicklungserregung des tierischen Eis.» Berlin 1909, S. 13 ff.

¹⁾ «Beobachtungen über die Oxydationen im Seeigelei.» Diese Zeitschrift, Bd. LVII, S. 1.

²⁾ l. c.

³⁾ l. c.

⁴⁾ «The Transformations usw.», l. c.

Membranbildung in Alkohol konserviert; der Rest entwickelte sich bis zum Morulastadium (annähernd 500–1000 Zellen) und kam dann ebenfalls in Alkohol. Beide Portionen wurden in unten angegebener Weise weiter verarbeitet. Es stellte sich bald heraus, daß ich mich auf die Bestimmung des Nucleinphosphors und der Purinbasen beschränken konnte.

Methodik.

Es braucht nicht lange erörtert zu werden, daß Echinodermeneier das günstigste Objekt zur Entscheidung solcher Fragen sind, denn erstens lassen sie sich in großer Menge beschaffen, zweitens ist der Grad der Entwicklung jederzeit einfach zu kontrollieren, endlich ist die Dottermasse gering, so daß quantitative Verschiebungen der einzelnen Komponenten gegeneinander verhältnismäßig leicht nachzuweisen sind. Die relativ so große Menge Nahrungsdotter des Fisch- oder Amphibieneis, die während der ersten Entwicklungsstadien wahrscheinlich nahezu unverändert bleibt, wird natürlich die Verfolgung von Veränderungen des «Bildungsdotters» sehr erschweren.

1. Behandlung der Eier.

Sie wurden nach der Vorschrift von Lyon¹⁾ gewonnen und in Schalen aufgefangen; die Ovarien außerdem herausgenommen und mit Seewasser geschüttelt, dann alles durch Gaze geseit und die Eier durch Absitzenlassen und mehrfaches Wechseln des Wassers gründlich gewaschen.

Befruchtet wurde in größeren Gefäßen und zwar durch reichlichen Spermazusatz, so daß jedes Ei immer von zahlreichen Spermatozoen umschwärmt war. Sobald die Membranbildung deutlich war, wurde der Gesamtvorrat in 2 Teile geteilt, der eine sofort absitzen lassen, zentrifugiert und mit heißem Alkohol behandelt, während der zweite sich noch 9–12 Stunden lang entwickeln mußte, bis er ebenfalls in Alkohol kam. Ich will hierbei bemerken, daß es wichtig zu sein scheint, bei großen Materialmengen in sehr großen Gefäßen und in möglichst viel Seewasser zu befruchten; die Furchung gelang am besten, wenn die Eier in einfacher Schicht in weiten Schalen sich entwickeln konnten. In dickerer Schicht und mit Apparaten, die das Sedimentieren verhindern sollten, habe ich eine gleichmäßige Entwicklung nicht erzielt.

2. Bestimmung des Nucleinphosphors.

Die sedimentierten Eier wurden mit einem etwa 6fachen Volumen heißen 96%igen Alkohols übergossen, nach 12 Stunden der Alkohol abgosaugt, 3 mal mit heißem Alkohol und 3 mal mit kochendem Äther (a)

¹⁾ American. Journ. of Physiol., Bd. IX, S. 308.

gewaschen; ich habe mich mehrfach davon überzeugt, daß sich nach dieser Vorbehandlung oft noch Spuren des roten Farbstoffes, aber kein P mehr extrahieren ließ. Wenn die Phosphatide mitbestimmt werden sollten, wurde der Alkohol des Extrakts im Vakuum abdestilliert, der Rückstand mit Äther erschöpft und dieser Ätherextrakt mit dem obigen (a) vereinigt. Der Rest des Rückstandes war immer fast vollständig in 1%iger HCl löslich und enthielt P.

Durch die Alkohol-Ätherbehandlung werden die Eier in ein feines rotes Pulver verwandelt. Zur Entfernung des wasserlöslichen P wurde das Pulver mit der etwa 25fachen Menge 1%iger HCl verrieben, 1 Stunde lang in verschlossenem Glasgefäß auf einer Drehscheibe gedreht, um das Absetzen zu verhindern.

Dann wurde das nur wenig gequollene Pulver durch Zusatz von 20—25% Magnesiumsulfat ausgesalzen, die Flüssigkeit abgesaugt und der Rückstand mehrfach mit saurer Magnesiumsulfatlösung, Alkohol und Äther gewaschen; hierbei gibt es noch reichlich Farbstoff, zum Schluß aber keinen P mehr ab und verwandelt sich in ein ganz schwach rotes feines Pulver, das nur noch Phosphoprotein- (Vitellin-, Nucleoalbumin-) P und Nuclein-P enthalten konnte.

Die Weiterbehandlung geschah nach den Vorschriften von Plimmer und Scott,¹⁾ nach deren Untersuchungen 1% NaOH bei 37° in 24 Stunden allen Protein-P in anorganischen verwandelt, den Nuclein-P aber nicht abspaltet.

Es wurde also je 1 g der gepulverten Eiersubstanz in 100 ccm 1%iger NaOH im Wärmeschrank bei 37° etwa 24 Stunden gespalten, wobei die Hauptmenge des Pulvers sich löst, dann 10 ccm zur N-Bestimmung (Kjeldahl) entnommen, der Rest von 90 ccm mit Essigsäure stark angesäuert, der ausgefallene Niederschlag²⁾ abzentrifugiert, die noch trübe Flüssigkeit mit starkem NH₃ vollständig geklärt, etwa $\frac{1}{3}$ Volumen ammoniakalischer Magnesiamischung zugesetzt zur Ausfällung des eventuell nicht ganz entfernten und des abgespaltenen anorganischen P. Ich will hier gleich bemerken, daß nach 24-stündigem Stehen zuweilen ein kleiner Niederschlag(*) ausfiel, der aber stets nur Spuren von P beim Veraschen gab. Ich habe mich ferner davon überzeugt, daß zugesetzter anorganischer P hierbei quantitativ ausgefällt wurde.³⁾ Hieraus geht also hervor, daß

1) «A Reaction etc.», l. c.

2) Er enthielt nie mehr als Spuren von P.

3) Beleg: Es wurden 2 ccm einer annähernd $\frac{n}{10}$ -KH₂PO₄-Lösung zu 100 ccm Lösung von Eiersubstanz zugesetzt und mit Magnesiamischung gefällt, der abfiltrierte und gewaschene Niederschlag zusammen mit dem Filter verascht. Die P-Bestimmung ergibt 11,7 ccm $\frac{n}{2}$ -NaOH, während 2 ccm derselben P-Lösung direkt mit Ammonmolybdat gefällt 11,4 ccm $\frac{n}{2}$ -NaOH gaben.

die Entfernung des anorganischen P bei der HCl-Extraktion als gelungen zu betrachten ist und daß das Arbaciaei keinen mit NaOH abspaltbaren P, also kein Phosphoprotein enthält.

Blieb die Flüssigkeit klar, so wurde sie direkt verascht und der darin enthaltene P als Nuclein-P angesehen; wenn der erwähnte Niederschlag (*) entstand, so wurde er abfiltriert und das Filtrat verascht.

Alle Phosphorbestimmungen geschahen nach Veraschung mit dem Neumannschen Säuregemisch nach Neumanns¹⁾ alkalimetrischer Methode, mit den Modifikationen von Plimmer und Bayliss.²⁾ Titriert wurde mit $\frac{n}{2}$ -NaOH und $\frac{n}{2}$ -H₂SO₄, wobei 1 ccm 1.268 mg P₂O₅ = 0,553 P entspricht; die Fehler betragen höchstens \pm 0,5 ccm $\frac{n}{2}$ -NaOH.

3. Bestimmung der Purinbasen.

Ich hielt mich genau an die Vorschriften von Burian und Hall³⁾ und fällte nach geeigneter Vorbehandlung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung. Da die Basenbestimmung mehr den Zweck einer Kontrolle der Nuclein-P-Bestimmungen hatte, so glaubte ich mich mit der «Hauptfällung» begnügen und auf die «Korrekturfällung» verzichten zu können. Die einmal ausgeführte «Korrekturfällung» ergab übrigens keine Spur von Niederschlag. Es waren also alle Purinbasen bei der «Hauptfällung» ausgefallen.

Von den in der angegebenen Weise angestellten Versuchen möchte ich folgende kurz wiedergeben.

1. Unbefruchtete Eier.

Nach Ätherextraktion und Entfernung des salzsäure-löslichen P enthält etwa 0,9 g trockenes Pulver 3,3 mg Nuclein-P (abgelesen 6,0 $\frac{n}{2}$ -NaOH).

2. Unbefruchtete Eier.

1 g vorbehandelte Substanz enthält 3,4 mg Nuclein-P (abgelesen 6,2 $\frac{n}{2}$ -NaOH) und 95 mg N (abgelesen 6,8 ccm $\frac{n}{10}$ -H), also auf 0,1 g N — 3,6 mg P. Die Magnesiafällung gab keine Trübung.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 129.

²⁾ «The Separation of Phosphorus from Caseinogen by the Action of Enzymes and Alkali.» Journ. of Physiology, Bd. XXXIII, S. 439.

³⁾ «Die Bestimmung der Purinstoffe in tierischen Organen mittels der Methode des korrigierten Wertes.» Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 336.

Aus diesen Versuchen geht zunächst hervor, daß unbefruchtete Arbaciaeier reichlich weder in Äther noch in HCl löslichen, noch mit 1%iger NaOH abspaltbaren P, also offenbar Nuclein-P enthalten. Protein-P war nicht nachweisbar.

3. Befruchtete Eier. Ein beträchtlicher Teil der Eier hatte keine Membranen gebildet, wohl weil die Suspension der Eier in Seewasser zu dick war.

a) Ungefurchte Eier. 1 g Substanz enthält 4,1 mg Nuclein-P (abgelesen 6,9 $n_{1/2}$ -NaOH) und 99,4 mg N, also pro 0,1 g N — 4,1 mg Nuclein-P. Kein mit 1%iger NaOH abspaltbarer P.

b) Gefurchte Eier. Expositionsdauer 9 Stunden, Zimmertemperatur: es entwickelte sich nur etwas über die Hälfte der Eier bis zum Morulastadium, während der Rest ungefurcht blieb.

1 g Substanz enthält 3,3 mg (abgelesen 5,6 $n_{1/2}$ -NaOH), eine weitere Bestimmung ergab 3,1 mg (abgelesen 5,3 $n_{1/2}$ -NaOH) Nuclein-P und 82,6 mg N, also auf 0,1 g N 3,9 resp. 3,7 mg Nuclein-P.

Aus 3,5 g Substanz (Gemisch von unbefruchteten und ungefurchten Eiern) läßt sich ein beträchtlicher Purinbasensilberniederschlag gewinnen.

4. Eine größere Menge Eier wird in einem 4 l-Gefäß befruchtet; fast alle Eier (90—95%) bilden Membrane. Die größere Hälfte wird nach passendem Zusatz von NaCN zur Sistierung der Kernbildung sedimentiert, zentrifugiert und wie oben weiterbehandelt und ergibt schließlich etwa 3,5 g Substanz.

Die kleinere Hälfte wird z. T. in einem großen Gefäß in Seewasser suspendiert; durch eine besondere auf der zoologischen Station gebrauchte Vorrichtung wird das Wasser zur Sättigung mit Sauerstoff immer in Bewegung gehalten; trotzdem setzten sich die Eier teilweise ab. Nach 13 Stunden Zusatz von NaCN; die Weiterbehandlung in der gewöhnlichen Weise ergibt etwa 2 g Substanz. Die Mehrzahl der Eier hatte sich bis etwa zum 500-Zellenstadium entwickelt; doch fanden sich auch zahlreiche weniger entwickelte, einzelne waren sogar im 2- und 4-Zellenstadium geblieben. Augenscheinlich hatte doch die spontane Sedimentierung durch Sauerstoffmangel eine gleichmäßige Entwicklung verhindert.

Der zweite Teil der zweiten Hälfte wird in dünner Schicht auf 20 große Schalen verteilt und entwickelt sich gleichmäßig im Laufe von 13 Stunden bis zu einem vorgeschrittenen Stadium, jedenfalls weiter als

die besten der vorigen Portion. Gleiche Weiterbehandlung, die etwa 1 g Substanz ergibt.

Die so gewonnenen Substanzen werden weiter bearbeitet.

A. Bestimmung des Nuclein-P.

a) Befruchtete ungefurchte Eier.

1 g Substanz enthält 3,8 mg Nuclein-P (abgelesen 6,2 $n_{1/2}$ -NaOH) und 92 mg N, also auf 0,1 g N 4,1 mg Nuclein-P.

b) Ungleichmäßig gefurchte Eier.

1 g Substanz enthält 4,0 mg Nuclein-P (abgelesen 6,6 $n_{1/2}$ -NaOH) und 96 mg N, also auf 0,1 g N 4,1 mg Nuclein-P.

c) Gleichmäßig gefurchte Eier.

0,95 g Substanz enthält 4,6 mg (abgelesen 7,5 $n_{1/2}$ -NaOH) Nuclein-P und 101 mg N, also auf 0,1 g N 4,5 mg Nuclein-P.

B. Bestimmung der Purinbasen.

a) 2,9566 g Substanz aus unbefruchteten und befruchteten ungefurchten Eiern (0,1 g = 9,24 mg N) werden nach Burian und Hall verarbeitet. Der Purinsilberniederschlag enthält 12,6 mg N. Der Purin-N beträgt 4,6 % des Gesamt-N (0,2731 g), auf 0,1 g N kommen also 4,6 mg Purin-N.

b) 1,7214 g Substanz aus gefurchten Eiern (Gemenge von mehreren Versuchen, darunter auch die ungleichmäßig entwickelten von Versuch Ab) werden ebenso verarbeitet (0,1 g = 9,66 mg N). Die Silberfällung enthält 7,56 mg N, der Purin-N beträgt wieder 4,6 % des Gesamt-N (0,1632 g), von 0,1 g Gesamt-N sind also 4,6 mg Purin-N.

Wenn ich die Resultate noch einmal kurz zusammenfasse, so enthalten also pro 0,1 g N die unbefruchteten Eier 3,6 mg Nuclein-P, befruchtete ungefurchte 4,1 und 4,1 mg, gefurchte (annähernd 500—1000 Zellenstadium) 3,9, 3,7, 4,1 und 4,5 mg; ferner sowohl ungefurchte als gefurchte pro 0,1 g N 4,6 mg Purin-N.¹⁾

Die Werte des Nuclein-P schwanken um den Mittelwert von 4,0—4,1 mg herum und lassen erkennen, daß von einer

¹⁾ Hierzu will ich bemerken, daß die entwickelten Eier nicht weniger mit Äther und mit HCl extrahierbaren P enthielten als die ungefurchten, und zwar ebensoviel «Lecithin»-P und etwa $1\frac{1}{2}$ mal soviel säurelöslichen P wie Nuclein-P.

Zunahme mit der Kernbildung nicht die Rede sein kann, obgleich doch das Einzellen- und Vielhundertzellenstadium miteinander verglichen werden. Der letzte Wert von 4,5 mg (Versuch A c) ist freilich recht hoch und könnte als Beginn einer «Nucleinsynthese» angesehen werden, zumal es sich gerade um die am weitesten entwickelten Eier handelt. Doch möchte ich in Anbetracht der prozentisch nicht kleinen Versuchsfehler (etwa $\pm 10\%$) eine solche Deutung als ganz unsicher bezeichnen.

Es könnte vielleicht daran gedacht werden, daß durch den Zusatz des so nucleinsäurereichen Sperma bei der Befruchtung eine wesentliche Anreicherung der Eiermasse mit Nucleinsäure stattfindet.

Dagegen spricht aber der Nuclein-P-Gehalt unbefruchteter Eier (Versuch 1 und 2) und der folgende Versuch.

Eine Spermamenge, die größer ist als die beim Versuch 4 verbrauchte, wird verascht und ergibt 1,7 mg Gesamt-P. Die befruchteten Eier des Versuchs 4 ergaben schließlich insgesamt 6,5 g mit Äther und HCl extrahierte Substanz; also pro 1 g Eiersubstanz hätten wir höchstens 0,26 mg P (= 0,4—0,5 ccm $n/4$ -NaOH) Spermaphosphor, was schon beinahe in die Fehlergrenzen fällt. Außerdem aber war im Versuch 4 jedes befruchtete Ei noch von zahlreichen überschüssigen Spermatozoen umschwärmt, die beim Sedimentieren und Zentrifugieren der Eier doch z. T. gewaschen werden, wodurch der wirklich mitbestimmte Sperma-P noch viel geringer wird.

Das Seewasser enthält nur Spuren von P,¹⁾ zudem anorganischen, so daß eine Bestimmung von Nuclein-P durch die Anwesenheit von Seewasser nicht gestört wird.

Sollten die Versuche mit ungleichmäßiger Entwicklung der Eier (3 b und A b) beanstandet werden, obgleich trotz der Ungleichmäßigkeit sicher eine 50—100fache Vermehrung der morphologischen Kernmasse bestand, so verweise ich auf den letzten, reinen Versuch (A c), der auch keine deutliche und jedenfalls keine der gebildeten Kernmasse proportionale Vermehrung des Nuclein-P zeigt.

Bemerkenswert ist auch die Menge und das Verhalten der Purinbasen. Nach der Burianschen Formel²⁾ der Sperm nucleinsäure kommen auf 2 Moleküle P_2O_5 je 1 Molekül Adenin und Guanin, also auf 4 P — 10 Atome Purin-N oder auf 4,6 mg Purin-N — 4,0—4,1 mg P; genau so viel beträgt auch der

¹⁾ 150 ccm Seewasser mit dem Säuregemisch eingedampft geben mit Ammonmolybdat und NH_4NO_3 nur einen minimalen gelben Niederschlag.

²⁾ Burian, «Chemie der Spermatozoen», Asher-Spiros Ergebnisse der Physiol., V. Jahrg. 1906, S. 802, 803.

Durchschnitt meiner Bestimmungen. Auch die Purinbasen haben sich bei der Entwicklung der Eier nicht vermehrt.

Daß der Nuclein-P und die Basen im vorliegenden Falle nicht getrennt voneinander da sind, wird durch die Überlegung wahrscheinlich gemacht, daß freie oder locker gebundene Purinbasen wohl bei der HCl-Extraktion der Eier mit entfernt worden wären. Daß der P wirklich Nuclein-P ist, beruht auf der Voraussetzung, daß keine andere P-Verbindung bekannt ist, die gleiches Verhalten zeigt, wird aber auch durch die quantitative Übereinstimmung mit der Menge der Purinbasen nahegelegt.

Es ergibt sich also erstens mit der größten Wahrscheinlichkeit, daß das ungefurchte Seeigeelei eine relativ bedeutende Menge Nucleinsäure enthält, und zwar offenbar im Protoplasmaleibe, denn es ist wohl ausgeschlossen, daß der Eikern, der den Wert eines Spermatozoenkopfes hat, eine so beträchtliche Menge beherbergen kann. Zweitens ergibt sich, daß bei einer Vermehrung der Kernmasse annähernd ums 100fache der Nucleinsäuregehalt des Eis nicht merklich zunimmt. In diesen Sätzen liegt auch die Antwort auf die am Eingang gestellte Frage, daß nämlich die Nucleinsäure der Furchungskerne aus dem im Eiplasma präformierten Vorrat stammen muß.

Es wird auf den ersten Blick überraschen, daß bei der Bildung von vielen hundert Kernen keine tiefer greifenden chemischen Umwandlungen an dem Hauptbestandteil der Kerne, der Nucleinsäure, nachweisbar sind. Ich erinnere hierbei an Warburgs¹⁾ Bestimmungen des Gaswechsels befruchteter Eier: der Sauerstoffverbrauch nahm im Verlauf der Furchung zu, aber keineswegs proportional der Zahl der Kerne, sondern in viel geringerem Maße. Wir müssen offenbar von der Vorstellung abgehen, daß die prägnantesten sichtbaren Umwälzungen unbedingt auch von besonders eingreifenden chemischen Umsetzungen begleitet werden.

Bei der Furchung wächst die Vermehrung der Kerne mit der Kernzahl. Dieser Vorgang erinnert an autokatalytische Prozesse, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit auch mit der Zunahme der Reaktionsprodukte wächst. Unter der Voraus-

¹⁾ l. c.

setzung, daß eine Nucleinsynthese stattfindet, ist nun der Versuch gemacht worden, die Vermehrung der Kerne als autokatalytische Reaktion zu deuten.¹⁾ Diese Vorstellung wird aber revisionsbedürftig durch den Nachweis von präformierter Nucleinsäure.

Aus diesem Resultat geht ferner mit Evidenz hervor, daß Nucleinsäure und das Chromatin der Histologen verschiedene Dinge sein müssen. Wenn auch wirklich die Größe der Chromosomen (Rh. Erdmann) abnehmen sollte, so bleibt die Gesamtvermehrung des Chromatins bei der Furchung doch unbestreitbar.

Weiter scheint mir, daß der Nucleinsäuregehalt des Cytoplasmas eine Bedeutung gewinnen könnte für einige Vererbungshypothesen. Godlewski²⁾ ist es anscheinend gelungen, kernlose Fragmente von Echinideneiern mit Crinoidensperma zu befruchten und zur Entwicklung zu bringen; die Larven hatten exquisit mütterliche Charaktere. Daraus folgert Godlewski, daß bei der Übertragung mütterlicher Eigenschaften Kern und Plasma eine Rolle spielen. Nun eröffnet sich aber die Möglichkeit, daß beim Godlewskischen Versuch die im Plasma enthaltenen Kernstoffe die Übertragung vermittelten.

Ein solcher Erklärungsversuch hätte freilich noch die Schwierigkeit zu überwinden, warum bei normaler Entwicklung trotz der so verschiedenen Nucleinsäuremengen der Samenzelle und des Eis sich väterliche und mütterliche Eigenschaften in annähernd gleicher Weise vererben.

Es ist viel darüber diskutiert worden, warum der Furchungsprozeß schließlich stille steht und nicht ins Ungemessene fortschreitet. Die meisten Anhänger hat wohl die Ansicht gefunden, daß die Furchung aufhört, wenn ein bestimmtes Größenverhältnis zwischen Kern bzw. Chromatinmenge und dem Protoplasma der einzelnen Zelle erreicht ist (Hertwig, Boveri,

¹⁾ Cf. Besonders J. Loeb, «Über den chem. Charakter usw.», l. c., S. 24; «Die chem. Entwicklungserregung usw.», l. c., S. 219 ff; ferner auch Ostwald, Vortr. über Entwicklungsmechanik, H. 5, Leipzig 1908 und Robertson, Arch. f. Entwicklungsmechanik, Bd. XXV, S. 581 und Bd. XXVI, S. 108.

²⁾ «Untersuchungen über die Bastardierung der Echiniden- und Crinoidenfamilie», Archiv f. Entwickel.-Mechanik. Bd. XX, S. 628.

J. Loeb). Ich möchte hier auf die Möglichkeit hinweisen, daß vielleicht der Nucleinsäurevorrat des Eiplasmas hierbei in Betracht kommt; die Furchung würde danach solange dauern, als dieser Vorrat reicht. Godlewskis¹⁾ Messungen ergeben auch tatsächlich, daß das Gesamtvolumen der Kerne im Blastulastadium von äußeren Faktoren, die die Zellzahl und die Kerngröße erheblich beeinflussen, anscheinend unabhängig ist. Doch bedarf die geäußerte Vermutung noch der experimentellen Bestätigung.

Ich schulde den Herren O. Warburg, R. Burian und M. Henze vielen Dank für die stets in freundlichster Weise gewährte Unterstützung.

Heidelberg, Juni 1910.

¹⁾ «Plasma und Kernsubstanz usw.», l. c. S. 294 ff.
