

Untersuchungen über die Zusammensetzung der Desoxyribonucleinsäure aus den reifen Spermatozoen von Seegurken

Von RUDOLF K. ZAHN, ANNESUSE DOCTER

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt am Main

und HANSKURT MÜLLER

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. 13 b, 404—407 [1958]; eingegangen am 19. März 1958)

A method which serves to isolate the gonads from the sea cucumber (*Holothuria polii*) is outlined.

Criteria that will secure a well determined status of maturity of the sperm are given.

From this preparation a deoxyribonucleic acid is made, purified and analysed.

It is concluded that the analytical data are in compliance with the theory of Crick and Watson.

The ratio of Moles $\frac{\text{Adenin} + \text{Thymin}}{\text{Guanin} + \text{Cytosin}} = 1,43$ for this DNA while its nitrogen to phosphorus ratio on weight basis is 1,67.

Die Klasse der Holothurien, die Seegurken oder Seewalzen, gehören zusammen mit den Seeigeln und den Seesternen zu dem Kreis der Echinodermata, den Stachelhäutern. Wir haben für diese Arbeit die in großer Zahl die flachen Buchten der nördlichen Adria besiedelnde Art *Holothuria polii* (warzige Seegurke) verwendet.

Früher haben wir uns mit der Zusammensetzung und den Eigenschaften der Desoxyribonucleinsäure (DNS) aus Heringsspermatozoen beschäftigt¹. Diese Nucleinsäure war mit einem extrem zusammengesetzten Protamin verbunden, in dem auf jede Monoaminosäure zwei Argininmoll. kommen². Hier war das Asymmetrieverhältnis

$$\frac{\text{Adenin} + \text{Thymin}}{\text{Guanin} + \text{Cytosin} + 5\text{-Methylcytosin}} = 1,33.$$

CHARGAFF³ ist der Ansicht, und er weist dafür auch viele Beispiele nach, daß dieser Quotient für die einzelnen Tierarten charakteristisch sei. Die Seeigel, als die den Holothurien nächst verwandte Klasse, haben nun nach der Literatur Asymmetriequotienten von 1,5—1,8^{4,5}. Damit erreichen sie wohl mit die höchsten Werte überhaupt. Die Holothurien-DNS ist

nun — wenn man annimmt, daß die DNS in allen Zellen von Tieren gleicher Art dieselbe chemische Zusammensetzung hat³ — nicht ganz so extrem gebaut wie die der hartschaligen Verwandten. Wir fanden den Quotienten zu 1,43, also immer noch höher als beim Hering. Der Partner der Holothurien-DNS ist ein Histon, das im Vergleich zu anderen Histonen, wenigstens bei vorläufiger qualitativer Bewertung keine Besonderheiten erkennen läßt.

Als DNS-Lieferanten sind die Holothurien angenehme Versuchstiere, da sie leicht zu handhaben sind, zur Entnahme der Gonaden nicht getötet werden müssen und noch dazu innerhalb kurzer Zeit wieder Sperma liefern. Jedoch liegt im letzten Punkt auch eine gewisse Schwierigkeit. Die Tiere bauen die Gonaden sehr leicht auf und im Hunger sehr schnell ab. Damit parallel geht ein Wechsel im DNS-Gehalt und in der DNS-Zusammensetzung. Die DNS eines Tieres stellt offenbar ein Gemisch verschiedener Mol.-Sorten dar, das man fraktionieren kann^{6,7,8}.

Wir möchten annehmen, daß bei heftigem Auf- und Abbau der Gonaden die einzelnen Nucleohiston-sorten verschieden schnell auf- und abgebaut werden, so daß zu verschiedenen Reifezeiten das DNS-Spek-

¹ K. FELIX, I. JILKE u. R. K. ZAHN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 303, 140 [1956].

² K. FELIX, Ciba Foundation Sympos. The Chemical Structure of Proteins, London 1953.

³ E. CHARGAFF u. I. N. DAVIDSON, The Nucleic Acids, Academic Press, New York 1955.

⁴ E. CHARGAFF, R. LIPSHITZ u. C. GREEN, J. biol. Chemistry 195, 155 [1952].

⁵ G. R. WYATT, Biochem. J. 48, 584 [1951]; M. M. DALY, V. G. ALLFREY u. A. E. MIRSKY, J. gen. Physiol. 33, 497 [1950]; S. HÖRSTADIUS, I. J. LORCH u. E. CHARGAFF, Exp. Cell. Res. 6, 440 [1954].

⁶ E. CHARGAFF, C. F. CRAMPTON u. R. LIPSHITZ, Nature [London] 172, 289 [1953].

⁷ C. F. CRAMPTON, R. LIPSHITZ u. E. CHARGAFF, J. biol. Chemistry 211, 125 [1954].

⁸ R. LIPSHITZ u. E. CHARGAFF, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 19, 256 [1956].

trum möglicherweise verschieden ausfällt⁹⁻¹³. So haben wir bei dieser Untersuchung nicht nur sorgfältig darauf geachtet, Gonaden nur einer Tierart bzw. Subspecies getrennt zu untersuchen, sondern auch den Reifezustand möglichst genau zu definieren. Die Frage, ob sich bei gleicher Tierart, jedoch in einem anderen Reifezustand der Gonaden, eine anders zusammengesetzte DNS findet, wird Gegenstand einer anderen Veröffentlichung sein.

Die von uns an reifen Gonaden von *Holothuria polii* durchgeführten Analysen geben das Verhältnis der Purin- zu den Pyrimidinbasen, in guter Übereinstimmung mit der Theorie von WATSON und CRICK, als 1 : 1^{14,15}. Auch die spezifisch miteinander durch Wasserstoffbrücken¹⁶ verbundenen Basenpaare zeigen ein 1 : 1-Mengenverhältnis zueinander.

Die Tab. 1 faßt die bisher gewonnenen Ergebnisse zusammen.

Nr.	Meßgröße	Wert	Dimension	Zahl der Bestimmungen
<i>Vakuumgetrocknete DNS-Fasern</i>				
1	Stickstoff	13,65 ± 0,25	% v. Ausgangsmaterial	15
2	Phosphor	7,90 ± 0,14	„	15
3	Wasser	13,80 ± 1,7	„	3
4	<u>g Stickstoff</u> <u>g Phosphor</u>	1,73 ± 0,05	—	—
<i>Getrocknetes Hydrolysat</i>				
5	Stickstoff	11,84 ± 0,25	„	15
6	Phosphor	6,85 ± 0,16	„	15
7	<u>g Stickstoff</u> <u>g Phosphor</u>	1,73 ± 0,06	—	—
8	Guanin	20,1 ± 0,2	Mol-% Basen	150
9	Adenin	29,5 ± 0,4	„	150
10	Cytosin evtl. 5-Methyl-Cytosin	21,2 ± 0,7	„	150
11	Thymin	29,3 ± 0,5	„	150
12	Summe 8—11	100,1 ± 1,8	„	—
13	<u>Mol Adenin</u> <u>Mol Thymin</u>	1,00 ± 0,04	—	—
14	<u>Mol Guanin</u> <u>Mol Cytosin</u>	0,95 ± 0,04	—	—
15	<u>Mol Purin-Basen</u> <u>Mol Pyrimidin-Basen</u>	0,98 ± 0,02	—	—
16	<u>Mol (Adenin + Thymin)</u> <u>Mol (Guanin + Cytosin)</u>	1,43 ± 0,05	—	—
17	Nukleobasen	26,30 ± 0,50	% v. Ausgangsmaterial	15
18	Basen-Stickstoff	10,45 ± 0,19	„	15
19	DNS-Phosphor	6,28 ± 0,17	„	15
20	<u>g Basen-N</u> <u>g DNS-P</u>	1,67 ± 0,07	—	—
21	<u>g DNS-Phosphor</u> <u>g Gesamt-P</u>	0,92 ± 0,05	—	—

Tab. 1. Ergebnisse der Analysen von DNS-Fasern und Hydrolysat.

⁹ G. R. WYATT, Nature [London] **166**, 237 [1950].

¹⁰ G. L. BROWN u. M. WATSON, Nature [London] **172**, 339 [1953].

¹¹ L. S. LERMAN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **18**, 132 [1955].

¹² M. ROSOFF, G. DiMAYORCA u. A. BENDICH, Nature [London] **180**, 1355 [1957].

¹³ I. AGRELL u. H. PERSSON, Nature [London] **178**, 1398 [1956].

¹⁴ I. D. WATSON u. F. H. C. CRICK, Nature [London] **171**, 737 [1953].

¹⁵ I. D. WATSON u. F. H. C. CRICK, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. **18**, 123 [1953].

¹⁶ L. PAULING, Arch. Biochem. Biophysics **65**, 164 [1956].

Methodik

Große Exemplare von *Holothuria polii* (warzige Seegurke) wurden von uns in der Bucht von Rovinj (Istrien) in einer Wassertiefe von 2–6 m ertauht. Noch am Strand unmittelbar nach dem Fang entnehmen wir die Gonaden. Den Tieren wurde hierzu auf der Bauchseite im vorderen Drittel ein etwa 2 cm großer querer Einschnitt gemacht, durch den die Gonaden herausstraten.

Holothuria polii wurde aus verschiedenen Gründen gewählt. Die weit häufigere *Holothuria forskåli* entleert bereits auf leichte Reize ihren gesamten Coelominhalt und darüber hinaus noch eine schnell erstarrende byssusartige Substanz, die relativ schwierig von den Gonaden abzutrennen ist. Außerdem leben diese Tiere in größerer Tiefe, von wo sie nur mit dem Schleppnetz heraufgeholt werden. Infolge der mechanischen Insulte entleeren sich die meisten Tiere dabei.

Bei dem von uns geübten Verfahren lassen sich die Gonaden rein gewinnen, meist ohne daß die Tiere dabei andere Organe verlieren. Die gonadenlosen Organismen wurden darauf wieder in den Sammelkübel gegeben, an eine nahrungsreiche, ruhige Stelle geschwommen und dort ausgesetzt. Die Tiere bewegen sich zunächst kaum von ihrer Stelle weg. Sind ihre Wunden zugeheilt – in der Regel ist das nach 5 Tagen der Fall – kriechen sie auf Nahrungssuche und nach etwa 10 Tagen vermögen sie neuerlich Gonaden zu liefern.

Die Gonaden wurden von uns in 3 Klassen eingeteilt: 1. weibliche, kenntlich an ihrer lebhaften Färbung, rot bis violett, und einer gewissen Transparenz, 2. reife, männliche, kenntlich an prall gefüllten, völlig undurchsichtigen porzellanweißen bis schwach rosa, breiten Schläuchen und 3. unreife männliche, deren Schläuche noch dünn, geschlängelt und zum großen Teil transparent sind. Stichproben wurden mikroskopisch kontrolliert.

Innerhalb von höchstens zwei Stdn. wurden die Gonaden aufgearbeitet.

Nach verschiedenen Vorversuchen entschlossen wir uns, den Gegebenheiten des Meeresbiologischen Institutes entsprechend, das Material eingesalzen zu konservieren. Die frischen Gonaden wurden mit Kochsalz, äthylendiamintetraessigsäurem Natrium (ÄDTE), Natriumcitrat ($\text{Na}_3\text{Cit.}$) und Thymol im Starmix ca. 40 sec lang zerkleinert und so auf folgende Endzusammensetzung gebracht:

	[%]	
NaCl	12	
ÄDTE	0,5	
$\text{Na}_3\text{Cit.}$	1,0	
Thymol	0,1,	$\text{pH} = 7,0 - 7,3.$

Diese zähflüssige, gelartige Masse (Rohgel) wurde unter Luftabschluß in Dunkelheit so kühl wie möglich

aufbewahrt und nach unserer Ankunft in Frankfurt rasch aufgearbeitet.

Die Darstellung der DNS aus diesem Rohgel und ihre Reinigung gestalten sich relativ einfach, weil der Partner ein Histon zu sein scheint*, welches im Verlaufe der Aufarbeitung denaturiert und leicht abzutrennen ist.

1 Tl. Rohgel wird mit 1,5 Tln. 0,5-m. NaCl-Lösung (2,9%) eine Min. lang in der Kälte homogenisiert. Diese 2,5 Tle. Homogenat werden darauf nochmals mit 2,5 Tln. kalter 0,5-m. NaCl-Lösung versetzt und in der Kälte dann 5 Tle. gekühltes Wasser eingerührt. Hierdurch wird das Rohgel auf $\frac{1}{10}$ verdünnt. Dies ist erforderlich, um die Viskosität so weit herabzusetzen, daß beim nachfolgenden Zentrifugieren Sedimentation möglich ist.

In diesem Zustand ist das Präparat eine milchige, visköse Flüssigkeit, deren Salzkonzentration etwa 2,6 bis 2,8% NaCl, entsprechend ca. 0,5-m. beträgt.

Sie wird unter Kühlung 90 min bei 44 000-facher Erdbeschleunigung zentrifugiert. Dabei geht ein weißes, krümeliges Sediment zu Boden und läßt einen farblosen, wasserklaren, fadenziehenden Überstand zurück.

Dieser Überstand wird unter Rühren in die dreifache Menge Äthanol gegossen. Die DNS fällt dabei in Fasern, die sich leicht aus der wolkig getrübbten Lösung herausheben lassen. Diese Fasern werden am besten nach Abtropfen in etwa 0,5-m. NaCl-Lösung wieder gelöst, nochmals mit Äthanol gefällt und dann noch mehrmals mit trockenem Äthanol gewaschen, das Äthanol mit Äther ausgewaschen und der Äther im Vakuum abgesaugt.

Es werden reine weiße, leichte DNS-Fasern erhalten. Diese Fasern lassen sich noch weiter reinigen, wobei noch etwas stickstoffhaltiges Material (bis zu 3%) entfernt werden kann. Dabei leidet jedoch das physikalisch-chemische Verhalten sehr stark. Auch zu starke Entsalzung muß vermieden werden.

Die DNS-Fasern wurden bei Zimmertemperatur im Vakuum (10^{-2} Torr, 16 Stdn.) getrocknet und analysiert.

Zur Stickstoffbestimmung haben wir ein Aliquot von ca. 5 mg mit 2 ml Selenschwefelsäure 3 Stdn. lang versetzt und nach PARNAS und WAGNER¹⁷ destilliert. Den Phosphor bestimmten wir nach ALLEN¹⁸ in Aliquots von je 1–2 mg.

Zur Bestimmung des Wassergehaltes der DNS-Fasern trockneten wir 14 Stdn. bei 110°C , ca. 1 Torr, über Phosphorpentoxyd.

Zur Basenbestimmung wurden etwa 20 mg DNS-Fasern mit 0,5 ml konz. Ameisensäure (98%) in eine 10-ml-Ampulle eingeschmolzen und 1 Stde. bei 175°C (einschließlich Anwärmen und Abkühlen) hydrolysiert.

Die auf Zimmertemperatur gekühlte Ampulle wird nun in eine Trockeneis-Aceton-Paste gebracht und dort etwa 20 min belassen, wobei der Inhalt fest gefriert. Bei aminosäurehaltigem Material kann sich das Gefrie-

* Wir danken Frau Dr. GOPPOLD für die chromatographische Untersuchung, die die Aminosäuren: Asp., Glu., Ser., Threo., Ala., Tyr., Val., Ileu und/oder Phenyl-Ala., Pro., Arg., Lys. und/oder His. fand.

¹⁷ I. K. PARNAS u. R. WAGNER, Biochem. J. **125**, 253 [1921].

¹⁸ R. I. L. ALLEN, Biochem. J. **30**, 858 [1940].

ren noch mehr verzögern. Schließlich werden die Ampullenhalse geritzt, die Ampullen nacheinander in Tücher gewickelt und mit einem heißen Metallstück oder Glasstab die Kapfen abgesprengt. Dabei kommt es fast nie zur Explosion und zum Übersäumen des flüssigen Inhaltes bei der plötzlichen Druckentlastung. Gegenüber der Hydrolyse mit Perchlorsäure⁵ hat diese Art eben den Vorteil, an Nucleoprotamin und u. U. sogar an ganzen Zellkernen eine Nucleobasen-Analyse zu ermöglichen. Darüber hinaus kann die Ameisensäure abgepumpt werden, während die Perchlorsäure nur schwierig und unvollständig wieder zu entfernen ist.

Die geöffneten Ampullen werden an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen und in Wasser von ca. 80° C getaucht, wobei die Ameisensäure schnell entweicht und der Rückstand trocken pulvrig oder lackartig erstarrt. Er wird in 0,5 ml warmer 2-n. HCl gelöst und — immer noch in der Ampulle — zentrifugiert. Vom klaren (bei reiner DNS) wasserhellen bis braunen Überstand werden die Aliquots zur Untersuchung entnommen.

Die chromatographische Analyse führten wir nach WYATT⁵ durch, wozu wir 10 Flecken von je 10 mm³ Volumen der Lösung zusammen mit je einem Flecken eines Nucleobasen-Testgemisches auf 4–5 Bögen Chromatographie-Papier (a) auftrugen und die Bögen in die 2 cm hohe Bodenschicht des Lösungsmittel-Gemisches stellten. Die mobile Phase zur Entwicklung des Chromatogrammes war folgendermaßen zusammengesetzt:

	[ml]
Isopropanol (b)	330,
HCl 25%	140,
Wasser	30.

Die Gefäße verschlossen wir durch eine Folie von Parafilm (c) mit darauf liegender Glasplatte absolut luft- und lösungsmitteldicht und entwickelten bei 21° C während etwa 30 Stunden. Nach dem Herausnehmen und Trocknen konnten entweder im Auflicht eines Quecksilber-Niederdruckbrenners die Basenposition umrandet oder im Durchlicht ein Photoprint gemacht werden¹⁹.

a) Schleicher & Schüll, 2043 a; b) Erg.B. 6, Merck; c) Fisher Scientific Comp., Chicago, Fa. Braun, Messungen.

Zusammen mit den in ihrer Position festgelegten Basen wurden auf gleicher Entfernung von der Startlinie entsprechend große Leerwerte ausgeschnitten, alles getrennt mit 0,2-n. HCl ca. 14 Stdn. lang extrahiert und in den klar zentrifugierten Extrakten die Extinktionen bestimmt. Zur Berechnung der Absolutmengen an Base pro Fleck benutzten wir die von WYATT⁵ angegebenen und von uns gegen die jeweiligen Leer- und Eichwerte korrigierten, spezifischen Extinktionswerte. Danach ließ sich die Basen- und Stickstoffbilanz der DNS aufstellen. Unter der Annahme, daß jedes Nucleotid nur ein Phosphoratom³ enthält, ließ sich auch eine Phosphorbilanz kalkulieren.

Von den Meßwerten wurden die arithmetischen Mittel (Z, N) und deren mittlere quadratische Abweichungen (s_z, s_N) errechnet. Bei den abgeleiteten Quotienten (Q) kalkulierten wir die Werte folgendermaßen:

$$Q_{(Z/N)} = Z/N.$$

Die mittlere Abweichung dieses Quotienten ist:

$$a = \frac{Z + s_z}{N - s_N} - Q_{(Z/N)} = Q_{(Z/N)} - \frac{Z - s_z}{N + s_N}.$$

In der Tab. 1 sind die Werte der abgeleiteten Quotienten dann gegeben als:

$$Q_{(Z/N)} \pm a.$$

Unser besonderer Dank gilt Herrn Professor MIRO ZEI, dem Leiter des Instituts Za Biologiju Mora in Rovinj, und Herrn Dr. MIRO NICOLIĆ für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihr Interesse an unserer Arbeit sowie den jugoslawischen Behörden, die uns bei der Gewinnung des Rohmaterials für unsere Versuche unterstützten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für ihre Hilfe, der zoologischen Exkursionsgruppe unter Professor PFLUGFELDER für Anregungen und Unterstützung.

¹⁹ A. MARSHAK u. H. J. VOGEL, J. biol. Chemistry **189**, 597 [1951].

NOTIZEN

Fluoreszenzuntersuchungen an Gewebekulturen I Die metachromatische Vitalfluoreszenz mit Acridinorange

VON LEOPOLD STOCKINGER

Abteilung für Gewebezüchtung, Max-Planck-Institut für vergleichende Erbbiologie und Erbpathologie, Berlin-Dahlem
(Z. Naturforschg. **13 b**, 407–409 [1958]; eingegangen am 10. März 1958)

Nach Behandlung mit sehr stark verdünnten Acridinorange-Lösungen tritt in den Zellen von Fibroblasten-Kulturen fast augenblicklich eine polychrome Fluoreszenz der verschiedenen Zellbestandteile auf. Das Plasma

der Zellen fluoresziert zunächst kaum oder nur ganz schwach grün, der Zellkern bleibt entweder als dunkler Hof ausgespart oder fluoresziert ebenfalls ganz schwach graugrün, die Kernkörperchen etwas heller gelblich. Im Cytoplasma der Zellen fluoreszieren mehr oder weniger Granula verschiedener Größe in kupferroter Fluoreszenzfarbe (STOCKINGER)¹.

Diese „Roten Granula“ treten nach verschiedener Vorbehandlung auch in zahlreichen anderen Zellen auf. Zuerst wurden sie von HIRT und Mitarbb.² nach Trypa-

¹ L. STOCKINGER, Z. mikr. anatom. Forsch. **59**, 304 [1952].

² A. HIRT, H. SOMMER, K. WIMMER u. A. KIESSELBACH, Anatom. Anz. Erg. H. zu **87**, [1939] (46. Vers. 1938) 97–105.