

extension constante du champ structural de l'activité, le nombre des combinaisons actives augmentant progressivement.

Nos recherches sur les acides doisynoliques montrent que dans cette série, le champ de l'activité œstrogène est relativement vaste. L'effet persiste malgré le passage du système tétracyclique aux systèmes tri- et bicycliques et même malgré le remplacement de la fonction acide par la fonction aldéhyde ou alcool. Elles montrent aussi combien il peut être limité par des conditions d'ordre spatial. Comme nous l'avons vu dans la série des œstrones, la configuration stérique semble y limiter davantage encore le champ structural. La différence pourrait provenir de la position fixe de la fonction cétonique qui s'oppose à la rotation libre du groupe carboxyle.

Mentionnons pour terminer que le champ structural dépend aussi du mode d'application et d'une façon décisive du sujet récepteur<sup>1</sup>, homme ou animal.

### Conclusion

Comme nous l'avons montré, la synthèse des œstrogènes stéroïdes s'est accomplie par étapes. Leur constitution une fois élucidée, on parvenait, après une première période de huit ans environ, à la synthèse totale d'un de leurs produits d'élimination, l'équilénine, et à une synthèse partielle de l'un d'entre eux, l'œstradiol.

Une seconde période de huit ans s'achevait avec la synthèse des hormones natives elles-mêmes.

Des recherches très complètes sur les acides doisynoliques, une nouvelle classe d'œstrogènes à l'activité puissante, aplanirent la route qui nous conduisit à la synthèse totale de l'œstrone. Comme l'œstradiol et l'œstriol avaient déjà été préparés à ses dépens, ce sont les trois hormones natives elles-mêmes qui sont dès maintenant accessibles à la synthèse totale.

L'équilénine compte deux centres d'asymétrie. Pour les hormones natives leur nombre s'élève de quatre à six et celui des stéro-isomères optiques de seize (œstrone) à soixante-quatre (œstriol). Et déjà l'attaque se tourne vers la synthèse encore plus ardue

des stéroïdes purement hydroaromatiques où l'on dénombre six (testostérone), voire huit centres d'asymétrie (cholestérol), ce qui, pour ce dernier ne présente pas moins de deux cent cinquante-six stéro-isomères optiques possibles. Le prix Nobel de chimie de 1947, Sir ROBERT ROBINSON<sup>1</sup> vient précisément de faire connaître ses derniers succès dans cette direction.

Il y a évidemment lieu de se demander si la synthèse de combinaisons à l'architecture spatiale si compliquée prendra jamais une importance pratique, alors que la nature, avec les stérols, nous dispense le squelette nécessaire tout fait. A quoi nous répondrons que la recherche doit se fixer ses buts hors de considérations semblables. La nature semble suivre sans peine la voie de la synthèse asymétrique, à nous de lui arracher ses secrets.

### Summary

After the discovery of the œstrogenic hormones in 1929 and subsequent years, and the determination of their constitution, their synthesis was performed in two stages.

Following many preliminary synthetic attempts (BARDHAN, BUTENANDT, ROBINSON and others), in 1940 equilénine was synthesized by BACHMANN and, at almost the same time, INHOFFEN succeeded in the partial synthesis of œstrone from cholesterol.

In 1942 the preparation of a nearly inactive isomer of œstrone was disclosed by BACHMANN. Of decisive importance, however, was the elucidation since 1944 of the doisynolic acids deriving from the œstrogenic ketones and showing themselves high œstrogenic effectiveness, as well as the discovery of important sterical relationships between ketones and acids.

The total synthesis of the doisynolic acids in 1947, which was conducted via sterically uniform ketoesters of the octahydrophenanthrene series, simultaneously cleared the way to the natural œstrone itself (1948). Now all genuine œstrogens (œstrone, œstradiol, œstriol) are accessible to total synthesis.

Attempts to obtain œstrone by means of a diene-synthesis have so far been unsuccessful. On the other hand, it was possible, by this method, to build up a sterically uniform but inactive monodehydro-œstrone and the corresponding highly active monodehydro-doisylnolic acid.

Attention is drawn to the new conception of the "constitutional field of activity".

<sup>1</sup> S. W. CORNFORTH et R. ROBINSON, *Nature* 160, 737 (1947).

<sup>1</sup> R. COURRIER, A. HOREAU et J. JACQUES, *C. r. Soc. biol.* 142, 146 (1948).

## Wirkstoffe der tierischen Befruchtung

Von HANS-JOACHIM BIELIG<sup>1</sup> und Graf FRED MEDEM<sup>2</sup>, Heidelberg

### Der Begriff Befruchtungstoffe

Bei den Metazoen, welche hier ausschließlich betrachtet werden sollen, besteht die Befruchtung in einer

Vereinigung von Spermium und Ei. Seit den klassischen Untersuchungen von O. und R. HERTWIG (1875 u. ff.) an Seeigeln weiß man, daß der Vorgang der Befruchtung in einer Reihe von Akten abläuft: u. a. Ansammlung der Spermien an der Eioberfläche, Eindringen eines Spermakopfes in das Eiinnere, Ausbildung

<sup>1</sup> Kaiser-Wilhelm-Institut für medizinische Forschung (Institut für Chemie), Heidelberg.

<sup>2</sup> Kaiser-Wilhelm-Inst. f. Biol. (Abt. M. HARTMANN), Hechingen.

der Befruchtungsmembran, Verschmelzung von männlichem und weiblichem Vorkern.

Seit der Jahrhundertwende<sup>1</sup> ist zuerst von J. DE MEYER (1911) und vor allem von F. R. LILLIE (1912 u. ff.) gezeigt worden, daß die weiblichen Geschlechtszellen der Seeigel und Polychäten Stoffe enthalten, die die Spermien spezifisch anlocken, in ihrer Bewegung aktivieren und zur Agglutination bringen. Man wußte auch schon, daß diese Wirkstoffe, welche von den Eiern an Wasser (Eisekretwasser) abgegeben werden und daß ihre Wirkung durch Sperma abgeschwächt werden kann. Die Bedeutung, die man solchen Stoffen zuschrieb, geht daraus hervor, daß LILLIE<sup>2</sup> sie «Fertilizin» genannt hat.

Aus seinen Untersuchungen über die relative Sexualität der Braunalge *Ectocarpus siliculosus* zog M. HARTMANN (1925) den Schluß, daß gleichgestaltete Gameten verschiedenen Geschlechts sich stofflich unterscheiden und daß die Vereinigung der männlichen und weiblichen Gameten durch geschlechtsspezifische Stoffe bedingt wird. Der Nachweis derartiger Stoffe wurde dann von ihm und seinen Schülern für eine Reihe weiterer Algen erbracht und besonders von F. MOEWUS (1933 u. ff.) an der einzelligen Grünalge *Clamydomonas eugametos* näher geprüft.

Es ist das Verdienst M. HARTMANN (1932), erkannt zu haben, daß zwischen den geschlechtsspezifischen Stoffen der Algen und denen der Seeigel kein grundsätzlicher biologischer Unterschied besteht. In Zusammenarbeit zwischen dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie in Berlin-Dahlem, später Hechingen (M. HARTMANN), und dem Kaiser-Wilhelm-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg (R. KUHN) wurden zum ersten Male aus den Geschlechtsprodukten des Seeigels *Arbacia pustulosa* und aus denen der Regenbogenforelle (*Salmo irideus*) derartige Stoffe isoliert und zum Teil ihre chemische Natur erkannt. Diese Wirkstoffe haben nach einem gemeinsamen Vorschlag von M. HARTMANN und R. KUHN (1939) den Namen *Gamone*, d. h. Befruchtungsstoffe erhalten, da sie die Vereinigung der Geschlechtszellen bewirken und damit die Befruchtung (*γάμος* = Hochzeit) ermöglichen<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Vgl. die folgenden Zusammenfassungen des Gebietes: J. LOEB, Artificial Parthenogenesis and Fertilization (University Press, Chicago, 1913). – F. R. LILLIE, Fertilization. General Cytology (University Press, Chicago, 1924). – E. GODLEWSKI, Problem der Entwicklungserregung (Physiologie der Befruchtung) in: A. BETHES Hb. d. normalen u. pathologischen Physiologie, Bd. 14, 1 (Springer, Berlin 1926). – E. E. JUST, Protoplasma 10, 300 (1930). – R. KUHN, Angew. Chem. 53, 1 (1940). – M. HARTMANN, Naturwiss. 28, 807 (1940); Die Sexualität (G. Fischer, Jena 1943). – P. E. LINDAHL, Fortschr. Zool. 5, 193, 356 (1941). – J. RUNNSTRÖM, Scientia 71, 149 (1942). – E. RAMSTAD, Norsk Farm. Selskab. 5, 65 (1943). – LORD ROTHCHILD, Nature 157, 720 (1946). – J. HÄMMERLING, Fortschr. Zool. 8, 159 (1947). A. TYLER, Ann. Rev. Physiol. 9 19 (1947).

<sup>2</sup> F. R. LILLIE, Science (N.Y.) 38, 524 (1913).

<sup>3</sup> Zur Definition und Abgrenzung der Begriffe Hormon, Gamon, Termon vgl. R. KUHN, Angew. Chem. 53, 1 (1940).

## Die Gyno- und die Androgamone

HARTMANN, SCHARTAU, KUHN und WALLENFELS<sup>1</sup> konnten 1939 an der Zoologischen Station in Neapel (R. DOHRN) am Seeigel *Arbacia pustulosa* feststellen, daß die von LILLIE und anderen gefundenen Wirkungen der Eisekrete auf die Spermien verschiedenen, voneinander trennbaren Stoffen zukommen. Es wurden zunächst 4 Gamone nachgewiesen: 2 in den weiblichen Gameten (Eiern) enthaltene Gynogamone und 2 in den männlichen Gameten (Sperma) vorkommende Androgamone. Nach einer Anregung von R. KUHN (1947) bezeichnet man die Gamone mit ihrem Anfangsbuchstaben unter Anfügung römischer Ziffern als Indices:  $G_I$ ,  $G_{II}$  usw. für die Gynogamone,  $A_I$ ,  $A_{II}$  usw. für die Androgamone. Eine ähnliche Nomenklatur benutzten schon J. RUNNSTRÖM und Mitarbeiter<sup>2</sup> für die Androgamone ( $A_I$ ,  $A_{II}$  usw.)<sup>3</sup>.

Die Auffindung von wenigstens 2 Gyno- und 2 Androgamonen bei *Arbacia pustulosa* war für die Feststellung von Befruchtungsstoffen bei anderen Organismen wegweisend. Sie erlaubte einerseits die Einordnung vieler Einzelbeobachtungen gamonartiger Wirkstoffe, wie sie von FRANK<sup>4</sup>, TYLER und Mitarbeitern<sup>5</sup>, SOUTHWICK<sup>6</sup> und anderen bei Seeigeln sowie bei Mollusken erhoben worden waren. Andererseits konnten SCHARTAU und MONTALENTI<sup>7</sup> am Flußneunauge (*Lampetra fluviatilis*), MEDEM<sup>8</sup> bei marinen Schnecken und Muscheln, und neuerdings HARTMANN, MEDEM, KUHN und BIELIG<sup>9</sup> bei Forellen zeigen, daß auch hier mindestens 4 Gamone wirksam sind.

Untersuchungen der letzten Jahre deuten darauf hin, daß einzelne dieser Gamone, die jeweils zwei oder mehr verschiedene Wirkungen entfalten, stofflich noch nicht einheitlich sind. Es bahnt sich hier eine ähnliche Entwicklung an, wie sie von der Vitaminforschung her bekannt ist. Dort ließen sich zum Beispiel die ursprünglich dem «Vitamin B» zugeschriebenen Wirkungen auf die Anwesenheit einer ganzen Reihe von spezifischen Faktoren (z. B. Filtratfaktor, antiparalytischer Faktor u. a.) zurückführen. Die Glieder des «Vitamin-B-Komplexes» wurden mit fortschreitender Verfeinerung der

<sup>1</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU, R. KUHN und K. WALLENFELS, Naturwiss. 27, 433 (1939); 28, 144 (1940). – M. HARTMANN und O. SCHARTAU, Biol. Zbl. 59, 571 (1939). – M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940).

<sup>2</sup> J. RUNNSTRÖM, S. LINDVALL und A. TISELIUS, Nature (London) 153, 285 (1944).

<sup>3</sup> Die Schreibweise mit römischen Ziffern wird vorgezogen, da arabische Ziffern als Indices bereits für die Bezeichnung von Vitaminen ( $A_1$ ,  $A_2$ ) und Globulinen ( $G_1$  usw.) vergeben sind.

<sup>4</sup> J. A. FRANK, Biol. Bull. 76, 190 (1939).

<sup>5</sup> A. TYLER, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 25, 317 (1939); 26, 249 (1940); Biol. Bull. 78, 159 (1940). – A. TYLER und S. W. FOX, Science (N.Y.) 90, 516 (1939).

<sup>6</sup> W. E. SOUTHWICK, Biol. Bull. 77, 147, 157 (1939).

<sup>7</sup> O. SCHARTAU und G. MONTALENTI, Biol. Zbl. 61, 473 (1941).

<sup>8</sup> Graf F. MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).

<sup>9</sup> M. HARTMANN, Naturwiss. 32, 231 (1944). – M. HARTMANN, F. GRAF MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

Tabelle I  
Farbstoffe in den Ovarien einiger Tiere

Tierklasse	Tierart	Farbstoffe	Literatur
Echinodermen	<i>Arbacia pustulosa</i> <i>Arbacia aequituberculata</i> <i>Strongylocentrotus lividus</i>	<i>Naphthochinone</i> , Echinochrom A, B, C Echinochrom Carotinoide $\beta$ -Carotin, Echinenon	KUHN und WALLENFELS <sup>1</sup> LEDERER und GLASER <sup>2</sup> LEDERER <sup>3</sup>
Mollusken	<i>Pecten maximus</i> <i>Pectunculus glycymeris</i>	$\beta$ -Carotin, Pectenoxanthin Lutein, Cynthiaxanthin (Glycymerin)	LEDERER <sup>3</sup> LEDERER <sup>3</sup>
Crustaceen	<i>Homarus vulgaris</i> ( <i>Astacus gammarus</i> ) <i>Maja squinado</i>	Astaxanthin Astaxanthin, $\beta$ -Carotin	KUHN und SÖRENSEN <sup>4</sup> KUHN, LEDERER und DEUTSCH <sup>5</sup> KUHN, STENE und SÖRENSEN <sup>6</sup>
Teleosteer	<i>Salmo irideus</i>  <i>Salmo fario</i> <i>Eleginus navaga</i>	$\beta$ -Carotin, Lutein, Astaxanthin  Astaxanthin $\beta$ -Carotin, Xanthophylle	HARTMANN, MEDEM, KUHN und BIELIG <sup>7</sup> SÖRENSEN und STENE <sup>8</sup> LEDERER <sup>9</sup>
Amphibien	<i>Rana esculenta</i>	$\beta$ -Carotin, Lutein, Zeaxanthin	ZECHMEISTER und TUZSON <sup>10</sup>
Aves	<i>Gallus domesticus</i>	Carotin, Lutein, Zeaxanthin, Krypto-xanthin u.a.	KUHN und Mitarbeiter <sup>11, 12</sup> GILLAM und HEILBRON <sup>13</sup> EULER und GARD <sup>14</sup>
Mammalia	<i>Bos taurus</i>	$\beta$ -Carotin	KUHN und BROCKMANN <sup>12</sup>

Trennungs- und Charakterisierungsmethoden einzeln in ihrer chemischen Struktur und ihrer biologischen Wirkung erkannt. Angelehnt an die Nomenklatur der Vitamine, sprechen wir bei den Befruchtungsstoffen in ähnlichen Fällen von *Gamonkomplexen* (z.B. Androgamon-II-Komplex), bei den einzelnen Gliedern eines Komplexes von *Faktoren* (z.B. eihüllelösender  $A_{II}$ -Faktor, fällender  $A_{II}$ -Faktor).

Der Besprechung der einzelnen Befruchtungsstoffe sei zunächst eine Übersicht vorausgeschickt, die die bisher gefundenen charakteristischen Eigenschaften wiedergibt:

*Gynogamon-I-Komplex.* Dem Gynogamon-I-Komplex kommen folgende Wirkungen zu: 1. chemotaktische Anlockung der Spermatozoen (Aggregation LILLIES); 2. Aktivierung der Spermienbewegung (aktivierender Faktor, activation principle); 3. Antagonismus zum Androgamon I. Die Wirkgruppe, die diese Fähigkeiten besitzt, erwies sich in den bisher untersuchten Fällen als Farbstoff; bei *Arbacia pustulosa* als ein Naphthochinon-abkömmling, bei der Regenbogenforelle (*Salmo irideus*)

als Carotinoid. In den Eiern liegen diese Farbstoffe symplexartig an Proteine gebunden vor. Die Symplexe sind thermolabil, die freien Farbstoffe weitgehend thermostabil, aber lichtempfindlich.

*Gynogamon II* (arteigen = Isoagglutinin, artfremd = Heteroagglutinin). Das  $G_{II}$  bewirkt eine Agglutination der Spermatozoen. Das Agglutinin kann im Eiinhalt enthalten sein (z.B. bei *Salmo irideus*) oder sich nur in der Gallerthülle der Eier befinden (z. B. bei *Arbacia pustulosa* und *Megathura crenulata*). Chemisch handelt es sich um Proteine oder diesen nahestehende Stoffe, die teils thermolabil sind (z.B. bei *S. irideus*, *A. pustulosa*). Das *M.-crenulata*-Agglutinin ist indessen thermostabil. Das  $G_{II}$  entspricht in seiner Wirkung dem Fertilizin LILLIES.

*Androgamon I.* Das  $A_I$  bedingt je nach Konzentration teilweise oder völlige Lähmung der Spermienbewegung. Mit der prosthetischen Farbstoffgruppe des  $G_I$ -Komplexes reagiert es in unbekannter Weise, wobei sowohl die  $G_I$ -Wirkungen als auch der  $A_I$ -Effekt aufgehoben werden können. Das Androgamon I läßt sich aus getrocknetem Sperma mit Methanol extrahieren, ist niedermolekular, thermostabil und, soweit wir bis-

<sup>1</sup> R. KUHN und K. WALLENFELS, Ber. deutsch. Chem. Ges. 72, 1407 (1938).  
<sup>2</sup> E. LEDERER und R. GLASER, C. R. Acad. Sci. (Paris) 207, 454 (1938).  
<sup>3</sup> E. LEDERER, C. R. Soc. Biol. 20, 567 (1938).  
<sup>4</sup> R. KUHN und N. A. SÖRENSEN Ber. deutsch. Chem. Ges. 71, 1879 (1938).  
<sup>5</sup> R. KUHN, E. LEDERER und A. DEUTSCH, Z. physiol. Chem. 220, 229 (1933).  
<sup>6</sup> R. KUHN, J. STENE und N. A. SÖRENSEN, Ber. deutsch. Chem. Ges. 72, 1688 (1939).  
<sup>7</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

<sup>8</sup> N. A. SÖRENSEN und J. STENE, Kongr. norske vid. Selsk. Skr. 1938, Nr. 9 (1939).  
<sup>9</sup> E. LEDERER, C. R. Soc. Biol. 20, 554 (1938).  
<sup>10</sup> L. ZECHMEISTER und P. TUZSON, Z. physiol. Chem. 238, 197 (1936).  
<sup>11</sup> R. KUHN, A. WINTERSTEIN und E. LEDERER, Z. physiol. Chem. 197, 141 (1931).  
<sup>12</sup> R. KUHN und H. BROCKMANN, Z. physiol. Chem. 206, 41 (1932).  
<sup>13</sup> A. E. GILLAM und I. HEILBRON, Biochem. J. 29, 1064 (1938).  
<sup>14</sup> H. v. EULER und H. GARD, Ark. Kemi, Mineral. Geol. 10B, Nr. 19 (1931).

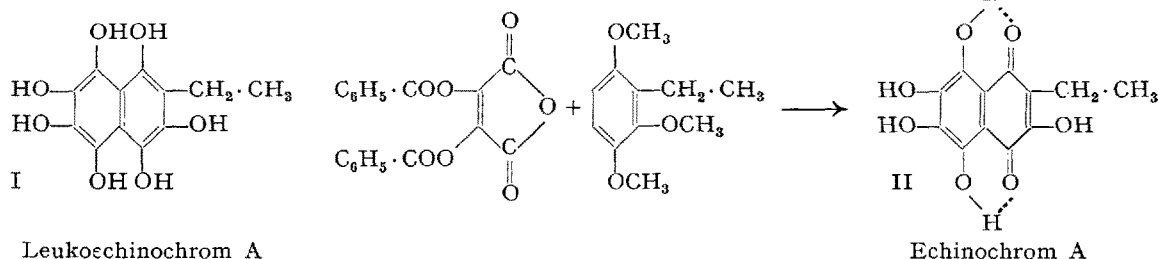
her wissen, weder art- noch gattungs- oder ordnungsspezifisch. Über die chemische Natur ist bis heute nichts Endgültiges bekannt.

**Androgamon-II-Komplex.** Die Wirkungen dieses Komplexes äußern sich: 1. in einer Auflösung (z. B. *Arbacia pustulosa*, *Haliotis tuberculata*); 2. in einer Fällung der Eihüllensubstanz (z. B. *Echinocardium cordatum*, *Salmo irideus*); 3. in einer Aufhebung der Agglutinationswirkung des Gynogamons II. Die lösende Wirkung auf die Eihülle kommt einem thermolabilen Ferment, einer Hyaluronidase, zu. Daneben scheint bei *A. pustulosa* ein hochmolekularer, thermostabiler Faktor vorzuliegen, der ebenfalls die Viskosität der Eihülle herabsetzt. Der Antagonismus zum  $G_{II}$  und die Fällung der Eihüllensubstanz werden durch sehr thermostabile, methanolunlösliche Faktoren bedingt, die sich bei *S. irideus* durch Nukleinsäuren ersetzen lassen.

In einer Reihe von Fällen ist die Anwesenheit von Gamonen nur an dem wechselseitigen Antagonismus zwischen  $G_I$ -Komplex und  $A_I$  bzw. zwischen  $G_{II}$  und

MEDEM, KUHN und BIELIG<sup>1</sup> die des Carotinoids Astaxanthin bei der Regenbogenforelle *Salmo irideus*<sup>2</sup>.

Das von KUHN und WALLENFELS<sup>3</sup> aus den vollreifen, braunroten Ovarien von *A. pustulosa* isolierte Echinochrom A, 10 mg je Ovar, kristallisiert in roten Nadeln vom Schmelzpunkt 220°. Es ist kaum löslich in Wasser, löst sich gut in Na-Hydrogenkarbonat und hat ein dreibandiges Absorptionsspektrum (526, 490, 456 m $\mu$  in Chloroform). Nach den Ergebnissen von Zinkstaubdestillation, reduzierender Azetylierung, Methylierung mit Diazomethan und Oxydation mit Chromsäure (Bildung von Propionsäure) kommt dem Leukoechinochrom A die Formel I zu. Das Echinochrom A selbst ist ein 2-Äthyl-3,5,6,7,8-pentoxy-naphthochinon-1,4 (II), das im Gleichgewicht mit isomeren Chinonen vorliegen dürfte. Die Konstitution wurde von WALLENFELS und GAUHE<sup>4</sup> durch Synthese sichergestellt: Dibenzoyl-oxymaleinsäure-anhydrid und 2-Äthyl-1,3,4-trimethoxybenzol kondensieren in der Aluminiumchlorid-Natriumchlorid-Schmelze bei 180–183° zu II.



dem  $A_{II}$ -Komplex erkannt worden. Je nach der Konzentration des einen Befruchtungstoffes wird die des Antagonisten dann entweder abgeschwächt oder völlig aufgehoben.

Weitere mit der Befruchtung in Zusammenhang gebrachte Stoffe, z. B. ein in Eiern vorkommendes *Antifertilizin* und ein *Androgamon III*, sollen später gesondert besprochen werden, da ihre Bearbeitung unseres Wissens noch in den Anfängen steht.

#### Der Gynogamon-I-Komplex

Die Eier zahlreicher Tiere sind gefärbt. Durch die Untersuchungen vor allem von KUHN, LEDERER und deren Mitarbeitern sind die Farbstoffe aus den Ovarien einer Reihe von Tieren isoliert worden. Diese Pigmente, deren chemische Struktur in den meisten Fällen erkannt werden konnte, gehören entweder zur Gruppe der Carotinoide oder zu der der Naphthochinonfarbstoffe (Tab. I). Das Interesse der Biologen erweckten die Eifarbstoffe indessen erst, als man in zwei Fällen ihre Gamonnatur erkannt hatte. HARTMANN, SCHARTAU, KUHN und WALLENFELS<sup>1</sup> entdeckten die Gynogamon-I-Wirkung des Naphthochinonfarbstoffes Echinochrom A bei dem Seeigel *Arbacia pustulosa*; HARTMANN,

Violette Ovarien, die sich im Zustand beginnender Reife befinden, enthalten wenig Echinochrom A, indessen zwei ihm verwandte, noch unaufgeklärte, kristallisiert erhaltene Naphthochinonfarbstoffe, die Echinochrome B und C. Das rote B ist wie A in Natronlauge löslich, das violette C nicht.

In den Eiern sind die Echinochrome, wie KUHN und WALLENFELS<sup>5</sup> gefunden haben, an hochmolekulare, proteinartige Träger gebunden. Diese Symplexe sind, verglichen mit den freien Farbstoffen, tiefer gefärbt und lösen sich leicht in 4%igem Natriumchlorid oder Meerwasser. Aus ihnen lassen sich die prosthetischen Farbstoffgruppen mit n/100 Salzsäure, Alkohol oder Invertseifen<sup>6</sup> abspalten, wobei die Haftfestigkeit in der Reihenfolge C  $\rightarrow$  B  $\rightarrow$  A abnimmt. Sowohl freies wie

<sup>1</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 3b, 330 (1947).

<sup>2</sup> Daß Carotinoide auch bei Pflanzen gamonwirksam sind, haben zuerst KUHN, MOEWUS und JERCHEL<sup>7</sup> an der Grünalge *Clamydomonas eugametos* entdeckt. Crocin wirkt hier als Gelbfärbungsstoff.

<sup>3</sup> R. KUHN und K. WALLENFELS, Ber. dtsh. Chem. Ges. 72, 1407 (1939).

<sup>4</sup> K. WALLENFELS und A. GAUHE, Ber. dtsh. Chem. Ges. 76, 325 (1943).

<sup>5</sup> R. KUHN und K. WALLENFELS, Ber. dtsh. Chem. Ges. 73, 458 (1940).

<sup>6</sup> R. KUHN und H.-J. BIELIG, Ber. dtsh. Chem. Ges. 73, 1080 (1940).

<sup>7</sup> R. KUHN, F. MOEWUS und D. JERCHEL, Ber. dtsh. Chem. Ges. 71, 1541 (1938). – F. MOEWUS, Naturwiss. 31, 420 (1943).

<sup>1</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU, R. KUHN und K. WALLENFELS, Naturwiss. 27, 433 (1939); 28, 144 (1940). – M. HARTMANN und O. SCHARTAU, Biol. Zbl. 59, 571 (1939).

gebundenes Echinochrom A sind reversibel hydrier- und dehydrierbar. Das Redoxpotential liegt zwischen  $E_0 = -76$  und  $-81\text{ mV}^1$ .

Der im Eiinhalt vorkommende *binäre Symplex*, Echinochrom-A-...-Träger, läßt sich aus gefroren zerkleinerten, gallerthüllefreien Eiern herauslösen und mit Ammonsulfat fällen. Er ist biologisch unwirksam. Mit dem aus der farbstofffreien Gallerthülle isolierten Hilfs-träger beladen, wird der binäre zum biologisch hoch-wirksamen ternären Symplex, Echinochrom-...-Trä-ger-...-Hilfs-träger. Wie HARTMANN, SCHARTAU und WALLENFELS<sup>2</sup> festgestellt haben, aktiviert dieser Sym-plex die Spermien von *A. pustulosa* noch in einer Ver-dünnung von 1:300 Milliarden, d. h. rund 100mal stär-ker als das freie Echinochrom A, das noch in der Grenz-verdünnung von 1:2,5 Milliarden bewegungsaktivierend wirkt. Die entsprechende Wirkung von Eisekretwasser hört bereits in einer Konzentration von 1:50000 auf (Tab. II). Der *ternäre Symplex* scheint danach der eig-entliche Urheber der  $G_I$ -Wirkungen bei *A. pustulosa* zu sein. Das geht vor allem aus der merkwürdigen Tat-sache hervor, daß im biologisch unwirksamen binären Symplex, der rund 35 kg hochmolekulare organische Substanz auf 1 Mol Farbstoff enthält, doppelt soviel Echinochrom A gebunden ist wie im ternären Symplex. Das *Echinochrom B* ist bisher biologisch nicht vom Echinochrom A zu unterscheiden. Während das Echino-chrom A indessen beim Stehen im Tageslicht zuneh-mend inaktiver wird (vgl. Tab. II, letzte Spalte), bleibt die Wirkung des Echinochroms B unter denselben Be-dingungen wochenlang unvermindert erhalten.

CORNMAN<sup>3</sup> findet bei *Arbacia punctulata* ebenfalls die aktivierende Wirkung eines aus den Eiern gewon-nenen «Echinochromsymplexes», während das Ei-

sekretwasser die Beweglichkeit der Spermien nicht steigerte. Im Zusammenhang damit ist die Feststellung SHAPIROS<sup>1</sup> bemerkenswert, daß innerhalb mehrerer Stunden keine nennenswerten Mengen Farbstoff von den Eiern dieses Seeigels an Seewasser abgegeben werden.

Daß das Echinochrom A auch chemotaktisch anlok-kend auf die Spermatozoen von *A. pustulosa* wirkt, zeigten HARTMANN und SCHARTAU<sup>2</sup> in einem auf DAKIN und FORTHAM<sup>3</sup> zurückgehenden Kapillarversuch: beid-seits offene Kapillaren, die den in Seewasser gelösten Farbstoff bzw. Eisekretwasser oder Seewasser allein enthalten, werden in eine Spermasuspension gebracht. Die Menge der Spermien, die innerhalb weniger Mi-nuten in die Kapillaren einwandern, fällt in der Reihen-folge: Echinochrom A, Eisekretwasser, Seewasser.

Die Eier der Regenbogen- und der Bachforelle, die von HARTMANN, MEDEM, KUHN und BIELIG<sup>4</sup> auf Ga-mone untersucht wurden, sind goldgelb bis ziegelrot gefärbt. Auch das Fruchtwasser, in das die Eier im Ovar eingebettet sind und das beim Streifen der Tiere mit den Eiern zusammen abgegeben wird, hat gelbe Farbe. Es enthält, ähnlich wie ein Eisekretwasser, In-haltsstoffe des Eies. Im Fruchtwasser zeigen die Sper-mien von *Salmo irideus*, die im Wasser nur weniger als eine Minute lang beweglich werden, eine mindestens sechsmal längere und dreimal aktivere Bewegung. Der Zusatz von Ovarialflüssigkeit zum Sperma vermag also hier nicht nur die Spermienbewegung auszulösen, die nach SCHLENK und KAHMANN<sup>5</sup> auf einer Abnahme der Konzentration an Kaliumionen beruht, er zeigt auch, daß das Fruchtwasser die bewegungsaktivierende Wir-kung des  $G_I$ -Komplexes hat.

Von den drei im Eiöl der Regenbogenforelle gelösten Carotinoiden kommt diese Wirkung in erster Linie dem Astaxanthin zu, welches mengenmäßig 12% der Gesamtcarotinoide des Eies ausmachte (Tab. III). In

Tabelle II  
Aktivierung der Spermienbewegung bei *Arbacia pustulosa* durch Ei-sekretwasser und Echinochrom A  
(nach HARTMANN und SCHARTAU<sup>4</sup>, abgeändert)

Aktivitätsgrade der Spermien 0 bis 3. Erhitztes Eisekretwasser: Stammlösung 1 Teil Eier auf 5 Teile Seewasser, 2 Stunden bei 95°

Eisekretwasser		Echinochrom A		
		Konzen-tration g/cm <sup>3</sup>	Aktivitätsgrade der Spermien in	
Verdünnungs-grad	Aktivitäts-grad		frischer Lösung	derselb. Lsg. nach 4 Tg. am Licht
1:10 <sup>2</sup>	3	5 · 10 <sup>-6</sup>	3	2
1:10 <sup>3</sup>	3	5 · 10 <sup>-7</sup>	3	1 (?)
1:10 <sup>4</sup>	3	5 · 10 <sup>-8</sup>	3	—
1:3 · 10 <sup>4</sup>	2	1,5 · 10 <sup>-9</sup>	2	—
1:5 · 10 <sup>4</sup>	1	2,5 · 10 <sup>-9</sup>	2	—

<sup>1</sup> K. WALLENFELS und W. MÖHLE, Ber. dtsch. Chem. Ges. 76, 924 (1943).  
<sup>2</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940).  
<sup>3</sup> J. CORNMANN, Biol. Bull. 80, 202 (1941).  
<sup>4</sup> M. HARTMANN und O. SCHARTAU, Biol. Zbl. 59, 571 (1939).

Tabelle III  
Die Eifarbstoffe der Regenbogenforelle (nach HARTMANN, MEDEM, KUHN und BIELIG<sup>6</sup>)

	γ% des Frischeies	mg% des Eiöls	γ je Frischei
Gesamtcarotinoide*	62,3	17,5	0,028
Lutein . . . . .	43,4	12,0	0,019
β-Carotin . . . . .	12,0	3,5	0,005
Astaxanthin . . . . .	7,2	2,0	0,003
Laktoflavin . . . . .	220	24,6**	0,35

\* Als Lutein berechnet.      \*\* mg% der Eiflüssigkeit.

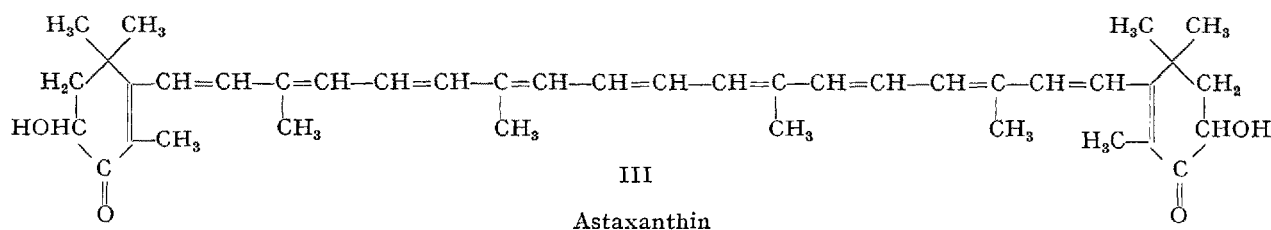
<sup>1</sup> H. SHAPIRO, J. Gen. Physiol. 29, 267 (1946).  
<sup>2</sup> M. HARTMANN und O. SCHARTAU, Biol. Zbl. 59, 571 (1939).  
<sup>3</sup> W. J. DAKIN und M. G. S. FORTHAM, Brit. J. Exp. Biol. 1, 183 (1924).  
<sup>4</sup> M. HARTMANN, Naturwiss. 32, 231 (1944). — M. HARTMANN, F. Graf MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).  
<sup>5</sup> W. SCHLENK jr. und H. KAHMANN, Biochem. Z. 295, 283 (1938).  
<sup>6</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

Tabelle IV

Aktivitätsgrade und Bewegungszeiten von Spermien der Regenbogenforelle in verschiedenen Medien  
(nach HARTMANN, MEDEM, KUHN und BIELIG<sup>1</sup>)

Aktivitätsgrade 0 bis 4; Bewegungszeiten in Sekunden; Temperatur 10°. 1 mm<sup>3</sup> Sperma in 1 Tropfen (= 0,06 cm<sup>3</sup>) Medium sorgfältig verteilt. (Mittelwerte und mittlere Fehler aus je 6–10 Bestimmungen.)

Medium	Wasser $p_H$ 6,6	Fruchtwasser		Frucht- wasser gekocht $p_H$ 9,0	Asta- xanthin 60 $\gamma$ /cm <sup>3</sup>	$\beta$ -Carotin 120 $\gamma$ /cm <sup>3</sup>	Lutein 115 $\gamma$ /cm <sup>3</sup>	Lakto- flavin 1 mg/cm <sup>3</sup>
		$p_H$ 7,7	$p_H$ 9,0					
Anfangsaktivitätsgrad . . . .	1	3	1	1–2	4	3–4	2–3	2–3
Freie Beweglichkeit bei maxi- maler Aktivität bis . . . .	17 $\pm$ 3,5	25 $\pm$ 3	19 $\pm$ 3,5	22 $\pm$ 2	28 $\pm$ 1,5	28 $\pm$ 3,5	26 $\pm$ 3,5	24 $\pm$ 1,5
Freie Beweglichkeit bei mini- maler Aktivität bis . . . .	30 $\pm$ 4	83 $\pm$ 11	55 $\pm$ 13	47 $\pm$ 9	59 $\pm$ 4,5	58 $\pm$ 9,5	67 $\pm$ 12	44 $\pm$ 2
Bewegung an Ort bis . . . .	37 $\pm$ 6,5	216 $\pm$ 27	69 $\pm$ 4	65 $\pm$ 9	93 $\pm$ 6,5	89 $\pm$ 23	93 $\pm$ 10,5	74 $\pm$ 7



abgekochtem Fruchtwasser kolloidal gelöstes kristallisiertes *Astaxanthin*, das KUHN und SÖRENSEN<sup>2</sup> aus Hummereiern isoliert und als 5,5'-Dioxy-4,4'-diketo- $\beta$ -carotin (III) erkannt hatten, bringt noch in einer Verdünnung von 1:100000 die Spermien von *Salmo irideus* auf den höchsten beobachteten Grad der Beweglichkeit. Bei derartigen Versuchen muß auf sorgfältige Einhaltung vergleichbarer Wasserstoffionenkonzentrationen geachtet werden, da die Spermienbeweglichkeit auch vom  $p_H$  beeinflusst wird<sup>3</sup>. Zum Beispiel nimmt in dem für die Carotinoidlösungen als Schutzkolloid verwandten abgekochten Fruchtwasser, das ein  $p_H$  von 9 hat, die Aktivität der Spermien, verglichen mit nativem Fruchtwasser ( $p_H$  7,7) ebenso stark ab, wie wenn letzteres ohne Verdünnung auf  $p_H$  9 gebracht wird. Die Befunde der Spermienaktivierung in den verschiedenen genannten Medien enthält Tab. IV.

Das Astaxanthin lockt ferner die Spermatozoen von *Salmo irideus* im Kapillarversuch chemotaktisch an, hat also auch die zweite für den  $G_1$ -Komplex charakteristische Wirkung. Die Methodik wurde durch Anwendung einseitig geschlossener Kapillaren verbessert. Von den übrigen Eifarbstoffen der Regenbogenforelle erwiesen sich Lutein und Laktoflavin sowohl im Aktivierungswie im Kapillarversuch als völlig unwirksam. Dem  $\beta$ -Carotin kommt eine schwächer aktivierende und chemo-

taktische Wirkung zu (vgl. die Tab. IV und V). Es ist indessen im Gegensatz zum Astaxanthin nicht befähigt, durch Androgamon I völlig gelähmtes Sperma wieder beweglich zu machen, worauf bei der Besprechung des  $A_1$  noch eingegangen wird. Die merkwürdige Tatsache, daß im Eiöl gelöste Farbstoffe an die wässrige Phase (Fruchtwasser) abgegeben werden und dort biologische Wirkungen ausüben, wird durch die Beobachtung erklärlich, daß das Eiöl, welches 3,6% des Gesamteies ausmacht, an die in der Eiflüssigkeit vorkommenden Lipoproteide gebunden ist und sich erst nach deren Denaturierung in Fettlösungsmitteln aufnehmen läßt<sup>1</sup>.

Das Sperma der Bachforelle (*Salmo fario*) verhält sich in Wasser und Fruchtwasser hinsichtlich Aktivitätsgrad und Bewegungsdauer gleich dem von *Salmo irideus*. Diese Wirkung dürfte auch hier auf dem von SÖRENSEN und STENE<sup>2</sup> festgestellten Gehalt der Eier an Astaxanthin beruhen. Weiter deutet das Vorkommen dieses Farbstoffes in den Eiern des Hummers<sup>3</sup> und der Seespinne<sup>4</sup> darauf hin, daß es hier ebenfalls am Befruchtungsvorgang teilnimmt. Beim Flußneunauge (*Lampetra fluviatilis*), dessen Spermien in Wasser etwa fünfmal länger als die von *S. irideus* beweglich sind, beobachteten SCHARTAU und MONTALENTI<sup>5</sup>, daß die am animalen Eipol in Leitungswasser entstehende

<sup>1</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

<sup>2</sup> R. KUHN und N. A. SÖRENSEN, Ber. dtsch. Chem. Ges. 71, 1879 (1938).

<sup>3</sup> W. SCHLENK jr., Biochem. Z. 265, 29 (1933). – Ö. WINGE und E. DITLEVSEN, C. R. Trav. Lab. Carlsberg 22, 121 (1937).

<sup>1</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

<sup>2</sup> N. A. SÖRENSEN und J. STENE, Kongr. norske vid. Selsk. Skr. 1938, Nr. 9 (1939).

<sup>3</sup> R. KUHN und N. A. SÖRENSEN, Ber. dtsch. Chem. Ges. 71, 1879 (1938).

<sup>4</sup> R. KUHN, E. LEDERER und A. DEUTSCH, Z. physiol. Chem. 220, 229 (1933).

<sup>5</sup> O. SCHARTAU und G. MONTALENTI, Biol. Zbl. 61, 473 (1941).

Tabelle V

Chemotaktische Wirkung von Carotinoiden auf die Spermien der Regenbogenforelle (Kapillarversuche)  
(nach HARTMANN, MEDEM, KUHN und BIELIG, [Vgl. Note I, Tab. IV])  
Spermien in Fruchtwasser, Farbstoffe in abgekochtem Fruchtwasser kolloidal gelöst und in einseitig offenen Kapillaren eingeschlossen.  
Jeder Versuch 3–4mal wiederholt

Kapillare I	Kapillare II	Beobachtung
Fruchtwasser abgekocht	Fruchtwasser abgekocht	Gleichmäßig wenige Spermien in I und II.
Astaxanthin 60 γ je 1 cm <sup>3</sup>	Fruchtwasser abgekocht	Spermienmenge I:II ≈ 5:1; Anhäufung besonders am geschlossenen Ende von I. In der Umgebung der Mündung von I Anhäufung und Aktivierung der Spermien.
β-Carotin 120 γ je 1 cm <sup>3</sup>	Fruchtwasser abgekocht	Spermienmenge I:II ≈ 3:1, sonst wie Astaxanthin.
Lutein 115 γ je 1 cm <sup>3</sup>	Fruchtwasser abgekocht	Kein Unterschied im Spermiengehalt zwischen I und II.
Astaxanthin 60 γ je 1 cm <sup>3</sup>	β-Carotin 120 γ je 1 cm <sup>3</sup>	Spermienmenge I:II ≈ 1,5:1; in beiden Fällen Ansammlung und Aktivierung der Spermien an der Kapillarmündung.
Astaxanthin 60 γ je 1 cm <sup>3</sup>	Lutein 115 γ je 1 cm <sup>3</sup>	Spermienmenge I:II ≈ 5:1; stärkste Anhäufung am geschlossenen Ende von I und II.

«trübe Flocke» die Spermien besonders stark anlockt und daß diese in ihrer Umgebung erhöht beweglich werden. Da die Eier gelb gefärbt sind, beruhten auch hier die G<sub>1</sub>-Wirkungen wahrscheinlich auf einem Ei-farbstoff, der in der «Flocke» bevorzugt austritt.

Über die Gynogamon-I-Faktoren im Eisekretwasser

zahlreicher weiterer Tiere, und zwar ausschließlich Wirbelloser (Tab. VI), ist unseres Wissens bis heute nichts bekannt. Die von MEDEM<sup>1</sup> ausgeführte Analyse der G<sub>1</sub>-Wirkungen bei marinen Schnecken und Muscheln hat gezeigt, daß diese im Eisekretwasser vermißt wer-

<sup>1</sup> Graf F. MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).

Tabelle VI

Vorkommen von Gynogamon-I-Wirkungen im Eisekretwasser verschiedener Wirbelloser

Polychäten	<i>Nereis limbata</i> <i>Platynereis megalops</i>	LILLIE (1913) <sup>1</sup> ; SAMPSON (1922) <sup>2</sup> JUST (1915) <sup>3</sup>
Echinodermen	<i>Arbacia punctulata</i> <i>Arbacia pustulosa</i> <i>Echinus microtuberculatus</i> <i>Paracentrotus lividus</i> <i>Echinocardium cordatum</i> <i>Echinarachnius parma</i> <i>Echinometra subangularis</i> <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> <i>Asterias forbesii</i> <i>Asterias ochracea</i> <i>Leptasterias aequalis</i> <i>Stichopus regalis</i>	LILLIE (1912) <sup>4</sup> ; SAMPSON (1922) <sup>2</sup> ; FRANK (1939) <sup>5</sup> HARTMANN und SCHARTAU (1939) <sup>6</sup> DE MEYER (1911) <sup>7</sup> ; HARTMANN und SCHARTAU (1939) <sup>6</sup> JUST (1929) <sup>8</sup> ; HARTMANN und SCHARTAU (1939) <sup>6</sup> HARTMANN und SCHARTAU (1939) <sup>6</sup> JUST (1915) <sup>3</sup> SOUTHWICK (1939) <sup>9</sup> SAMPSON (1922) <sup>2</sup> ; TYLER (1940) <sup>10</sup> SAMPSON (1922) <sup>2</sup> SAMPSON (1922) <sup>2</sup> SAMPSON (1922) <sup>2</sup> HARTMANN und SCHARTAU (1939) <sup>6</sup>
Mollusken	<i>Katharina tunicata</i> <i>Ischnochiton magdalenensis</i> <i>Mopalia muscosa</i> <i>Haliotis cracherodii</i> <i>Haliotis tuberculata</i> <i>Fissurella nubecula</i> <i>Megathura crenulata</i>	SAMPSON (1922) <sup>2</sup> SAMPSON (1922) <sup>2</sup> SAMPSON (1922) <sup>2</sup> SAMPSON (1922) <sup>2</sup> MEDEM (1942) <sup>11</sup> MEDEM (1942) <sup>11</sup> TYLER (1940) <sup>10</sup>

<sup>1</sup> F. R. LILLIE, J. Exp. Zool. 14, 515 (1913).

<sup>2</sup> M. M. SAMPSON, Biol. Bull. 43, 267 (1922).

<sup>3</sup> E. E. JUST, Biol. Bull. 28, 93 (1915).

<sup>4</sup> F. R. LILLIE, Science (N.Y.) 36, 527 (1912).

<sup>5</sup> J. A. FRANK, Biol. Bull. 76, 190 (1939).

<sup>6</sup> M. HARTMANN und O. SCHARTAU, Biol. Zbl. 59, 571 (1939).

<sup>7</sup> J. DE MEYER, Arch. Biol. 26, 65 (1911).

<sup>8</sup> E. E. JUST, Biol. Bull. 57, 326 (1929).

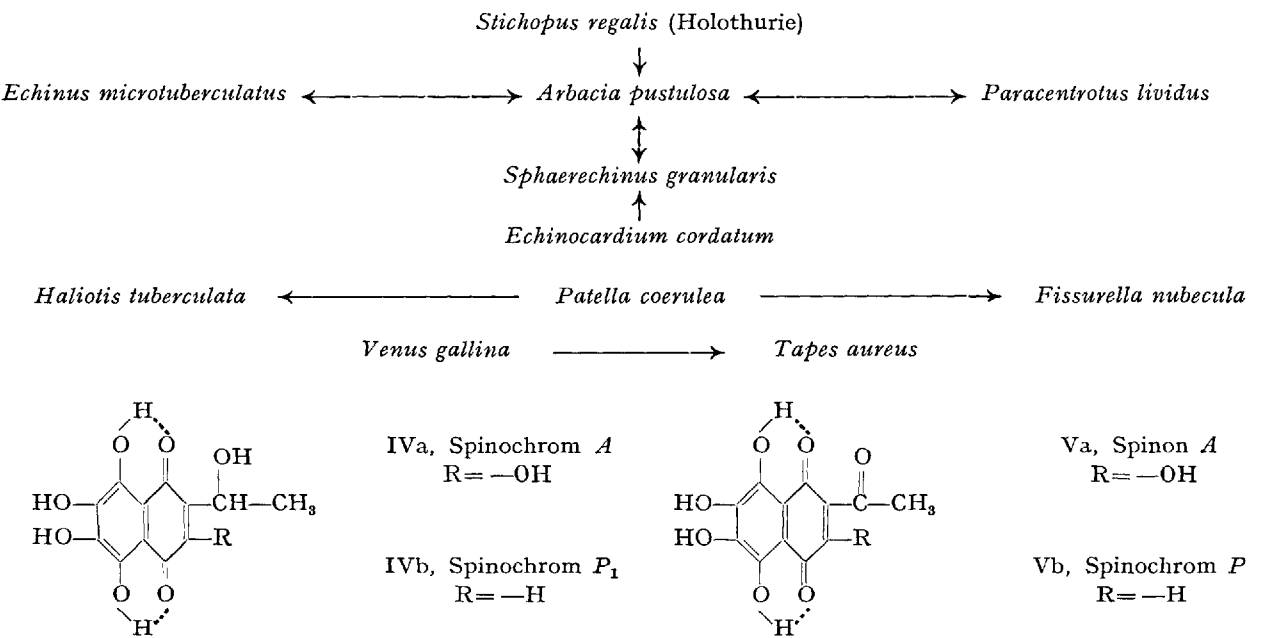
<sup>9</sup> W. E. SOUTHWICK, Biol. Bull. 77, 147, 157 (1939).

<sup>10</sup> A. TYLER, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 25, 317 (1939); 26, 249 (1940); Biol. Bull. 78, 159 (1940).

<sup>11</sup> Graf F. MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).

Tabelle VII  
Vorkommen von Gynogamon I-Faktoren bei marinen Schnecken und Muscheln

Tierart	Eifarbe	G <sub>I</sub> -Wirkung
<i>Fissurella nubecula</i> <i>Haliotis tuberculata</i> <i>Patella coerulea</i>	hellgrün blaugrün tiefolivgrün	Aktivation der Spermien in Eisekretwasser. Chemotaktische Anlockung durch intakte Eier, nicht durch leere Eihüllen.
<i>Pecten varius</i> <i>Solen ensis</i> <i>Tapes aureus</i>	braunrot (Pectenoxanthin ?) schwach braungelb schwach braungelb	Keine Aktivierung im Eisekretwasser, wohl aber am Ei selbst. Chemotaktische Anlockung durch intakte Eier und leere Eihüllen, nicht durch Eiinhalt.



den kann, am intakten Ei indessen auftritt (Tab. VII). In neuester Zeit hat derselbe Autor<sup>1</sup> ein Tier mit innerer Befruchtung untersucht, nämlich die Wollhandkrabbe (*Eriocheir sinensis*). Bereits CANO<sup>2</sup> hatte an Dromiiden gefunden, daß das Sperma in den weiblichen Geschlechtswegen beweglich wird. Dieses Beweglichwerden ist, wie jetzt festgestellt werden konnte, jedenfalls bei *Eriocheir* auf den Einfluß der dunkelbraunen Ovarialflüssigkeit zurückzuführen, die zusammen mit den Eiern durch den Ovidukt zu dem im Receptaculum seminis unbeweglich lagernden Sperma gelangt. *In vitro* beginnt die Bewegung frühestens zwei Minuten nach Einbringen der Spermien in die Ovarialflüssigkeit und hält etwa 15 Minuten lang an. Diese Beobachtungen sind hier insofern von Interesse, als BIELIG<sup>3</sup> ermittelt hat, daß die reifen, leuchtendvioletten Eier von *Eriocheir* ein Gemisch von sauren und neutralen epi- und hypophasischen Carotinoiden in symplexer Bindung an Proteine enthalten.

Über die *Artspezifität der G<sub>I</sub>-Wirkung* liegen Beobachtungen von HARTMANN und SCHARTAU<sup>1</sup> bei einigen Seeigeln und von MEDEM<sup>2</sup> bei marinen Schnecken und Muscheln vor. Soweit die Versuche der Einwirkung von Eiern oder Eisekretwässern auf artfremde Spermien positiv verliefen, sind sie in der folgenden Übersicht vereinigt (Wirkung des G<sub>I</sub>-Komplexes in Pfeilrichtung<sup>1, 2</sup>):

TYLER<sup>3</sup> fand, daß die kristallisierten *Stachelarbstoffe* von *Strongylocentrotus purpuratus* im Gegensatz zu dessen Eisekretwasser nicht G<sub>I</sub>-wirksam sind. Nach MUSAIO und MINCHILLI<sup>4</sup> enthalten die Stacheln von *S. purpuratus* kein Echinochrom, indessen zwei ihm verwandte, als Ca-Salze gebundene Spinochrome P und P<sub>1</sub>. KUHN und WALLENFELS<sup>5</sup> geben dem Spinochrom A in den Schalen von *A. pustulosa* die Formel IVa.

<sup>1</sup> M. HARTMANN und O. SCHARTAU, Biol. Zbl. 59, 571 (1939).

<sup>2</sup> Graf F. MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).

<sup>3</sup> A. TYLER, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 25, 523 (1939).

<sup>4</sup> L. MUSAIO und M. MINCHILLI, Boll. sci. Fac. chim. ind. Bologna 3, 113 (1942).

<sup>5</sup> R. KUHN und K. WALLENFELS, Ber. dtsch. Chem. Ges. 74, 1594 (1941).

<sup>1</sup> Graf F. MEDEM, unveröffentlicht.

<sup>2</sup> G. CANO, Mitt. Zool. Stat. Neapel 9, 503 (1889).

<sup>3</sup> H.-J. BIELIG, unveröffentlicht.



Das Spinochrom *A*, das in Form seines violetten Calciumsalzes beständig ist, geht, sobald diese Bindung während der Aufarbeitung durch Säure gespalten wird, unter der dehydrierenden Wirkung des Luftsauerstoffes in das kristallisiert erhaltene Spinon *A* (Va) über. In Anlehnung an diese Befunde schreiben die beiden italienischen Forscher dem Spinochrom *P*<sub>1</sub> die Konstitution IVb, dem Spinochrom *P* die Formel Vb zu. Das Spinon *A* konnte noch nicht auf *G*<sub>1</sub>-Wirkungen hin geprüft werden.

### Das Androgamon I

Der aktivierende Faktor des Gynogamon-I-Komplexes hat als Gegenspieler einen von den Spermien abgegebenen Wirkstoff, den man daher Androgamon I genannt hat. Wie nämlich HARTMANN, SCHARTAU und WALLENFELS<sup>1</sup> zuerst beobachteten, wird die aktivierende Wirkung des Eisekretwassers von *Arbacia pustulosa* auf arteigene Spermien herabgesetzt oder völlig aufgehoben, sowohl durch Spermaliquor als auch durch Filtrate von abgekochtem bzw. gefrorenem und dann aufgetautem Sperma. Daß es sich hier tatsächlich um einen Antagonismus zwischen dem aktivierenden Prinzip und einem Spermawirkstoff handelt, geht eindeutig aus dem gleichartigen Verhalten von Echinochrom *A* hervor: 1 cm<sup>3</sup> Spermaliquor von *A. pustulosa* vermag noch die spermienaktivierende Wirkung von  $5 \cdot 10^{-7}$  g kristallisiertem Echinochrom *A* zu verhindern.

Eine Methode zur Abtrennung des *A*<sub>1</sub> aus Sperma verdankt man KUHN und WALLENFELS<sup>2</sup>. Die *A*<sub>1</sub>-haltige Fraktion läßt sich aus schonend getrocknetem Sperma mit Methanol extrahieren und findet sich angereichert in dessen Abdampfrückstand wieder. Solche Auszüge aus *A. pustulosa*-Sperma lähmten die Bewegung der art-eigenen Spermien noch bis zu einer Verdünnung von 1:8000. Die lähmende Wirkung derartiger Extrakte ließ sich durch Echinochrom *A* aufheben. Es handelt sich hier um dieselbe Wirkung auf die Spermien, die unabhängig voneinander bereits SOUTHWICK<sup>3</sup> bei *Echinometra subangularis* und HARTMANN und Mitarbeiter<sup>4</sup> bei *A. pustulosa* mit unextrahiertem Sperma festgestellt hatten<sup>5</sup>. Aus diesen Arbeiten geht weiter hervor, daß die *A*<sub>1</sub>-Wirkung reversibel ist und daß der Wirkstoff von den Spermien an den Liquor abgegeben wird. Unbeweglich gewordene Spermatozoen von *E. subangularis* werden nämlich durch Zusatz von Seewasser, was einer

Herabsetzung der Konzentration an lähmender Substanz entspricht, wieder beweglich; ein Vorgang, der sich mehrmals wiederholen läßt. Es ist wichtig, mit gereinigten *A*<sub>1</sub>-Präparaten zu arbeiten und sich von der antagonistischen Wirkung gegenüber dem aktivierenden *G*<sub>1</sub>-Faktor zu überzeugen, wie aus den Versuchen bei *Salmo irideus* hervorgeht<sup>1</sup>.

Das mit Methanol extrahierte Rohandrogamon I der Regenbogenforelle, welches 0,5% des freien Spermas ausmacht, wirkt noch in einer Verdünnung von 1:1000 Spermien lähmend. Die Grenzkonzentration, in der totaler Antagonismus zum *G*<sub>1</sub>-Komplex bei *S. irideus* besteht, liegt bei  $2,4 \cdot 10^{-4}$  g Astaxanthin auf 1 g Rohandrogamon I. Diese antagonistische Wirkung zum *A*<sub>1</sub> unterscheidet das Astaxanthin vom  $\beta$ -Carotin der Forelleneier, welches zwar die Spermien aktiviert und anlockt, den Lähmungsstoff aber nicht unwirksam zu machen vermag. Nur dem Astaxanthin kommen also alle drei Wirkungen des *G*<sub>1</sub>-Komplexes zu. Die Auslösung der Spermienbewegung bei Forellen durch Verdünnung des Spermas mit Wasser ist allein kein sicherer Test auf Androgamon I. Nach SCHLENK und KAHMANN<sup>2</sup> sind nämlich die Forellenspermien auch in «künstlichem», d. h. rein anorganischem, *A*<sub>1</sub>-freiem Liquor unbeweglich und die Auslösung ihrer Bewegung durch Verdünnung beruht hier einzig auf der Änderung des Gleichgewichtes an Kaliumionen zwischen Liquor und Spermatozoenschwänzen.

Im Sperma weiterer Tiere wurde *A*<sub>1</sub>-Wirkung gefunden bei:

- Echinodermen*: *Echinus esculentus* (RUNNSTRÖM und Mitarbeiter, 1944)<sup>3</sup>  
*Strongylocentrotus droebachiensis* (RUNNSTRÖM und Mitarbeiter, 1944)<sup>3</sup>  
*Mollusken*: *Haliotis tuberculata* (MEDEM, 1942)<sup>4</sup>  
*Patella coerulea* (MEDEM, 1942)<sup>4</sup>  
*Fissurella nubecula* (MEDEM, 1942)<sup>4</sup>  
*Pecten varius* (MEDEM, 1942)<sup>4</sup>  
*Solen ensis* (MEDEM, 1942)<sup>4</sup>  
*Ostrea edulis* (MEDEM, 1942)<sup>4</sup>  
*Tunicaten*: *Ciona intestinalis* (MEDEM, 1942)<sup>4</sup>  
*Cyclostomen*: *Lampræta fluviatilis* (SCHARTAU und MONTALENTI, 1941)<sup>5</sup>  
*Teleostee*: *Salmo fario* (HARTMANN und Mitarbeiter, 1947)<sup>6</sup>  
*Salmo salar* (RUNNSTRÖM und Mitarbeiter, 1944)<sup>7</sup>  
*Amphibien*: *Rana temporaria* (MEDEM, unveröffentlicht)

Bei *Echinocardium cordatum* und *Psammechinus miliiaris* ist die Anwesenheit von *A*<sub>1</sub> zweifelhaft<sup>7</sup>. Row-

<sup>1</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940).

<sup>2</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU, R. KUHN und K. WALLENFELS, Naturwiss. 28, 144 (1940).

<sup>3</sup> W. E. SOUTHWICK, Biol. Bull. 77, 147, 157 (1939).

<sup>4</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940).

<sup>5</sup> Der vielfach benutzte Ausdruck «Spermaextrakte» für Filtrate von abgekochtem oder gefrorenem und aufgetautem Sperma gibt zur Verwechslung mit den Methanolextrakten aus Sperma Anlaß und wird deshalb in diesem Aufsatz nicht gebraucht. Wir vermeiden auch den Begriff «Trockensperma» für unverdünntes Sperma, weil hier eine Verwechslung mit getrocknetem Sperma naheliegt.

<sup>1</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

<sup>2</sup> W. SCHLENK jr. und H. KAHMANN, Biochem. Z. 295, 283 (1938).

<sup>3</sup> J. RUNNSTRÖM, S. LINDVALL und A. TISELIUS, Nature (London) 153, 285 (1944).

<sup>4</sup> F. Graf MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).

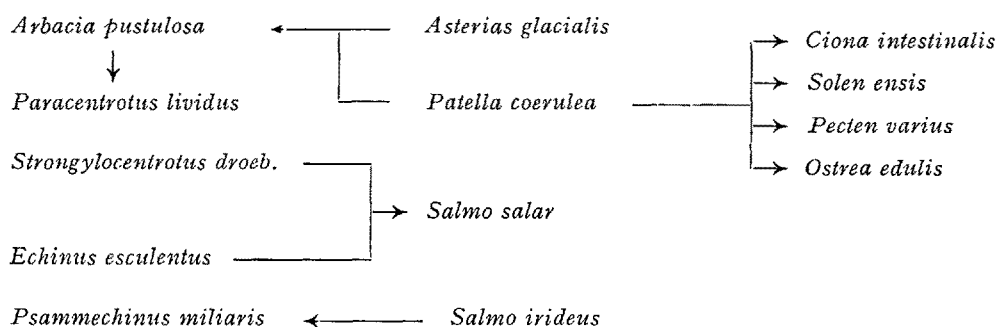
<sup>5</sup> O. SCHARTAU und G. MONTALENTI, Biol. Zbl. 61, 473 (1941).

<sup>6</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

<sup>7</sup> J. RUNNSTRÖM, S. LINDVALL und A. TISELIUS, Nature (London) 153, 285 (1944).

LANDS<sup>1</sup> gibt neuerdings an, daß verdünntes Kaninchensperma, dem ein arteigenes Spermafiltrat zugefügt wurde, in seiner Befruchtungsfähigkeit beeinträchtigt wird. Es ist zu vermuten, daß auch diese Wirkung in erster Linie auf der Anwesenheit eines  $A_I$  beruht und nicht, wie der Autor meint, allein der im Samen enthaltenen Hyaluronidase (Faktor des  $A_{II}$ -Komplexes) zuzuschreiben ist.

In den bisher geprüften Fällen erwies sich das  $A_I$  als weder art-, noch gattungs-, noch ordnungsspezifisch, wie aus folgender Übersicht hervorgeht (Wirkung des  $A_I$  in Pfeilrichtung <sup>2, 3, 4 5</sup>):



Über die bei der geringen Spezifität besonders interessante chemische Natur eines  $A_I$ -Faktors ist bisher nichts bekannt. Das Rohandrogamon I im Rückstand von Methanolauszügen aus gefroren getrocknetem Seeigelsperma wird weder durch 30minütiges Kochen mit Wasser<sup>3</sup> noch durch ebenso langes Erhitzen mit n/HCl auf 100°<sup>2</sup> in seiner Wirkung beeinträchtigt. Al-Oxyd oder -Hydroxyd adsorbieren das  $A_I$  stark aus wässriger Lösung<sup>2</sup>.

### Das Gynogamon II

Die Wirkung, die man heute dem Gynogamon II zuschreibt, nämlich die Agglutination der Spermien durch Eisekrete, ist viel diskutiert worden, seit LILLIE<sup>6</sup> ihr in seiner Fertilizintheorie die maßgebliche Rolle bei der Befruchtung zuerkannte. Ihre tatsächliche Stellung innerhalb des Befruchtungsgeschehens ließ sich indessen erst klarer beurteilen, nachdem HARTMANN und Mitarbeiter<sup>7,8</sup> das Agglutinin genannte Prinzip der Eier erstmals beim Seeigel *Arbacia pustulosa* von Wirkungen des  $G_I$ -Komplexes abzutrennen vermochten.

Nach LILLIE<sup>9</sup> geht die Agglutination der Spermien

durch das Eisekretwasser von *Arbacia* Hand in Hand mit deren Aktivierung und Chemotaxis. Diese Wirkungen des Eisekretwassers kommen nach HARTMANN, SCHARTAU, KUHN und WALLENFELS<sup>1, 2</sup> dem vom Ei abgegebenen ternären Symplex, Echinochrom-...-Träger-...-Hilfsträger zu. Bei der Dialyse dieses Symplexes gegen destilliertes Wasser bleibt der *Hilfsträger*, der, wie früher erwähnt, ausschließlich der Gallerthülle entstammt, in Lösung, während der Farbstoff als binärer Symplex ausfällt. Die farblose Lösung des Hilfsträgers vermag die Spermien nicht mehr zu aktivieren, hat dagegen noch die volle Agglutinationswirkung des ter-

nären Symplexes. Der Hilfsträger ist also bei *A. pustulosa* das  $G_{II}$ -wirksame Agglutinin und in seinen Wirkungen identisch mit dem Fertilizin LILLIES. Bei der Verdünnung des Eisekretwassers von *Arbacia* nimmt die Wirkung des Agglutinins rascher ab als die des Gynogamons I; durch zweistündiges Erhitzen auf 95° wird sie völlig zerstört (Tab. VIII). Aus seiner Lösung fällt

Tabelle VIII

Vergleich von Spermienagglutination und -aktivierung in nativem und erhitztem Eisekretwasser von *Arbacia pustulosa* (nach HARTMANN und SCHARTAU<sup>3</sup>, abgeändert)

Agglutinationsstärke 0–IV; Aktivationsgrade 0–3. Eisekretwasser: Stammlösung 1 Teil Eier auf 5 Teile Seewasser. Erhitzungsdauer: 2 Stunden 95°

Verdünnungsgrad	Natives Eisekretwasser		Erhitztes Eisekretwasser	
	Agglutination	Aktivation	Agglutination	Aktivation
1:100	IV	3	0	3
1:1000	III	3	0	3
1:10000	II	3	0	3
1:30000	I	3	0	2
1:50000	0	3	0	1

der Hilfsträger mittels Ammonsulfat, anderen Sulfaten oder n/100 Salzsäure aus. Die Fällung enthält 8,5% Stickstoff und hat den Charakter einer Säure vom Äquivalentgewicht etwa 500. Aus dem mit verdünnter Salzsäure gewonnenen Hydrolysat läßt sich mit Phos-

<sup>1</sup> I. W. ROWLANDS, Nature (London) 154, 332 (1944).

<sup>2</sup> J. RUNNSTRÖM, S. LINDVALL und A. TISELIUS, Nature (London) 153, 285 (1944).

<sup>3</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940).

<sup>4</sup> F. Graf MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, I (1945).

<sup>5</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

<sup>6</sup> F. R. LILLIE, Science (N.Y.) 38, 524 (1913).

<sup>7</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU, R. KUHN und K. WALLENFELS, Naturwiss. 27, 433 (1939); 28, 144 (1940).

<sup>8</sup> M. HARTMANN und O. SCHARTAU, Biol. Zbl. 59, 571 (1939).

<sup>9</sup> F. R. LILLIE, J. Exp. Zool. 14, 515 (1913).

<sup>1</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU, R. KUHN und K. WALLENFELS, Naturwiss. 27, 433 (1939); 28, 144 (1940).

<sup>2</sup> R. KUHN und K. WALLENFELS, Ber. dtsh. Chem. Ges. 73, 458 (1940).

<sup>3</sup> M. HARTMANN und O. SCHARTAU, Biol. Zbl. 59, 571 (1939).

Tabelle IX

Agglutinationsgrade der Spermien der Regenbogenforelle unter der Einwirkung von Rohagglutinin  
Stammlösung: 9,6 mg Rohagglutinin je 1 cm<sup>3</sup> 1%iges Natriumchlorid Verdünnung mit Wasser. Agglutinationsgrade (subjektiv): I–IV  
(nach HARTMANN, MEDEM, KUHN und BIELIG<sup>1</sup>)

Konzentration an Rohagglutinin (g je cm <sup>3</sup> )	Beobachtete Agglutinationsstufen der Spermien
9,6 · 10 <sup>-3</sup>	Grad IV. Stärkste Agglutination. Sperma sofort «geronnen»; völlig bewegungslos; z.T. an der Sonde haftend. Streifen und Haufen schon makroskopisch erkennbar.
2,4 · 10 <sup>-5</sup>	Grad III. Starke Agglutination. Sofort beginnende Ausbildung ausgedehnter dicker Netze (Eisblumenmuster). Spermien z.T. in den Netzen noch bis zu 30 Sekunden zitternd. Die Netzbildung nimmt bis zu 1 Minute dauernd zu, wobei die Netzfäden schrumpfen und reißen.
4,8 · 10 <sup>-7</sup>	Grad II. Mittelstarke Agglutination. Nach 20 Sekunden beginnende Ausbildung dünner Netze, die bis zu 90 Sekunden anhält. Die Netze schrumpfen und reißen. — Vor Beginn der Agglutination entfalten die Spermien eine ungehemmte, freie Aktivität (Aktivitätsgrad 2). Nach Beginn der Agglutination bewegen sie sich innerhalb und außerhalb der Netze noch bis zu 1 Minute an Ort.
4,8 · 10 <sup>-9</sup>	Grad I. Schwache Agglutination. 25–30 Sekunden nach Einbringen des Spermas beginnende Bildung von Agglutinationsfäden. Vor Beginn der Agglutination sind die Spermien voll aktiv (Aktivitätsgrad 2); z.T. findet lose Zusammenlagerung (Adhäsion) statt. Das Ende der Spermienbewegung fällt mit der vollen Ausbildung der Agglutinationsfäden zusammen (1 Minute).
4,8 · 10 <sup>-10</sup>	Keine Agglutination. Verhalten der Spermien wie in Wasser; Aktivitätsgrad 1–2; 20 Sekunden. Mit Verlangsamung der Bewegung beginnt lose Zusammenlagerung (Adhäsion) der Spermatozoen, aus der sich diese bei Berührung wieder lösen. Gesamtbewegungsdauer: 35–40 Sekunden.

phorwolframsäure eine stickstoffreiche Base abscheiden, wobei ein aminosäurehaltiges Filtrat zurückbleibt<sup>2</sup>. Das Agglutinin aus den Eihüllen von *Strongylocentrotus purpuratus* verhält sich nach TYLER und FOX<sup>3</sup> ähnlich. Es wird durch proteolytische Fermente inaktiviert.

In einer bemerkenswerten Arbeit beschreibt POPA<sup>4</sup> die mikroskopisch erkennbaren Veränderungen, welche die Spermien von *Arbacia* im Verlaufe der Agglutination erfahren: 1. bildet sich unter dem Einfluß des Eisekretwassers an der Spitze des Spermakopfes für eine Minute eine Mikropyle aus, durch die eine klebrige Substanz als Flocke austritt (mit diesen Flocken haften die noch beweglichen Spermien aneinander [reversible Phase der Agglutination]); 2. löst sich die zytoplasmatische, lipophile, den Kern umgebende Hülle allmählich ab und häuft sich als «Lateralkörper» am Kopf des Restspermiums an. In dieser irreversiblen Phase der Agglutination werden die Spermien unbeweglich (Abb. 1).

Bei *Salmo irideus*<sup>5</sup> ist der Träger der Agglutinationswirkung im Gegensatz zu *Arbacia* nicht in der Eihülle,

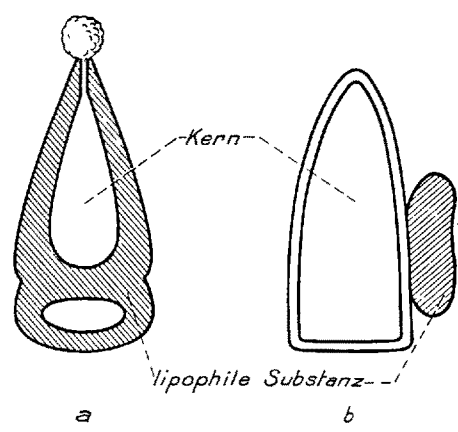


Abb. 1. Veränderungen von *Arbaciaspermien* bei der Agglutination (nach POPA<sup>4</sup>).

- a Bewegliches Spermium mit Mikropyle und Flocke.
- b Irreversibel unbewegliches Spermium mit Lateralkörper.

sondern im Eiinnern enthalten. Das Agglutinin wird von dort an das Fruchtwasser abgegeben. Während natives Fruchtwasser die Aktivität der Forellenspermien erhöht und ihre Bewegungsdauer erheblich verlängert, tritt in verdünntem Fruchtwasser starke, irreversible Agglutination der Spermatozoen ein. 1%iges Na-Chlorid verhindert diese Koagulation. Durch zwei

<sup>1</sup> Vgl. Note 1, Tab. IV.  
<sup>2</sup> R. KUHN und K. WALLENFELS, Ber. dtsch. Chem. Ges. 73, 458 (1940).  
<sup>3</sup> A. TYLER und S. W. FOX, Science (N.Y.) 90, 516 (1939).  
<sup>4</sup> G. T. POPA, Biol. Bull. 52, 238 (1927).  
<sup>5</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

<sup>1</sup> G. T. POPA, Biol. Bull. 52, 238 (1927).

minütiges Kochen des Fruchtwassers wird die  $G_{II}$ -Wirkung vernichtet.

KUHN und BIELIG<sup>1</sup> haben das *Forellenagglutinin* aus der wässrigen Eiflüssigkeit durch wiederholtes Umfällen zunächst mit Wasser, dann mit 30%igem Azeton und Lösen in 1%igem Na-Chlorid angereichert und durch Dialyse gegen Wasser abgeschieden. 7500 (= 350 g) Eier ergaben 56 g Rohagglutinin in Lamellen, d. h. 47% des Eitrockengewichts. Das Regenbogenforellenagglutinin hat die Eigenschaften eines Eiweißkörpers von Globulinnatur. Es ist thermolabiler als der *Arbacia*-hilfsträger, unlöslich in Wasser, aber löslich in verdünnten Salzlösungen und in verdünnten Säuren und Laugen. Halbsättigung mit Ammonsulfat schlägt das  $G_{II}$  nieder. Die Lösung in 1%igem Na-Chlorid reagiert mit nukleinsaurem Natrium und mit Agar-Agar unter Fällung. In seiner elementaren Zusammensetzung und seinem Gehalt an gebundenem Zucker und Phosphatiden ähnelt es den *Ichthulinen*, die aus vielen Fischeiern erhalten worden sind<sup>2</sup>. Das Trockenpräparat wird zunehmend schwerer löslich. Die schwerlösliche Form entspricht einem Globulan<sup>3</sup>. Das Rohagglutinin wirkt noch in einer Verdünnung von 1:5 Milliarden auf die Spermatozoen der Regenbogenforelle. Die einzelnen Stufen der Agglutination bei abnehmender Konzentration des Wirkstoffes zeigt Tab. IX. Nichtdialysiertes Rohagglutinin, das BIELIG und MEDEM<sup>4</sup> 1948 aus den Eiern zweijähriger Regenbogenforellen bereiteten, wirkte mehr als 1000mal schwächer agglutinierend auf die Spermien gleichaltriger Männchen als das im Vorjahre dargestellte, eben beschriebene Präparat aus den Eiern vierjähriger Tiere. Die Agglutination des Eiinhalt war indessen beidmalig annähernd dieselbe. Nach Untersuchungen von BERGOLD, BIELIG und MEDEM<sup>5</sup> mittels der Ultrazentrifuge besteht das Rohagglutinin aus zwei Komponenten mit  $S_{20} = 3,4$  und  $= 7,3$ . Bei Annahme von Sphäroproteiden entspricht dies Molekulargewichten von  $\sim 35000$  und  $\sim 70000$ . Nach 10minütigem Kochen der Lösung in 0,5 Mol Na-Hydrogenkarbonat ist die Komponente mit dem kleineren Molekulargewicht parallel mit dem Ausbleiben der Agglutinationswirkung verschwunden.

Die Bachforelle<sup>6</sup> unterscheidet sich hinsichtlich der Agglutination dadurch von *Salmo irideus*, daß zwar der verdünnte Eiinhalt, nicht aber das Eisekretwasser die Spermien zusammenballt. Ähnlich findet bei den Muscheln *Pecten varius* und *Solen ensis* Agglutination nur direkt an den intakten Eiern statt<sup>7</sup>. Beim Flußneunauge<sup>8</sup> folgen Aktivierung und Agglutinierung der

Spermien durch Eisekretwasser zeitlich aufeinander. Die Spermien verkleben bei der Agglutination nicht wie bei *S. irideus* unter Ausbildung von Netzen, sondern lagern sich strahlenförmig mit den Schwänzen an zentral geballtes Sperma an.

Eingehend untersucht haben TYLER und Mitarbeiter<sup>1</sup> das Gynogamon II der Schnecke *Megathura crenulata*. Dieses hochmolekulare Agglutinin, welches Eiweißreaktionen gibt, wird durch Dialyse, Adsorption an Ca-Karbonat und Fällung des Seewassereluats mit Ammonsulfat gereinigt. Von den bisher beschriebenen Agglutininen unterscheidet sich das *Megathura*agglutinin durch seine außerordentliche Thermostabilität. 24stündiges Kochen bei  $p_H$  3 inaktiviert nur zu 50%. Das Agglutinin ist in destilliertem Wasser instabil und wird durch proteolytische Fermente zerstört.

Hinsichtlich der Erforschung der  $G_{II}$ -Wirkstoffe bei Säugetieren verdient eine Arbeit von POPA<sup>2</sup> besondere Erwähnung, die die agglutinierende Wirkung von *Follikelflüssigkeit* auf Säugetierspermien beschreibt. In der zellfreien Flüssigkeit GRAAFscher Follikel von Kuh, Schaf und Schwein werden arteigene, aus Hoden, Nebenhoden oder Samenblasen gewonnene Spermien 1–20 Minuten nach dem Einbringen zu durchscheinenden, bröckligen Coagula zusammengeballt. Das Agglutinin, welches wahrscheinlich vom Ei abgegeben wird, wird durch Erhitzen auf 56° inaktiviert. Eine Agglutination findet auch an gekochtem Sperma statt, fehlt aber im Spermaliquor. Sie soll in einer Reaktion zwischen den Lipoiden der Spermienoberfläche und dem Agglutinin der Follikelflüssigkeit bestehen. Andere lipoidhaltige Gewebe, z. B. Gehirn, Schilddrüse und Subkutanfett, geben die als «Lipogelreaktion» bezeichnete Umsetzung nämlich ebenso wie reines Kephalin, während Eialbumin nicht reagiert.

Die folgende Zusammenstellung gibt eine Übersicht über weitere Tierarten, bei denen *Agglutination art-eigener Spermien* im Eisekretwasser oder am Ei selbst beobachtet wurde, über deren agglutinierendes Prinzip aber nichts Genaueres bekannt ist.

- Polychäten:* *Nereis limbata* (LILLIE, 1913, JUST, 1915, SAMPSON, 1922, POPA, 1927<sup>3,4,5,6</sup>)  
*Platynereis megalops* (JUST, 1915<sup>4</sup>)  
*Echinodermen:* *Arbacia punctulata* (LILLIE, 1913; SAMPSON, 1922<sup>3,5</sup>)  
*Echinarachnius parma* (JUST, 1919<sup>7</sup>)  
*Echinus microtuberculatus* (JUST, 1929<sup>8</sup>)  
*Strongylocentrotus purpuratus* (TYLER und FOX, 1939<sup>9</sup>)

<sup>1</sup> A. TYLER, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 25, 317 (1939); 26, 249 (1940); Biol. Bull. 78, 159 (1940). – A. TYLER und S. W. FOX, Science (N.Y.) 90, 516 (1939).

<sup>2</sup> G. T. POPA, Biol. Bull. 52, 223 (1927).

<sup>3</sup> F. R. LILLIE, J. Exp. Zool. 14, 515 (1913).

<sup>4</sup> E. E. JUST, Biol. Bull. 28, 93 (1915).

<sup>5</sup> M. M. SAMPSON, Biol. Bull. 43, 267 (1922).

<sup>6</sup> G. T. POPA, Biol. Bull. 52, 238 (1927).

<sup>7</sup> E. E. JUST, Biol. Bull. 36, 11 (1919).

<sup>8</sup> E. E. JUST, Biol. Bull. 57, 326 (1929).

<sup>9</sup> A. TYLER und S. W. FOX, Science (N.Y.) 90, 516 (1939).

<sup>1</sup> Vgl. Note 6 von S. 21.

<sup>2</sup> Vgl. die Übersicht bei J. NEEDHAM, Chemical Embryologie I, 323 (1933).

<sup>3</sup> Vgl. C. T. MÖRNER, Z. physiol. Chem. 40, 429 (1904).

<sup>4</sup> H.-J. BIELIG und F. Graf MEDEM, unveröffentlicht.

<sup>5</sup> G. BERGOLD, H.-J. BIELIG und Graf F. MEDEM, unveröffentlicht.

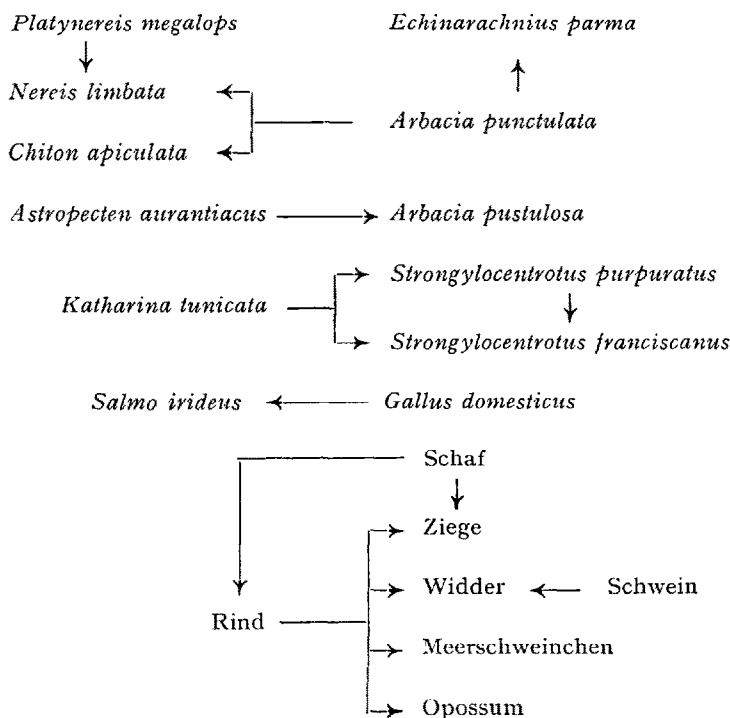
<sup>6</sup> M. HARTMANN, F. Graf MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

<sup>7</sup> F. Graf MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).

<sup>8</sup> O. SCHARTAU und G. MONTALENTI, Biol. Zbl. 61, 473 (1941).

	<i>Strongylocentrotus franciscanus</i> (LOEB, 1914 <sup>1</sup> , LILLIE, 1921 <sup>2</sup> , SAMPSON, 1922 <sup>3</sup> )
	<i>Echinus esculentus</i> (CHARTER, 1932 <sup>4</sup> )
	<i>Paracentrotus lividus</i> (JUST, 1929, HARTMANN und Mitarbeiter, 1939 <sup>5</sup> )
	<i>Echinometra subangularis</i> (SOUTHWICK, 1939) <sup>7</sup>
Mollusken:	<i>Katharina tunicata</i> (SAMPSON, 1922) <sup>8</sup>
	<i>Solen ensis</i> (MEDEM, 1942) <sup>9</sup>
	<i>Pecten varius</i> (MEDEM, 1942) <sup>9</sup>
Tunicaten:	<i>Ciona intestinalis</i> (FUCHS, 1914) <sup>10</sup>

Entsprechend ihren physikalisch-chemischen Unterschieden wirken die Agglutinine verschiedener Tierarten spezifisch. Es sind indessen einige Fälle bekanntgeworden, in denen eine Reaktion zwischen dem  $G_{II}$  einer Art und den Spermien einer anderen Art stattfindet. LILLIE<sup>11</sup> unterscheidet diese Agglutination artfremder Spermien als *Heteroagglutination* von der Isoagglutination arteigener Spermatozoen. Die folgende Übersicht enthält Beispiele derartiger Heteroagglutinationen (Wirkung des  $G_{II}$  in Pfeilrichtung<sup>3,12 13</sup>):



Der Mechanismus der Agglutination der Spermien durch Gynogamon II ähnelt der serologischen Reaktion von Antigen und Antikörper. Der Agglutininreaktion entspricht die Präzipitinreaktion. Hierher gehört die Beobachtung von TYLER<sup>1</sup>, daß hitzeinaktiviertes *Arbacia*agglutinin die arteigenen Spermien zwar nicht mehr zusammenballt, mit diesen aber noch reagiert. Man erkennt das daran, daß eine spätere Zugabe von nativem Agglutinin nun ebenfalls keine Agglutination mehr bewirkt. Der genannte Autor erklärt diesen Effekt mit einem durch Hitze bewirkten Übergang des normalen, multivalenten Agglutinins in ein *univalentes Agglutinin*. In diesem Zusammenhang sei weiter die Heteroagglutination von Spermien durch Körperflüssigkeiten erwähnt. Eine solche erleiden zum Beispiel die Spermien von *Nereis limbata* und *Echinarachnius parma* durch das Blut von *Arbacia punctulata*<sup>2</sup> und die Spermatozoen vieler Wirbelloser und Wirbeltiere durch das Serum des Hummers *Panuliris interruptus*<sup>3</sup>. Nach TYLER und SCHEER<sup>4</sup> kommt die letztere Wirkung einer

<sup>1</sup> J. LOEB, J. Exp. Zool. 17, 123 (1914).  
<sup>2</sup> F. R. LILLIE, Biol. Bull. 40, 1 (1921).  
<sup>3</sup> M. M. SAMPSON, Biol. Bull. 57, 326 (1929).  
<sup>4</sup> G. S. CHARTER, J. Exp. Biol. 9, 253 (1932).  
<sup>5</sup> E. E. JUST, Biol. Bull. 43, 267 (1922).  
<sup>6</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60 398 (1940).  
<sup>7</sup> W. E. SOUTHWICK, Biol. Bull. 77, 147, 157 (1939).  
<sup>8</sup> M. M. SAMPSON, Biol. Bull. 43, 267 (1922).  
<sup>9</sup> Graf F. MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).  
<sup>10</sup> H. M. FUCHS, Arch. Entwicklungsmechanik 40, 157 (1914).  
<sup>11</sup> F. R. LILLIE, J. Exp. Zool. 14, 515 (1913).  
<sup>12</sup> F. R. LILLIE, Science (N.Y.) 38, 524 (1913). – M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940). – G. T. POPA, Biol. Bull. 52, 223 (1927). – E. E. JUST, Biol. Bull. 36, 11 (1919).  
<sup>13</sup> H.-J. BIELIG und F. Graf MEDEM, unveröffentlicht.

bei der Elektrophorese langsam wandernden, nicht hämozyaninartigen Proteinkomponente zu. Ferner zeigten CHAMBERS und Mitarbeiter<sup>5</sup>, daß man durch Einspritzen von Stierspermaauszügen in Kaninchen ein spezifisches Antiserum erhält, das die Stierspermien agglutiniert. Die Spermien der Regenbogenforelle wur-

<sup>1</sup> A. TYLER, Biol. Bull. 81, 190 (1941).  
<sup>2</sup> F. R. LILLIE, Science (N.Y.) 38, 524 (1913). – E. E. JUST, Biol. Bull. 36, 11 (1919).  
<sup>3</sup> A. TYLER und C. B. METZ, J. Exp. Zool. 100, 387 (1945).  
<sup>4</sup> A. TYLER und B. T. SCHEER, Biol. Bull. 89, 193 (1945).  
<sup>5</sup> G. HENLE, W. HENLE und L. A. CHAMBERS, J. Exp. Med. 68, 335 (1938).

den durch Rinderserum und durch Serumalbumin (Hammel) zur Agglutination gebracht<sup>1</sup>. Von ROSENTHAL<sup>2</sup> wurde schließlich eine agglutinierende Wirkung beschrieben, die aus Faeces isolierte Stämme von *Escherichia coli* auf menschliche und Rattenspermien ausüben. Vielleicht geht auch die von KATO<sup>3</sup> beobachtete Agglutination verschiedener Säugetierspermien durch Vaginalsekrete auf die Anwesenheit solcher sehr thermolabiler Bakterienagglutinine zurück.

### Der Androgamon-II-Komplex

Der Faktor, den HARTMANN, SCHARTAU und WALLENFELS<sup>4</sup> bei *Arbacia pustulosa* ursprünglich Androgamon II nannten, findet sich in der Nukleoproteidfraktion, die zurückbleibt, wenn man aus schonend getrocknetem Sperma die  $A_{II}$ -haltige Fraktion mit Methanol herauslöst. Die  $A_{II}$ -Fraktion vermag folgende Wirkungen zu entfalten: 1. eine antagonistische Wirkung gegenüber dem Gynogamon II (Isoagglutinin); 2. eine Auflösung der Eihülle; 3. eine Fällung der Eihülle, die auch die Ursache einer häufiger beobachteten, irreversiblen Agglutination der Eier sein dürfte.

Eine abschwächende Wirkung von nativem Seeigelsperma auf die Agglutination durch Eisekretwasser war bereits DE MEYER<sup>5</sup> und LILLIE<sup>6</sup> bekannt. Eingehend studiert wurde dieses Phänomen bei Wirbellosen indessen erst von FRANK<sup>7</sup> (*Arbacia punctulata*), SOUTHWICK<sup>8</sup> (*Echinometra subangularis*), TYLER<sup>9</sup> (*Megathura crenulata*) und vor allem von HARTMANN, SCHARTAU und WALLENFELS<sup>10</sup> (*Arbacia pustulosa*). Nach diesen Arbeiten vermögen auch filtrierte Kochsäfte und Seewasserauszüge aus gefrorenem Sperma das in den jeweiligen Eisekretwassern enthaltene Agglutinin unwirksam zu machen.

Soweit bisher geprüft, sind die  $G_{II}$ -antagonistische und die fällende oder lösende Wirkung primär vergesellschaftet. Dies gilt für das Sperma des Seeigels *A. pustulosa*<sup>10</sup>, der Schnecken *Megathura crenulata*<sup>9</sup>, *Halio. tuberculata*, *Fissurella nubecula*, der Muschel *Pecten varius*<sup>10</sup> und der Forelle *Salmo irideus*<sup>11</sup>. Das Sperma der Bachforelle<sup>12</sup> u. des Flußneunauges<sup>13</sup> wurde bisher

nur auf die  $G_{II}$ -antagonistische Wirkung hin untersucht und diese bestätigt gefunden.

Die fällende und die lösende Wirkung auf die Eihülle können gemeinsam im Spermaauszug gefunden werden oder dieser enthält, soweit bekannt, nur die eine oder die andere Wirkung.

Es wurden beobachtet: a) fällende Wirkung und Eiagglutination gleichzeitig bei *Echinocardium cordatum*, *Psammechinus miliaris*, *Strongylocentrotus droebachiensis* und *Echinus esculentus*<sup>1</sup>; b) nur Eiagglutination bei *Arbacia punctulata*<sup>2</sup> und *Strongylocentrotus purpuratus*<sup>3</sup>; c) nur die lösende Wirkung auf die Gallerthüllen bei *Arbacia pustulosa*, *Paracentrotus lividus*, *Echinus microtuberculatus*<sup>4</sup>, *Megathura crenulata*, *Halio. cracherodii*<sup>5</sup>, *H. tuberculata*, *Fissurella nubecula*, *Pecten varius*<sup>6</sup>; d) nur die fällende Wirkung auf die Eihüllen bei *Salmo irideus*<sup>7</sup>.

1940 fand TYLER<sup>5</sup> bei *Megathura crenulata*, daß durch zweiminütiges Erhitzen von kaltbereiteten Spermaauszügen auf 60° die eihüllenlösende Wirkung zerstört wird, während die Anti- $G_{II}$ -Wirkung erhalten bleibt. MONROY und RUFFO<sup>8</sup> zeigten später, daß sich aus dem Sperma von *Arbacia pustulosa* (syn. *A. lixula*) ein eihüllenlösendes Prinzip abtrennen läßt, das nun umgekehrt das Eiagglutinin nicht mehr inaktiviert. Dieser Stoff erwies sich als ein mucinspaltendes, viskositätsniedrigendes Ferment, eine *Hyaluronidase*. Er unterscheidet sich durch seine Thermolabilität — fünfminütiges Erhitzen auf 100° inaktiviert total — von einem ebenfalls gallertlösenden Faktor, den WALLENFELS<sup>9</sup> schon 1940 aus getrocknetem, methanolextrahiertem Sperma angereichert hatte, der aber auch durch fünfstündige Einwirkung von 98° in seiner Wirkung nicht beeinträchtigt wird. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß McCLEAN und HALE<sup>10</sup> auch Azoproteine sowie Ascorbinsäure und deren Oxydationsprodukte befähigt gefunden haben, ähnlich viskositätsniedrigend zu wirken wie Hyaluronidase, und zwar ohne reduzierende Gruppen aus Hyaluronsäure freizulegen.

Wir haben es nach dem Gesagten also in den Spermaauszügen mit verschiedenen Stoffen zu tun, die die eine oder die andere der ursprünglich dem  $A_{II}$  zugeschriebenen Wirkungen entfalten ( $A_{II}$ -Komplex). TYLER<sup>11</sup> nimmt an, daß die  $G_{II}$ -antagonistische Wirkung und die gallertthüllenlösende Wirkung im Sperma von *Mega-*

<sup>1</sup> H.-J. BIELIG und Graf F. MEDEM, unveröffentlicht.

<sup>2</sup> L. ROSENTHAL, J. Bacteriol. 45, 545 (1943).

<sup>3</sup> K. KATO, Mem. Faculty Sci. Taihoku Imp. Univ. 19, 1 (1936).

<sup>4</sup> K. WALLENFELS, Österr. Chem.-Ztg. Nr. 19/20 (1940).

<sup>5</sup> J. DE MEYER, Arch. Biol. 26, 65 (1911).

<sup>6</sup> F. R. LILLIE, J. Exp. Zool. 14, 515 (1913).

<sup>7</sup> J. A. FRANK, Biol. Bull. 76, 190 (1939).

<sup>8</sup> W. E. SOUTHWICK, Biol. Bull. 77, 147, 157 (1939).

<sup>9</sup> A. TYLER, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 25, 317 (1939); 26, 249 (1940); Biol. Bull. 78, 159 (1940).

<sup>10</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940).

<sup>11</sup> Graf F. MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).

<sup>12</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b 350 (1947).

<sup>13</sup> J. RUNNSTRÖM, S. LINDVALL und A. TISELIUS, Nature (London) 153, 285 (1944). — O. SCHARTAU und G. MONTALENTI, Biol. Zbl. 61, 47 (1941).

<sup>1</sup> Vgl. Note 13, I. Kol.

<sup>2</sup> J. A. FRANK, Biol. Bull. 76, 190 (1939).

<sup>3</sup> A. TYLER, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 25, 317 (1939); 26, 249 (1940); Biol. Bull. 78, 159 (1940).

<sup>4</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940).

<sup>5</sup> A. TYLER, 26, 249 (1940); Biol. Bull. 78, 159 (1940).

<sup>6</sup> F. Graf MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).

<sup>7</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Naturwiss. 34, 25 (1947); Z. Naturforsch. 2b, 380 (1947).

<sup>8</sup> A. MONROY und A. RUFFO, Nature (London) 159, 603 (1947).

<sup>9</sup> K. WALLENFELS, Österr. Chem.-Ztg. Nr. 19/20 (1940).

<sup>10</sup> D. McCLEAN und C. V. HALE, Biochem. J. 35, 159 (1941).

<sup>11</sup> A. TYLER, 26, 249 (1940); Biol. Bull. 78, 159 (1940).

*thura crenulata* entsprechend den Anschauungen der Immunchemie wie thermostabiler Antikörper und thermostabiles Agens zum Komplement vereinigt sind.

Es seien im folgenden die Methoden beschrieben, die zur Anreicherung der eihüllenlösenden Wirkung des  $A_{II}$ -Komplexes von WALLENFELS<sup>1</sup> thermostabiler  $A_{II}$ -Faktor und von MONROY und RUFFO<sup>2</sup> (thermostabiler  $A_{II}$ -Faktor) benutzt wurden.

WALLENFELS<sup>1</sup> fällt die natronalkalische Lösung der durch Hitze nicht koagulierbaren Nukleoproteidfraction von  $A_I$ -freiem *Arbacia*sperma, fraktioniert mit Phosphorwolframsäure. Die ersten Fällungen enthalten die gesamte Wirksamkeit. Beim Zerlegen mit Baryt geht das  $A_{II}$  in die wässrige Lösung. Es ist nicht dialysierbar und wird nicht von Essigsäure oder Methanol gefällt. Von dem Trockenpräparat, einem farblosen, 9% Stickstoff enthaltendem Lack lösen 0,5 mg in 1 cm<sup>3</sup> Seewasser bzw. damit isotonischem Na-Chlorid die Gallerthülle eines Eies von *A. pustulosa* in 30 Sekunden vollständig auf (Tab. X). Löste man dieselbe Menge in 1 cm<sup>3</sup> mit Seewasser isotonischem Ca-Chlorid, so betrug die Auflösungszeit für die Eigallerte 3 Minuten. Cu-2-Chlorid und K-Cyanid hemmen die Wirkung des thermostabilen  $A_{II}$ -Faktors nicht.

Tabelle X

Lösung der Eigallerte von *Arbacia pustulosa* durch arteigenen gereinigten eihüllenlösenden thermostabilen  $A_{II}$ -Faktor\* (nach HARTMANN, SCHARTAU und WALLENFELS<sup>3</sup>, abgeändert).

$A_{II}$ -Faktor je cm <sup>3</sup> Seewasser	Einwirkungszeit und Effekt
$5 \cdot 10^{-4}$	Eigallerte in 30–40 Sekunden total gelöst
$1 \cdot 10^{-4}$	Eigallerte in etwa 5 Minuten total gelöst
$2,5 \cdot 10^{-5}$	Eigallerte nicht mehr gelöst, aber gelockert
$5 \cdot 10^{-6}$	Kein Unterschied mehr zu Seewasser allein

\* Reinigungsstufen vgl. im Text.

II. MONROY und RUFFO<sup>2</sup> verwenden die von CLAUDE und DURAN-REYNALS<sup>4</sup> angegebene Technik zur Extraktion der Hyaluronidase aus Stierhoden. Das homogenisierte Sperma von *A. pustulosa* oder *Sphaerechinus granularis* wird mit n/10 Essigsäure ausgezogen, der Extrakt mit Azeton gefällt und die Fällung im Vakuum getrocknet. Nach Aufschlännen in 0,85%igem Na-Chlorid werden 60% des Trockenpräparates als unlöslicher Niederschlag abzentrifugiert. Die Lösung, welche 15 mg Trockensubstanz je 10 cm<sup>3</sup> enthält, löst die Eihüllen unbefruchteter, arteigener Eier unter vorhergehender Quellung, in 10 bis 15 Min. auf. Diese Wirkung ist rund 60mal geringer als die des gereinigten thermostabilen Faktors von WALLENFELS<sup>1</sup>. Indessen ist die angewandte Fällung mit Azeton nach Befunden

von FAVILLI und BERGAMINI<sup>1</sup> nicht günstig, da sie die Extraktion des Ferments aus dem Trockenpulver erschwert. Die *Arbacia*hyaluronidase wird weder durch Dialyse noch durch arteigenes Eisekretwasser inaktiviert.

Den Ausgangspunkt für die beschriebene Untersuchung auf Hyaluronidase bei *Arbacia* bildete die 1942 von McCLEAN und ROWLANDS<sup>2</sup> gefundene Beziehung dieses Ferments zum Befruchtungsvorgang bei Säugetieren<sup>3</sup>. Angereicherte Auszüge aus Säugetiersperma oder -hoden sind danach befähigt, die das Säugerei nach der Ovulation in der Tube umgebenden Follikelzellen abzulösen und so den Spermien den Weg zum Ei freizugeben. Diese Reaktion wird durch homologes oder heterologes Blutserum gehemmt<sup>4</sup>, was nach HAAS<sup>5</sup> auf der Anwesenheit eines Antiinvasins I im Plasma beruht, das Hyaluronidase verschiedenster Herkunft zerstört. Die Wirkung der Sera folgender Individuen nimmt gegenüber Stierhodenhyaluronidase in der Reihenfolge Ratte, Kücken, Kaninchen, Pferd, Limulus, Mensch, Kuh ab<sup>6</sup>.

Die Darstellung mehr als 10000fach angereicherter Hyaluronidasepräparate aus Stierhoden beschreibt HAHN<sup>7</sup> nach Vorarbeiten von MORGAN und McCLEAN<sup>8</sup>, MADINAVEITIA<sup>9</sup> und FAVILLI und BERGAMINI<sup>10</sup>.

Hodentrockenpulver wird mit n/10 Essigsäure extrahiert, einer fraktionierten Ammonsulfatfällung unterworfen, wobei das Ferment bei 70%iger Sättigung niedergeschlagen wird. Durch Zusatz von Cu-Sulfat, Halbsättigung mit Na-Chlorid und fraktionierte Pb-Azetatfällung werden weitere unwirksame Proteine abgetrennt. Nach dieser Stufe sind etwa 80% der Aktivität erhalten und noch annähernd 3,5% der ursprünglichen Stickstoffmenge. Die fraktionierte NH<sub>4</sub>- und Pb-Fällung werden wiederholt. Das danach 300fach angereicherte, noch uneinheitliche Produkt wird durch Elektrophorese auf 10000fach konzentriert. Es zeigt dann in der Ultrazentrifuge eine mittlere Sedimentationskonstante von  $S_{20} = 4,60$  gegenüber 4,29 der aktiven Komponente.

Das Präparat ist noch in einer Verdünnung von 1:10<sup>7</sup> mucolytisch wirksam, die Hydrolyse von Hyaluronsäure indessen nicht mehr vollständig, woraus auf begleitende Enzyme in den Rohpräparaten geschlossen wird.

Der isoelektrische Punkt liegt bei  $p_H$  5,7; das  $p_H$ -Optimum bei 5,5. Zunehmende Ionenstärke vermindert

<sup>1</sup> F. FAVILLI und M. BERGAMINI, Biochem. Z. 313, 243 (1942).

<sup>2</sup> D. McCLEAN und I. W. ROWLANDS, Nature (London) 150, 627, (1942).

<sup>3</sup> Vgl. die Zusammenfassung über Hyaluronidase (Mucinas. Spreading Factor) bei F. DURAN-REYNALS, Ann. Rev. Biochem. 13, 34 (1944).

<sup>4</sup> D. McCLEAN, J. Pathol. Bacteriol. 54, 284 (1942). – E. FEKETE und F. DURAN-REYNALS, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 52, 119 (1943). – S. L. LEONARD und R. KURZROK, Endocrinol. 37, 171 (1945).

<sup>5</sup> E. HAAS, J. biol. Chem. 163, 63, 89, 101 (1946).

<sup>6</sup> S. L. LEONARD und R. KURZROK, Endocrinol. 39, 85 (1946).

<sup>7</sup> L. HAHN, Ark. Kemi Mineral. Geol. 19.4, n:r 35 (1944); Biochem. Z. 315, 83 (1943).

<sup>8</sup> W. T. J. MORGAN und D. McCLEAN, J. Chem. Soc. Ind. 51, 912 (1932).

<sup>9</sup> J. MADINAVEITIA, Biochem. J. 35, 447 (1941).

<sup>10</sup> F. FAVILLI und M. BERGAMINI, Biochem. Z. 313, 243 (1942).

<sup>1</sup> K. WALLENFELS, Österr. Chem.-Ztg. Nr. 19/20 (1940).

<sup>2</sup> A. MONROY und A. RUFFO, Nature (London) 159, 603 (1947).

<sup>3</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU, R. KUHN und K. WALLENFELS, 60, 398 (1940).

<sup>4</sup> A. CLAUDE und F. DURAN-REYNALS, J. Exp. Med. 65, 661 (1937).



die Aktivität des Enzyms<sup>1</sup>. Ascorbinsäure und Dicoumarin hemmen die Hyaluronidase mit 10 mg% um 25 bzw. 35%; phosphoryliertes Hesperidin und Germanin mit 1 mg% zu 65 bzw. 75%<sup>2</sup>. Ein Antagonist des Spreading-Faktors ist ferner Heparin<sup>3</sup>, das nach SWYER<sup>4</sup> mit 6,6 mg% die Wirkung des Ferments total aufhebt. Salizylsäure ist *in vitro* unwirksam, Azetylsalizylsäure wirkt schwach hemmend<sup>4</sup>.

Als Substrat zur Bestimmung der Aktivität der Hyaluronidase wird im allgemeinen Hyaluronsäure angewandt. Es sind Darstellungen reiner Präparate aus Glaskörper<sup>5</sup>, Nabelschnur<sup>6</sup> und Placenta<sup>7</sup> beschrieben.

Zur Ermittlung des Hyaluronidasegehaltes wurden zahlreiche Methoden beschrieben:

1. Die Messung des Spreading-Effekts in der Haut von Kaninchen und Meerschweinchen<sup>8</sup>.

2. Die Bestimmung der viskositätserniedrigenden Wirkung auf Hyaluronsäure<sup>9</sup>. 1 viskositätsreduzierende Einheit (VRU) ist diejenige Konzentration an Enzym in 0,5 cm<sup>3</sup> Lösung, die die Viskosität von 2,5 cm<sup>3</sup> einer Lösung aus 4 Vol. 0,2%igem K-Hyaluronat und 1 Vol. 1-Mol-Zitratpuffer vom  $p_H$  4,6 bei 34° nach 20 Min. Einwirkung auf die Hälfte des Kontrollansatzes mit hitzeinaktiviertem Enzym herabsetzt. Nach der Abwandlung der Methode durch SWYER und EMMENS<sup>9</sup> ist 1 Hyaluronidaseeinheit = 53,5 VRU.

3. Der MCP-Test, der die Fähigkeit der Hyaluronidase benutzt, die durch Essigsäure hervorgerufene Mucinballung in einem Substrat aus Hyaluronsäure und Serumalbumin zu verhindern<sup>10</sup>.

4. Die Bestimmung der reduzierenden Substanzen (N-Azetyl-glucosamin, Glukuronsäure), die unter Wirkung des Ferments aus Hyaluronsäure gebildet werden<sup>11</sup>.

5. Eine Methode zur Bestimmung der Trübungsabnahme, die Hyaluronidase auf mit Essigsäure gefällte Hyaluronsäure in Gegenwart von Serumalbumin bewirkt<sup>12</sup>. 2 TRU (Turbidity Reducing Unit) = 1 VRU.

6. Die Standardisierung im Rattentest<sup>13</sup>. 1 Rat-

Ova-Einheit ist die Menge an Enzym in 0,2 cm<sup>3</sup> Ringer-Lösung, die die Follikelzellen von 50% der vorliegenden Eier in  $\frac{3}{4}$  bis 1 Stunde ablöst.

Zur Bestimmung der Hyaluronidase im Sperma eignen sich vor allem die Methoden 2, 5 und 6. Es wurde gefunden, daß eine direkte Beziehung zwischen Fermentgehalt und Spermiedichte bei Kaninchen, Stier, Mensch und Eber besteht. 100 Millionen Spermatozoen je 1 cm<sup>3</sup> Samen dieser Individuen enthalten 1070, bzw. 375, bzw. 21, bzw. 11 VRU<sup>1</sup>. Ein Rattenhoden enthält etwa 5 VRU<sup>2</sup>. 75% der Hyaluronidase im Kaninchen-sperma ist an die Spermatozoen gebunden, der Rest im Spermaliquor gelöst<sup>3</sup>. Die Spermien machen das Ferment nur aus seiner Bindung frei; sie bilden selbst keine Hyaluronidase. Diese entstammt wahrscheinlich dem Epithel der Tubuli seminiferi des Hodens<sup>3</sup>. Männer mit Azoospermie lassen das Enzym im Sperma ebenso vermissen<sup>4</sup> wie Kaninchenhoden in der Präpubertät und bei Kryptorchismus<sup>1</sup>. Der Gehalt an Hyaluronidase im Hundesperma ist gering und unabhängig von der Spermiedichte, der des Hahnspermas gleich 0<sup>1</sup>. In Hoden zahlreicher Reptilien fand SWYER<sup>5</sup> ebenfalls keine Hyaluronidase. Dies ist hinsichtlich des Befruchtungsvorganges insofern von Bedeutung, als, soweit bisher bekannt, bei Vögeln und Reptilien die Eier nicht von Follikelzellen umgeben sind.

RUNNSTRÖM und Mitarbeiter<sup>6</sup> haben den  $A_{11}$ -Faktor, der auf die Eihüllensubstanz bei den oben angegebenen Seeigeln fäallend wirkt, auf folgende Weise angereichert: *Echinocardium*sperma wird tief gefroren in Vakuum getrocknet, mit Methanol extrahiert, in Seewasser suspendiert 5 Minuten auf 90° erhitzt, Ungelöstes abzentrifugiert und die Lösung der Elektrophorese unterworfen. Die wirksame Fraktion wandert einheitlich zur Anode, ist thermostabil, nicht dialysierbar, aber fällbar mit Ammonsulfat. Das Molekulargewicht liegt bei 10000. Nach diesen Eigenschaften, der UV-Absorption bei 260 m $\mu$  und der positiven Kohlehydratreaktion scheint es sich um ein Nukleoprotein zu handeln. Trypsin vernichtet die fällende Wirkung.

HARTMANN, MEDEM, KUHN und BIELIG<sup>7</sup> berichteten, daß das gereinigte Gynogamon II aus Forelleneiern durch Nukleinsäure gefällt wird. BIELIG und MEDEM<sup>8</sup> konnten neuerdings ferner feststellen, daß Thymo- und Hefenukleinsäure die agglutinierende Wirkung des  $G_{11}$  auf die Spermien der Regenbogenforelle aufheben. Sie fanden unter der Annahme, daß das Molekulargewicht

<sup>1</sup> A. DORFMAN und M. L. OTT, J. biol. Chem. 172, 367 (1948).

<sup>2</sup> J. M. BEILER und G. J. MARTIN, J. biol. Chem. 171, 507 (1947); 174, 31 (1948).

<sup>3</sup> K. MEYER, Physiol. Rev. 27, 335 (1947).

<sup>4</sup> G. I. M. SWYER, Biochem. J. 42, 28 (1948).

<sup>5</sup> C. W. SEASTONE, J. Exp. Med. 70, 361 (1939). – G. BLIK und O. SNELLMANN, Ark. Kemi Mineral. Geol. 19A, Nr. 221 (1945).

<sup>6</sup> D. McCLEAN, Biochem. J. 37, 169 (1943). – Z. HADIDIAN und N. V. PIRIE, Biochem. J. 42, 260 (1948).

<sup>7</sup> J. MADINAVEITIA und M. STACEY, Biochem. J. 38, 413 (1944).

<sup>8</sup> J. MADINAVEITIA, Biochem. J. 23, 347 (1939). – J. HUMPHREY, Biochem. J. 37, 177 (1943).

<sup>9</sup> D. McCLEAN und C. V. HALE, Biochem. J. 35, 159 (1941). – E. HAAS, J. biol. Chem. 163, 63 (1946). – G. I. M. SWYER und C. W. EMMENS, Biochem. J. 41, 29 (1947).

<sup>10</sup> D. McCLEAN, Biochem. J. 37, 169 (1943).

<sup>11</sup> K. MEYER, G. L. HOBBS, E. CHAFFEE und M. H. DAWSON, J. Exp. Med. 71, 137 (1940). – J. H. HUMPHREY, Biochem. J. 40, 442 (1946).

<sup>12</sup> E. H. KASS und C. V. SEASTONE, J. Exp. Med. 79, 319 (1944). – A. DORFMAN und N. L. OTT, J. biol. Chem. 172, 367 (1948).

<sup>13</sup> S. L. LEONARD, P. L. PERLMAN und R. KURZROK, Endocrinol. 39, 261 (1946).

<sup>1</sup> G. I. M. SWYER, Biochem. J. 41, 409 (1947).

<sup>2</sup> Vgl. Note von I. Kolonne

<sup>3</sup> G. I. M. SWYER, Biochem. J. 41, 413 (1947).

<sup>4</sup> C. A. JOEL und E. EICHENBERGER, Schweiz. med. Wschr. 27, 601 (1945).

<sup>5</sup> G. I. M. SWYER, Nature (London) 160, 433 (1947).

<sup>6</sup> J. RUNNSTRÖM, S. LINDBALL und A. TISELIUS, Nature (London) 153, 285 (1944). – J. RUNNSTRÖM, A. TISELIUS und E. VASSEUR, Ark. Kemi Mineral. Geol. 15A, Nr. 16 (1942).

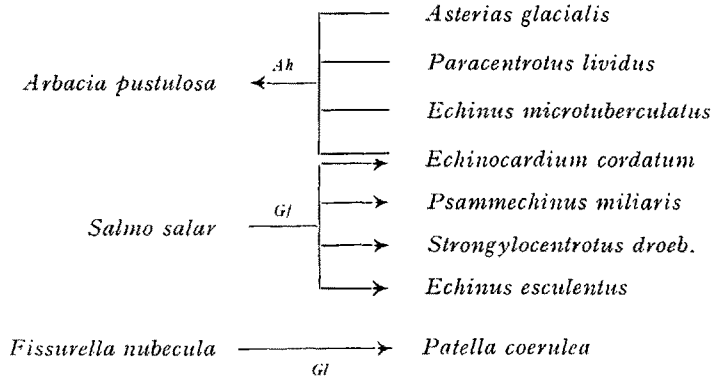
<sup>7</sup> M. HARTMANN, F. Graf MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

<sup>8</sup> H.-J. BIELIG und F. Graf MEDEM, unveröffentlicht.



des Forellenagglutinins bei 35000 liegt (vgl. S. 30), daß 1 Mol Thymonukleinsäure vom Molekulargewicht etwa 1 Million auf 1 Mol Agglutinin genügt, um die Agglutination der arteigenen Spermien gerade noch total zu hemmen. Dagegen sind 2000 Mole Hefenukleinsäure vom Molekulargewicht etwa 20000 für denselben Effekt nötig. Es ist nach diesen Befunden anzunehmen, daß bei der beobachteten  $G_{II}$ -inaktivierenden Wirkung

spiel das Sperma von *Haliotis tuberculata* die Gallert-hüllen der Eier von *Patella coerulea* nicht, obwohl es diese befruchtete<sup>1</sup>. Entsprechendes gilt wechselseitig für *Megathura crenulata* und *Haliotis cracherodii*<sup>2</sup>. Die bisher gefundenen *Spezifitätsbeziehungen* des  $A_{II}$ -Komplexes zeigt folgende Übersicht (Wirkung in Pfeilrichtung; *Ah* Aufhebung der  $G_{II}$ -Wirkung, *Gf* Fällung des Gallerthüllenproteins, *Gl* Auflösung der Gallerthülle<sup>3</sup>):



des  $A_{II}$ -Komplexes (vgl. Abb. 2) aus den Spermien stammende Desoxyribonukleinsäure im Spiele sein wird und daß zwischen dieser Wirkung und dem fällenden Effekt auf die agglutininhaltige Eihülle kein grundlegender Unterschied besteht.

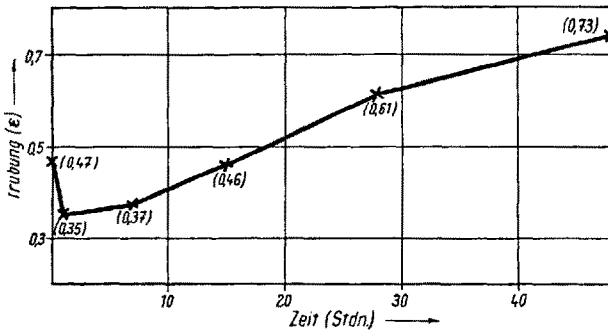


Abb. 2. Fällende Wirkung von fällendem  $A_{II}$ -Faktor auf die Gallert-hüllen der Eier der Regenbogenforelle (nach HARTMANN, MEDEM, KUHN und BIELIG<sup>1</sup>).

In 10 cm<sup>3</sup> Rohandrogon-II-Lösung in 1%igem NaCl (entsprechend 1 g methanolextrahiertem, getrocknetem Sperma) sind 30 mg im Achatmörser pulverisierte, gewaschene und getrocknete Gallert-hüllen suspendiert (Überschichtung mit Toluol). Trübungsmessung mit dem lichtelektrischen Kolorimeter. Extinktion der Roh- $A_{II}$ -Lösung allein = 0,22. Die anfängliche Abnahme der Trübung ist auf die Quellung der trockenen Gallerthüllen zurückzuführen. Die dann einsetzende Trübungszunahme beruht auf der Wirkung  $A_{II}$ .

Nach den Untersuchungen von HARTMANN und Mitarbeitern<sup>2</sup> ist die antagonistische Wirkung des  $A_{II}$ -Komplexes zum  $G_{II}$  ebensowenig art-, gattungs- und ordnungsspezifisch wie die spermienlähmende Wirkung des  $A_I$ . Nicht so ausschließlich trifft dies für die lösende Wirkung auf die Eihüllen zu. So beeinflusst zum Bei-

Auch die Hyaluronidase der Säugetierspermien wirkt nicht immer spezifisch. Es werden zum Beispiel die Follikelzellen der Ratte vom Ei abgelöst durch Fermentpräparate aus Stierhoden, Schafestikeln und Kaninchensperma<sup>4</sup>. Andererseits vermag die Mucinase aus Stierhoden die Eigallerten von *Arbacia pustulosa* und *Sphaerechinus granularis* nicht zu lösen<sup>5,6</sup>.

Zum Abschluß der Besprechung der einzelnen Gamone sei hier nochmals eine Gegenüberstellung ihrer chemischen Charakterisierung und biologischen Wirkung bei den beiden bisher am vollständigsten untersuchten Tieren gebracht, einem Wirbellosen (*Arbacia pustulosa* syn. *Arbacia lixula*) und einem Wirbeltier (*Salmo irideus*).

#### Weitere in Zusammenhang mit der Befruchtung gebrachte Stoffe

Es ist bereits darauf hingewiesen worden, daß beim Studium der Befruchtungsvorgänge über die Leistungen der bisher beschriebenen Gamone hinaus noch Wirkungen entdeckt worden sind, die auf die Anwesenheit weiterer Befruchtungsstoffe hindeuten.

Im Zuge seiner ausgedehnten Untersuchungen gab bereits LILLIE<sup>7</sup> an, daß in den Eiern von *Arbacia pun-*

<sup>1</sup> M. HARTMANN, F. Graf MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIEL, Z. Naturforsch. 2b, 350 (1947).

<sup>2</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 389 (1940).

<sup>1</sup> F. Graf MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).

<sup>2</sup> A. TYLER, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 25, 317 (1939); 26, 249 (1940); Biol. Bull. 78, 159 (1940).

<sup>3</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940). – Graf F. MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945). – J. RUNNSTRÖM, S. LINDVALL und A. TISELIUS, Nature (London) 153, 285 (1944).

<sup>4</sup> D. McCLEAN und J. W. ROWLANDS, Nature (London) 150, 627 (1942). – E. FEKETE und F. DURAN-REYNALS, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 52, 119 (1943).

<sup>5</sup> J. RUNNSTRÖM, L. MONNÉ und L. BROMANN, Ark. Zool. 35A, nr 3 (1943).

<sup>6</sup> A. MONROY und A. RUFFO, Nature (London) 159, 603 (1947).

<sup>7</sup> F. R. LILLIE, J. Exp. Zool. 16, 523 (1914).

Tabelle XI  
Vergleich der Befruchtungsfstoffe von *Arbacia punctulosa*<sup>1,2</sup> und *Salmo irideus*<sup>3</sup>

Gamone	<i>Arbacia punctulosa</i> <sup>1,2</sup>		<i>Salmo irideus</i> <sup>3</sup>	
	Chemische Charakterisierung	Biologische Wirkung	Chemische Charakterisierung	Biologische Wirkung
Gynogamon-I-Komplex	<i>Echinochrom A</i> (symplexgebunden), <i>Naphthochinonfarbstoff</i> C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> , Smp. 220°. Chinon von 1,3,4,5,6,7,8-Hepta-oxy-2-äthyl-naphthalin	1. Aktivierung der Spermien bis 1:2,5 · 10 <sup>9</sup> (krist. Farbstoff); bis 1:3 · 10 <sup>11</sup> (ternärer Symplex) 2. Chemotaxis der Spermien im Kapillarversuch 3. Antagonist zu A <sub>I</sub>	<i>Astaxanthin</i> (im Eiöl gelöst), <i>Carotinoid</i> C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub> , Smp. 216°5, 5'-Dioxy-4,4'-diketo-β-carotin	1. Aktivierung der Spermien bis ~ 1:1 · 10 <sup>5</sup> (krist. kolloider Farbstoff) 2. Chemotaxis der Spermien im Kapillarversuch (60 γ je cm <sup>3</sup> ) 3. Antagonist zu A <sub>I</sub>
Gynogamon II	<i>Agglutinin</i> (Hilfsträger) aus Gallerthülle, fehlt im Eiinhalt, löslich im Wasser, fällbar mit NH <sub>4</sub> -Sulfat und n/100 HCl, nicht dialysabel, thermolabil	1. Agglutiniert die Spermien bis 1:5 · 10 <sup>6</sup> 2. Antagonist des lösenden A <sub>II</sub> -Faktors	<i>Agglutinin</i> aus Eiinhalt. Unlöslich in Wasser, löslich in verdünnten Salzlösungen, Säuren und Laugen; fällbar mit NH <sub>4</sub> -Sulfat und mit Nukleinsäure, Globulinatur. Sehr thermolabil	1. Agglutiniert die Spermien bis 1:5 · 10 <sup>9</sup> 2. Antagonist des fällenden A <sub>II</sub> -Faktors
Androgamon I	Rückstand des Methanolauszuges aus getrocknetem Sperma (Roh-A <sub>I</sub> ), thermostabil	1. Spermienlähmend bis 1:8 · 10 <sup>3</sup> 2. Aufhebung der G <sub>I</sub> -Wirkung: 5 · 10 <sup>-7</sup> g <i>Echinochrom A</i> durch 1 cm <sup>3</sup> Spermaliquor	Rückstand des Methanolauszuges aus getrocknetem Sperma (Roh-A <sub>I</sub> ), thermostabil	1. Spermienlähmend bis 1:1 · 10 <sup>3</sup> 2. Aufhebung der G <sub>I</sub> -Wirkung von 2,4 · 10 <sup>-4</sup> g <i>Astaxanthin</i> durch 1 g Roh-A <sub>I</sub>
Androgamon-II-Komplex	a) Thermostabiler Faktor <sup>4</sup> : Unlöslich in Methanol, löslich in 1%igem NaCl, fällbar mit Phosphorwolframsäure, thermostabil 5 Stunden bei 98°. b) Thermolabiler Faktor <sup>5</sup> : Hyaluronidase.	a) Gereinigtes Präparat gallerthüllessend bis 1:9 · 10 <sup>2</sup> Rohpräparat hebt G <sub>II</sub> -Wirkung auf. b) Eihüllessend mit 1:1,5 · 10 <sup>3</sup> in 10–15 Min. Kein Antagonist des G <sub>II</sub>	Roh-A <sub>II</sub> -Komplex. Unlöslich in Methanol, thermostabil in siedendem Methanol	1. Keine lösende, aber fällende Wirkung auf die Gallerthüllen 2. Aufhebung der G <sub>II</sub> -Wirkung von 1 · 10 <sup>-6</sup> g; Rohagglutinin durch 1 g rohen A <sub>II</sub> -Komplex

*tulata* neben dem Fertilizin ein diesem antagonistisch wirkendes Antifertilizin vorkommt. TYLER<sup>6</sup> fand eine entsprechende Wirkung in Extrakten aus tiefgefrorenen, hüllfreien Eiern von *Strongylocentrotus purpuratus*. Durch solche Eiauszüge wird die G<sub>II</sub>-Wirkung von Eisekretwasser aufgehoben, wobei es sogar zu Fällungen kommen kann. Daß hier eine echte Präzipitinreaktion vorliegt, ergibt sich auch daraus, daß das Antifertilizin bei intakten Eiern eine Agglutination unter Ausbildung einer befruchtungshindernden Präzipitin-

membran hervorruft, was RUNNSTRÖM<sup>1</sup> schon früher bei *Arbacia punctulata* festgestellt hatte. Diese Eiagglutination wird durch einen Überschuß an Eisekretwasser verhindert. Nach ihrer Übereinstimmung in Thermolabilität, Verhalten bei der Dialyse, Fällungsreaktionen und Inaktivierung durch proteolytische Enzyme hält TYLER<sup>2</sup> das Antifertilizin der Eier und das G<sub>II</sub>-hemmende Prinzip des Androgamon-II-Komplexes der Spermien bei *Arbacia* für identisch. In neuerer Zeit fand dieser Autor<sup>3</sup> weiter, daß mit gereinigtem Antifertilizin aus den Eiern des Seeigels *Lytechinus pictus* und des Gephyreen *Urechis caupo* immunisierte Kaninchen multivalente Antikörper bilden. Letztere gehen bei Photooxydation in eine nicht mehr präzipitierende,

<sup>1</sup> M. HARTMANN und O. SCHARTAU, Biol. Zbl. 59, 571 (1939).

<sup>2</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940).

<sup>3</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Z. Naturforsch. 2b, 330 (1948).

<sup>4</sup> K. WALLENFELS, Österr. Chem.-Ztg. Nr. 19/20 (1940).

<sup>5</sup> A. MONROY und A. RUFFO, Nature (London) 159 603 (1947).

<sup>6</sup> A. TYLER, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 25, 317 (1939); 26, 249 (1940); Biol. Bull. 73, 159 (1940).

<sup>1</sup> J. RUNNSTRÖM, Biol. Bull. 69, 345 (1935).

<sup>2</sup> A. TYLER und K. O'MELVENY, Biol. Bull. 81, 364 (1941).

<sup>3</sup> A. TYLER, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 62, 197 (1946).

univalente Form über, die die Befruchtungsfähigkeit der Spermien sehr stark herabsetzt, ohne deren Aktivität zu beeinflussen. Bei der Regenbogenforelle beobachteten schließlich HARTMANN, MEDEM, KUHN und BIELIG<sup>1</sup>, daß die agglutinierende Wirkung des Eiinhaltes sehr viel schwächer ist als die einer entsprechenden Menge gereinigten Agglutinins, was ebenfalls auf die Anwesenheit eines  $G_{II}$ -Hemmstoffes im Ei hinweist. Da die  $G_{II}$ -hemmende Wirkung des Spermas von *S. irideus* wahrscheinlich auf seinem Gehalt an Nukleinsäure beruht (vgl. S. 26 Kol. 2 unt.), wird das Antifertilizin in der Nukleoproteidfraktion des Eies zu suchen sein.

Der Methanolauszug aus dem Sperma von *Echinus esculentus* und anderen Seeigeln enthält, vergesellschaftet mit dem  $A_I$ , einen Faktor, der die Oberfläche der Eier spezifisch beeinflußt, und den RUNNSTRÖM und Mitarbeiter<sup>2</sup>  $A_{III}$  nennen. Unbefruchtete, hüllenfreie Seeigeleier, die in hypertonischem Seewasser mit runzlicher Oberfläche reversibel schrumpfen, tun dies in Gegenwart von  $A_{III}$  mit glatter Oberfläche. Die Wirkung dieses «Androgamons» wird auf eine Verflüssigung der Kortikalschicht (Perivitellinmembran) der Eier zurückgeführt<sup>3</sup>. Der  $A_{III}$ -Wirkstoff ist dialysabel, schwach thermolabil und empfindlich gegen die Einwirkung proteolytischer Enzyme. Er wird von Al-Oxyd und Al-Hydroxyd nicht adsorbiert, was seine chromatographische Trennung vom  $A_I$  ermöglicht. Die  $A_I$ - und  $A_{III}$ -haltigen Lösungen sollen ferner die fallende Wirkung des  $A_{II}$ -Komplexes hemmen.

Eine antagonistische Wirkung zum  $A_I$  wurde von MEDEM<sup>4</sup> in den Spermatophoren der Auster festgestellt.

WOODARD<sup>5</sup> gibt an, daß die nicht befruchtenden, apyrenen Spermien der Süßwasserschnecke *Goniobasis laqueata* das Beweglichwerden der eupyrenen Spermien bewirken. Sie rufen weiter Spermaagglutination hervor. Eine schwache Agglutination der arteigenen Spermien wurde auch in verdünnten,  $A_I$ -haltigen Methanolauszügen aus dem Sperma der Regenbogenforelle beobachtet<sup>6</sup>.

Prostatasekret von *Bombyx mori* erhöht die Beweglichkeit der arteigenen Spermien so, daß diese die Bursa copulatrix verlassen können<sup>7</sup>.

CORNMAN<sup>8</sup> findet merkwürdigerweise eine spermienaktivierende Wirkung im Wasserdampfdestillat des «Echinochromsymplexes» der Eier von *Arbacia punctulata*.

Nach LILLIE und JUST<sup>9</sup> geben geschlechtsreife *Nereis*-

weibchen einen Faktor an Seewasser ab, der die Männchen zur Spermaabgabe veranlaßt. DEFRETIN<sup>1</sup> erzielte denselben Effekt mit Extrakten aus ganzen Tieren.

Die Ovarialflüssigkeit reifer und unreifer Eierstöcke der Wollhandkrabbe löst die reifen Spermatophoren auf, wobei die Spermien im ersten Falle beweglich werden, im zweiten nicht<sup>2</sup>.

Über die Faktoren, die die Ausbildung der Befruchtungsmembran bei Seeigeleiern bedingen, ist unseres Wissens noch nichts Sicheres bekannt. Die normale Entstehung dieser Membran ist nach CHAMBERS<sup>3</sup> von osmotischen Phänomenen unabhängig. Da sich die Farbe der Eioberfläche nach dem Eindringen des Spermakopfes ändert, und da die fertige Befruchtungsmembran im Gegensatz zur entstehenden von Kaliumchlorid und Harnstoff nicht mehr gelöst wird, nimmt man an, daß ihre Ausbildung mit Änderungen in der Lipoidstruktur der Kortikalschicht einhergeht und auf der Umwandlung von Sphäro- in Linearproteide beruht<sup>4</sup>.

Schließlich sei darauf hingewiesen, daß KUHLE<sup>5</sup> mittels des Zeitrafferfilmes erstmals zeigen konnte, daß bei *Psammechinus miliaris* sich der weibliche Vorkern zur Verschmelzung auf den in das Ei eingedrungenen männlichen Vorkern zubewegt. Sicher sind auch hier noch unbekannte physiko-chemische Wirkungen im Spiel.

#### Bedeutung der Gamone für den Befruchtungsvorgang

Die Erkenntnisse, die vor allem im letzten Jahrzehnt gesammelt und in dem vorliegenden Bericht zusammengestellt sind, lassen neue Einblicke in das Wesen des Befruchtungsvorganges zu. Wenn sie auch bisher nicht zur Aufstellung einer allgemeinen «Theorie» der Befruchtung geführt haben, so zeigen sie doch den Weg, in welcher Weise die Anschauungen der älteren Forscher, vor allem LILLIES *Fertilizintheorie*, abzuändern und dem heutigen Stande der Forschung nach zu ergänzen sind. Hinweise in dieser Richtung verdanken wir vor allem HARTMANN<sup>6</sup> und TYLER<sup>7</sup>.

Der Gynogamon-I-Komplex lockt die Spermien chemotaktisch an und erhöht deren Beweglichkeit in Einnähe durch Aufhebung ihrer  $A_I$ -Wirkung. Die Lähmung der Spermienbewegung durch das *Androgamon I* kann als Schutz gegen vorzeitigen Energieverbrauch der Spermien aufgefaßt werden, wodurch diese länger befruchtungsfähig bleiben. Aus Versuchen am Seeigel *Arbacia* folgt nämlich, daß Eier, die in Gegenwart von zusätzlichem  $A_I$  arteigen oder kreuzbefruchtet werden, wesentlich in der Entwicklung gegenüber normal be-

<sup>1</sup> M. HARTMANN, Graf F. MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947).

<sup>2</sup> J. RUNNSTRÖM, S. LINDVALL und A. TISELIUS, Nature (London) 153, 285 (1944).

<sup>3</sup> J. RUNNSTRÖM, L. MONNÉ und L. BROMAN, Ark. Zool. (Stockholm) 35A, Nr. 4 (1943).

<sup>4</sup> F. Graf MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).

<sup>5</sup> T. M. WOODARD jr., J. Exp. Zool. 55, 103 (1940).

<sup>6</sup> F. Graf MEDEM und H.-J. BIELIG, unveröffentlicht.

<sup>7</sup> S. OMURA, Jap. J. Genetics 16, 63 (1940).

<sup>8</sup> J. CORNMANN, Biol. Bull. 80, 202 (1941).

<sup>9</sup> F. R. LILLIE und E. E. JUST, Biol. Bull. 24, Nr. 3 (1913).

<sup>1</sup> R. DEFRETIN, Bull. Soc. Zool. France 66, 149 (1941).

<sup>2</sup> F. Graf MEDEM, unveröffentlicht.

<sup>3</sup> R. CHAMBERS, J. Cell. Comp. Physiol. 19, 145 (1942).

<sup>4</sup> J. RUNNSTRÖM, Scientia (Malland) 71, 149 (1942). — J. RUNNSTRÖM, L. MONNÉ und E. WICKLUND, J. Coll. Sci. 1, 421 (1946).

<sup>5</sup> W. KUHLE, Die Entwicklung des Seeigeleies. Hochschulfilm C 382 der Reichsanstalt für Film und Bild (1941).

<sup>6</sup> M. HARTMANN, Naturwiss. 28, 807 (1940).

<sup>7</sup> A. TYLER, Biol. Bull. 81, 190 (1941).

fruchteten Eiern zurückbleiben. Durch gleichzeitig zugegebenes Echinochrom A wird diese befruchtungs-hemmende Wirkung aufgehoben<sup>1</sup>.

Unterschiedlich beurteilt wurde bisher die Rolle des *Gynogamons II*. Während LILLIE dem Agglutinin (Fertilizin) die entscheidende Bedeutung für die Befruchtung zuschrieb, wurde dieser Substanz von LOEB<sup>2</sup> und anderen Forschern<sup>3</sup> ein allgemeingültiger Einfluß auf das Befruchtungsgeschehen abgesprochen, da man bei vielen Arten keine von den Eiern ausgehende Agglutinationswirkung feststellen konnte. Dank der Entdeckung der antagonistischen Wirkung des  $G_{II}$  zu einem Faktor des  $A_{II}$ -Komplexes hat sich das Gynogamon II auch in allen bisher untersuchten Fällen nachweisen lassen, wo seine agglutinierende Wirkung vermißt wurde. Sieht man von der experimentellen, unphysiologisch starken Agglutination ab, so kann man in Anlehnung an LILLIE das Gynogamon II als einen Faktor ansehen, der sowohl die Ei- wie die Spermienoberfläche beeinflusst. Um die Eioberfläche bildet sich anscheinend ein  $G_{II}$ -Antifertilizinkomplex aus, der durch Reaktion mit dem antagonistischen  $A_{II}$ -Faktor der Spermien diese in Einähe hält (reversible Agglutination). Die Masse der so fixierten Spermien macht schließlich die Hauptmenge des Agglutinins in gleicher Weise weiter unwirksam und bewirkt durch das lösende  $A_{II}$ -Prinzip die Auflockerung der Eihülle, so daß schließlich einem Spermium der Eintritt in das Ei gelingt. Wie sehr es auf das richtige Verhältnis von  $G_{II}$  und  $A_{II}$ -Komplex ankommt, geht u. a. aus einem Versuch von HARTMANN und Mitarbeitern<sup>1</sup> hervor. Während normal in Seewasser befruchtete *Arbacia*-Eier eine Befruchtungsrate von 100% ergaben, sank diese nach einstündigem Aufenthalt in einer Lösung des thermostabilen, eihüllelösenden  $A_{II}$ -Faktors (0,3 mg je 1 cm<sup>3</sup> Seewasser) auf 50% und bei zweistündigem Aufenthalt auf 0%. Bei *Arbacia* spielt das  $G_{II}$  noch insofern eine besondere Rolle, als es als Hilfsträger im ternären Symplex erst dessen  $G_I$ -Wirkung ermöglicht. Eine irreversible Heteroagglutination wird schließlich als Schutz gegen Kreuzbefruchtung aufgefaßt. Zum Beispiel werden *Arbacia*-Eier in *Paracentrotus*-Eisekretwasser durch *Paracentrotus*-Sperma zu weniger als 1% befruchtet. Wäscht man in dessen das  $G_{II}$  aus den *Arbacia*-Eiern aus, so steigt nach

Zusatz von Eisekretwasser von *Paracentrotus* ( $G_I$ -Komplex und  $G_{II}$ ) die Befruchtungsziffer auf 20%<sup>1 2</sup>.

Es ist nach dem Gesagten verständlich, daß nur morphologisch und physiologisch reife Gameten voll wirksame Gamone abgeben. Eine abgeschwächte oder ausbleibende Gamonwirkung bei unreifen oder überreifen Eiern und Spermien ist daher immer wieder Gegenstand der Beobachtung gewesen<sup>1 3</sup>. «Bei den Gamonen ... handelt es sich (eben) um ein fein abgestimmtes System, und der Erfolg der Befruchtungen, der sich in hohen Entwicklungsziffern kundgibt, hängt von den günstigen Konzentrationsverhältnissen und vom mengenmäßigen Zusammenspiel der männlichen und weiblichen Gamone ab» (HARTMANN<sup>4</sup>).

#### Summary

The authors review the development and present state of biological and chemical research on the fertilizing substances (gamons) of the metazoa. The general principles of nomenclature proposed by M. HARTMANN and R. KUHN (1939) are taken as a basis. Other customary ways of naming single gamons are given a place within it.

In particular are treated:

(1) The gynogamon I complex. Activating and chemotactically attracting factors of the eggs (echinochrom in the case of *Arbacia pustulosa*, astaxanthin in the case of *Salmo irideus*); antagonism to androgamon I.

(2) Gynogamon II. Iso- and heteroagglutinins of the eggs.

(3) Androgamon I as a factor of the sperm that inhibits the movements of the spermatozoa.

(4) The androgamon-II complex. Factors that dissolve the ovulatory membranes (thermostable factor in the case of *Arbacia pustulosa*, Hyaluronidase in the case of *A. pustulosa* and of mammals). Factors that precipitate the ovulatory membranes and factors antagonistic to gynogamon II in the case of *Salmo irideus*, some sea-urchin eggs, and *Megathura crenulata*.

(5) Additional substances brought into connection with fertilization (antifertilizin of the eggs, androgamon III, factors in the sperm that agglutinate spermatozoa, and others).

Under the separate gamons tables are to be found on their occurrence and biological specificity. The review is concluded with some considerations on the significance of the gamons in the process of fertilization.

<sup>1</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940).

<sup>2</sup> H.-J. ELSTER, Arch. Entwicklungsmechanik 133, 1 (1935).

<sup>3</sup> F. Graf MEDEM, Biol. Zbl. 62, 431 (1942); Zool. Jb. 61, 1 (1945).  
- M. HARTMANN, F. Graf MEDEM, R. KUHN und H.-J. BIELIG, Z. Naturforsch. 2b, 330 (1947). - E. E. JUST, Protoplasma 10, 308 (1930).

<sup>4</sup> M. HARTMANN, Naturwiss. 28, 807 (1940).

<sup>1</sup> M. HARTMANN, O. SCHARTAU und K. WALLENFELS, Biol. Zbl. 60, 398 (1940).

<sup>2</sup> J. LOEB, J. Exp. Zool. 17, 123 (1914); Am. Nat. 49, 278 (1915).

<sup>3</sup> A. DALCQ, Les bases physiologiques de la fécondation (Presses Univ., Paris 1928). - H.-J. ELSTER, Verh. Dtsch. zool. Ges. 1936, 168.