

239. F. G. Fischer, E. Wehmeier, H. Lehmann, L. Jühling und K. Hultzsch: Zur Kenntnis der Induktionsmittel in der Embryonal-Entwicklung.

[Vorläuf. Mittel.; aus d. Chem. u. d. Zool. Institut d. Universität Freiburg i. Br.]
(Eingegangen am 23. Mai 1935.)

Das Zentralnervensystem des Amphibien-Keims empfängt den Anreiz zu seiner Entwicklung aus dem ektodermalen Material von den Gewebeteilen, die unmittelbar unter ihm liegen. Diese vermögen auch nach Transplantation unter das Ektoderm irgend einer anderen Keimregion die Bildung einer Medullarplatte hervorzurufen, zu „induzieren“. Die Differenzierung von Ektoderm zu Nervengewebe läßt sich nicht nur durch Unterlagerung mit lebenden „Induktoren“ experimentell herbeiführen, sondern auch mit solchen, die in verschiedener Weise geschädigt¹⁾ oder abgetötet waren²⁾. Nach Abtötung induzieren sogar Keimbezirke, die lebend ohne Wirkung sind³⁾. Die Induktion der Medullarplatte wird also durch stoffliche Einflüsse bewirkt.

Die Fähigkeit, Neural-Induktionen hervorzurufen, kommt nicht allein dem embryonalen Gewebe von Amphibien zu. Die verschiedensten Organe verschiedener, auch ausgewachsener Tiere, wie z. B. Gehirn und Netzhaut von Triton und vom Hühnchen, Leber von Kalb und Schwein, besitzen sie ebenfalls^{4) 5)}.

Einige Versuche zur Kennzeichnung der wirksamen Faktoren sind schon veröffentlicht worden^{6) 7)}, von uns zuletzt vor anderthalb Jahren⁸⁾. Da sich die Induktion von Medullarplatten sowohl mit äther-löslichen Fraktionen, wie auch mit gereinigten Fraktionen von Nucleinsäuren und mit reiner Muskel-Adenylsäure erzielen ließ, wurde damals geschlossen, „daß die Bildung der Medullarplatte durch verschiedene Stoffe induziert werden kann. Die Frage, ob diese Stoffe bei der Determination der Neuralorgane in der normalen Entwicklung sich überhaupt leitend beteiligen, kann noch nicht beantwortet werden. Da sie zell-eigen sind, ist die Möglichkeit ihrer Mitwirkung gegeben. Doch genügt die bloße Tatsache ihrer Wirksamkeit nicht zur Entscheidung. Es muß damit gerechnet werden, daß auch andere, normalerweise unbeteiligte, vielleicht sogar zell-fremde Stoffe, im Experiment die Stoffwechsel-Vorgänge der Ektodermzellen in die Bahn einzulenken vermögen, welche zum Neuralgewebe führt.“

Wir teilen im folgenden kurz die Ergebnisse unserer weiteren Arbeit mit. Jede einzelne der untersuchten Substanz-Fraktionen wurde in mindestens 20—30, zuweilen in über 100 Operationen geprüft, meistens mit Amblystoma-Keimen. Im ganzen sind über 5000 Operationen ausgeführt

¹⁾ H. Spemann, Verhandl. Dtsch. Zoolog. Ges. 1931, 129.

²⁾ H. Bautzmann, J. Holtfreter, H. Spemann u. O. Mangold, Naturwiss. 20, 971 [1932].

³⁾ J. Holtfreter, Roux' Arch. 128, 584 [1933].

⁴⁾ F. G. Fischer u. E. Wehmeier, Naturwiss. 21, 518 [Juli 1933].

⁵⁾ J. Holtfreter, Naturwiss. 21, 766 [Oktober 1933].

⁶⁾ H. Spemann, F. G. Fischer u. E. Wehmeier, Naturwiss. 21, 505 [Juli 1933].

⁷⁾ C. H. Waddington, J. Needham u. D. M. Needham, Nature 132, 239 [August 1933].

⁸⁾ F. G. Fischer u. E. Wehmeier, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Abt. Biologie, November 1933, S. 394.

worden. „Wirksam“ oder „induzierend“ wird eine Fraktion genannt, wenn in mehreren Fällen die Bildung von eindeutig erkennbaren Medullarplatten beobachtet wurde⁹⁾.

Äther-lösliche Anteile: Aus den ersten Versuchen von H. Spemann, F. G. Fischer und E. Wehmeier⁶⁾ zur Analyse der wirksamen Substanzen ging hervor, daß die Induktionswirkung von Keimteilen auch nach Extraktion mit organischen Lösungsmitteln voll erhalten bleibt. C. H. Waddington, J. Needham und D. M. Needham⁷⁾ gewannen aus Triton-Keimen, die durch Verreiben mit wasser-freiem Natriumsulfat zerkleinert und getrocknet waren, durch Extraktion mit Äther und Petroläther sehr schwach wirksame Auszüge (von 430 Operationen nur 5 deutliche Induktionen)¹⁰⁾. Sie folgerten daraus: „... ,that in the Amphibia this agent is a definite chemical substance, certainly soluble in ether, and probably of a lipoidal nature“.

Wir fanden, daß sich aus Amphibien-Keimen mit Alkohol, Aceton oder Äther gut wirksame Auszüge darstellen lassen. Auch aus Schweine-Leber und anderen Organen wurden mit organischen Lösungsmitteln zuweilen, jedoch nicht immer, Extrakte erhalten, die induzierend wirkten⁸⁾.

Unsere seitherigen Versuche sprechen dafür, daß die Induktions-Wirkung der mit organischen Flüssigkeiten bereiteten Auszüge nicht auf eine bestimmte Substanz, sondern auf darin enthaltene Säuren zurückzuführen ist.

Induzierende Auszüge aus Amphibien-Keimen z. B., werden unwirksam, wenn man ihre ätherische Lösung mit Wasser ausschüttelt; dem Rückstand aus der wäßrigen Schicht kommt schwache Wirksamkeit zu. Unwirksam sind auch die Lipoid-Auszüge aus Leber oder andern Organen, wenn man durch Ausschütteln mit Natriumbicarbonat-Lösung die Säuren entfernt hat. Glykogen-Präparate, durch alkalische Hydrolyse aus Leber dargestellt, enthalten induzierende Beimengungen, die bei den üblichen Reinigungen und auch bei langdauernden Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln sich nicht entfernen ließen. Das hatte zur irrtümlichen Vermutung geführt, daß Glykogen selbst induzieren könne⁴⁾. Die wirksamen Stoffe können aber durch langdauernde Dialyse oder Elektro-dialyse entfernt werden⁹⁾ und sind dann im Außenwasser nachweisbar; nach dem Ansäuern der Glykogen-Präparate sind sie äther-löslich.

Gereinigte Fett- und Phosphatid-Fraktionen, nach bekannten Vorschriften aus verschiedenen Organen hergestellt, induzieren nicht. Die Fraktionen des „Unverseifbaren“, durch alkalische Hydrolyse von Amphibien-Keimen, tierischen Organen oder von Lipoid-Auszügen und Ölen tierischer Herkunft erhalten und zur Implantation in einer Agar-Gallerte emulgiert oder an geronnenes Eiklar adsorbiert, zeigen keine Induktions-Wirkung; über 100 Operationen mit gutem Keim-Material waren negativ.

Einige wenige Neural-Induktionen wurden mit Präparaten erhalten, die nicht völlig von den Säuren befreit waren; nach der Reinigung wurden auch sie unwirksam.

Wahrscheinlich sind die von L. G. Barth¹¹⁾ mit einem unreinen und autoxydierten Kephalin-Präparat erzielten Induktionen auf die Anwesenheit freier Säure zurückzuführen.

⁹⁾ s. E. Wehmeier, Roux' Arch. **132**, 384, u. zw. S. 389 [Dezember 1934].

¹⁰⁾ J. Needham, C. H. Waddington u. D. M. Needham, Proceed. Royal Society (B) **114**, 393 [1934].

¹¹⁾ Biol. Bull. **67**, 244 [Oktober 1934].

C. H. Waddington, J. Needham, W. W. Nowinski, D. M. Needham und R. Lemberg finden¹²⁾, daß die Fraktion des „Unverseifbaren“ aus Kalbs-Leber induziert, daß die wirksame Substanz sich mit Digitonin fällen läßt und dann anscheinend in der Restlösung nicht mehr nachweisbar ist. Sie halten es für wahrscheinlich, „... that the naturally occurring evocator belongs to some group of sterol-like compounds.“

Durch Verseifung der an und für sich unwirksamen Fette und Phosphatide verschiedener Herkunft, z. B. von Lebertran, Eieröl, Schweine-Schmalz, werden stets induzierende Säure-Fractionen erhalten. Auch die Säuren aus mehreren Ölen pflanzlicher Abstammung, die geprüft wurden, sind wirksam. Die Implantate mit flüssigen Säure-Fractionen (die freien Säuren werden 5-proz. in einer Agar-Gallerte fein emulgiert) rufen in etwa 60% der gelungenen Operationen eindeutige Neural-Induktionen hervor. Im ganzen wurden über 500 positive Fälle beobachtet.

Die induzierende Wirkung der Säuren bleibt unvermindert nach Entfernung der Neutralteile durch Ausäthern ihrer alkalischen Lösung oder durch Digitonin-Fällung, nach fraktionierter Destillation und nach vielfacher Umkrystallisation ihrer Salze aus organischen Lösungsmitteln.

Sie ist nicht auf eine bestimmte, besondere Säure zurückzuführen. Ölsäure, welche aus öfters umkrystallisierter Dioxy-stearinsäure dargestellt war, und Linolensäure, die aus ihrem mehrfach umgelösten Bromid regeneriert wurde, induzierten ebenfalls. Gleich wirksam war eine aus Ricinolsäure dargestellte Octadecen-(12)-säure-(1). Völlig gesichert wird die Wirksamkeit von Säuren durch Neural-Induktionen, die mit einem Präparat synthetischer Ölsäure erzielt wurden (aus Sebacinsäure und Octylalkohol dargestellt). Hier ist die Anwesenheit eines unbekanntes „Induktionsstoffes“ ausgeschlossen.

Die Möglichkeit einer Säure-Wirkung war schon am Beginn unserer Versuche geprüft worden. Sie konnte aber erst nachgewiesen werden, nachdem bestimmte, für den Erfolg der Implantation erforderliche Bedingungen ermittelt waren. Die Fettsäuren müssen z. B. flüssig sein. Feste Fettsäuren, die zur anfänglichen Prüfung herangezogen wurden, induzieren nicht; ebenso wenig daher die flüssigen Säure-Fractionen nach der Hydrierung. Die feste Stearolsäure wirkt nicht, wohl aber daraus dargestellte Ölsäure. Niedrige Fettsäuren und verschiedene synthetische Säuren mit verzweigter Kette, die geprüft wurden, schädigen die Keime. Erfolglos waren bisher auch Versuche mit wasser-löslichen Säuren und mit verschiedenen anderen, sauer reagierenden Substanzen.

Äther-unlösliche Anteile: Wie erwähnt, hatten schon unsere allerersten Versuche gezeigt, daß Gewebestückchen aus Amphibien-Keim oder anderer Herkunft auch nach der Behandlung mit organischen Lösungsmitteln Medullarplatten zu induzieren vermögen. Ihre Wirksamkeit tritt nach der Entfettung sogar regelmäßiger und ausgesprochener hervor. Die Induktionen werden nicht schwächer oder seltener, wenn man z. B. fein zerstückelte Amphibien-Eier tagelang im Extraktor mit verschiedenen Lösungsmitteln hintereinander auszieht⁸⁾. J. Holtfreter, der auf Grund einer Versuchsreihe zunächst, wie die englischen Autoren, die Äther-Löslichkeit des „Induktionsstoffes“ vertrat⁵⁾, findet nach Wiederholung unserer Extraktionsversuche ihre Ergebnisse bestätigt¹³⁾.

¹²⁾ Nature **134**, 103 [Juli 1934].

¹³⁾ Roux' Arch. **132**, 225 [Dezember 1934].

Wirksame Auszüge aus entfetteten Amphibien-Keimen und aus tierischen Organen lassen sich in wäßrigem Medium erhalten, und zwar ist die Induktionswirkung mit den Nucleoproteid-Fractionen verknüpft. Nach den Verfahren, die zur Extraktion und Fällung dieser Fractionen dienen, werden zum Teil sehr stark induzierende Präparate erhalten, am besten aus Organen, welche größere Mengen von Kernsubstanzen enthalten, wie aus der Thymus- und Pankreas-Drüse und aus Leber. Die Wirksamkeit dieser Präparate vermindert sich nicht, wenn sie mehrfach umgefällt oder lang andauernd dialysiert oder mit verschiedenen organischen Flüssigkeiten, auch nach vorherigem Ansäuern und in der Hitze, ausgezogen werden.

Mit Nucleinsäuren aus Thymus und aus Pankreas sind ebenfalls in vielen Fällen Induktionen erzielt worden.

Sowohl Keim- und Organ-Stückchen, wie die Nucleoproteid-Fractionen induzieren nur, wenn sie in Substanz, nicht aber, wenn sie in einer Agar-Agar- oder Gelatine-Gallerte eingebettet implantiert werden. Sehr wahrscheinlich werden die wirksamen Stoffe erst durch die Einwirkung der Fermente des Wirtskeims auf das Implantat gebildet. Die Vermutung ist naheliegend, daß es die aus den Nuclein-Substanzen freiwerdenden, sauer wirkenden Nucleotide sind. Daß sie es sein können, geht aus den Neural-Induktionen hervor, die von reiner Muskel-Adenylsäure hervorgebracht wurden⁸⁾. Mit andern Mono-nucleotiden aus tierischen Nucleinsäuren und aus denen der Hefe wurden keine positiven Ergebnisse erhalten, vielleicht infolge ihrer zu großen Löslichkeit in Wasser. Sogar bei der am schwersten löslichen Muskel-Adenylsäure lassen sich neben Versuchsreihen mit Induktionen auch völlig negative Reihen beobachten.

Die Möglichkeit, daß die Induktionswirkung der äther-unlöslichen Fractionen auch auf andersartige Stoffe zurückzuführen ist, steht selbstverständlich noch offen.

Aus den erzielten Ergebnissen läßt sich schließen, daß der Induktionsreiz, der von toten Implantaten ausgeübt wird, ein Säure-Reiz sein kann. Es ist daher zu prüfen, inwiefern die Wirksamkeit lebender Induktoren sich ebenfalls darauf zurückführen läßt.

Wir danken der Freiburger Wissenschaftlichen Gesellschaft, der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft und Hrn. Prof. H. Hörlein, I.-G. Farbenindustrie A.-G., Werk Elberfeld, für die Unterstützung unserer Arbeit.
