

286. Richard Kuhn, Franz Moewus und Gerhard Wendt: Über die geschlechtsbestimmenden Stoffe einer Grünalge.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut f. medizin. Forschung, Heidelberg. Institut
f. Physiologie u. Institut f. Chemie.]
(Eingegangen am 2. August 1939.)

Die Geschlechtszellen der Pflanzen und Tiere sezernieren spezifische Stoffe, welche das Wechselspiel zwischen den männlichen und weiblichen Gameten beim Vorgang der Befruchtung steuern. Diese Gametenhormone (Befruchtungsstoffe) bezeichnen wir im Einvernehmen mit Hrn. Prof. M. Hartmann abgekürzt als *Gamone*. Je nachdem der betreffende Stoff von weiblichen oder männlichen Geschlechtszellen abgegeben wird, sprechen wir von *Gyno-* und *Androgamonen*. In den einzelnen Akten, aus denen sich das Schauspiel der Befruchtung zusammensetzt, treten „Anlockungsstoffe“, „Beweglichkeitsstoffe“, „Kopulationsstoffe“, „Agglutinierungsstoffe“ u. a. auf den Plan.

Die ersten Einblicke in die chemische Natur von Gamonen sind an *Chlamydomonas eugametos f. simplex*¹⁾ und an *Arbacia pustulosa*²⁾ gewonnen worden. Bei der Grünalge handelt es sich um Carotinoide, beim Seeigel um einen Naphthochinonfarbstoff.

Chlamydomonas eugametos f. simplex ist diözisch (getrennt-geschlechtlich) und morphologisch isogam (die männlichen und weiblichen Gameten besitzen gleiche Gestalt). Der „Beweglichkeitsstoff“, den die Zellen unter dem Einfluß des Lichtes sezernieren, ist bei den männlichen und weiblichen Gameten offenbar derselbe. Er läßt sich ersetzen durch Crocin, $C_{44}H_{64}O_{24}$ (Schmp. 215⁰). Der biologische Unterschied im Reaktionsvermögen der ♂- und ♀-Zellen beruht auf der Verschiedenheit der „Kopulationsstoffe“: *cis*-Crocetin-dimethylester, $C_{22}H_{28}O_4$ (Schmp. 141⁰) und *trans*-Crocetin-dimethylester (Schmp. 222⁰). Diese werden von den männlichen und weiblichen Gameten in einem für jede Rasse erblich genau festgelegten Mischungsverhältnis im Lichte ausgeschieden, nämlich³⁾:

Gameten (Rasse)	♀ ⁴	♀ ³	♀ ²	♀ ¹	♂ ¹	♂ ²	♂ ³	♂ ⁴
<i>cis/trans</i>	95/5	85/15	75/25	65/35	35/65	25/75	15/85	5/95

Wie es die morphologische Isogamie von *Chlamydomonas* erwarten ließ, spielt sich die chemotaktische Anlockung, die zur Gruppenbildung (Kopulation) führt, zwischen ♂ und ♀ durchaus wechselseitig ab. Die „Anlockungsstoffe“ sind hier mit den „Kopulationsstoffen“ identisch.⁴⁾

Beim Seeigel sind die Gameten bereits außerordentlich differenziert. Das große Ei reagiert mit einem winzigen Spermatozoon. Dieser morphologischen Anisogamie entsprechend, sind auch die chemischen Wirkstoffe der ♂- und ♀-Zellen ganz verschieden. Man empfindet es als natürlich und zweckmäßig, daß die Chemotaxis hier einseitig vom schweren Ei ausgeht, auf das die leichten Spermatozoen zuwandern. In der Tat enthalten bei *Arbacia* nur die Eier ein chemotaktisches Gamon, das Echinochrom, $C_{12}H_{10}O_7$ (Schmp. 220⁰). In den milchig-weißen Spermatozoen findet sich keine nachweisbare Menge eines vergleichbaren Farbstoffs.

¹⁾ R. Kuhn, F. Moewus u. D. Jerchel, B. **71**, 1541 [1938]; F. Moewus, Jahrb. wiss. Botanik, **86**, 753 [1938].

²⁾ R. Kuhn u. K. Wallenfels, B. **72**, 1407 [1939]; M. Hartmann, O. Schartau, R. Kuhn u. K. Wallenfels, Naturwiss. **27**, 433 [1939].

³⁾ F. Moewus, Biol. Zbl. **59**, 40 [1939].

⁴⁾ F. Moewus, Arch. Prot., im Druck [1939].

Neben den beim eigentlichen Vorgang der Befruchtung wirkenden Gameten werden, wie im folgenden gezeigt wird, von Gameten noch andersartige Stoffe ausgeschieden, nämlich solche, die für die *Geschlechtsbestimmung bei gemischt-geschlechtlichen Organismen* entscheidend sind.

Die Erscheinung der Gemischtgeschlechtlichkeit⁵⁾ findet man bei zahlreichen Protisten und Thallophyten sowie bei höheren Pflanzen und wirbellosen Metazoen. Sie kommt nicht nur bei Lebewesen mit morphologisch isogamen Geschlechtszellen vor, sondern auch bei Organismen, deren männliche und weibliche Gameten bereits weit differenziert sind. In fast allen Fällen dieser Art erfolgt die Bestimmung des Geschlechts modifikatorisch, d. h. durch „Außenfaktoren“. Diese entscheiden darüber, ob die genetisch gleichartigen Zellen, welche eine bisexuelle Potenz besitzen, männliche oder weibliche Eigenschaften annehmen.

Nach F. Moewus⁶⁾ kann man in der monözischen (gemischtgeschlechtlichen) Kultur von *Protosiphon botryoides*, einer Grünalge, das Verhältnis ♂:♀ durch Änderung der Temperatur und des p_H verschieben. In saurer Lösung nimmt die Zahl der +-Gameten, in alkalischer diejenige der --Gameten zu. Diese Wirkung läßt sich durch Filtrate der diözischen (getrenntgeschlechtlichen) Kulturen außerordentlich verstärken, so daß die Zwitterform von *Protosiphon botryoides* nach Belieben völlig in die getrenntgeschlechtlichen Formen verwandelt werden kann: versetzt man die monözische Form bei saurer Reaktion mit dem Filtrat von +-Gameten, so entstehen ausschließlich +-Gameten; gibt man bei alkalischer Reaktion das Filtrat von --Gameten zu, so werden nur --Gameten gebildet. Die chemische Natur der in den Filtraten enthaltenen Wirkstoffe ist unbekannt geblieben.

Sehr viel schöner lassen sich nun, wie F. Moewus⁷⁾ neuerdings gefunden hat, diese Erscheinungen der nichterblichen Geschlechtsbestimmung bei der Grünalge *Chlamydomonas eugametos f. synoica* studieren. Diese ist morphologisch isogam und, wie schon der Name besagt, monözisch. Sie steht der diözischen Alge *Chlamydomonas eugametos f. simplex*, deren Gamete bekannt sind, nahe. Darauf gründete sich unsere Hoffnung, gerade hier einen Einblick in das chemische Wesen der Determinierung des Geschlechts gewinnen zu können.

Die Valenz (Stärke) der *synoica*-Gameten ist 1, so daß sie mit den diözischen ♀¹- und ♂¹-Gameten auf gleicher Stufe stehen. Überdies sind 2 subheterözische Formen bekannt⁸⁾, d. h. solche, bei denen einmal stets mehr weibliche als männliche Zellen, das anderemal stets mehr männliche als weibliche Gameten gebildet werden, so daß man über die vollständige Reihe verfügt: ♀ diözisch, ♀ subheterözisch, monözisch, ♂ subheterözisch, ♂ diözisch. Gegenüber *Protosiphon* bedeutet es auch einen Vorteil, daß man die *Chlamydomonas*-Gameten nicht nur als + und -- unterscheiden kann, sondern durch Kreuzungsversuche mit anisogamen Arten genau weiß, welche Zellen männlich und welche weiblich sind.

Wird *Chlamydomonas eugametos f. synoica* mit dem Filtrat der ♀¹-Gameten versetzt, so werden alle Zellen weiblich; gibt man das Filtrat der ♂¹-Gameten zu, so erhält man lauter männliche Zellen. Es ist in diesem Falle nicht notwendig, Änderungen der Temperatur

⁵⁾ M. Hartmann, *Geschlecht u. Geschlechtsbestimmung im Tier- und Pflanzenreich*, Walter de Gruyter & Co., Berlin 1939. ⁶⁾ Biol. Zbl. **55**, 293 [1935].

⁷⁾ Biol. Zbl., im Druck [1939]. ⁸⁾ F. Moewus, Arch. Prot. **83**, 98 [1934].

bzw. der Wasserstoffionenkonzentration zu Hilfe zu nehmen. Der geschilderte Grundversuch von F. Moewus⁷⁾ zeigt, daß die Gameten geschlechtsdeterminierende Stoffe abgeben. Die geschlechtsbestimmenden Stoffe werden im folgenden kurz *Termone* genannt werden. Der das männliche Geschlecht determinierende Faktor wird als *Androtermon*, der das weibliche Geschlecht determinierende als *Gynotermon* bezeichnet.

Es war noch nicht möglich, diese Wirkstoffe aus den aktiven Filtraten zu isolieren. Ihre Konzentration darin ist von derselben Größenordnung wie diejenige der Beweglichkeits- und Kopulationsgamone, von denen sich rund 1 mg in 1000 l Zellfiltrat spektroskopisch nachweisen ließ¹⁾. Es kommt hinzu, daß die Termone allem Anschein nach keinen Farbstoffcharakter besitzen. Sie sind auch nach langdauernder Einwirkung von blauem und violetter Licht noch in voller Wirksamkeit nachweisbar, wenn die Kopulationsgamone schon längst durch Übergang in *trans*-Crocin-dimethylester (Endstufe K₀) völlig inaktiviert sind.

Immerhin war es uns möglich, an den aktiven Filtraten eine Reihe von Eigenschaften der geschlechtsdeterminierenden Stoffe experimentell zu ermitteln, welche bemerkenswerte Schlußfolgerungen gestatten:

- 1) Das *Androtermon* ist ätherlöslich und mit Wasserdampf flüchtig.
- 2) Das *Gynotermon* läßt sich der wäßrigen Lösung durch Äther nicht entziehen und nicht mit Wasserdampf verflüchtigen.
- 3) Durch Erhitzen mit verd. Schwefelsäure oder mit verd. Barytwasser wird der das weibliche Geschlecht bestimmende Stoff zerstört. Hand in Hand mit dieser Inaktivierung tritt der das männliche Geschlecht bestimmende, ätherlösliche und wasserdampf-flüchtige Stoff auf.

Es wurde wahrscheinlich, daß das Gynotermon zum Androtermon im Verhältnis von Glykosid zu Aglykon steht. Es ist zwar ungewöhnlich, daß Glykoside auch durch verd. Alkalien gespalten werden, doch erinnerten wir uns, daß das Pikrocrocine, der Bitterstoff des Safrans, ein solches Verhalten zeigt. Die Spaltung des Pikrocrocins in Safranal und *d*-Glucose stellt keine gewöhnliche Hydrolyse dar, sondern vollzieht sich ohne Aufnahme von Wasser nach der Gleichung: $C_{16}H_{26}O_7 \rightarrow C_{10}H_{14}O + C_6H_{12}O_6$.

Die Prüfung von kristallisiertem Pikrocrocine aus Safran (Schmp. 152—153°) hat ergeben, daß dieses Terpenglykosid das Gynotermon von Chlamydomonas zu ersetzen vermag. Bringt man *synoica*-Zellen in eine Lösung, die 0.02 γ oder mehr Pikrocrocine in 1 ccm Wasser enthält, so sind nach 10 Min. alle Zellen gegenüber ♂¹-Gameten kopulationsfähig, d. h. sie sind weiblich geworden.

Nun wurden je 0.1 mg Pikrocrocine, die in 25 ccm Wasser gelöst waren, einmal mit 50 ccm 2-proz. Schwefelsäure, das andere Mal mit 50 ccm 3-proz. Bariumhydroxydlösung versetzt und der Wasserdampfdestillation unterworfen, so daß im Laufe von 20 Min. je 100 ccm übergingen. Beide Destillate zeigten keine Spur von Gynotermon-Wirkung mehr, sie waren dafür im Androtermon-Test hochaktiv. Alle *synoica*-Zellen wurden unter dem Einfluß des Safranals männlich und kopulierten mit den ♀¹-Gameten. Die Grenze der Wirksamkeit wurde erst erreicht, nachdem die Destillate rund 100000000fach verdünnt worden waren. Versuche mit Safranal, das durch Spaltung von reinstem Safranal-semicarbazone (Schmp.

174⁰) mit Phthalsäureanhydrid frisch hergestellt wurde, haben dieses Ergebnis bestätigt. Da die Zelldichte von *Chlamydomonas eugametos* f. *synoica* 2×10^6 Zellen/ccm betrug, ergibt sich, daß 10—20 Molekeln Safranal imstande sind, 1 Zelle männlich zu determinieren.

Die Wirkung des Safranals ist höchst spezifisch. Citral, α -Cyclocitral und β -Cyclocitral, die aus reinsten Semicarbazon-Präparaten durch Spaltung mit Phthalsäureanhydrid und mit verd. Schwefelsäure hergestellt wurden, waren bis zu 10^9 -mal höheren Konzentrationen ohne jede determinierende Wirkung. In Anbetracht dieser Spezifität und der hohen absoluten Wirksamkeit halten wir es für wahrscheinlich, daß das von den Gameten ausgeschiedene Androtermon mit Safranal identisch ist.

Das Gynotermon der aktiven Filtrate kann jedoch nicht Pikrocrocin sein, obwohl dieses gleichartig wirkt. Wären beide Stoffe identisch, dann sollten Lösungen von kryst. Pikrocrocin und Filtrate von φ^1 -Zellen, die auf gleiche Aktivität im Gynotermon-Test eingestellt sind, nach Hydrolyse mit verd. Schwefelsäure oder mit verd. Barytwasser auch im Androtermon-Test gleiche Wirksamkeit zeigen. Man findet jedoch eine Diskrepanz von mehreren Zehnerpotenzen. Für die folgenden Versuche wurde ein Filtrat von φ^1 -Gameten verwendet, dessen Gynotermon-Wirkung genau so groß war wie die einer 0.0004-proz. Lösung von kryst. Pikrocrocin aus Safran in Wasser; die Grenze der Wirksamkeit war in beiden Fällen nach einer Verdünnung von 1:200 erreicht.

Je 25 ccm wurden a) mit 50 ccm 2-proz. Schwefelsäure, b) mit 50 ccm 3-proz. Barytwasser versetzt. Hierauf wurde mit Wasserdampf destilliert bis nach 20 Min. je 100 ccm übergegangen waren. Die folgenden Zahlen geben an, wie stark die Destillate verdünnt werden mußten, bis die Grenze der Androtermon-Wirkung erreicht war.

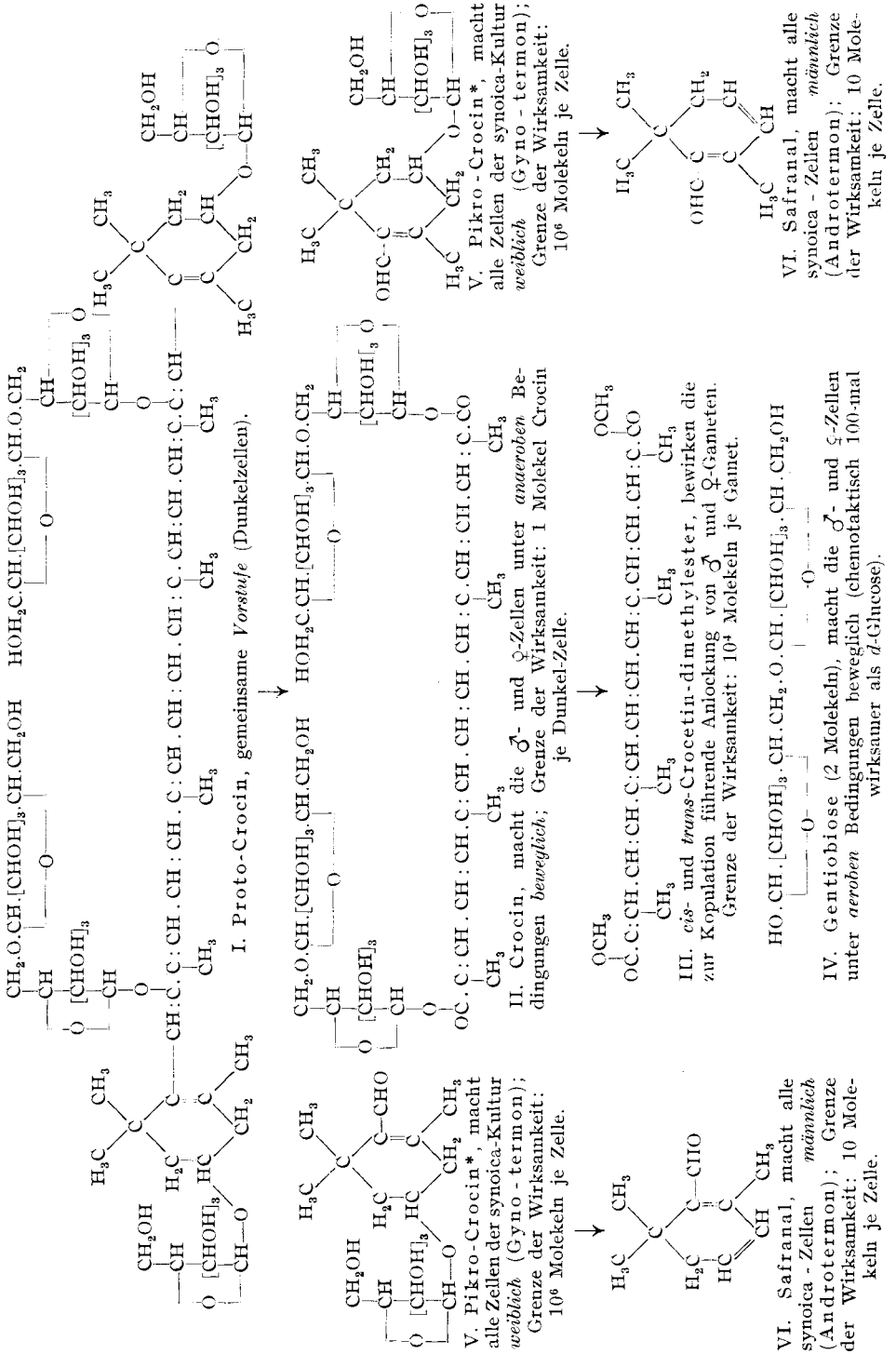
Ausgangslösung	Nach Hydrolyse mit H_2SO_4	Nach Hydrolyse mit $Ba(OH)_2$
φ^1 -Filtrat	10000-fach	10000-fach
kryst. Pikrocrocin	10000000-fach	10000000-fach

Anscheinend wird also aus Pikrocrocin 10^8 -mal mehr Safranal gebildet als aus dem aktiven *Chlamydomonas*-Filtrat. Daraus ist zu schließen, daß im Filtrat ein Gynotermon enthalten ist, das 1000-mal wirksamer ist als der aus Safran isolierte Bitterstoff. Wir vermuten, daß es sich um eine dem Pikrocrocin ganz analog gebaute Verbindung handelt, die an Stelle der Glucose einen anderen Zucker enthält, vielleicht Gentiobiose oder ein ähnliches Disaccharid.

Für die Vorstellung, daß das Androtermon mit Safranal identisch, das Gynotermon jedoch vom Pikrocrocin aus Safran verschieden ist, gibt es noch einen anderen wichtigen Anhaltspunkt:

Die Grenze der Wirksamkeit von Pikrocrocin aus Safran liegt bei einer Verdünnung von 8×10^{12} Molekeln/ccm. Da ein unter Standardbedingungen hergestelltes φ^1 -Filtrat 1000-fach verdünnt werden muß, bis diese Grenze erreicht wird, müßten darin 8×10^{15} Molekeln Pikrocrocin/ccm enthalten sein. Entsprechend der durchwegs eingehaltenen Zelldichte von 2×10^6 Gameten/ccm müßte jede Zelle 4×10^9 Molekeln Pikrocrocin ausscheiden. Diese Zahl ist ganz unwahrscheinlich. Denn wir wissen aus früheren Versuchen, daß die Gameten unter den eingehaltenen Bedingungen nur 4×10^6 Molekeln *cis*- und *trans*-Crocetin-dimethylester ausscheiden. Nach R. Kuhn

Chemischer Zusammenhang zwischen den Befruchtungstoffen (Gamonen) und Determinierungsstoffen (Termonen) bei Chlamydomonas.



und A. Winterstein⁹⁾ stellen Crocin und Pikrocrocine Zerfallsprodukte eines Carotinoids mit der normalen Zahl von 40 C-Atomen, des Protocrocins, dar. Dieser Hypothese entsprechend ist das molare Verhältnis Farbstoff: Bitterstoff in frischem Safran annähernd gleich 1:2 gefunden worden. Bei *Chlamydomonas* müßten nach der eben angestellten Rechnung $4 \times 10^9 / 4 \times 10^6 = 1000$ -mal mehr Molekeln Pikrocrocine als Crocin (Crocetin-dimethylester) auftreten. Diese Schwierigkeit fällt sofort weg, wenn man die Annahme macht, daß das Gynotermion 1000-mal wirksamer ist als das Pikrocrocine. Man kommt so zu der aus ganz unabhängigen Versuchen oben bereits gezogenen Schlußfolgerung und bleibt in Übereinstimmung mit der Zerfallshypothese von R. Kuhn und A. Winterstein: je Mol. Crocin (Crocetin-dimethylester) wird auch bei *Chlamydomonas* rund 1 Mol. einer pikrocrocineähnlichen Verbindung gebildet. Der biologische Test ist nicht genau genug, um zu entscheiden, ob eine Abweichung von dem theoretischen Verhältnis 1:2 vorliegt.

Die chemischen Zusammenhänge zwischen den Befruchtungsstoffen (Gamonen) und Determinierungsstoffen (Termonen) von *Chlamydomonas eugametos* f. *simplex* sind auf S. 1706 (Tafel) zusammenfassend wiedergegeben. Man wird bewundernd erkennen, mit welcher Vielseitigkeit und Vollständigkeit die Natur alle physiologisch auftretenden Spaltstücke eines Carotinoids in den Dienst der Geschlechtsfunktionen dieser Grünalge gestellt hat. Aus dem Formelbild des Proto-Crocins leiten sich sämtliche bisher bekannten Sexualstoffe von *Chlamydomonas* ab: „Beweglichkeitsstoff“, „Anlockungsstoffe“, „Kopulationsstoffe“, „geschlechtsbestimmende Stoffe“.

Es ist gewiß kein Zufall, daß gerade der Safran sich als so reiche Quelle pflanzlicher Sexualstoffe erwiesen hat, stellen doch die Narben von *Crocus sativus* selbst Geschlechtsorgane dar. Man darf daher erwarten, daß die von uns an einer Grünalge studierten Gamone und Termone auch noch bei höheren Pflanzen von Bedeutung sein werden.

Wenn wirklich Safranal und Pikrocrocine geschlechtsbestimmende Stoffe sind, dann muß man erwarten, daß unter ihrem Einfluß die synoica-Zellen dazu gebracht werden, das für die ♀¹- und ♂¹-Gameten charakteristische und sonst erblich festgelegte Verhältnis von *cis*-: *trans*-Crocetin-dimethyl-ester auszuscheiden. Wir haben gefunden, daß das tatsächlich der Fall ist. Die weiblich determinierten Gameten sezernieren *cis*-: *trans*- = 65:35, die männlich determinierten 35:65. Auch bei *Chlamydomonas dresdensis*, die monözisch ist und deren Gameten die Stärke 3 haben, ließ sich dieser Beweis erbringen. Nach Einwirkung von Pikrocrocine wurde *cis*-: *trans*- = 85:15 und nach Vorbehandlung mit Safranal *cis*-: *trans*- = 15:85 ausgeschieden. In bezug auf alle Einzelheiten, das interessante Verhalten der subheterözischen Formen usw. verweisen wir an dieser Stelle auf die im Druck befindliche Abhandlung von F. Moewus⁷⁾.

Von allen bisher bekannten Sexualhormonen unterscheiden sich Safranal und Pikrocrocine dadurch, daß sie nicht die sekundären sondern die primären Geschlechtsmerkmale¹⁰⁾ bestimmen. Die Aussichten zur Synthese des Pikrocrocins und verwandter Verbindungen sind leider gering. Das Safranal konnte dagegen durch Dehydrierung von β -Cyclocitral von R. Kuhn und G. Wendt¹¹⁾ bereits künstlich dargestellt werden. So ist — 3 Jahre ehe die biologische Bedeutung erkannt wurde — die Synthese des ersten geschlechtsbestimmenden Stoffes schon ausgeführt gewesen.

⁹⁾ B. 67, 344 [1934].

¹⁰⁾ Definition: C. Claus, K. Grobben, A. Kühn, Lehrb. d. Zoologie, 10. Aufl., J. Springer 1932, S. 90.

¹¹⁾ B. 69, 1549 [1936].