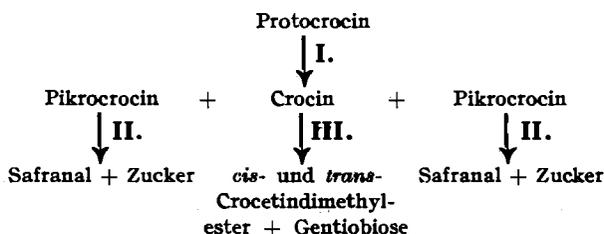


90. Richard Kuhn und Franz Moewus: Über die chemische Wirkungsweise der Gene Mot, M_D und Gathe bei Chlamydomonas.

[Aus d. Kaiser Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung Heidelberg, Institut für Biologie.]

(Eingegangen am 15. April 1940.)

Der stoffliche Zusammenhang zwischen den Befruchtungstoffen (Gamonen) und Determinierungstoffen (Termonen) bei Chlamydomonas ist bisher nur indirekt erschlossen. Das aufgestellte Formelschema¹⁾ stützt sich a) auf den Nachweis, daß die von der Grünalge ausgeschiedenen Sexualstoffe biologisch vertreten werden können durch die in kryst. Zustand bekannten Farbstoffe, den Geschmackstoff und den Riechstoff des Safrans, b) auf die chemischen Konstitutionsformeln dieser aus Safran gewonnenen Stoffe, c) auf die Hypothese, daß Crocin und Pikrocrocine Zerfallsprodukte eines in Substanz noch unbekanntes Carotinoids mit der normalen Zahl von 40 C-Atomen, des Protocrocins²⁾, darstellen:



Trifft dieses Schema zu, dann sollten I) das Gynotermon (Pikrocrocine) und der Beweglichkeitsstoff (Crocin) nicht unabhängig voneinander auftreten können; II) die männlichen Geschlechtszellen, welche Androtermon (Safranal) sezernieren, zur Spaltung des Gynotermons (Pikrocrocins) befähigt sein; III) alle Zellen, die Kopulationsgamone (*cis-* und *trans-*Crocinindimethylester) ausscheiden, imstande sein, durch Umesterung die Gentiobiosereste des Crocins gegen Methyl auszutauschen. Die vorliegende Arbeit erbringt den Nachweis, daß alle drei Schlußfolgerungen mit experimentell feststellbaren Tatsachen in Einklang stehen. Die Reaktionen II und III werden von Gen-abhängigen Fermenten (*Gen-Fermenten*) bewirkt, die sich unter geeigneten Bedingungen aus den Geschlechtszellen in Lösung bringen und kinetisch untersuchen lassen.

I) Protocrocine → Crocin + 2 Pikrocrocine; Mot-Wirkung.

Die wechselseitige Abhängigkeit von Crocin- und Pikrocrocine-Bildung läßt sich an den Gameten auf zweierlei Art erkennen:

a) *Physiologisch*. Im Dunkeln bleiben die Gameten aller Rassen unbeweglich. Sie scheiden kein Crocin aus. Es hat sich ergeben, daß unter diesen Bedingungen auch niemals Gynotermon (Pikrocrocine) ausgeschieden wird. Belichtet man die Geschlechtszellen, so wird, sobald Crocin in Lösung geht, auch das Gynotermon nachweisbar. Dies gilt insbesondere auch für Versuche mit rotem Licht. In rotem Licht werden bekanntlich die Chlamydomonas-Gameten beweglich, aber nicht kopulationsfähig. Nunmehr hat sich

¹⁾ R. Kuhn, F. Moewus u. G. Wendt, B. 72, 1702 [1939].

²⁾ R. Kuhn u. A. Winterstein, B. 67, 344 [1934].

zeigt, daß auch die Bildung von Gynotermion (sowie diejenige des Crocins) bereits stattfindet, wenn man eine Suspension von Dunkelgameten monochromatisch mit dem Licht der roten Cd-Linie (643 m μ) bestrahlt. Dabei ist es gleichgültig, ob man unter anaeroben oder unter aeroben Bedingungen arbeitet.

Die Geschlechtszellen von Chlamydomonas können auch im Dunkeln beweglich gemacht werden, wenn man auf sie unter Zutritt von Luft bestimmte Zucker (Glucose u. a., am besten Gentiobiose) einwirken läßt. Wir haben gefunden, daß auch in diesen Dunkelversuchen gleichzeitig mit dem Crocin die geschlechtsbestimmenden Stoffe (Pikrocrocine und Safranal) ausgeschieden werden.

b) *Genetisch.* In 60614 Mutationsversuchen, über die F. Moewus an anderer Stelle eingehend berichtet wird, sind 14 Klone aufgetreten, die weder Crocin noch Gynotermion bzw. Androtermon ausscheiden (mot-Mutanten). Diese Mutanten bleiben auch im Lichte unbeweglich (motus = Bewegung) und sind nicht mehr befähigt, sich geschlechtlich zu vermehren. Ungeschlechtlich (durch Zellteilung) lassen sie sich aber auf Agar vermehren. Solche mot-Mutanten, welche die Fähigkeit zur Bildung des Beweglichkeitsstoffes und der geschlechtsbestimmenden Stoffe verloren haben, sind bisher nur aufgetreten unter der Einwirkung von erhöhter Temperatur, nicht aber unter dem Einfluß von Radium- γ -Strahlen. Sie entstanden sowohl aus getrenntgeschlechtlichen als auch aus zwittrigen Rassen.

Rasse der Gameten	Thermische Behandlung	Zahl der auf Mutation geprüften Gameten	Zahl der entstandenen mot-Mutanten
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (F ¹)	20° (Kontrolle)	4291	0
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (F ¹)	45 Min. bei 55°	5600	4
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (M ¹)	20° (Kontrolle)	3148	0
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (M ¹)	45 Min. bei 55°	4927	5
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (F ¹ M ¹)	20° (Kontrolle)	7142	0
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (F ¹ M ¹)	45 Min. bei 55°	2035	1
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (F ¹ M ¹)	45 Min. bei 65°	1952	4

Niemals sind Mutanten erhalten worden, bei denen nur die Fähigkeit zur Bildung von Crocin oder nur das Vermögen, Gynotermion bzw. Androtermon zu bilden, verlorengegangen war. Wir schließen daraus, daß tatsächlich der Beweglichkeitsstoff und die geschlechtsbestimmenden Stoffe von den Chlamydomonaszellen nicht unabhängig voneinander gebildet werden können, was mit den Folgerungen aus dem chemischen Formelschema übereinstimmt. Offensichtlich wird die Bildung beider Stoffe durch ein und dasselbe Gen (Mot) beherrscht.

Theoretisch zu berücksichtigen ist die Möglichkeit, daß aus dem Protocrocine unter Abspaltung von nur 1 Mol. Pikrocrocine ein Polyfarbstoff entsteht, der noch nicht wie Crocin die Dunkelzellen beweglich macht. In diesem Falle wäre mit dem Auftreten von Mutanten zu rechnen, die zwar Termon ausscheiden, aber unbeweglich bleiben. Da solche Mutanten noch nicht aufgefunden wurden, der ternäre Zerfall Protocrocine \rightarrow Crocin + 2 Pikrocrocine aber sehr wahrscheinlich stufenweise verläuft, ist damit zu rechnen, daß der fragliche Polyfarbstoff, d. h. das aus Protocrocine unter Bildung von nur 1 Pikrocrocine entstehende Spaltstück, bereits wie Crocin als Beweglichkeitsstoff wirkt.

II) Pikrocrocinein → Safranal + Zucker; M_D-Wirkung.

Alle getrenntgeschlechtlich-männlichen Chlamydomonas-Gameten, die befähigt sind, Crocin zu bilden, scheiden im roten bis violetten Licht Androtermon (Safranal) aus. Das angegebene Formelschema ließ erwarten, daß das Androtermon durch Spaltung des Gynotermons (Pikrocrocins) gebildet wird. Die Bildung des Androtermons aus dem Gynotermon ist bereits experimentell festgestellt worden beim Erhitzen mit verd. Säuren und mit verd. Alkalien¹⁾. Diese Spaltung sollte den männlichen Zellen auch unter physiologischen Bedingungen möglich sein.

In der Absicht, ein Pikrocrocinein-spaltendes Ferment in den ♂-Gameten nachzuweisen, haben wir zunächst folgende Versuche angestellt: Je 5 ccm Suspensionen von ♂-Gameten (M¹, M², M³ und M⁴), die $\sim 2 \times 10^6$ Zellen/ccm enthielten, wurden im Dunkeln unter anaeroben Bedingungen (dies ist notwendig, um die Eigenbildung von Safranal zu verhindern) mit kryst. Pikrocrocinein aus Safran (0.005—0.5%) versetzt. Nach 2—48 Stdn. (20⁰) wurden die Gameten abfiltriert und die Filtrate mit je 5 ccm reinem Äther ausgeschüttelt. Die Abtrennung von unverändertem Pikrocrocinein ist im Hinblick auf den folgenden Test unerlässlich. Die Ätherlösung, die auf Safranal zu prüfen ist, darf nicht verdampft werden, da die geringen Mengen des Termons, auf die es ankommt, mit Äther flüchtig wären. Wir haben daher die Ätherschicht (5 ccm) sofort mit so viel dest. Wasser (250 ccm) verdünnt, daß sich aller Äther darin löste. In Kontrollversuchen ergab sich, daß der Androtermontest durch die in Frage kommenden Äthermengen nicht gestört wird. Die hohe Verdünnung mit Wasser ist leicht tragbar, da sich ja noch 10 Molekeln Safranal je Zelle nachweisen lassen. Die mit Wasser verdünnten Ätherauszüge ließen wir bis zu 30 Min. bei 20⁰ auf *Chl. synoica* (♀) einwirken und prüften, ob dabei die Zellen männlich, d. h. gegenüber ♀¹-Gameten, kopulationsfähig wurden. Alle, oftmals und unter abgeänderten Bedingungen wiederholten Versuche dieser Art waren völlig ergebnislos. In keinem Falle ließ sich die Bildung von Safranal im Androtermontest nachweisen, auch wenn als Substrat an Stelle von kryst. Pikrocrocinein natürliche Gynotermonlösungen aus ♀⁴, ♀³, ♀² oder ♀¹ angewandt wurden.

Der Nachweis des pikrocrocineinspaltenden Ferments gelingt erst, wenn man die ♂-Zellen, deren Länge durchschnittlich 15 μ beträgt, so energisch mechanisch zerstört, daß man unter dem Mikroskop keine Partikelchen von mehr als 3 μ Durchmesser mehr erkennen kann. Dies gelingt am besten, wenn man a) die vom Agar abgehobenen, noch unbeweglichen Zellen unter Zusatz von etwas Wasser und etwa der 10-fachen Menge Glaspulver im Porzellanmörser 2 Stdn. energisch verreibt, b) ohne Wasser unter immer wiederholtem Übergießen mit flüssiger Luft $\frac{1}{2}$ Stde. sehr gründlich verreibt oder c) die vom Agar abgehobenen, noch unbeweglichen Zellen über Phosphor-pentoxyd unter 10—20 mm scharf trocknet und dann im Achatmörser mit etwa 10 Tln. Glaspulver $\frac{1}{2}$ —1 Stde. verreibt. In jedem Fall wird nach dem Verreiben mit 5 ccm Pikrocrocineinlösung (10^{10} Molekeln/ccm = 5.5×10^{-9} mg Pikrocrocinein/ccm) übergossen, gut durchgeschüttelt, durch Filterpapier abfiltriert und das Filtrat nach bestimmten Zeiten mit 5 ccm Äther ausgeschüttelt. Die Prüfung der Ätherschicht auf Safranal erfolgt dann im Androtermontest. Die für jeden Versuch vom Agar abgehobene Zellmenge beträgt ungefähr 10^7 , so daß im eigentlichen Versuch der Auszug aus $\sim 2 \times 10^6$ Zellen/ccm wirkt.

Unter diesen Bedingungen findet man, daß sowohl kryst. Pikrocrocine wie Gynotermonlösungen aus ♀-Zellen (♀^4 , ♀^3 , ♀^2 und ♀^1) unter Bildung von Androtermon (Safranal) gespalten werden. Der Versuch gelingt mit den Auszügen sämtlicher ♂-Zellen (♂^4 , ♂^3 , ♂^2 und ♂^1), ohne daß eine Beziehung zwischen der enzymatischen Wirksamkeit und der Valenz der angewandten Gameten zu erkennen wäre.

Um ein quantitatives Maß für die Wirksamkeit des pikrocrocinspaltenden Ferments zu gewinnen, haben wir im allgemeinen die Zeiten (Min.) bestimmt, nach denen bei 20° 50% des angewandten Pikrocrocins bzw. Gynotermons gespalten, d. h. 5×10^9 Molekeln Safranal/ccm gebildet waren. Eine unter den angegebenen Standardbedingungen zu 50% gespalten Lösung ist nach 100-facher Verdünnung noch sehr deutlich männlich determinierend, wenn sie mit soviel *synoica*-Zellen versetzt wird, daß 2×10^6 Zellen/ccm kommen. Nach 1000-facher Verdünnung hat die zu 50% gespalten Lösung keine determinierende Wirkung mehr.

Die Zeit, nach der 50% der maximal möglichen Safranalmenge gebildet sind, kann man auf zwei Arten ermitteln: 1) Man bestimmt, nach welcher Zeit die Wirksamkeit des Ätherauszuges ebenso groß ist wie diejenige einer Vergleichslösung, die 5×10^9 Molekeln Safranal in 1 ccm Äther enthält. 2) Man äthert nicht aus und bestimmt die Zeit, nach der die *synoica*-Zellen synöcisch bleiben. War die Zeit zu kurz, so werden unter dem Einfluß des überschüssigen Pikrocrocins die *synoica*-Zellen zu ♀^1 , später weiblich subheteröcisch. War die Zeit zu lang, so daß bereits mehr Safranal als Pikrocrocine vorlag, so beobachtet man die Umwandlung der *synoica*-Zellen in männlich subheteröcische, nach noch längerer Zeit in ♂^1 -Zellen. Dieser sehr rasch ausführbare Test gestattet festzustellen, wann 45—55% gespalten sind.

Beide Verfahren führen zu befriedigend übereinstimmenden Ergebnissen, z. B. 1) mit Ausäthern des Safranals: 43, 52 Min., 2) ohne Ausäthern: 45, 50, 55 Minuten.

Hitzeempfindlichkeit. Erwärmt man Lösungen des Ferments aus ♂-Zellen im Wasserbad 10 Min. auf 80°, so erlischt jede Wirksamkeit gegenüber kryst. Pikrocrocine und gegenüber Gynotermonlösungen aus ♀-Zellen. Das pikrocrocinspaltende Ferment wird durch Hitze leicht zerstört.

Abhängigkeit vom Substrat. Es gibt 2 Substrate, die vom Ferment gespalten werden: Pikrocrocine (aus Safran) und Gynotermon (aus ♀-Chlamydomonas-Zellen), das pikrocrocineähnlich gebaut ist, aber an Stelle der *d*-Glucose vermutlich einen anderen, noch unbekanntes Zuckerrest trägt¹⁾. Das Gynotermon wird 4—6-mal rascher gespalten als Pikrocrocine.

Zeiten für 50% Spaltung, Substratkonzentration äquimolar, so daß nach 100-proz. Spaltung je 5×10^{11} Molekeln Safranal/ccm (nicht 5×10^9 wie unter den Standardbedingungen) gebildet werden. *Synoica*-Test 2 (ohne Ausäthern).

Gynotermon: 4 Stdn., 5 Stdn.

Pikrocrocine: 22 Stdn., 24 Stdn.

Diese Zeiten waren sehr lang, da die Substratkonzentration noch zu hoch bemessen war. Alle folgenden Versuche sind mit Gynotermonlösung aus ♀^2 -Zellen angestellt worden.

Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Synoica-Test 2 (ohne Ausäthern).

Molekeln Gynotermon/ccm	Zeit für 50 % Spaltung bei 26°	Mittelwert (Min.)
10 ⁹	3' 50'', 4' 10'', 3' 35'', 3' 55''	3' 53''
10 ¹⁰	50', 45', 55'	50'
10 ¹¹	300', 330'	315'
10 ¹²	2760', 2940', 3000'	2900'

Man erkennt, daß die für 50% Spaltung benötigten Zeiten der Substratkonzentration annähernd proportional sind. Das bedeutet, daß die Dissoziationskonstante der Ferment-Substrat-Verbindung unerwartet klein ist. Das Ferment ist selbst in einer $10^9 \times 10^3 : 6 \times 10^{23} = 0.0000000000016$ molaren Gynotermonlösung noch mit seinem Substrat gesättigt. Aus diesem Grunde bleibt der, auch der unter optimalen Bedingungen erzielbare, absolute Umsatz so ungeheuer klein, daß es ganz hoffnungslos erscheint, die enzymatische Spaltung des Pikrocrocins etwa polarimetrisch oder mit einer der bekannten Mikro-Zucker-Methoden feststellen zu wollen.

Absolute Wirksamkeit. Wir wollen annehmen, daß entsprechend der in der Fermentchemie üblichen Methodik 10 ccm 0.1 mol. Pikrocrocinslösung mit 0.1 g Fermentpräparat (Trockengameten) im Thermostaten bei 26° angesetzt würden und wollen berechnen, nach welcher Zeit man am Polarisationsapparat 50% Spaltung würde feststellen können.

Die Petrischalen, in denen die Gameten auf Agar gezüchtet werden, haben eine Oberfläche von 75 qcm. Auf 1 qcm befinden sich 2×10^6 Gameten. Isoliert man die Zellen von 70 Petrischalen und trocknet sie über P₂O₅, so erhält man 0.60 g Trockengameten. 1 g Trockengameten bedeutet daher $2 \times 10^6 \times 75 \times 70 \times 1.67 = 17 \times 10^9$ Zellen. Wenn also 0.1 g Trockengameten im 10 ccm-Meßkölbchen angesetzt würden, hätte man 1.7×10^8 Zellen/ccm.

Mit 10⁹ Molekeln Gynotermon/ccm und 2×10^6 Zellen/ccm erhält man 50-proz. Spaltung nach 4 Min., mit 10⁹ Molekeln Pikrocrocins/ccm nach 20 Min.; 10⁹ Molekeln/ccm = 10¹² Molekeln/l bedeuten eine $10^{12} : (6.06 \times 10^{23}) = 1.67 \times 10^{-12}$ molare Lösung.

Eine 10⁻¹ molare Pikrocrocinslösung kann somit durch 1.7×10^8 Zellen/ccm zu 50% erst gespalten sein nach

$$20 \times \frac{2 \times 10^6}{1.7 \times 10^8} \times \frac{10^{-1}}{1.67 \times 10^{-12}} = \sim 15 \times 10^9 \text{ Min.} = \sim 30000 \text{ Jahren!}$$

Den handgreiflichen chemischen Beweis für die Existenz des pikrocrocinspaltenden Ferments in den männlichen Gameten von Chlamydomonas werden wir also nicht erleben. Es wäre sinnlos, einen solchen Versuch unter aseptischen Bedingungen dennoch anzusetzen und von Generation zu Generation dafür zu sorgen, daß der Thermostat auf 26° bleibt und jemand am Polarisationsapparat nach 30000 Jahren abliest. Denn die H⁺-Ionenkonzentration des reinsten Wassers — gegen OH⁻-Ionen ist das Pikrocrocins noch empfindlicher — würde das Glykosid schon früher gespalten haben, und überdies wäre die Fermentlösung längst inaktiv.

Man erkennt: Die *synoica*-Zellen sind wohl das einzige Reagens, das uns den Nachweis des pikrocrocinspaltenden Ferments möglich macht.

Abhängigkeit vom p_{H} . Die optimale Wasserstoffzahl des Gynotermionspaltenden Ferments liegt bei p_{H} 7.0.

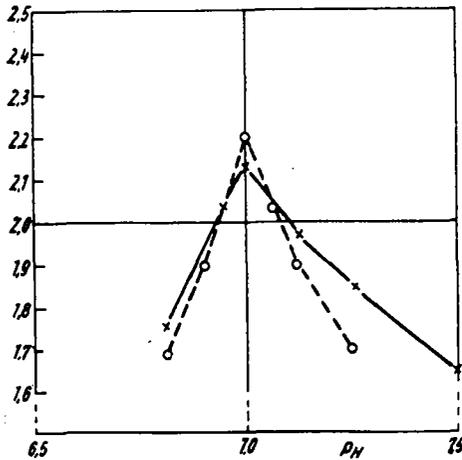


Abbildung 1. p_{H} -Abhängigkeit des pikrocrocinspaltenden Fermentes.

×—× Versuchsreihe I, o—o Versuchsreihe II.

Als Puffer dienen $m/15$ -Phosphatgemische. Als Ordinaten sind in Abbild. 1 und 2 die Reziprokwerte der für 50% Spaltung erforderlichen Zeiten (100/t, t in Min.) aufgetragen.

Abhängigkeit von der Temperatur. Das Optimum der Wirksamkeit liegt auffallend niedrig, nämlich bei 26° (Abbildung. 2).

Abhängigkeit vom Gen M_D . Das pikrocrocinspaltende Ferment findet sich nur in den männlichen Geschlechtszellen und fehlt in den weiblichen. Genetisch sind die männlichen Gameten durch das Gen M (M^1 , M^2 , M^3 , M^4), die weiblichen durch F (F^1 , F^2 , F^3 , F^4) ausgezeichnet. Diese Gene sind verantwortlich für die charakteristischen *cis/trans*-Zahlen der ausgeschiedenen Ga-

monen. Zusammen mit M wird nun noch ein besonderes Gen vererbt, das bewirkt, daß die männlichen Zellen eine Determinierung des Geschlechts bei Zwitterkulturen hervorrufen, indem sie zur Bildung und Ausscheidung des Androtermons befähigt werden: M_D . Das Safranin ist der vom Gen M_D abhängige Wirkstoff, das eben beschriebene Ferment der vom Gen M_D abhängige oder mit diesem identische Katalysator, der das Termon erzeugt.

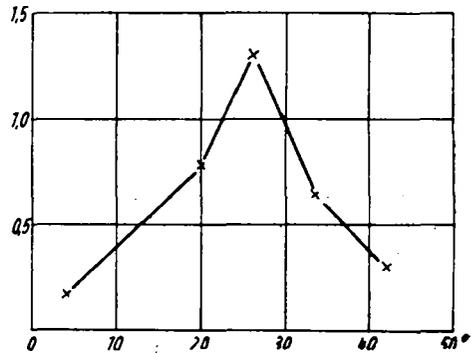


Abbildung 2. Temperatur-Abhängigkeit des pikrocrocinspaltenden Fermentes.

III) Crocin → Crocetin dimethylester; Gathe-Wirkung.

Das Kopulationsvermögen der einzelnen Chlamydomonasrassen ist an bestimmte Temperaturgrenzen gebunden. Es kopulieren

<i>Chl. philothermos</i>	bei 4° bis 36°
<i>Chl. typica</i>	bei 4° bis 36°
<i>Chl. dresdensis</i>	bei 2° bis 25°
<i>Chl. rigophilos</i>	bei 1° bis 16°.

Chl. rigophilos stammt aus der Gegend von Petsamo (Nordfinnland), was die merkwürdige Eigenschaft verständlich macht, daß sich diese Grünalge nur unterhalb von 16° geschlechtlich vermehren kann. Das Gen, welches für die Gamonausscheidung und deren thermische Grenzen verantwortlich ist, hat die Bezeichnung Gathe erhalten. Es handelt sich um das Gen Nr. 31 in der von F. Moewus aufgestellten genetischen Systematik.

Nur innerhalb der angeführten Temperaturgrenzen scheiden die Algen unter dem Einfluß von Licht die Kopulationsgamone (*cis*- und *trans*-Crocetindimethylester) aus. Darüber hinaus ließ sich feststellen, daß die Gameten Fermente enthalten, die nur innerhalb dieser Temperaturgrenzen imstande sind, durch Umesterung von Crocin Crocetindimethylester zu bilden. Diese umesternden Fermente findet man im Gegensatz zum pikrocrocinspaltenden Ferment sowohl in den weiblichen wie in den männlichen Geschlechtszellen. Die Umesterung von *trans*-Crocin zu *trans*-Crocetindimethylester und von *cis*-Crocin zu *cis*-Crocetindimethylester werden allem Anscheine nach durch 2 besondere Fermente bewirkt.

Versuchsansatz: 20×10^6 Gameten von *Chlamydomonas eugametos f. simplex*, d. h. die von 10 qcm Agarkultur abgehobene Zellmenge (\varnothing^2), werden im feuchten Zustande mit etwa der 10-fachen Menge Glaspulver in der Porzellanschale $\frac{1}{2}$ Stde. energisch verrieben. Man übergießt im Dunkeln mit 10 ccm einer Lösung von 4×10^{18} Molekeln Crocin in einem Gemisch von 99.5% Wasser und 0.5% Methanol, schwenkt gut um, gießt durch Filtrierpapier und läßt im Thermostaten unter Ausschluß von Licht stehen.

Aufarbeitung: Nach 2 Stdn. bzw. nach den im folgenden angegebenen Zeiten, wird 1 ccm der Lösung mit insgesamt 9 ccm Chloroform im Scheidetrichter ausgeschüttelt, das Chloroform abgelassen, durch ein trocknes Papierfilter gegossen und im Wasserbad verdampft. Den Rückstand nimmt man in 1 ccm dest. Wasser auf. Die darin nachweisbare Menge Crocetindimethylester stammt also aus 4×10^{12} Molekeln Crocin. Man könnte meinen, daß das Eintreten der enzymatischen Umesterung bereits mit freiem Auge erkennbar sein werde, wenn man von einer farbigen Lösung des wasserlöslichen Crocins ausgeht und nach dem Ausschütteln mit Chloroform Farbstoff in der unteren Schicht findet²⁾. Die absolut erzielbaren Umsätze sind jedoch hier wie beim pikrocrocinspaltenden Ferment so ungeheuer klein, daß es aussichtslos erscheint, den Eintritt der Umesterung auf diese Art oder mit irgendeinem bekannten chemischen bzw. physikalischen Hilfsmittel erkennen zu wollen. Auch hier wieder sind geeignete *Chlamydomonas*-Zellen das einzige Reagens, das den Nachweis der Fermentwirkung gestattet. Die als Substrat dienende Crocinlösung ist so verdünnt, daß sie farblos erscheint.

Nachweis: Der unter den angeführten Bedingungen entstandene, in Chloroform lösliche „Farbstoff“ hat sich zu unserer Überraschung im Gamon-Test als praktisch reiner *cis*-Crocetindimethylester erwiesen, obwohl das angewandte Crocin ganz überwiegend aus *trans*-Crocin bestehen mußte. In oftmals wiederholten Versuchen hat sich ergeben, daß bei Innehaltung der angegebenen Bedingungen tatsächlich nur *cis*-Ester als chloroformlösliches Reaktionsprodukt auftritt. Als Beleg seien zwei Versuchsreihen angeführt, in denen der in Wasser aufgenommene Rückstand des Chloroformauszuges

²⁾ Vergl. die Umesterung von Crocin zu Crocetindimethylester mit Natronlauge in wäbr. Methanol nach P. Karrer u. A. Helfenstein, *Helv. chim. Acta* **18**, 392 [1930].

unter Standardbedingungen bestrahlt und die Zeit bestimmt wurde, nach der 2×10^6 Dunkelzellen von ♀⁴, ♀³, ♀² usw. durch 1 ccm der Lösung kopulationsfähig wurden.

Rasse der Test-Gameten .	♀ ⁴	♀ ³	♀ ²	♀ ¹	♂ ¹	♂ ²	♂ ³	♂ ⁴
Kopulationsfähig nach ...	10	20	30	40	70	80	90	105 Min.
Kopulationsfähig nach ...	5	15	25	35	65	75	85	95 Min.

Beweisend für die Bildung von praktisch reinem *cis*-Crocetindimethylester ist ferner folgender Versuch: Der in Wasser aufgenommene Rückstand der Chloroformlösung wurde in 2 Tle. geteilt; der eine im Dunkeln aufbewahrt, der andere dem ungefilterten Licht einer Quecksilberlampe ausgesetzt, bis die *cis-trans*-Umlagerung vollständig sein mußte. Wurden nun 3 ccm unbestrahlte und 1 ccm bestrahlte Lösung gemischt, so wurden ♀²-Dunkelzellen kopulationsfähig, während ein Gemisch von 1 ccm unbelichteter und 3 ccm belichteter Lösung ♂²-Dunkelzellen zur Kopulation brachte.

Kontrollen: Läßt man im Versuchsansatz entweder den Methylalkohol oder das Crocin oder die zerriebenen Gameten weg, so geht beim Ausschütteln mit Chloroform kein Wirkstoff in dieses. Wird die Fermentlösung 10 Min. im Wasserbad auf 80° erhitzt, so ist ebenfalls jede umesternde Wirkung erloschen.

cis-Crocic in Crocinpräparaten aus Safran: Es ist eine im Laufe der letzten Jahre wiederholt gemachte, betrübliche Erfahrung unseres Instituts, daß sich aus den meisten Safransorten und dem daraus gewonnenen Crocin, auch wenn man sorgfältig im Dunkeln arbeitet, nach der Vorschrift von R. Kuhn und A. Winterstein kein *cis*-Crocetindimethylester, sondern nur die *trans*-Verbindung gewinnen läßt. Aus diesem Grunde ist es verständlich, daß das *cis*-Crocic bis heute eine hypothetische Substanz geblieben ist, deren präparative Gewinnung noch aussteht. Die eben beschriebene fermentative Bildung von *cis*-Crocetindimethylester führte zu dem Schluß, daß das als Substrat angewandte Crocinpräparat, das noch den Untersuchungen mit A. Winterstein entstammte, einen gewissen Prozentsatz an *cis*-Crocic enthalten müsse. Diese Folgerung wurde erhärtet durch die Feststellung, daß die Bildung von *cis*-Crocetindimethylester völlig ausblieb, wenn als Substrat ein 1938 dargestelltes Crocinpräparat, das wir der Firma E. Merck-Darmstadt verdanken, angewandt wurde. Das letztere enthält offenbar nur *trans*-Crocic.

Eine annähernd quantitative Bestimmung des *cis*-Gehalts in dem mit A. Winterstein isolierten Crocin war uns auf 2 Wegen möglich:

1) 10 ccm einer Lösung dieses Präparates, die 4×10^{12} Molekeln Farbstoff/ccm enthielt, wurden fermentativ in 0.5-proz. Methanol umgeestert, mit Chloroform ausgeschüttelt und der Rückstand in 10 ccm Wasser aufgenommen. Den in dieser wäßrigen Lösung enthaltenen *cis*-Farbstoff haben wir durch Belichten völlig in die *trans*-Form umgelagert und ermittelt, wie weit eine Lösung von kryst. *trans*-Crocetindimethylester verdünnt werden muß, damit sie in Gemischen mit *cis*-Crocetindimethylester genau so wirksam ist. Testobjekt waren ♀²- und ♂²-Dunkelzellen.

Es ergab sich, daß eine Lösung von 2×10^{10} Molekeln kryst. *trans*-Ester/ccm dieselbe Wirksamkeit wie die bestrahlte Lösung aus dem Umesterungsversuch besaß. Da letztere aus 4×10^{12} Molekeln Crocin hervorgegangen war, beträgt das Verhältnis von eingesetztem Crocin zu erhaltenem *cis*-Ester 4×10^{12} :

$2 \times 10^{10} = 200 : 1$. Dazu soll bemerkt werden, daß die Umesterung offenbar vollständig war. Denn wenn die vom Chloroform abgetrennte wäßrige Lösung mit $1/2\%$ Methanol und mit frischem Ferment versetzt wurde, so trat keine Neubildung von *cis*-Ester ein.

2) Wir wissen, daß eine einzelne ♀²- bzw. ♂²-Zelle, um kopulationsfähig zu werden, rund 10000 Molekeln *cis-trans*-Estergemisch benötigt. Man kann nun die Substratkonzentration im Umesterungsversuch variieren — wir wandten 4×10^{15} , 4×10^{14} , 4×10^{13} , 4×10^{12} , 4×10^{11} und 4×10^{10} Molekeln Crocin „Winterstein“ je ccm an — und prüfen, bei welcher Verdünnung in das Chloroform eben noch soviel *cis*-Ester geht, daß im Verlaufe der anschließenden Belichtung ein Zeitpunkt auftritt, in dem noch mehr als 95% von 2×10^6 ♀²-Gameten und später von 2×10^6 ♂²-Gameten kopulationsfähig werden. Wir fanden, daß aus 4×10^{13} Molekeln Crocin/ccm so viel Ester entsteht, daß der Rückstand der Chloroformlösung in 10 ccm Wasser aufgenommen werden kann; daß aus 4×10^{12} Molekeln Crocin/ccm gerade so viel Ester gebildet wird, als zur Kopulation nötig ist, wenn man in 1 ccm löst; daß 4×10^{11} Molekeln Crocin/ccm nicht mehr ausreichen. Dies bedeutet ein Verhältnis von angewandtem Crocin zu gebildetem *cis*-Ester von $4 \times 10^{12} : 2 \times 10^6 \times 10000 = 200 : 1$.

Auf beiden Wegen ergibt sich somit übereinstimmend für

Crocin „Winterstein“	0.5% <i>cis</i> -Crocin,
Crocin „Merck“	0.00% <i>cis</i> -Crocin.

Umesterung von *trans*-Crocin: Im Dunkeln sind die aus den Gameten gewonnenen Fermentlösungen ohne jede Wirkung auf Crocin „Merck“ in 0.5-proz. Methanol. Belichtet man aber den Versuchsansatz, so wird chloroformlöslicher *trans*-Dimethylester gebildet, und zwar bei hinreichender Verdünnung in guter Ausbeute: 8×10^{10} Molekeln *trans*-Dimethylester/ccm aus 4×10^{11} Molekeln Crocin/ccm mit dem Ferment aus 2×10^6 Gameten nach 5 Stdn. bei 20° und p_H 7.0 (Test-Gameten ♀² und ♂²).

Abhängigkeit von der Substratkonzentration: Um die für 50% *cis*-Umesterung erforderlichen Zeiten zu bestimmen, wurden 10 ccm einer Lösung, die 8×10^{12} Molekeln Crocin/ccm in *m*₁₅-Phosphatpuffer von p_H 7.0 und $1/2\%$ Methanol enthielt, mit der aus je 20×10^6 Gameten stammenden Fermentmenge bei den laut Abbild. 4 jeweils optimalen Temperaturen angesetzt, d. h. die Versuche mit *Chlamydomonas typica* bei 27°, mit *Chlamydomonas dresdensis* bei 19°, mit *Chlamydomonas rigophilos* bei 12°. Die Substratkonzentration von 8×10^{12} Molekeln/ccm war so bemessen, daß bei vollständiger Umesterung $8 \times 10^{12} : 200 = 4 \times 10^{10}$ Molekeln *cis*-Crocin-dimethylester/ccm entstehen konnten, bei 50-proz. Umesterung also 2×10^{10} Molekeln/ccm. Schüttelt man daher nach bestimmten Zeiten n ccm des Ansatzes mit Chloroform aus, und löst man den Rückstand des Chloroformauszugs in n ccm Wasser, so hat man, wenn 50% Umesterung eingetreten sind, gerade so viel *cis*-Crocinester/ccm als notwendig ist, um nach entsprechend langer Belichtung 2×10^6 Gameten, von denen jeder 10^4 Molekeln *cis-trans*-Estergemisch benötigt, kopulationsfähig zu machen: $2 \times 10^{10} = 10^4 \times 2 \times 10^6$. Man bestimmt also, wie lange das Ferment auf die Crocin-Methanol-Lösung einwirken muß, bis dieser Punkt erreicht wird, d. h. mehr als 95% der Test-Gameten kopulationsfähig werden.

Erhöht man jetzt die Substratkonzentration von 8×10^{12} auf 8×10^{13} , 8×10^{14} usw. Molekeln Crocin/ccm, so wird auch die Wassermenge, in der man den Chloroformrückstand (der 1 ccm der ursprünglichen Lösung entspricht) auflöst, von 1 ccm auf 10 ccm, 100 ccm usw. erhöht. Als Zeiten für 50-proz. Umesterung wurden so gefunden:

Molekeln Crocin/ccm	M ³ , <i>Chl. typica</i> (27°)	M ³ , <i>Chl. dresdensis</i> (19°)	M ³ , <i>Chl. rigophilos</i> (11.5°)
8×10^{12}	30 Min. (30, 35, 25')	50 Min. (50, 50')	47 Min. (40, 50, 50')
8×10^{13}	5 Stdn. (5, 5, 5)	6 Stdn. (6, 6)	5 1/3 Stdn. (5, 5 1/2, 5 1/2)
8×10^{14}	48 Stdn. (45, 55, 45)	57 1/2 Stdn. (55, 60)	55 Stdn. (50, 60, 55)
8×10^{15}	durchwegs noch nach 6 Tagen unwirksam.		

Man erkennt, daß die für 50% Umsetzung erforderlichen Zeiten der Substratkonzentration annähernd proportional sind. Eine gegebene Fermentmenge estert in dem untersuchten Bereich unabhängig von der gebotenen Crocinmenge in gleichen Zeiten gleich viele Molekeln Farbstoffglykosid um. Das crocinumesternde Ferment ist also wie das pikrocrocinspaltende schon in erstaunlich verdünnten Lösungen ($8 \times 10^{12} \times 10^3$): (6.06×10^{23}) = 0.000000012 molar, mit seinem Substrat gesättigt.

Absolute Wirksamkeit: Die zuletzt angeführte Versuchsreihe zeigt, daß bei den jeweils optimalen Temperaturen die Wirksamkeit von *typica*-, *dresdensis*- und *rigophilos*-Zellen annähernd gleich groß ist. Die aus 1 Zelle stammende Fermentmenge vermag in 1 Sekunde ~5 Molekeln *cis*-Crocin umzuestern. Diese Übereinstimmung gilt aber durchaus nicht für alle *Chlamydomonas*-Gameten, sondern nur deshalb, weil die „Valenz“ von *Chlamydomonas typica*, *Chlamydomonas dresdensis* und *Chlamydomonas rigophilos* dieselbe ist (3) und weil zu den Versuchen des letzten Absatzes durchwegs männliche Gameten verwendet wurden (M³).

Prüft man die Gameten beiderlei Geschlechts und aller 4 Valenzstärken, so ergeben sich große Unterschiede des Umesterungsvermögens.

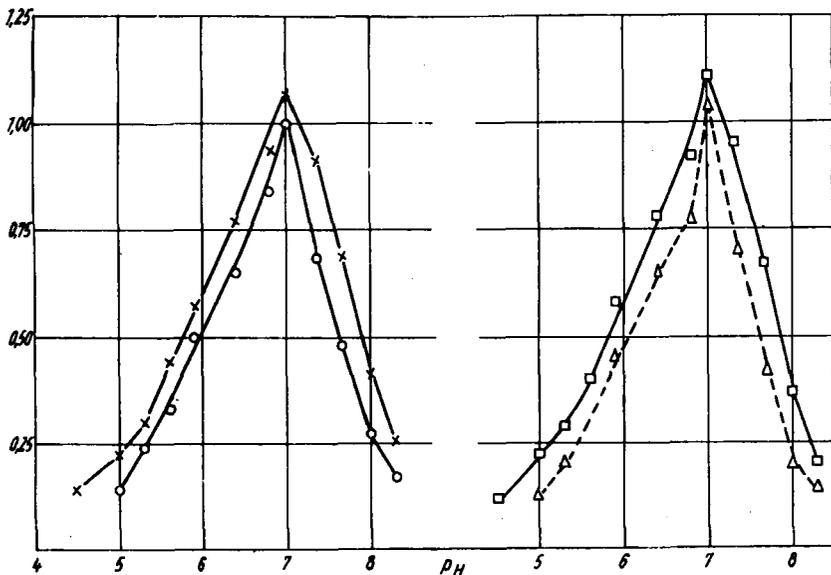
Zeiten 50-proz. *cis*-Umsetzung in Minuten (') bei p_H 7.0 (*m*/15-Phosphat); Ferment aus je 2×10^6 Zellen/ccm; Testzellen ♀² und ♂².

Molekeln Crocin/ccm	F ⁴	F ³	F ²	F ¹	M ¹	M ²	M ³	M ⁴
8×10^{12}	1/4'	1/2'	2'	3'	8'	20'	40'	120'
8×10^{13}	3'	5'	21'	33'	85'	190'	420'	1250'

Die weiblichen Geschlechtszellen sind also viel wirksamer als die männlichen. Die Wirksamkeit nimmt in der Reihe F⁴ → F¹ und M¹ → M⁴ gesetzmäßig ab. Es ist dieselbe Reihenfolge wie für das Verhältnis *cis*:*trans*-Crocinindimethylester, welches diese Gameten unter dem Einfluß des Lichtes ausscheiden. Es liegt nahe, hier einen ursächlichen Zusammenhang zu vermuten.

p_H-Abhängigkeit: Die optimale Wasserstoffzahl für die fermentative Umesterung des *cis*-Crocin ist p_H 7.0. In Abbild. 3 findet man die p_H-Kurven

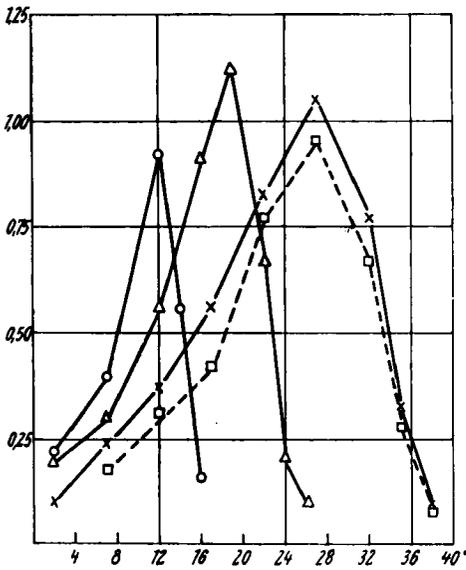
für *Chlamydomonas typica* (M^3), *Chlamydomonas rigophilos* (M^3), *Chlamydomonas dresdensis* (M^3) und *Chlamydomonas philothermos* (M^3). Die Versuche sind mit 4×10^{12} Molekeln Crocin/ccm 0.5-proz. Methanol bei der jeweils optimalen Temperatur angestellt. Als Puffer dienten $m/15$ -Phosphatgemische. Ausgetestet wurde an M^2 - und F^2 -Gameten. Die Ordinaten in Abbild. 3 geben an $100/t$ (t = die für praktisch vollständige *cis*-Umesterung erforderliche Zeit in Minuten). Da ein solches Maß, aber auch die ganze Analysenmethode in der Fermentkinetik nicht geläufig ist, soll die Bedeutung eines Einzelpunktes einer p_H -Kurve genauer erläutert werden. Auf der *typica*-Kurve liest man bei p_H 8.0 als Ordinate 0.4 ab. Es waren also $100/0.4 = 250$ Min. Einwirkungszeit bei 27° erforderlich, bis aus den angewandten 4×10^{12} Molekeln Crocin/ccm = 2×10^{10} Molekeln *cis*-Crocin/ccm so viel chloroformlöslicher *cis*-Dimethylester/ccm entstanden war, als 2×10^6 Test-Gameten (*Chlamydomonas f. simplex*) zur Kopulation benötigten. Um diese Zeit zu ermitteln, wurde dem Umesterungsansatz zunächst alle 15 Min., von 3 Std. ab alle 30 Min. eine Probe von 1 ccm entnommen, mit Chloroform ausgeschüttelt und der Rückstand der Chloroformlösung in 1 ccm Wasser gelöst. Diese Lösung wurde dann unter Standardbedingungen mit der Hg-Lampe bestrahlt und festgestellt, ob nach der für die Umlagerung von 25% erfahrungsgemäß erforderlichen Belichtungsdauer von 25—35 Min. sich ein *cis*-:trans-Dimethylestergemisch 3:1 gebildet hatte, dessen Konzentration hinreichend war, um 2×10^6 Test-Gameten zu mehr als 95% im Dunkeln kopulationsfähig zu machen.


 Abbild. 3. p_H -Abhängigkeit der umesternden Fermente.

- ×—× *Chlamydomonas typica* (σ^3) bei 27°
- *Chlamydomonas rigophilos* (σ^3) bei 12°
- *Chlamydomonas philothermos* (σ^3) bei 27°
- Δ—Δ *Chlamydomonas dresdensis* (σ^3) bei 19°

Temperaturoptima: Mit derselben Methodik, die zur Ermittlung der p_H -Kurven gedient hatte, wurden die Temperaturbereiche, innerhalb deren die Umesterung des *cis*-Crocins eintritt, in m_{15} -Phosphat von p_H 7.0 festgestellt. Das Ergebnis ist aus Abbild. 4 ersichtlich. Wählen wir jene Temperaturen, bei denen nach 500 Min. gerade noch die Mindestzahl von 10^4 Molekeln *cis*-Dimethylester/ccm gebildet wurde, d. h. 0.2 als Ordinate (sind die erforderlichen Zeiten noch länger, so werden die Werte zu ungenau), so findet man die folgenden Grenzen, denen die Temperaturgrenzen für das Kopulationsvermögen der intakten Gameten gegenübergestellt werden. Die letzte Spalte gibt die optimalen Temperaturen an:

	Die Gameten kopulieren bei	Die Fermentlösung estert um bei	Temp. opt.
	in ° C		
<i>Chl. typica</i> (♂ ^{3a})	4—36	5—36	27
<i>Chl. philothermos</i> (♂ ^{3a})	4—36	7—36	27
<i>Chl. dresdensis</i> (♂ ^{3a})	2—25	2—24	19
<i>Chl. rigophilos</i> (♂ ^{3a})	1—16	2—16	12



Abbild. 4. Temperatur-Abhängigkeit der umesternden Fermente.

- *Chlamydomonas rigophilos*
- △—△ *Chlamydomonas dresdensis*
- ×—× *Chlamydomonas typica*
- *Chlamydomonas philothermos*

franal hemmt. Die Aktivierung durch den Bitterstoff ist bei F^4M^4 am stärksten ausgeprägt.

Diese Versuche bedeuten einen ersten Schritt auf dem Wege zum Verständnis der Termon-Wirkung. Bisher wußte man, daß *synoica*-Zellen, die man mit Pikrocrocins versetzt hat, mehr *cis*- als *trans*-Crocetindimethylester

Es ist unerwartet, daß die Temperaturgrenzen der aus den Gameten gewonnenen Fermentlösungen so nahe mit denjenigen übereinstimmen, die für das Kopulationsvermögen der lebenden Geschlechtszellen maßgebend sind.

Umesterung durch Fermentlösungen aus Zwitterzellen: Sowie aus den Gameten der getrennt-geschlechtlichen Formen lassen sich auch aus synöcischen Rassen Fermentlösungen gewinnen, die im Dunkeln aus *cis*-haltigen Crocin in Gegenwart von $1/2\%$ Methanol *cis*-Crocetindimethylester bilden. F^1M^1 -Zellen waren am stärksten, F^4M^4 -Zellen am schwächsten wirksam. Die geschlechtsdeterminierende Wirkung von Pikrocrocins und Saffranal gab Veranlassung, Umesterungsversuche auch unter Zusatz der beiden Termonen anzustellen. Wir fanden, daß Pikrocrocins aktiviert und Saffranal hemmt.

Zeiten für 50-proz. Umesterung bei pH 7.0 und 20°. Pikrocrocine je 10^{12} Molekeln/ccm, Safranal je 10^9 Molekeln/ccm zugesetzt.

Rasse der Gameten	Zusatz	2×10^{12} Molekeln Crocin/ccm	8×10^{13} Molekeln Crocin/ccm
F ¹ M ¹ ($\frac{+}{-}$ ¹)	—	5 Min.	1 Stde.
F ¹ M ¹ ($\frac{+}{-}$ ¹)	Pikrocrocine	3 Min.	$\frac{1}{2}$ Stde.
F ¹ M ¹ ($\frac{+}{-}$ ¹)	Safranal	9 Min.	$1\frac{1}{2}$ Stdn.
F ² M ² ($\frac{+}{-}$ ²)	—	11 Min.	2 Stdn.
F ² M ² ($\frac{+}{-}$ ²)	Pikrocrocine	2 Min.	$\frac{1}{3}$ Stde.
F ² M ² ($\frac{+}{-}$ ²)	Safranal	20 Min.	$3\frac{1}{2}$ Stdn.
F ³ M ³ ($\frac{+}{-}$ ³)	—	20 Min.	$3\frac{1}{3}$ Stdn.
F ³ M ³ ($\frac{+}{-}$ ³)	Pikrocrocine	$\frac{1}{2}$ Min.	$\frac{1}{12}$ Stde.
F ³ M ³ ($\frac{+}{-}$ ³)	Safranal	42 Min.	$7\frac{1}{4}$ Stdn.
F ⁴ M ⁴ ($\frac{+}{-}$ ⁴)	—	60 Min.	6 Stdn.
F ⁴ M ⁴ ($\frac{+}{-}$ ⁴)	Pikrocrocine	$\frac{1}{3}$ Min.	$\frac{1}{20}$ Stde.
F ⁴ M ⁴ ($\frac{+}{-}$ ⁴)	Safranal	120 Min.	24 Stdn.

ausscheiden, d. h. weibliche Eigenschaften zeigen, während nach Zusatz von Safranal mehr *trans*- als *cis*-Ester ausgeschieden wird, d. h. funktionell männliche Zellen entstehen. Nachdem sich jetzt gezeigt hat, daß die Bildung von *cis*-Crocetindimethylester durch Pikrocrocine gefördert, durch Safranal aber gehemmt wird, kann man erkennen, wie die Verschiebung des *cis* : *trans*-Verhältnisses zustande kommt: Die *Termone* aktivieren bzw. hemmen die umesternden Fermente, denen die Bildung der *Gamone* obliegt. Dabei muß betont werden, daß eine *Termon*wirkung nur bei Zwittern nachweisbar ist. Die Gameten der getrennt-geschlechtlichen Rassen sprechen weder auf Pikrocrocine noch auf Safranal an. Das *cis* : *trans*-Verhältnis der zur Ausscheidung gelangenden *Gamone* ist bei den getrennt-geschlechtlichen *Chlamydomonas*-Rassen erblich festgelegt und chemisch bisher unverrückbar.

91. Richard Kuhn und Franz Moewus: Wie kommen die Verhältniszahlen *cis*- : *trans*-Crocetindimethylester bei den getrennt-geschlechtlichen Rassen von *Chlamydomonas* zustande?

[Aus d. Kaiser Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Biologie.]
(Eingegangen am 15. April 1940.)

Die *Gamone* von *Chlamydomonas eugametos* f. *simplex*, die bei Belichtung der Gameten gebildet werden, sind keine einheitlichen Wirkstoffe, sondern Gemische. Die weiblichen Geschlechtszellen ($\frac{+}{-}$ ²) scheiden ein Gemisch von 3 Teilen *cis*- und 1 Teil *trans*-Crocetindimethylester, die männlichen ($\frac{-}{+}$ ²) ein Gemisch von 1 Teil *cis*- und 3 Teilen *trans*-Ester aus¹⁾. Das *cis*- : *trans*-

¹⁾ R. Kuhn, F. Moewus u. D. Jerchel, B. 71, 1541 [1938].