

Über die Orientierung der Leptonen in Speicheldrüsenchromosomen

Von HANS H. PFEIFFER

Aus dem Staatl. Museum für Natur-, Völker- und Handelskunde, Bremen

(Z. Naturforschg. 1, 461—464 [1946]; eingegangen am 31. Mai 1946)

An Speicheldrüsenchromosomen aus Larven von *Chironomus (plumosus)*-Gruppe sind mittels der F. Beckeschen Imbibitionsmethode die Brechungskoeffizienten n_{11} , n_{12} gemessen und daraus nach vorangegangenen Modellversuchen mit α -thymonucleinsäurem Natrium nach A. Frey-Wyssling der Streuwinkel, welcher durch einen einzigen Wert den Streukegel der Leptonen im Raume beschreibt, ermittelt worden. Der geringe Grad der so bestimmten Orientierung der Leptonen ist ein Beweis für die hohe Empfindlichkeit polarisationsoptischer Messungen. Bestimmungen des Streuwinkels an frisch isolierten, schwach oder stärker gedehnten Chromosomenabschnitten beweisen, daß zumindest bei nicht zu hohen Dehnungsgraden (innerhalb der „Elastizitätsgrenze“) und bei Konstanz aller andern Variablen die optische Anisotropie ein recht zuverlässiges Maß des Orientierungsgrades der Leptonen bildet.

Das submikroskopische (leptonische) Gerüst organisierter Gele besteht nach der heute geläufigen Auffassung aus untereinander verhängten Fadenmolekeln oder Bündeln solcher (Micellarstränge), deren Orientierungsgrad darüber entscheidet, ob die Gele im Grenzfall ausgesprochen anisotrop (infolge Parallelisierung der Leptonen) oder isotrop (wegen vollkommener Desorientierung) erscheinen. Zwischen beiden Grenzfällen gibt es die verschiedensten Texturen mit wechselnd abgestuften Orientierungsgraden, wie denn auch bei Quellung oder Dehnung solcher Gele sehr unterschiedliche Orientierungsstufen resultieren müssen.

T. Caspersson¹ hat die Orientierung der Nucleinsäure in Chromosomen nach Messungen des Ultraviolett-Dichroismus mittels Photozelle beurteilt. Er hält dieses Verfahren für weit empfindlicher als Bestimmungen der Doppelbrechung und schließt auf eine kaum nennenswerte Orientierung der Nucleinsäure in Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. Hingegen haben W. J. Schmidt² und H. H. Pfeiffer³ gezeigt, daß die polarisationsmikroskopische Methode bei Messungen mit dem Kompensator nach Brace-Köhler⁴ so empfindlich ist, daß nicht erst 2, sondern unter geeigneten Messungsbedingungen bereits 0,055 $m\mu$ = 0,55 Å meßbar werden. Gestützt auf frühere Ableitungen eines Streuwinkels der Leptonen organisierter Hochpolymeren⁵, hat ferner A. Frey-Wyssling Formeln entwickelt⁶, zufolge deren Anwendung

die Streuung der Nucleinsäureketten um die Chromosomenachse den beträchtlichen Wert von 86 bis 87° erreicht. H. H. Pfeiffer⁷ endlich hat an zentrifugemikroskopisch vermessenen Eizellen von *Rana temporaria* die Doppelbrechung außer vom Orientierungsgrade und von der chemischen Konstitution auch von Quellungsgrad, Viscosität, Streckungs- bzw. Entfaltungsgrad der Fadenmolekeln und dem Volumenverhältnis gittermäßig orientierter und amorpher, wenn auch vielleicht eine „Nahordnung“ aufweisender Anteile des leptonischen Gefüges abhängig gefunden.

Überhaupt ist der theoretische Zusammenhang zwischen Doppelbrechung und Orientierung weitgehend unbestimmt, insofern selbst bei der „vollkommenen Orientierung“ (Parallelisierung der Leptonen) der Grad gittermäßiger Anordnung, der für sich allein nicht erfaßt werden kann, unbeachtet bleibt, vor allem aber die Isotropie Fälle absoluter Desorientierung ebenso wie partieller „Nahordnung“ in kleinen Bereichen umfaßt. Weitere Komplikationen müssen sich besonders infolge wechselnden Quellungszustandes und der beim Dehnen möglichen Entfaltung der Fadenmolekeln ergeben. Dennoch haben die von Frey-Wyssling entwickelten Ausdrücke, welche durch einen einzigen Winkel das Streufeld der Leptonen in der Ebene oder ihren Streukegel im Raume beschreiben, den Vorzug großer Einfachheit, auch wenn sie nur auf Fälle schwacher Anisotropie (wie bei den Chromosomen) angewandt werden dürfen und die Voraussetzung einer gleichmäßigen Häufigkeit der

¹ Chromosoma 1, 605 [1940].

² Chromosoma 2, 86 [1941].

³ Chromosoma 2, 77 [1941]; Bl. Unters.- u. Forsch.-Instr. 16 [1942].

⁴ H. H. Pfeiffer, Das Polarisationsmikroskop als Meßinstrument in Biologie und Medizin, im Druck (Braunschweig 1946).

⁵ A. Frey-Wyssling, Jb. wiss. Bot. 90, 705, 720 [1942].

⁶ Chromosoma 2, 473 [1943]; Helv. Chim. Acta 26, 833 [1943].

⁷ Kolloid-Z. 100, 254 [1942].



verschiedenen Orientierungsrichtungen der Leptonen mit experimentellen Befunden im Widerspruch steht.

Durch Kratky⁸ ebenso wie durch Hermans und Mitarb.⁸ ist die Verteilungsfunktion, nach deren Maßgabe die Häufigkeit der einzelnen Richtungen auftritt, aus dem Dehnungsgrade gedehnter Gele berechnet worden; da aber bei biogenen Gelen die Deformation im ursprünglichen, isotropen Zustande nicht bekannt ist, kann über die Art der Verteilung der einzelnen Richtungen nichts ausgesagt werden und mag daher die Annahme gleichmäßiger Verteilung vorerst gestattet sein.

Wie sich aus Bestimmungen der Koeffizienten $n_{||}$, n_{\perp} ergeben hat, muß in den untersuchten Speicheldrüsenchromosomen eine räumliche Streuung der Leptonen vorliegen und der Streuwinkel α , welchen die am stärksten divergierenden Stränge mit der Symmetrieachse des Streufeldes einschließen, aus dem von Frey-Wyssling entwickelten Ausdruck

$$n_{||} - n_{\perp} = (n_a - n_0) \frac{\cos \alpha + \cos^2 \alpha}{2}$$

ermittelt werden können. Man kann also an den Speicheldrüsenchromosomen zu bestimmten Aussagen über die Orientierung der Leptonen kommen, wenn man die optische Anisotropie des ideal ausgerichteten Gels aus n_a , n_0 kennt und die entsprechenden Brechungskoeffizienten $n_{||}$, n_{\perp} an dem Gel des unbekannten Orientierungsgrades mißt.

Die Koeffizienten n_a , n_0 müssen also vorweg im Modellversuch ermittelt werden.

Dazu ist unter Erwärmen auf Wasserbad eine 10-proz. wäßrige Lösung von α -thymonucleinsäurem Natrium, das ich einer früheren Freundlichkeit von Prof. Dr. W. T. Astbury (Leeds) verdanke, hergestellt und mit Luerscher Spritze in ein bis zum Rande mit absol. Alkohol gefülltes Reagensglas gespritzt worden. Aus dem Gewirr gröberer und feinerer Gallertfäden werden geeignete runden Querschnitte ausgewählt und vermessen.

Dazu dient die Imbibitionsmethode⁹, nach welcher mittels der F. Beckeschen Linie die beiden Koeffizienten n_a , n_0 einzeln erhalten werden. Als Imbibitionsmedien eignen sich für das benutzte Material Benzylalkohol (n_D 1,538) und Zimtöl (n_D 1,581 bis 1,591), denen tropfenweise Amylalkohol (n_D 1,397) bzw. Nelenöl (n_D 1,530 bis 1,535) hinzugefügt werden. Um Fehlmessungen infolge Adsorption von Anteilen der die Flüssigkeitsreihe hinauf und hinunter benutzten Medien möglichst auszuschließen, werden im Anschluß an das End-

ergebnis frisch isolierte Chromosomenabschnitte nochmals in dem zuletzt erhaltenen Gemisch, dessen Brechungskoeffizient mittels der Mikrokammer von A. Möhring¹⁰ ermittelt wird, vermessen. Wegen des merklichen Temperaturganges der Imbibitionsmedien ist die Angabe von nur drei Dezimalen ausreichend. Da die Medien in der Dispersion von den Chromosomen merklich abweichen, müssen die Beobachtungen in monochromatischem Lichte, zu dessen Darstellung sich die Cd-Spektrallampe der Osram-Gesellschaft hervorragend eignet, ausgeführt werden. Um eine das Ergebnis fälschende Quellung des leptonischen Gefüges durch die Imbibitionsmedien auszuschließen, muß darauf geachtet werden, daß bei deren Änderung in der hinauf- oder hinabführenden Reihe die Quellung ausbleibt.

Mit dieser Methode ist an den Modellfäden $n_a = 1,498$, $n_0 = 1,496$ bis 1,495 ermittelt worden, woraus sich eine (negative) Anisotropie zu $(n_a - n_0) = 0,2 \cdot 10^{-3}$ ergibt. Unter Berücksichtigung der Dicke umgerechnet ($0,62 \cdot 10^{-3}$), ist dieser Wert in guter Übereinstimmung mit jenem aus Messungen der Strömungsdoppelbrechung am gleichen Material¹¹.

Die gleiche Methode ist sodann auf die frisch isolierten und die in wechselnder Stärke mikrurgisch gedehnten Speicheldrüsen-Chromosomen von *Chironomus*-Larven der plumosus-Gruppe angewandt worden. Wenn gelegentlich die F. Beckesche Linie auch in monochromatischem Lichte nicht vollständig zum Verschwinden gebracht werden kann, so ist der Chromosomenabschnitt nicht homogen genug und muß von der Vermessung ausgeschlossen werden.

An eben isolierten Chromosomen ist ferner mittels der Kompensatoren von Brace-Köhler, von M. Berek und von H. Sénarmont die Anisotropie ($n_{||} - n_{\perp}$) ermittelt worden. Unter Berücksichtigung der Objektdicke stehen die erhaltenen Γ -Werte in befriedigender Übereinstimmung mit den aus $n_{||}$, n_{\perp} errechneten Größen; nur muß dabei bedacht werden, daß bei den Γ -Messungen die O. Wienersche oder G. J. Sadronsche Stäbchen-doppelbrechung mit erfaßt wird, welche nach der Imbibitionsmethode F. Beckes wegfällt, sobald die Imbibitionsmedien das Objekt völlig durchtränken. Nach unveröff. Vers. hat sich an frisch isolierten Chromosomen eine deutliche negative Eigendoppelbrechung ($- 0,62 \cdot 10^{-3}$) ergeben,

⁸ O. Kratky, Kolloid-Z. 64, 213 [1933]; 84, 149 [1938]; zus. m. R. Treer, ibid. 96, 30 [1941]. — P. H. Hermans, ibid. 96, 38 [1941]; zus. m. H. R. Kruyt u. D. Vermaas, ibid. 99, 244 u. 251; 100, 111 [1942]. — D. Vermaas, Dissertat. Utrecht 1941.

⁹ Fr. Vlès, Propriétés optiques des muscles, p. 82 sq. (Paris 1911). — K. Spangenberg, Fortschr. Mineral., Kristallogr., Petrogr. 7, 3 [1922]. — A. Frey-

Wyssling, Jb. wiss. Bot. 65, 195 [1926]; Kolloidchem. Beih. 23, 40 [1926]. — W. J. Schmidt, Handb. biol. Arbeitsmeth. (V) 10, 435, 550 [1934]; 10, 827, 852 [1935]. — H. H. Pfeiffer, l. c.⁴

¹⁰ Wiss. u. Industrie 2, 17 [1923].

¹¹ R. Signer, T. Caspersson u. E. Hammarsten, Nature [London] 141, 122 [1938].

v_s	bei v_0							
	87° 10'	86° 25'	86° 5'	85° 20'	85° 15'	85° 5'	83° 35'	81° 10'
10	84° 40'	—	—	84° 5'	—	—	81° 40'	79° 5'
20	—	79° 50'	80° 5'	—	79° 50'	79° 20'	—	—
30	78° 50'	—	—	76° 30'	—	—	78° 30'	74° 40'
40	—	72° 40'	72° 35'	—	72° 25'	—	—	—
50	71° 20'	—	69° 45'	69° 10'	—	69° 20'	75° 5'	65° 10'
60	—	66° 10'	66° 10'	—	—	—	—	—
80	65° 5'	62° 45'	—	—	63° 10'	—	60° 55'	60° 5'
100	—	61° 20'	61° 15'	61° 50'	—	62° 10'	—	58° 40'
120	62° 50'	—	60° 20'	—	60° 5'	—	59° 25'	—
125	—	60° 10'	—	59° 55'	—	—	—	57° 10'
150	—	—	60° 5'	—	59° 50'	59° 40'	—	—
180	60° 20'	—	59° 55'	59° 20'	59° 10'	—	—	—

Tabelle über die Abnahme der Streuwinkel (α) mit wachsender mikrurgischer Dehnungsverlängerung (v_s in %).

welche an gedehnten Chromosomen noch ansteigt, indem hier die Eigendoppelbrechung der Leptonen mit zunehmender Parallelausrichtung immer mehr zur Geltung kommt und die gleichfalls steigende (positive) Anisotropie der Proteingrundlage der chromosomalen Fadenmolekeln nach ihrer Entfältelung in den Interchromomeren¹² überkompensiert.

Die Bestimmung der Brechungskoeffizienten $n_{||}$, n_{\perp} an den in verschiedenem Grade *mikrurgisch gedehnten* Chromosomen läßt wie bei der Doppelbrechung ($n_{||} - n_{\perp}$) in früheren Versuchen am gleichen Material¹² eine *annähernd lineare* Zunahme der Doppelbrechung mit dem Dehnungsgrade, wenn dieser auf die Ausgangslänge der frisch isolierten Abschnitte (v_0) bezogen wird, erkennen.

Stelle ferner v_s die relative Verlängerung des noch eingespannten Chromosomenabschnitts, v_e die nach Entspannen verbleibende Verlängerung (den experimentellen Dehnungsgrad) dar, so ist das Verhältnis beider weitgehend von *Zeitfaktoren* abhängig. Deswegen sind die bei 18° C und mit möglichst gleichmäßiger Geschwindigkeit gedehnten Chromosomenabschnitte stets 30 Sek. ausgespannt gehalten und die entspannten Abschnitte 1 Stde. frei im Einschlußmedium belassen worden, bevor v_e bestimmt wurde. Übrigens erweist sich das Verhältnis v_e / v_s bei beginnender Dehnung als kleiner als bei länger fortgesetzter, d. h. die „Elastizität“ der Chromosomen nimmt in Funktion von v_s ab.

Der nach Ermittlung der Doppelbrechung nach dem Verfahren von Frey-Wyssling errechnete *Streuwinkel* gründet sich allein auf das Verhältnis $n_{||}/n_{\perp}$, nicht aber auf die absoluten Größen der

¹² H. H. Pfeiffer, *Chromosoma* **1**, 526 [1940]; **2**, 77, 80 [1941]. — Hingegen tritt T. Caspersson (ibid. **1**, 605, 616 [1941]) für eine Fältelung in den Chromomeren ein.

Refraktion. Deshalb konnte auch für nur in der Stärke der Doppelbrechung verschiedene Objekte innerhalb der Fehlergrenze der Methode befriedigende Übereinstimmung der Streuwinkel nachgewiesen werden¹³. Anders verhalten sich indessen die *infolge experimenteller Dehnung* eine Zunahme der Anisotropie bekommenden Chromosomenabschnitte (Tab.). Obgleich nachweislich ihre Quellung in radialer Richtung vermieden worden ist, ergibt sich eine Verringerung der Streuwinkel, welche mit Sicherheit die mutmaßliche Fehlergrenze der Methode überschreitet und einen guten Beweis für den *ausrichtenden Einfluß* des mikrurgischen Dehnungseingriffes bildet. Trotz der noch nicht übermäßig reichhaltigen Sammlung von Versuchsdaten hat sich ferner gezeigt, daß zumindest bei *schwachen* und *mittleren Dehnungsgraden*, bei denen die „Elastizitätsgrenze“ der Objekte noch nicht überschritten wird, die Abnahme der Streuwinkel und demzufolge die Zunahme der Orientierung der Leptonen in linearer Abhängigkeit von fortschreitender Dehnung erfolgt. Erst bei *höheren Dehnungsgraden* bleibt die Zunahme der Orientierung dahinter zurück und strebt die Kurve der Orientierung einem Sättigungswerte zu.

Indessen soll keineswegs auf die *absoluten* Werte der Streuwinkel oder der gemessenen Größen der Brechungskoeffizienten ein besonderer Wert gelegt werden. Aber ich stimme allerdings Frey-Wyssling zu, daß ernstlich mit der Sammlung *quantitativer* Daten begonnen werden sollte, welche so weit wie erlaubt ausgewertet werden müssen. Der an frisch isolierten Chromosomen nur geringe

¹³ A. Frey-Wyssling, *Jb. wiss. Bot.* **90**, 705, 722 [1942].

Grad der Orientierung der Leptonen (Streuwinkel zwischen 81 und 88°) ist jedenfalls ein ausgezeichneter Beweis für die überaus hohe *Empfindlichkeit der polarisationsmikroskopischen Methode*, welche theoretisch auszuwerten wohl lohnt¹⁴. Andererseits ist bei Konstanz aller andern den Orientierungsgrad beeinflussenden Variablen (s. oben) die experimentelle Dehnung, vor allem jene innerhalb der „Elastizitätsgrenze“ der Biogele, ein sicheres

¹⁴ H. H. Pfeiffer, Nature [London] **143**, 335 [1939]; vergl. auch l. c.⁴.

Mittel zur Herbeiführung einer Verstärkung der Orientierung.

Die zahlreichen Kollegen, welche die Untersuchungen vor allem auch durch Hilfe bei der Ausgestaltung der Versuchs- und Messungsvorrichtungen gefördert haben, können nicht gut einzeln aufgeführt werden. Vor allen andern aber sei hier nochmals Prof. Dr. Fr. Vlès (früher Straßburg), Prof. Dr. W. J. Schmidt (Gießen), Prof. Dr. A. Frey-Wyssling (Zürich), Dr. D. Vermaas (Utrecht), Dr. H. Freund (Wetzlar) und Dr. K. Albrecht (zuletzt Rathenow) der Ausdruck *verbindlichen Dankes* wiederholt.

Über die Tonofibrillen in der Wirbeltierepidermis, insbesondere bei *Hyla*

Von WILHELM J. SCHMIDT

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Gießen

Herrn Dr. med. et phil. h. c. Ernst Leitz in Wetzlar zum 75. Geburtstage

(Z. Naturforschg. **1**, 464—468 [1946]; eingegangen am 28. Mai 1946)

Nach allgemeiner Auffassung verlaufen die Tonofibrillen der Wirbeltierepidermis in Richtung des vorherrschenden Zuges und fangen diesen auf. Solche funktionelle Deutung wird besonders dadurch gestützt, daß mit einer von der Norm abweichenden Zugbeanspruchung auch eine entsprechende Änderung gegenüber dem gewöhnlichen Verlauf dieser Fibrillen besteht (Epithel der Haftscheibe gewisser Knochenfische). Und daß eine Ursache der Tonofibrillenentstehung eben dieser Zug ist, bezeugt das Auftreten besonderer Tonofibrillenstrukturen an lokal beanspruchten Epidermisstellen (z. B. Tonofibrillensehnen der Hautmuskelchen von Anuren). Jedoch dürfte der Zug nicht etwa unmittelbar das submikroskopische cytoplasmatische Gerüstwerk aus Proteinfadenmolekeln faserig verformen, sondern nur eine „Auslösung“ für die Fibrillenbildung darstellen. Denn man kennt auch Tonofibrillen — und darunter die mächtigsten überhaupt vorkommenden —, die distal *frei* im Cytoplasma ihrer Bildungszellen enden und daher während ihrer Entstehung keiner wesentlichen Zugbeanspruchung unterliegen können, übrigens auch andere Funktionen wie gewöhnlich vollziehen (Sinnes- und Haftborsten der Geckoniden). So liegt die Vorstellung nahe, die Tonofibrillenbildung vollziehe sich — gleich der anderer intra- und extracellulärer Fibrillen — durch einen Wachstumsprozeß, einen Polymerisationsvorgang, bei dem Proteingrundbausteine zu parallelierten Fadenmolekeln sich ordnen. Diese *Fibrillenkeime* vergrößern sich durch weitere geordnete Anfügung von Bildungsmaterial; stellen sie sich in die Richtung des vorherrschenden Zuges ein, so auch die aus ihnen heranwachsenden Fibrillen. Untersuchung der Epidermis von *Hyla* in polarisiertem Licht ließ um die obengenannten „Sehnen“ herum *Tonofibrillenringe* nachweisen, und ähnlich auch um den bisher unbekannten *Tonofibrillenkegel* in der Mündungszelle der Hautdrüsen. Die funktionelle Bedeutung des Ringes liegt im ersten Falle wohl darin, daß er einer Stauchung der Sehne vorbeugt und den an ihr ansetzenden Zug auch seitlich auf die Nachbarschaft verteilt. Der Tonofibrillenkegel um die Drüsenmündung herum aber fängt den Zug auf, dem der Ausführungsgang bei praller Füllung des Säckchens mit Sekret unterliegt, während die Umgürtung des Kegels einer Erweiterung des Mündungskanals durch diesen Zug und beim Auspressen des Sekretes entgegenwirkt.

Es ist seit langem bekannt¹, daß die Epidermis der Wirbeltiere die Neigung hat, im Cytoplasma ihrer Zellen eine faserige Struktur aus Proteinmaterial (Plasmafaserung, Tonofibrillen)

¹ Vergl. z. B. M. Heidenhain, Plasma und Zelle I, 2. Jena 1911, S. 957—972; W. Biedermann, Vergleich-

auszubilden, welche — durch Vermittelung von Zellbrücken — die Oberhaut als ein Ganzes durchzieht. Diesem „Tonofibrillensystem“ wird die Aufgabe zugesprochen, die Epidermis zu festigende Physiologie des Integuments der Wirbeltiere, Ergebn. Biol. **1**, S. 1—342 (S. 103—109) [1926].