

Die Steuerung des morphogenetischen Fließgleichgewichts in den Polypen von *Hydractinia echinata*

II. Chemisch-analytische Untersuchungen*

WERNER ALOIS MÜLLER**

Laboratory of the Marine Biological Association of the United Kingdom, Plymouth,
und Zoologisches Institut der Technischen Universität Braunschweig

Eingegangen am 14. April 1969

Control of the Morphogenetic Steady State in the Polyps of Hydractinia echinata

II. Chemical Analysis

Summary. 1. In homogenates of all tissues, including the hydrorhiza, thermostable factors are present capable of evoking heteropolar regeneration. Isolated heat-stable nematocyst toxins lead, in proper concentrations, to the same symptoms. A heat-labile substance with analogous effects is traceable in extracts of the nematocyst-free proboscis.

2. Extracts of gastrozooids and of blastostyles supply a substance which brings about the development of supernumerary tentacles. This substance, which was detectable only after separation of the extract by column chromatography, is digested by trypsin and seems to have a molecular weight in the range of peptide hormones. Heteropolar head-formations, which beyond that have been evoked after the first chromatographic step on DEAE-Sephadex A-50, remained within the normal range of frequency after further purifying the substance with Sephadex G-25.

3. Basic proteins, extracted with 0.57 M NaCl at pH 6.8, and purified by Reinecke-precipitation and by chromatography, block any regeneration and evoke spasmodic contractions. By means of disc-electrophoresis eight (at pH 8.2) resp. twelve (at pH 4.3) electropositive proteins have been detectable.

4. Material of the hydrorhiza retains, when freeze-dried, its inductive capacity.

5. In the discussion of the results concerning the apical inducers, the gradient hypothesis is confronted with the concept of an induction sequence. Furthermore, it is explained, that the testing system chosen here and in similar works does not prove the existence of hypostome-inducing ("polarizing") factors, since not only specific inducers but also inhibitors interfering with the dominance system will give rise to heteropolar regeneration.

Zusammenfassung. 1. In Homogenaten aller Gewebe ist ein thermostabiler Faktor zugegen, der inverspolare Regenerationen hervorruft. Isolierte, thermostabile Nesselgifte zeitigen gleiche Symptome. Eine thermolabile Substanz mit gleichsinniger Wirkung ist in Extrakten Cnidien-freier Mundkegel nachweisbar.

2. Eine erst nach chromatographischer Trennung der Extrakte nachweisbare, in Nähr- und Geschlechtspolypen vorhandene Substanz ruft eine Erhöhung der Tentakelzahl und die Entwicklung von Tentakeln außerhalb des Tentakelkranzes hervor. Nach dem 1. Trennschritt an DEAE-Sephadex A-50 darüber hinaus gehäuft aufgetretene inverspolare Peristombildungen blieben nach der 2. Trennung an Sephadex G-25 im Bereich der normalen Häufigkeit. Der Tentakel-induzierende Faktor wird durch Trypsin zerstört; nach der Retention an G-25 liegt sein MG im Bereich der Peptidhormone.

3. Bei pH 6,8 und hoher Salinität (= 0,57 M NaCl) extrahierte, säulenchromatographisch und durch Reinecke-Präzipitation isolierte basische Proteine blockieren die Regeneration und rufen spasmodische Kontraktionen hervor. Discelektrophoretisch waren bei pH 4,3 zwölf, bei pH 8,2 acht elektropositive Bande nachzuweisen.

* Zweiter Teil einer Arbeit, die der TU Braunschweig als Habilitationsschrift vorliegt.

** Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

4. Hydrorhizagewebe behält nach Gefriertrocknung seine induktive Kapazität.

5. In der Erörterung der Resultate wird u. a. bezüglich des apikalen Induktionssystems die Vorstellung einer Induktionskaskade der Vorstellung eines Konzentrationsgradienten gegenübergestellt. Es wird dargelegt, daß die hier und in vergleichbaren Arbeiten gewählten Testsysteme den Nachweis Peristom-induzierender („polarisierender“) Faktoren nicht gestatten.

Einleitung

„Morphogenetisches Fließgleichgewicht“ bezeichnet einen bei Hydroiden beobachtbaren kontinuierlichen Formbildungsvorgang: Das Gewebe des formkonstanten Polypenkormus befindet sich in dauernder Bewegung; von einer ruhenden Zone aus wandert zeitlebens proliferiertes Zellmaterial den Körperpolen zu, wo es sukzessive resorbiert wird; dabei passen die Zellen im Zuge ihrer Verfrachtung ihren Differenzierungszustand jeweils der Region an, die sie durchlaufen. Diese Erscheinung hat besonders in Hinblick auf die Steuerung der polaritätsrichtigen Differenzierung Interesse beansprucht (BURNETT, 1961; MÜLLER, 1964; CAMPBELL, 1967). Die biologische Analyse der steuernden Faktoren im Regenerations-, Dissoziations- und Induktionsexperiment durch MÜLLER (1969) hat zur Aufstellung eines Modells für die Steuerung der polaren Differenzierung geführt. Dieses Steuerungssystem umfaßt Faktoren, die Formbildungspotenzen blockieren, und Faktoren, die Potenzen aktivieren. Das aktivierende System ist gegliedert in ein apikales Induktionssystem mit Vektor Apex \rightarrow Base und in ein basales Induktionssystem mit Vektor Base \rightarrow Apex. Mit dem apikalen Induktionssystem sind Faktoren gekoppelt, die Formbildungspotenzen stabil blockieren, mit dem basalen Induktionssystem Faktoren, die Formbildungspotenzen reversibel unterdrücken. Die reversible Blockierung erweist sich im Regenerationsfall als instabil und wird auch durch apikale Induktion aufgelöst; die stabile Blockierung bleibt im Regenerationsfall bestehen und wird nur durch basale Induktion aufgehoben.

Dieses zur formelhaften Darstellung der Ergebnisse entworfene Modell verzichtet auf die Annahme von Konzentrationsgradienten diffusibler Wirksubstanzen, obwohl solche Vorstellungen naheliegen (MÜLLER, 1964) und zum traditionellen Postulat der Entwicklungsphysiologie geworden sind (CHILD und HYMAN, 1919; KÜHN, 1965; STUMPF, 1968). Es steht damit im Gegensatz zu dem Modell von BURNETT, der seine Vorstellungen zunächst für *Hydra* (1961, 1966) entwickelt und dann auch auf *Hydractinia echinata* (1967) ausgedehnt hat.

Freilich hat das für *Hydractinia* neu entworfene Modell mit seinem Verzicht auf Vorstellungen über die Basis der experimentell erfaßbaren Richtungsgefüge mehr deskriptiven als erklärenden Charakter. Es läßt offen, auf welche Art die Induktionssysteme eine ordnungsgemäße Reihenfolge der Differenzierungsschritte sicherstellen und worauf die gefälleartige Abnahme des Dominanzeffektes beruht. Das Modell impliziert nur insofern eine Deutung, als das Differenzierungsmuster letztlich auf differentielle Genaktivitäten zurückgeführt wird; es enthält sich jedoch aller Hypothesen darüber, wie die einzelnen Komponenten des Steuerungssystems molekularbiologisch konstruiert und funktionell verkettet sind. Vorliegende Arbeit stellt den Versuch dar, durch Extraktion der Gewebe morphogenetische Wirksubstanzen zu isolieren und dadurch erste Anhaltspunkte über die chemische Basis des Regulationssystems zu gewinnen.

Eine chemische Analyse verlangt als Arbeitshypothesen konkrete Vorstellungen über die Natur der induzierenden und der inhibierenden Reize und über die Weise ihrer Übermittlung. Als Möglichkeiten einer solchen Informationsübermittlung sind in Betracht zu ziehen:

1. *Bioelektrische Felder*. Sie sind vor allem durch BARTH (1934) in die Diskussion gebracht worden. Durch Applikation eines elektrischen Feldes geeigneter Stärke und Polung kann bei verschiedenen regenerierenden Hydrozoen eine Polaritätsinversion hervorgerufen werden. Solche Befunde sind jedoch vieldeutig und sollen deshalb außer Betracht bleiben.

2. *Oberflächenstrukturen*, die als informative Zeichen fungieren. Die Bedeutung gebundener Signalstrukturen für die Koordination von Entwicklungsprozessen ist bekannt (MOSCONA, 1960). Eine geordnete Differenzierungsfolge entlang der Körperachse könnte durch eine quantitative oder qualitative Abstufung solcher Strukturen gewährleistet sein.

3. *Lösliche Botenstoffe*, d.h. humorale Induktions- und Hemmsubstanzen. Auch ein auf solchen Stoffen basierendes System muß durch seine Charakteristik eine geordnete Reihenfolge der Differenzierungsschritte sicherstellen. Als Denkmotive bieten sich an:

a) Eine *Kettenfolge abhängiger Induktionen* oder *abhängiger Repressionsprozesse*. ROSE (1966, 1967), ROSE u. POWERS (1966) sowie AKIN u. AKIN (1967) finden in *Tubularia*-Extrakten positiv geladene, Trypsin-sensible Substanzen („Histone“), die je nach Herkunft unterschiedliche Regenerationsphasen blockieren. Ein hierarchisches System der Repression soll eine Entwicklungsordination bewerkstelligen. Durch Abgabe löslicher Repressoren soll eine Region in der Nachbarregion eine gleichartige Differenzierung unmöglich machen.

b) *Ein Konzentrationsgefälle*, wobei das Differenzierungsmuster durch die Niveauewerte des Gradienten bestimmt wird. Nach LESH u. BURNETT (1966) und LENTZ (1965) ist in Homogenaten von Hydren eine Substanz zugegen, die heteropolare Regenerationen hervorruft. Sie wird als „polarisierender Faktor“ und als spezifischer Induktor interpretiert. LENTZ glaubt, ein neurosekretorisches Produkt angereichert zu haben. Nach diesen Autoren führt die gradientenhafte Verteilung dieses neurosekretorisch erzeugten polarisierenden Faktors zur polaren Gliederung der Differenzierung. Formal entspräche dieser Faktor dem apikalen Induktor im hier aufgestellten Modell. Nach LENIQUE u. LUNDBLAD (1966) wird bei *Clava* im Zuge der Regeneration eine zunächst erzeugte entwicklungsfördernde Substanz von Inhibitoren abgelöst. Die Symptome der vom Promotor ausgehenden Wirkung sind solche, die LESH u. BURNETT dem polarisierenden Faktor zusprechen. Die Inhibitoren werden wiederum als Histone angesprochen.

Methoden

1. Allgemeines Vorgehen

Zur Anreicherung und Abtrennung eventuell vorhandener Wirksubstanzen erschien nur die Säulenchromatographie erfolgversprechend. Da bei isolierten Polypen bald Degenerationserscheinungen auftreten, ist die verwertbare Materialmenge begrenzt. In angemessener Frist (14 Tage) können nicht mehr als ca. 10000 Nährpolypen und 5000 Geschlechtspolypen, entsprechend ca. 40–60 mg Trockengewicht, von den Stöcken isoliert werden. Bei dieser Aus-

gangsmenge kann nicht erwartet werden, daß biologische Wirksubstanzen in spektralphotometrisch erfaßbarer Menge zu gewinnen sind. Dementsprechend mußten zunächst alle, auch die photometrisch „leer“ erscheinenden Fraktionen am biologischen Substrat auf ihre Fähigkeit geprüft werden, Entwicklungsanomalien zu erzeugen. Da im Kontrollversuch stets auch spontane irreguläre Bildungen registriert werden, wurden zum Ausgleich der statistischen Streuung über 100 Individuen pro Fraktion eingesetzt. Für eine chromatographische Trennung waren demzufolge ca. 24000 Testtiere insgesamt zu präparieren und die Entwicklungscharakteristika jedes einzelnen Polypen über 8—12 Tage täglich zu registrieren (s. Biologischer Test). Vor jedem weiteren experimentellen Schritt mußten diese Verfahren wiederholt werden, wobei insofern eine Vereinfachung möglich war, als die spektralphotometrisch erfaßbaren Peaks als Marken zur Abgrenzung der relevanten, im Stichprobentest dann näher lokalisierten Fraktionsbereiche dienen konnten.

2. Methodische Details

Gewinnung der Extrakte

Die vom Stock isolierten, von Hydrorhizaren befreiten und nach Formtyp sortierten Polypen wurden mehrfach in sterilem Seewasser gewaschen, dann weitere 2mal mit auf 0° C gekühlter Extraktionslösung, wobei der Waschvorgang wegen der geringen Osmoresistenz des Gewebes durch Zentrifugieren beschleunigt werden mußte. Durch die hypotonische Lösung werden die reifen Cniden zur Explosion gebracht; damit wird ein Teil des Nesselgiftes entfernt. Die mit 4—6 ml frischer Extraktionslösung aufgenommenen Polypen wurden durch Beschallung homogenisiert (Branson-Sonifier S-75, Mikrospitze, powersetting 4, D.C. Amp. 4). Zur Vermeidung von Überhitzungen wurde die Aufbereitung in Intervallen vorgenommen, d.h. der Geweberei zwischenzeitlich eingefroren und durch kurze Ultraschallstöße jeweils knapp über den Gefrierpunkt gebracht. Der Rückstand des 30 min bei $22000 \times g$ und 4° C zentrifugierten Homogenats wurde zur späteren Extraktion mit lipophilen Solventien tiefgefroren, der Überstand getestet oder den Trennverfahren unterworfen. Als Extraktionslösung wurde, soweit nicht anders vermerkt, atoxischer 0,02 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 6,8, eingesetzt, dem 0,01 M Na-citrat zur Reduktion der proteolytischen Aktivität zugesetzt war.

Die organischen Lösungsmittelgemische mit Methanol, Äthanol, Aceton, Äther, Phenol, Chloroform und Na-dodecylsulfat als Komponenten lieferten keine Extrakte mit bemerkenswerter biologischer Aktivität. Auf eine Beschreibung des einschlägigen Versuchsprogramms wird deshalb verzichtet.

Säulenchromatographie

Die Auftrennung der Rohextrakte geschah im Ionenaustausch- oder Gelfiltrationsverfahren mit DEAE-Sephadex A-50 oder Sephadex G-25 als Trägermaterialien. Die zweiten Trennschritte wurden an G-75 (basische Proteine) oder an G-25 (T-Substanz) durchgeführt. Die G-75-Säule war zu 1×20 , die A-50- und G-25-Säule zu $2,5 \times 38$ bemessen. Die jeweils 2—6 Tage bei 0° C mit dem Eluierungsmittel äquilibrierten Gele wurden, sofern nicht eine Abschätzung des Molekulargewichtes Ziel des Versuches war, für jeden Trennvorgang neu eingefüllt. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde auf 12 ml/h, die Fraktionsgröße auf 2,5 ml eingestellt und die Trennung bei 0—4° C vorgenommen. Die mit Saccharose versetzten, zur Vermeidung einer Wirbelbildung auf 0° C vorgekühlten Extrakte wurden mittels einer Kapillare dem überstehenden Puffer unterschichtet.

Bei Sephadex A-50 als Trägermaterial kam der zur Extraktion verwendete Phosphatpuffer als Elutionsmittel zum Einsatz, wobei nach 10—12 Fraktionen ein linearer NaCl-Gradient angeschossen wurde (0,02 M Phosphat + 0,01 M NaCl \rightarrow 0,02 M Phosphat + 0,6 M NaCl). Beim Einsatz von Sephadex G-25 wurde mit 0,02 M Phosphat + 0,05 M NaCl, bei Verwendung von G-75 in Anbetracht der an diesem Träger chromatographierten basischen Proteine mit 0,02 N HCl eluiert.

Die Auftrennung wurde spektralphotometrisch bei 280, 260 und teilweise bei 220 nm verfolgt. Von jeder 10. Fraktion wurde ein Aliquot von 0,1 ml zur Messung des Gefrierpunktes entnommen. Die Meßpunkte dienten als Handhabe zur Einstellung des osmotischen

Wertes der Proben vor dem biologischen Test. Anschließend wurden alle Fraktionen bis zur weiteren Verwertung tiefgefroren. Eine solche Behandlung reduziert, sofern das Einfrieren im Aceton-CO₂-Gemisch rasch vorgenommen wird, die biologische Aktivität der hier analysierten Substanzen nicht in bemerkbarem Ausmaß.

Weiterverarbeitung der basischen Proteine

Die zum Peak V (Abb. 8) gehörenden, basische Proteine enthaltenden Fraktionen der A-50 Trennung wurden vereinigt, mit HCl bis 0,25 N angesäuert und mit gleichem Volumen einer gesättigten Reinecke-Salz-Lösung (NH₄⁺[Cr(SCN)₄(NH₃)₂]⁻) versetzt. Das Reinecke-Ion schlägt nach LINDH u. BRANTMARK (1965) basische Proteine quantitativ nieder. Der zentrifugierte Niederschlag wurde 2mal mit halbgesättigter Reinecke-Tris-Lösung pH 8,3 gewaschen; anschließend wurden das Reinecke-Ion mit eiskalter Acetonlösung (2,5 ml 0,25 N HCl in 200 ml Aceton) entfernt und die Proteine gefriergetrocknet. In 0,25 N HCl aufgenommen, wurden die Proteine entweder an Sephadex G-75 weiter fraktioniert oder im Acrylamid-Gel pH 4,3 analytisch aufgetrennt. Der in Tris-Glycin-Puffer pH 7,9 lösliche Anteil wurde im Acrylamid-Gel pH 8,2 elektrophoretisch aufgeschlüsselt.

Acrylamidgel-Disc-Elektrophorese

In Abwandlung der Canalco-Anleitung wurden u. a. folgende, empirisch ermittelte Modifikationen der Standardmethoden erprobt und als Verfahren zur Identifizierung basischer Proteine eingesetzt.

Da die elektropositiven Proteine im oberen Gel (stacking gel) nahezu quantitativ zurückgehalten werden, wird auf dieses Gel verzichtet und die mit Saccharose versetzte Probe von 0,4 ml direkt dem unteren Gel (separating gel) überschichtet.

a) *Elektrophorese bei pH 8,2 (±0,1)*. Die Komponenten des unteren Gels werden wie folgt gemischt: 1 p HCl-Tris-Temed Stammlösung pH 8,0 + 2 p Acrylamid-Bis Stammlösung + 4 p Ammoniumpersulfat-Katalysator (Stammlösungen nach Canalco). Elektrophorese-puffer: Tris 2 g/l, Glycin 16 g/l, mit Essigsäure auf pH 7,9—8,0 eingestellt. Die Stromstärke wird zur Vermeidung einer Wärmekonvektion zunächst schwach (2 h bei 2 mA/Röhrchen 5 × 60 mm) eingestellt, dann schrittweise erhöht (2 h bei 4 mA/Röhrchen; 5—6 h bei 6 mA/Röhrchen).

b) *Elektrophorese bei pH 4,3*. Zur Herstellung des Trenngels werden gemischt: 1 p KOH-Temed-Essigsäure-Lösung pH 4,3 + 2 p Acrylamid (60%)-Bis (0,4%) + 4 p 0,28% Ammoniumpersulfat. Die Elektrophorese erfolgt im β-Alanin-Essigsäure-Puffer pH 4,9 zunächst 2 h bei 2 mA und anschließend 3 h bei 4 mA/Röhrchen.

Bei jeder Analyse wurden 2 von 6 Röhrchen mit umgekehrter Polung eingespannt, um die Proben auch auf elektronegative Proteine zu prüfen. Hierzu wurde der bei 0° C im Vakuum konzentrierte Extrakt mit stacking gel aufgenommen und das Gemisch polymerisiert.

3. Biologischer Test

Zwei Gründe waren Anlaß, regenerierende Polypen als Testtiere einzusetzen: a) Differenzierung und Morphogenese vollziehen sich beschleunigt; b) Vor Abschluß der Wundheilung erscheinen die Polypen auch für Molekülgrößen permeabel, die ein intaktes Tier nicht mehr passieren läßt (TARDENT, 1963; BURNETT, 1962).

Das normale Testverfahren

Isolierte Nährpolypen wurden unterhalb des Tentakelkranzes amputiert; ebenso wurde der basale Endabschnitt entfernt. 120 so vorbereitete Mittelstücke wurden unmittelbar in die zu testende Lösung gebracht. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 12 h. Sofern es nötig schien, sie zu verlängern, wurden die Lösungen alle 12 h erneuert. Die zu prüfenden Extrakte und Fraktionen wurden 1:5 (bei hemmenden Proben 1:10—1:20) mit sterilem Seewasser verdünnt. Solche Konzentrationen sind wegen der geringen Osmoresistenz der Gewebe nur anwendbar, wenn der osmotische Wert der Proben durch Zugabe von NaCl auf den Wert des

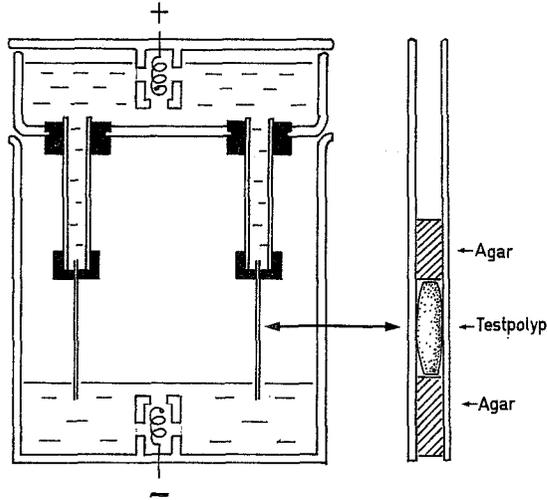


Abb. 1. Illustration zur Methode der elektrophoretischen Applikation elektropositiver Substanzen

Seewassers einjustiert wird. Bei Fraktionsserien gestattete die durch Gefrierpunktmessung gewonnene Kurve, die jeweils einzusetzende NaCl-Menge zu kalkulieren. Registriert wurden das erste Sichtbarwerden von Tentakelknospen als Maß der Regenerationsgeschwindigkeit, die Anzahl der pro Tag gebildeten Tentakel, der Anteil heteropolarer Regenerationen und alle sonstigen Anomalien.

Um Fehlinterpretationen zu entgehen, sind Kontrollen sorgfältig anzulegen: Die Polypen müssen nach Größe sortiert und gleichmäßig auf Test- und Kontrollproben verteilt werden. Genetisch inhomogene Gemische (Testpolypen von verschiedenen Klonen) müssen vermieden und von jedem verwendeten Stock Kontrollen angesetzt werden. Beim Test säulenchromatographischer Fraktionen wurden Aliquots aus dem Vor- und Nachlauf als Leerproben zur Bestimmung der Kontrollwerte benutzt. Die große Zahl der in diesen Versuchen zu prüfenden Proben machte es unumgänglich, daß von einer großen Zahl von Stöcken Testtiere entnommen werden mußten. Dabei wurden die Klone abwechselnd eingesetzt (z. B. für die Fraktionen 100, 104, 108, ... Tiere des Klones a, für die Proben 101, 105, 109, ... Polypen von Klon b u.s.f.) und die registrierten Werte der jeweils zugehörigen Kontrollgruppe (a, b, ...) gegenübergestellt.

Bei der Vielfalt möglicher Störfaktoren kann von einer Differenz in der Wirkung nur gesprochen werden, wenn im χ^2 -Test ein Signifikanzniveau von 1% und darunter erreicht wird.

Methode zur elektrophoretischen Applikation elektropositiver Substanzen

In Kapillaren (Microcaps mit 32 mm Länge und 5 μ l Inhalt) wird nacheinander erstarrtes Agargel (Reinagar, Behringwerke, 1,5% in Seewasser) ca. 2 mm hoch, der Testpolyp und nochmals Agar (4 mm hoch) eingesaugt. Dabei wird der Testpolyp (Nährpolypen-Mittelstück) in der Größe so gewählt, daß er, ohne gequetscht zu werden, von der Kapillarwand in senkrechter Lage gehalten wird. Die Röhrchen werden, das Apikalende der Polypen nach oben orientiert, mittels PVC-Adapter in die Disc-Elektrophorese-Apparatur eingespannt (Abb. 1). Der zu prüfende Extrakt wird mittels einer Kapillare über den oberen Agarpfropf geschichtet. Die Elektrophorese erfolgt mit Seewasser als „Puffer“ bei 1 mA/Kapillare ca. 4 h bei Zimmertemperatur. Die untere Elektrode wird als negativer, die obere als positiver Pol geschaltet, so daß basische Substanzen durch den oberen Gelpfropf hindurch auf den Testpolypen zugeleitet werden.

Resultate

1. Der „polarisierende“ Faktor

Hitzestabiler dialysierbarer Faktor

In Rohextrakten aller Polypentypen ist ein hitzestabiler, dialysierbarer Faktor zugegen, der den Anteil heteropolarer Regenerationen signifikant erhöht. Der Effekt tritt zutage, wenn die hitzeinstabilen toxischen Substanzen bei 100° C vor dem Test zerstört werden und die Extrakte innerhalb der ersten Regenerationsphase (0—6 h) appliziert werden. Insoweit können die von LESH u. BURNETT an Hydren gewonnenen Befunde für *Hydractinia* bestätigt werden. Dagegen konnte in keinem Versuch das Auftreten überzähliger Tentakel, d. i. eine über die statistische Streubreite gehende Erhöhung der Tentakelzahl oder die Entwicklung von Tentakeln außerhalb des Tentakelkranzes, festgestellt werden, und der Regenerationsprozeß setzte verzögert ein. Werden die Mittelwerte der Tentakelzahlen gegen die Zeit aufgetragen, so verlaufen alle Kurven nahezu parallel, sind jedoch phasenverschoben. In der Versuchsgruppe setzen sichtbare Differenzierungsleistungen später ein, vollziehen sich dann aber nur unwesentlich langsamer als in der Kontrollgruppe (Abb. 2). Entgegen der Erwartung ließen sich aus allen Geweben wirksame Extrakte herstellen, auch aus der Stolonenplatte. Die in Tabelle 1 wiedergegebenen Werte resultieren aus Versuchen, bei denen die Extrakte durch Verdünnung auf gleichen Proteingehalt (nach Folinreaktion ca. 20 µg/ml) eingestellt worden waren, ein Vorgehen, das freilich keine zuverlässigen Aussagen über quantitative Unterschiede zuläßt, weil Verdauungsenzyme in hohem Maße in diese Werte eingehen.

Tabelle 1. Vergleich der Wirksamkeit von Extrakten verschiedener Herkunft bezüglich ihrer Fähigkeit, inverspolare Regenerationen hervorzurufen. Ein Vergleich ist möglich an Hand der Werte % V/% K (Verhältnis der Prozentuale inverser Bildungen in Kontroll- und Versuchsansätzen). Die Extrakte wurden auf einen Proteingehalt von ca. 20 µg pro ml eingestellt. Beachte: Der in der Proboscis enthaltene Faktor ist thermolabil

Extrakt von	Summe der Testtiere		Invers		% V/% K	Signifikanz χ^2
	Kontrolle	Versuch	Kontrolle (%)	Versuch (%)		
1. Blastostyle ganz, 100° C	118	101	11	42	3,82	25,1
2. Nährpolypen ganz, 100° C	108	106	3,6	36	10,0	33,0
3. Peristome (AB), 100° C	108	114	3,6	28,5	7,92	10,8
4. Rumpf (DE), 100° C	108	104	3,6	14,5	3,61	7,21
5. Hydorrhiza, 100° C	134	122	12	26	2,18	7,64
6. Proboscis, 0° C	112	122	25	63	3,92	26,23
7. Proboscis, 100° C	112	110	25	24,5	0,00	—

Eine Knospenbildung induzierten die Extrakte nicht. Auf Deckgläsern angezüchtete, für 12—24 h in die Lösung gebrachte Kulturen ließen weder eine generelle Erhöhung der Knospungsrate erkennen, noch entwickelten sich an jenen Stellen der Hydorrhiza, die mehrfach durch Verletzungen zur Wundheilung angelegt worden waren, neue Polypen.

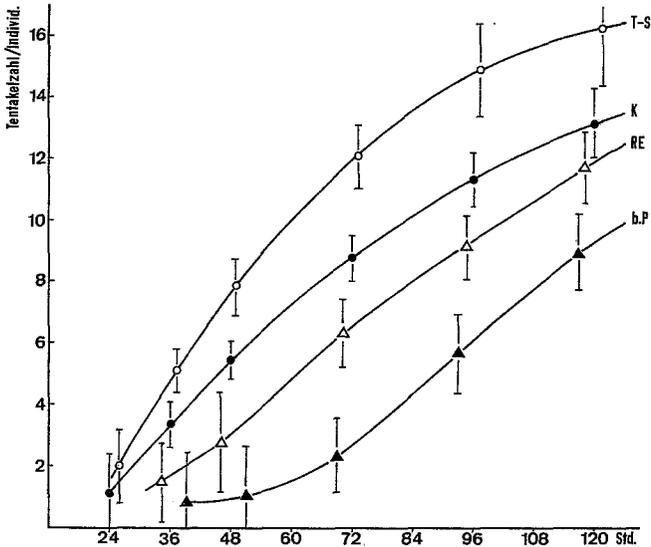


Abb. 2. Regenerationsgeschwindigkeit nach Applikation verschiedener Extrakte. *K* Kontrolle; *RE* Nährpolypen-Rohextrakt (auf 100° C erhitzt), Endkonzentration: $E_{280\text{ nm}} = 0,2$; *T-S* tentakelinduzierende Substanz = Fraktion 102 der zweiten chromatographischen Trennung (vgl. Abb. 9), Endkonzentration: $E_{260\text{ nm}} = 0,01$; *b.P.* basische Proteine = Fraktion 116 der ersten chromatographischen Trennung (vgl. Abb. 8), Endkonzentration: $E_{280\text{ nm}} = 0,01$

Hitzestabile Nesselgifte

Der Verdacht, daß hitzestabile Nesselgifte an der Auslösung der Hetermorphosen beteiligt sein könnten, machte einschlägige Kontrollversuche notwendig. Voraussetzung solcher Versuche ist, daß Nesselgifte in reiner Form zur Verfügung stehen. Die Reindarstellung erwies sich als einfach: Auf Elektrophoresepapier werden pro Streifen (4×10 cm) 500—800 Nährpolypen aufpipettiert; das überschüssige Wasser wird abgesogen und an die Streifen ein Wechselstrom von $3,3 \text{ V/cm}^2$ für 20 sec angeschlossen. Ohne geschädigt zu werden, entladen die Polypen ihre Cniden. Das freigewordene Nesselgift wird mit Seewasser (20 ml pro Streifen) abgeschwemmt, der Lösung 4 Aliquote entnommen und in einer linearen Verdünnungsreihe (1:1—1:4) zum Test angesetzt; 4 weitere, ebenso verdünnte Aliquote werden vor dem Test 6 min auf 100° C erhitzt.

Die Resultate (Tabelle 2) belegen, daß eine im Nesselgift enthaltene Komponente Hetermorphosen auslösen kann. Das Agens verliert bei 100° C zwar an Wirksamkeit, wird aber nicht völlig zerstört. In der unerhitzten Lösung wird der Auslöseeffekt bei hoher Dosis von der generellen Toxizität überlagert. Die Polypen kommen, wenn überhaupt, erst 2—4 Tage nach Behandlungsende zur Regeneration, und diese Verzögerung dürfte die Abnahme der Werte bedingen. Neben Hetermorphosen traten als irreguläre Bildungen Tentakulozoid-ähnliche Strukturen auf: Polypen mit dünn ausgezogenem, sich in einem langen Tentakel fortsetzendem Apikalende. Nesselgifte von *Tubularia* und *Calliactis* haben gleiche Effekte.

Tabelle 2. Erhöhung des Prozentsatzes inverser Regenerationen nach Applikation isolierter Nesselgifte. Die Wirksamkeit der Lösungen geht nach Erhitzen zurück, bleibt aber bei hoher Konzentration (1:1) nachweisbar (rechte Spalte)

Nesselgift von	Kontrolle		Nesselgift 20° C			Nesselgift 100° C		
	Summe	Invers (%)	Summe	Invers (%)	Signif. χ^2	Summe	Invers (%)	Signif. χ^2
Hydractinia	110	9,1						
1:4			98	20,2	4,50	118	8,4	—
1:3			104	29,8	17,97	125	8,0	—
1:2			91	11,0	—	112	14,5	—
1:1			63	7,8	—	109	22,0	6,02
Calliactis	116	0,0	109	7,3	6,81			
Tubularia	102	6,9	122	17,2	4,536			

Andere Faktoren

Gleichwohl muß als sicher gelten, daß Gewebsextrakte noch andere, gleichsinnig wirkende Faktoren enthalten. Auch Extrakte von isolierten Mundkegeln, die keine Cniden enthalten, erhöhen den Prozentsatz heteropolarer Regenerationen (Tabelle 1). Das wirksame Agens ist hier thermolabil und ist demzufolge nur faßbar, wenn unter Kühlung homogenisiert wird. Die ausgelösten Symptome freilich waren die gleichen, die auch nach Applikation der übrigen Extrakte zu beobachten waren, und es traten wiederum keine überzähligen Tentakel auf. Dieser Umstand war neben der Schwierigkeit, Mundkegel in größerer Menge zu gewinnen, Anlaß, keine chromatographischen Trennungen mit dem besonderen Ziel einer Isolierung dieser Substanz zu versuchen. Wie zu diskutieren sein wird, erlaubt das Testsystem nicht, von gleichsinniger Wirkung auf identische Substanzen oder gleichartige Wirkungsmechanismen zu schließen. Ebenso wenig können spezifische von unspezifischen Effekten getrennt werden. Von einer spezifischen Induktionswirkung kann zweifelsfrei nur dann gesprochen werden, wenn der Nachweis gelingt, daß der Extrakt wie das Transplantat in der *Hydrorhiza* eine Knospenbildung auslösen kann. Ein solcher Nachweis war nicht möglich.

2. Basische Proteine

Die Säulenchromatographie an Sephadex A-50 liefert eine Fraktion (Peak V in Abb. 3), die als Komponenten Substanzen mit stark entwicklungsstörender Wirkung enthält. Die Symptome der Störung sind dosisabhängig. In der Dosierungsreihe (Extinktion der Endkonzentrationen 0,01, 0,05, 0,1, 0,2 bei 280 nm) traten mit steigender Konzentration als Effekte auf: Verzögerung der Regeneration, reversibler Regenerationsblock und Entwicklung irregulärer Formen wie vielköpfiger Monster nach Inkubationsende, irreversibler Regenerationsblock, histolytischer Zerfall. Mit diesen Effekten war stets eine bemerkenswerte Nebenwirkung korreliert: Die Testpolypen reagieren mit Freßbewegungen und während der ganzen Inkubationszeit anhaltender Kontraktion. Bei isolierten Mittelregionen kommt es dabei häufig zu einer Umstülpung (Ekto-Entoderm-Inversion).

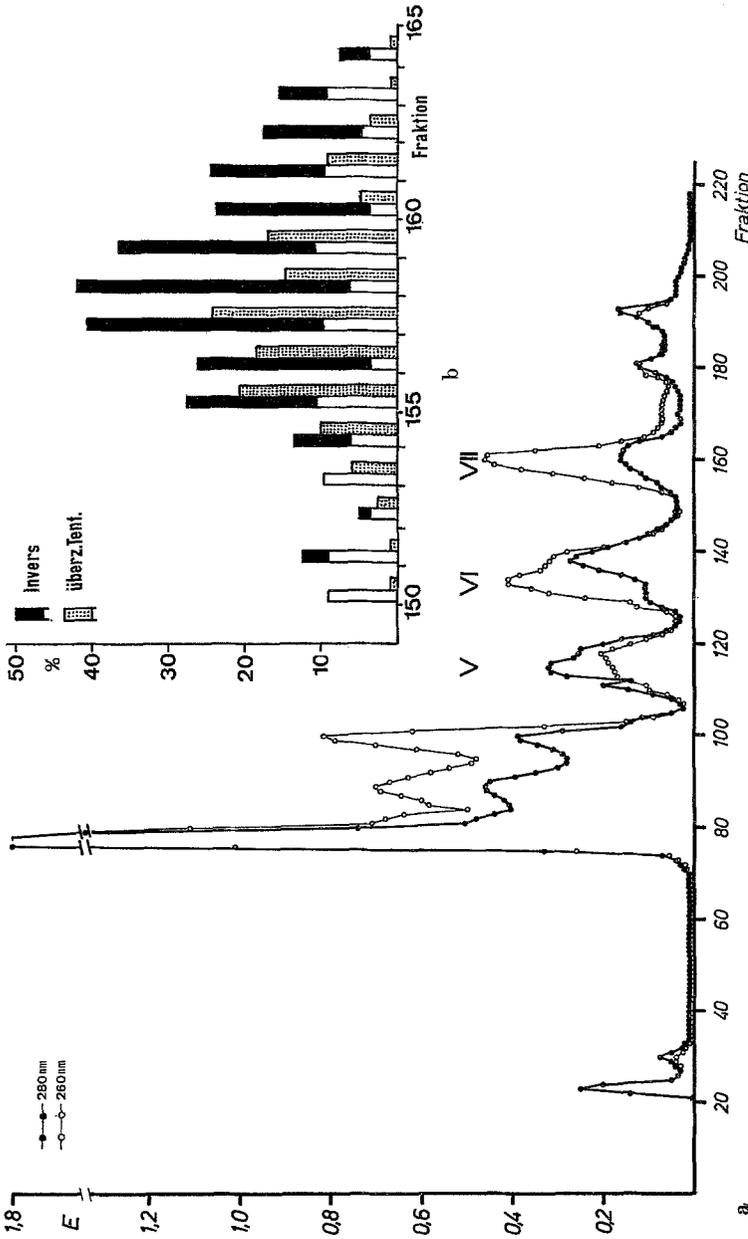


Abb. 3. a. Auftrennung eines Nährpolypen-Extraktes an DEAE-Sephadex A-60 unter Gradientenelution (vgl. „Methoden“). Gipfel V = basische Proteine enthaltender Fraktionsbereich; Gipfel VI bis VII = Bereich mit den im Diagramm (Abb. 3b) dargestellten biologischen Wirkungen. In diesem Diagramm bedeuten „Invers“ (schwarze Balken) = bipolare Regenerationen mit inversen Peristombildungen, „überz. Tent.“ (graue Balken) = Prozentual der Polypen mit mindestens zwei Tentakeln außerhalb des Tentakelkranzes. (Eine bloße Erhöhung der Tentakelzahl über das Kontrollniveau kam nicht in die Wertung.) Die Gesamthöhe der Balken gibt das in den Testproben registrierte Prozentual an, der weiße Abschnitt den Anteil, der dem jeweils zugehörigen Kontrollwert entspricht. Die Invers-Werte sind im Bereich von Fraktion Nr. 155—163, die Prozentuale überzähliger Tentakelbildungen im Bereich von Nr. 153—161 signifikant. (χ^2 -Test, 1% Überschreitungswahrscheinlichkeit)

Dieser kontraktionsauslösende Effekt konnte bei der Wiederholung der chromatographischen Trennung zur raschen Identifikation der Fraktion genutzt werden.

Chemische Analyse

Die inhibitorischen Komponenten der zum Peak V gehörenden Fraktionen sind basische Proteine. Die Peptidnatur wurde zunächst enzymatisch nachgewiesen: Nach Zugabe von 1 mg Trypsin pro ml auf $E(280) = 0,1$ eingestellter Lösung, einer Inkubationszeit von 2 h bei 36°C und anschließender Zugabe von 2 mg/ml Trypsininhibitor verschwand die Wirkung. Kontrollprobe: Ein Aliquot der Fraktion plus Trypsin-Inhibitor-Gemisch. Die Farbreaktion nach BLOCH u. GODMAN (1955) und die diselektrophoretische Analyse erbrachten den Nachweis, daß die Fraktion basische Proteine enthält. Um die vermutete Zuordnung der biologischen Wirkung auf den Gehalt an basischen Substanzen zu sichern, mußten weitere Trennschritte angeschlossen werden.

Die Aufarbeitung bereitete zunächst Schwierigkeiten, weil Gipfel V nicht regelmäßig im Eluat der 1. Trennung auftrat. Die Fehlerquelle lag in der schwankenden Salinität des Homogenats. Mit steigender Salinität gehen, bei konstantem pH 6,8, zunehmend mehr basische Proteine in Lösung. Bei einer Salinität entsprechend 0,06 M NaCl waren im Acrylamidgel pH 4,3 zwei bis vier, im Gel pH 8,2 null bis drei elektropositive Proteine nachweisbar. Nach Extraktion mit 0,56 M NaCl (+ 0,02 M Phosphat + 0,01 M Citrat) traten im pH 4,3 Gel zwölf, im pH 8,2 Gel acht Proteinbande auf. Entsprechend wurde für die weiteren Versuche die Salinität auf 0,56 M NaCl, den Wert des Seewassers, eingestellt.

Die Isolierung der in Peak V enthaltenen elektropositiven Substanzen geschah, wie in „Methoden“ näher erläutert, durch Präzipitation als Reinecke-Komplex. Die aus dem Niederschlag gewonnenen, gefriergetrockneten und in Seewasser aufgenommenen Proteine lösen im biologischen Test dieselben Symptome aus wie die Gesamtfraktion.

Die Gelfiltration an Sephadex G-75 trennte die Substanzen in drei Gruppen auf, wobei Peak I nur in schwacher Andeutung erschien und Peak III vermutlich in mehrere Unterfraktionen gegliedert ist. Vor der Applikation im biologischen Test wurden die Proben zur Entfernung des als Elutionsmittel eingesetzten HCl erneut gefriergetrocknet. Bedingt durch Verluste war der inhibitorische Effekt der Testlösungen zu gering, als daß eventuelle qualitative Unterschiede zwischen den Gruppen deutlich geworden wären.

Zur Frage der Spezifität des Hemmeffektes

Mittels der mikroelektrophoretischen Testmethode (Biologischer Test, S. 362) sollte geprüft werden, ob dem inhibitorischen Effekt der basischen Proteine innerhalb des morphogenetischen Regulationssystems überhaupt Relevanz zukommt. Eine einschlägige Hypothese wäre begründbar, wenn die basischen Proteine aus den verschiedenen Körperregionen qualitativ unterschiedliche Wirkungen entfalteten. Ebenso könnte ein räumliches und zeitliches Muster im Auftreten der Substanzen während des Regenerationsverlaufes als Indiz einer spezifischen Funktion gewertet werden.

Dementsprechend wurden Extrakte hergestellt aus Peristomen (ohne Tentakeln), aus Mittelzonen und aus der Hydrorhiza; ferner aus abgetrennten Apikalabschnitten regenerierender Polypen in verschiedenen Phasen des Regenerationsprozesses (0—6, 6—12, 12—24 h nach der Amputation des Peristoms). Die Abtrennung und gleichzeitige Applikation der elektropositiven Substanzen geschah elektrophoretisch in der Kapillare. Dieses sich an der Methode von ROSE (1966) orientierende Verfahren wurde entwickelt, weil im Zeitraum von 6 h nur sehr geringe Materialmengen zu gewinnen sind und eine säulenchromatographische Trennung nicht sinnvoll erschien. Als Testmaterial kamen wiederum Mittelregionen von Nährpolypen zum Einsatz, und zwar 0, 6, 12 h nach ihrer Isolierung. Die Kontrolltiere wurden in gleicher Weise in die Kapillaren eingesogen und dem elektrischen Feld ausgesetzt.

Resultate. In allen Extrakten sind ungeachtet ihrer Herkunft regenerationshemmende, elektropositive Substanzen nachweisbar. Ein quantitativer Vergleich der Wirksamkeit ist nicht möglich, weil eine konstante Durchlässigkeit der Agar-gele nicht sichergestellt ist und die Zahl eingesetzter Tiere (20—30 pro Versuch) eine statistische Signifikanzberechnung nicht zuläßt. Entwicklungsstörungen, wie irreguläre Anordnung der Tentakel oder Verdoppelung der Peristome, traten allenthalben auf. Eine Korrelation zwischen dem Erscheinen solcher Anomalien und der Herkunft des Extraktes war nicht gegeben. Deutlich war nur ein Absinken der Empfindlichkeit des Testmaterials im fortgeschrittenen Regenerationszustand, ein Befund, der unschwer auf die fallende Permeabilität des Gewebes zurückgeführt werden könnte.

3. Die tentakelinduzierende Substanz

In der Fraktionsserie des ersten Sephadex-A-50-Eluates (Abb. 3) war im Anstiegsbereich des Gipfels VII ein Faktor zu finden, der zunächst völlig dem polarisierenden Faktor der amerikanischen Autoren zu entsprechen schien. Testproben aus diesem Fraktionsbereich lösten Heteromorphosen aus und induzierten gleichzeitig — im Gegensatz zum erhitzten Rohextrakt, aber gleichartig wie erhitzte Hydren-Homogenate — die Entwicklung überzähliger Tentakel (Abb. 5). Freilich war mit diesem Effekt auch eine Verzögerung des Regenerationsbeginns verbunden (Abb. 2).

Die Position der Wirkkurve in der Fraktionsserie verschob sich bisweilen in Richtung des Gipfels VI, ohne daß sich diese Verschiebung in einer Änderung der 280- und 260 nm-Kurve geäußert hätte. Geschah dies, so blieb in den kleineren Fraktionsnummern der „polarisierende“ Effekt aus, und es traten zwar irreguläre Tentakel, aber keine heteropolaren Peristome auf. Nach der weiteren Aufgliederung des Fraktionsbereiches VI—VII an Sephadex G-25 (Abb. 4) trat der tentakelinduzierende Effekt (T-Effekt) für sich allein zutage. Es trennte sich jene in Peak VII enthaltene Komponente ab, die zur Regenerationsverzögerung führt. Das Maximum des hemmenden Effektes liegt in Abb. 4 bei Fraktion 95, das Maximum des T-Effektes in der photometrisch nahezu „leeren“ Fraktion 101. Beide Kurven überlappen sich zwar, decken sich aber nicht. Im Bereich 101—104 ist der T-Effekt nicht mit einer Regenerationsverzögerung gekoppelt.

Die Symptome der T-Substanz sind: Steigerung der Tentakelzahl über das Normalmaß und, damit verbunden, Verbreiterung der im Regelfall als enger Ring ausgebildeten Tentakelzone; Auftreten vereinzelter Tentakel in allen Bereichen des Rumpfes, insbesondere am Basalende. Mitunter sprossen ganze Tentakelbüschel hervor, ohne daß sich ein Mundkegel einschieben würde. Die irregulären

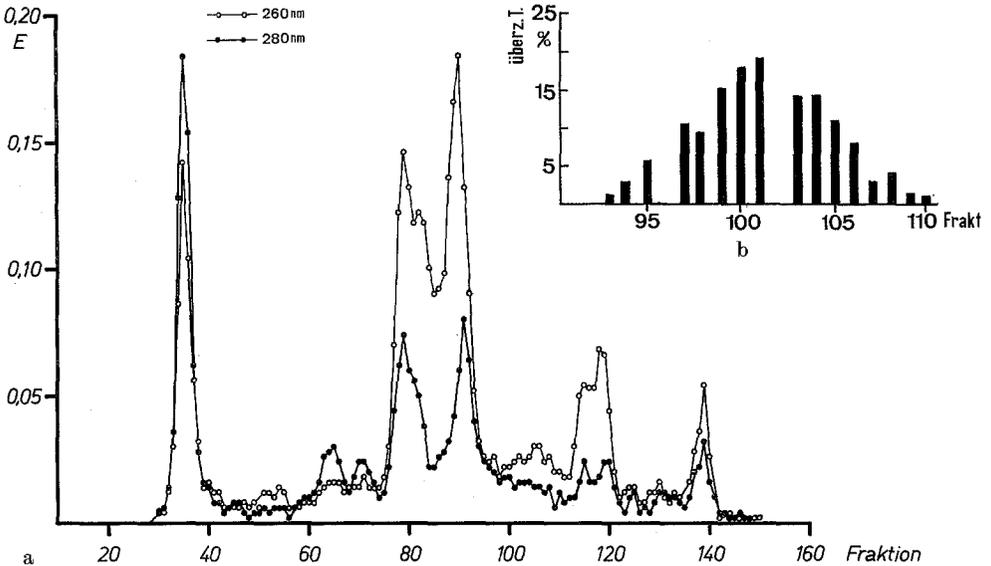


Abb. 4. a Auftrennung des Fraktionsbereiches Nr. 137—167 aus einer A-50-Trennung (vgl. Abb. 8) an Sephadex G-25 zur Reinigung der Tentakel-induzierenden Substanz. Im Diagramm Abb. 4b: die im Fraktionsbereich Nr. 94—110 des G-25-Eluats registrierten Prozentsätze von Polypen mit überzähligen Tentakeln (Kontrollwerte: unter 1%). Eine Erhöhung der Inversrate war hier nicht zu beobachten

Tentakel werden meistens später wieder resorbiert. Ein polarisierender Faktor war im Eluat der 2. chromatographischen Trennung nicht mehr nachzuweisen. Bei 5facher Wiederholung des ganzen Aufarbeitungsprozesses blieb der Anteil heteromorpher Regenerationen stets im Streubereich der Kontrollen. In Hinblick auf die Möglichkeit, daß infolge Materialverlustes die Konzentration der T-Substanz zur Auslösung von Mundkegeln nicht mehr ausreichend gewesen sein könnte, wurden zwei G-25-Säulen unmittelbar mit Rohextrakten beschickt. Hier war in einem Fall der T-Effekt wieder mit einer Erhöhung inverser Peristombildungen verknüpft (Maximum 17% gegenüber 9% in der Kontrollprobe; $\chi^2 = 4,708$).

Chemische Analyse

Die T-Substanz wird durch Trypsin zerstört (Versuch analog S. 367). Das UV-Spektrum der allerdings noch unreinen Fraktion 102 weist ein Maximum bei 257 nm (in Phosphatpuffer, pH 6,8) auf und steigt gegen 220 nm erneut an. Abgeschätzt nach der Retention an Sephadex G-25 mit Insulin und zwei Peptiden als Vergleichssubstanzen, liegt das Molekulargewicht in der Größenordnung von 1800 (± 600). Diese MG-Bestimmung ist freilich mit einer großen Unsicherheit behaftet; denn das Elutionsvolumen (V_e) für die T-Substanz und die Vergleichspeptide war größer als das Säulenvolumen ($V_i + V_0$), ein Hinweis darauf, daß eine unkalkulierbare Wechselwirkung zwischen dem Dextrangel und den Substanzen statthat. Die Vergleichspeptide sind: L-Glutathion (ox.) und 4-Phenylazobenzyl-oxycarbonyl-L-prolyl-L-leucyl-glycyl-L-prolyl-D-arginin (Serva). Disclektrophoretisch ist in diesem MG-Bereich naturgemäß auch im 33%-Gel keine Bande mehr erhältlich.

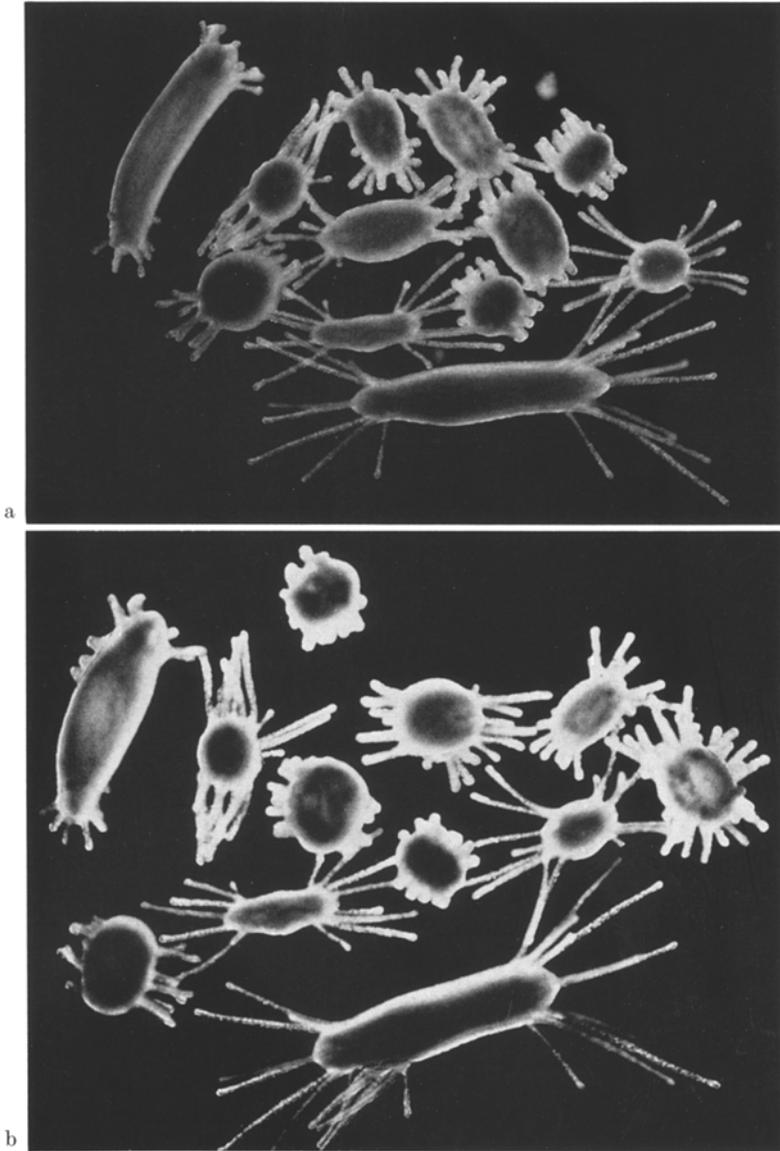


Abb. 5a u. b. Biologische Wirkung des an Sephadex A-50 aufgetrennten Nährpolypen-extraktes im Fraktionsbereich VI—VII (Bereich um Fraktion Nr. 155). Als Symptome erscheinen inverspolare Peristome und überzählige Tentakel am Rumpf. a 2 Tage, b 3 Tage nach Inkubationsende

Basale Induktion

Eine lösliche Substanz mit der Fähigkeit, die Entwicklung basaler Strukturen auszulösen, d.i. die stabile Blockierung aufzuheben, ließ sich trotz vielfältig modifizierter Extraktions- und Testverfahren nicht nachweisen. Beim Versuch, die Natur des induktiven Signals zu klären, sieht man sich auf einen Beobachtungs-

tatbestand aus der biologischen Analyse verwiesen: Das Wirkungsfeld des apikalen Induktors strahlt vom Implantat über die Verwachsungsgrenze in das Wirtsgewebe aus (MÜLLER, 1964, S. 225). Das induzierende Agens kann als diffusible Substanz interpretiert werden. Anders bei der basalen Induktion: Das Wirkungsfeld ist auf die unmittelbare Kontaktfläche Implantat-Wirtsgewebe beschränkt. Ein Implantat von wenigen Zellen Inhalt löst als Zweitbildung keinen normal dimensionierten Rumpf, sondern nur einen dünnen Gewebeschlauch aus. Es kann deshalb im Sinne einer Arbeitshypothese unterstellt werden, daß die basale Induktion von der physikalisch-chemischen Beschaffenheit der Zellwände ausgeht.

Diese Annahme wird durch folgenden Versuch gestützt. Aus der Stolonenplatte von Wildstöcken werden Peridermstacheln mitsamt aufliegender Gewebe isoliert, gefriergetrocknet, 5 min mit Chloroform und 4—6 h in Salzlösung (0,56 M NaCl) ausgewaschen. Die Gefriertrocknung soll einerseits elektrische Membranpotentiale als mögliche Induktionsreize ausschalten, andererseits die Oberflächenstrukturen im nativen Zustand erhalten. Das lipophile Solvens soll die Permeabilitätschranke für lösliche Stoffe des Zellinhalts aufheben. Das so vorbereitete Hydro-rhizamaterial wird unterhalb des Tentakelkranzes von Nährpolypen implantiert (Kombination C + F). Zur Vermeidung eventueller Unverträglichkeitsreaktionen sind Implantate und Wirtspolypen vom selben Stock zu wählen.

Resultat. Die basale Induktion ist nicht an den lebenden Zustand des Implantates gebunden. In der beschriebenen Art abgetötetes und ausgewaschenes Stolonenplattengewebe kann Zweitbildungen auslösen, sofern das Implantat nicht abgestoßen, sondern unwachsen wird und mehrere Tage in Kontakt mit dem Wirtsgewebe steht. Das war freilich nur in 5 von 420 Versuchen der Fall.

Diskussion

1. Die der chemischen Analyse vorangestellte Frage nach der Natur der induktiven Signale kann teilweise als beantwortet gelten. Die chemisch wahrscheinlich als Polypeptid anzusprechende Substanz mit tentakelinduzierender Wirkung ist Teilglied des apikalen Induktionssystems. Ob dieser Substanz bei der Auslösung weiterer Apikalstrukturen eine Bedeutung zukommt, erscheint in Hinblick auf die in der Entwicklungsphysiologie oftmals postulierten Konzentrationsgradienten einer eingehenden Diskussion wert. Geht man vom Transplantationsexperiment aus, so wird man auch hier einem solchen Gradienten als Erklärungshypothese den Vorzug geben, denn die Struktur der induzierten Zweitbildung wird vom Höhengniveau der Implantationsstelle bestimmt, und man kann keine Diskontinuitäten beobachten, die auf eine Induktionsfolge schließen ließen. In den Ergebnissen der chemischen Untersuchung kann man durchaus eine Stütze für solche Anschauungen sehen: Nach der Ionenaustausch-Chromatographie an Sephadex A-50 war, wie man argumentieren kann, die Konzentration der T-Substanz noch ausreichend, neben überzähligen Tentakeln auch Mundkegel zu induzieren. Nach der weiteren Gelfiltration an G-25 genügte die Dosis, bedingt durch Materialverlust, nur noch zur Induktion irregulärer Tentakel. Ebensogut erlauben die Ergebnisse eine andere Deutung: Die heteropolaren Peristombildungen können durch eine von der T-Substanz verschiedene, bei der 2. Trennung ausfiltrierte

Komponente des Extraktes hervorgerufen worden sein. Die T-Substanz würde demzufolge nur eine Tentakelbildung auslösen. Für die Existenz einer Induktionskaskade (\rightarrow Mundkegel \rightarrow Tentakelkranz) mag auch sprechen, daß im Mundkegel-Extrakt ein thermolabiler Faktor nachweisbar ist, der Peristom-, nicht aber Tentakelbildungen hervorruft.

Analyse und Deutung werden dadurch erschwert, daß das Testsystem von vornherein keine eindeutige Identifizierung einer peristominduzierenden Substanz zuläßt. Nach Maßgabe der Regenerationsversuche kann bei isolierten Mittelregionen die Entwicklung heteropolarer Peristome auch auf unspezifische Weise in Gang gesetzt werden. Es ist zu erwarten, daß Hemmsubstanzen, die mit dem Dominanzsystem interferieren, zu erscheinungsbildlich gleichen Reaktionen führen wie die originäre Determinationssubstanz. Das apikale Blastem wird für hemmende Einflüsse empfänglicher sein als der basale Wundbezirk; denn im apikalen Blastem setzt die metabolische Aktivität schon ein, solange die Permeabilität des Gewebes als Folge des Amputationstraumas noch erhöht ist. Es erfährt eine Retardation und kann seine Dominanzstellung nicht rechtzeitig zur Geltung bringen. In analogem Sinne hat WEBSTER (1967) die Wirkweise von Colcemid erklärt, das bei Hydren Heteromorphosen auszulösen vermag. (Bei *Hydractinia* erhöhen Colcemid-Dosen unter der Schwelle einer histolytischen Wirksamkeit die Rate heteropolarer Regenerationen nicht.) Es liegt nahe, die „induzierende“ Wirkung der Nesselgifte ebenfalls in diesem Sinne zu interpretieren. Freilich bleibt auch ein solcher Effekt von Interesse, weil keineswegs alle regenerationshemmenden Substanzen Heteromorphosen auslösen, z.B. nicht die hier geprüften basischen Proteine.

Der „polarisierende“ Effekt ist demzufolge zweideutig. Auf die Amputation des Peristoms kann andererseits kaum verzichtet werden, weil das Peristom durch seine Dominanzwirkung der nachzuweisenden Induktionssubstanz entgegenarbeiten würde.

Ein Indiz für das Vorliegen eines spezifischen Induktionseffektes wäre allerdings gegeben, wenn der geprüfte Extrakt die Regenerationsprozesse beschleunigen würde. Die Anzahl der pro Tag entwickelten Tentakel kann nicht als adäquates Maß für die Regenerationsgeschwindigkeit gewertet werden, wenn gleichzeitig von einer Induktion überzähliger Tentakel gesprochen wird (LESH u. BURNETT, 1966). Nur die Latenzzeit (im Kollektiv als T_{50}) bis zum Erscheinen der ersten Tentakelknospen erscheint zum Vergleich geeignet. Wird diese Zeit als Maßstab genommen, läßt sich bei *Hydractinia*-Extrakten keine signifikante Beschleunigung feststellen. Ebenso konnte weder hier noch bei jenen Untersuchungen, die Hydren zum Gegenstand haben, eine Knospeninduktion registriert werden. Es kann deshalb in keinem Fall von einem überzeugenden biochemischen Nachweis einer polarisierenden Substanz gesprochen werden. Bei der Annahme eines Konzentrationsgradienten sieht man sich demzufolge weiterhin allein auf die Befunde der Transplantationsexperimente verwiesen. Ebenso wie bei anderen tierischen Organismen (vgl. Diskussion zu STUMPF, 1967) hat auch bei Hydroiden der Versuch, Gefälle diffusibler Wirksubstanzen chemisch nachzuweisen, noch keinen überzeugenden Nachweis bringen können. „Gradienten“ bleiben somit vorerst deskriptive Begriffe, dazu geeignet, von qualitativen Unterschieden zugunsten eines beobachtbaren Richtungsgefüges abzusehen.

2. Die basalen Induktionssignale dürften durch Oberflächenstrukturen der Zellmembran repräsentiert werden. Wenn auch die Behandlung des gefriergetrockneten Materials mit Chloroform und 0,56 M NaCl keine vollständige Extraktion sicherstellt, so erscheint diese Annahme doch gerechtfertigt, um so mehr, als der Induktionseffekt nur bei anhaltendem Kontakt von induzierendem und reagierendem Gewebe in Erscheinung tritt. Ein Gegenargument ergibt sich allerdings aus dem Befund von MÜLLER (1967), wonach wandernde I-Zellen nekrotische Zellen ersetzen können. Ins tote Gewebe eingedrungene I-Zellen könnten zur Neubelebung des Gewebes geführt haben. In diesem Fall wäre die Frage nach der Natur des induzierenden Agens neu zu beantworten.

3. Aussagen über die molekularen Komponenten der Systeme, die eine Differenzierungspotenz unterdrücken (Dominanzsystem, Repressionsmechanismen), sind trotz des biochemischen Nachweises entwicklungshemmender Substanzen nicht begründbar. Formal ließen sich die basischen Proteine zwar entsprechend den Auffassungen von ROSE (1966) und LENIQUE u. LUNDBLAD als Repressoren der Genaktivität deuten. Doch stehen einer solchen Deutung schwerwiegende Argumente entgegen:

a) In Zweifel steht, ob den extrahierten Substanzen überhaupt eine regulatorische Funktion zukommt. Der generell ohnedies nicht leicht zu erbringende Nachweis wird bei *Hydractinia* noch dadurch erschwert, daß deutlich ausgeprägte Regenerationsstadien fehlen. Eventuell gegebene räumliche oder zeitliche Muster im Auftreten der basischen Substanzen sind ebenso schwer zu fassen wie Sensibilitätsphasen.

b) Bislang konnte noch nie einem basischen Protein eine Repressorfunktion schlüssig zugeordnet werden. Die Substanzen gar ohne weiteren Nachweis als Histone anzusprechen, verbietet sich, weil die Extraktionsmethoden bei allen einschlägigen Untersuchungen allenfalls die Ablösung der schwach gebundenen hydrophilen Histonkomponenten erwarten läßt und der überwiegende Teil löslicher basischer Proteine ohnedies nicht den Histonen zugehört.

Literatur

- AKIN, G. C., and J. R. AKIN: The effect of trypsin on regeneration inhibitors in *Tubularia*. Biol. Bull. **133**, 82—89 (1967).
- BARTH, L. G.: The effect of constant electric current on the regeneration of certain hydroids. Physiol. Zool. **7**, 340—364 (1934).
- The process of regeneration in hydroids. Biol. Rev. **15**, 405—420 (1940).
- BLOCH, D. P., and G. C. GODMAN: A microphotometric study of the syntheses of desoxyribonucleic acid and nuclear histone. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 17—28 (1955).
- BURNETT, A. L.: The growth process in hydra. J. exp. Zool. **146**, 21—84 (1961).
- The maintenance of form in *Hydra*. In: Regeneration. 20th Growth Symposium (D. RUDNICK, ed.), p. 27—52. New York: The Ronald Press 1962.
- A model of growth and cell differentiation in *Hydra*. Amer. Naturalist **100**, 165—190 (1966).
- W. SINDELAR, and N. DIEHL: An examination of polymorphism in the hydroid *Hydractinia echinata*. J. mar. biol. Ass. U.K. **47**, 645—658 (1967).
- CAMPBELL, R. D.: Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. II. Patterns of tissue movement. J. Morph. **121**, 19—28 (1967).
- Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. III. Behavior of specific cell types during tissue movement. J. exp. Zool. **164**, 379—392 (1967).
- Cell proliferation and morphological patterns in the hydroids *Tubularia* and *Hydractinia*. J. Embryol. exp. Morph. **17**, 607—616 (1967).

- CHILD, C. M., and L. H. HYMAN: Axial gradients in the hydrozoa. *Biol. Bull.* **36**, 183—221 (1919).
- KÜHN, A.: Vorlesungen über Entwicklungsphysiologie, 2. Aufl. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965.
- LENIQUE, P. M., and M. LUNDBLAD: Promotors and inhibitors of development during regeneration of the hypostome and tentacles of *Clava squamata*. *Acta zool.* **47**, 185—195 (1966).
- LENTZ, TH. L.: Induction of supernumary heads by isolated neurosecretory granules. *Science* **150**, 633—635 (1965).
- LESH, G. H., and A. L. BURNETT: An analysis of the chemical control of polarized form in hydra. *J. exp. Zool.* **163**, 55—78 (1966).
- LINDH, N. O., and B. L. BRANTMARK: Preparation of histones by the use of Reinecke salt. *Anal. Biochem.* **10**, 415—420 (1965).
- MACWILLIAMS, H. K., and F. C. KAFATOS: *Hydra viridis*: Inhibition by the basal disk of basal disk differentiation. *Science* **159**, 1246—1247 (1968).
- MOSCONA, A. A.: Developing cell systems and their controls. New York: The Ronald Press 1960.
- Studies on cell aggregation: Demonstration of materials with selective cell binding activities. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **49**, 742—747 (1963).
- MÜLLER, W.: Experimentelle Untersuchungen über Stockentwicklung, Polypendifferenzierung und Sexualchimären bei *Hydractinia echinata*. *Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org.* **155**, 181—268 (1964).
- Differenzierungspotenzen und Geschlechtsstabilität der I-Zellen von *Hydractinia echinata*. *Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org.* **159**, 412—432 (1967).
- Steuerung des morphogenetischen Fließgleichgewichtes in den Polypen von *Hydractinia echinata*. I. Biologisch-experimentelle Untersuchungen. *Wilhelm Roux' Archiv* **163**, 334—356 (1969).
- ROSE, S. M.: Polarized inhibitory control of regional differentiation during regeneration in *Tubularia*. II. Separation of active materials by electrophoresis. *Growth* **30**, 429—447 (1966).
- Polarized inhibitory control of regional differentiation during regeneration in *Tubularia*: III. The effect of grafts across sea water-agar bridges in electric fields. *Growth* **31**, 149—164 (1967).
- , and J. A. POWERS: Polarized inhibitory control of regional differentiation during regeneration in *Tubularia*: I. The effect of extracts from distal and proximal regions. *Growth* **30**, 419—427 (1966).
- STUMPF, H. F.: Differenzierung durch die Niveauewerte eines Konzentrationsgefälles. *Verh. Dtsch. Zool. Ges., 1966, Göttingen. Zool. Anz.* **30**, Suppl., 477—490 (1967).
- Gradienten im Entwicklungsgeschehen von Tieren. *Naturw. Rdsch.* **21**, 324—331 (1968).
- TARDENT, P.: Principles governing the process of regeneration in hydroids. In: *Developing cell systems* (D. RUDNICK, ed.), p. 21—43. New York: The Ronald Press 1960.
- Regeneration in the hydrozoa. *Biol. Rev.* **38**, 293—333 (1963).
- WEBSTER, G.: Studies on pattern regulation in hydra. IV. The effect of colcemide and puromycin on polarity and regulation. *J. Embryol. exp. Morph.* **18**, 181—197 (1967).

Dr. WERNER A. MÜLLER
 Zoologisches Institut der TU
 33 Braunschweig, Pockelsstr. 10a