Untersuchungen über fluoreszierende Stoffe der Hoden von Drosophila

Von G. E. GRAF * und E. HADORN

Aus dem Zoologisch-vergl. anatomischen Institut der Universität Zürich **

(Z. Naturforschg. **14 b**, 14—17 [1959]; eingegangen am 24. Juli 1958)

The pattern of fluorescent substances in Drosophila testes was qualitatively and quantitatively investigated through paper chromatography and fluorescence measurements. The pteridine inventary which is similar to that found in eyes, is quantitatively altered by a number of mutants of *Drosophila melanogaster*. Different species of Drosophila are characterized by specific patterns. The red pigments found in the testes of some species of Drosophila are chromatographically identical with the drosopterines of the eyes.

Seit der Arbeit von STERN und HADORN[1], die sich mit den Beziehungen zwischen der Ausfärbung in Hoden und Vasa defferentia befaßt, wurde dieses Pigmentierungs-System bei *Drosophila melanogaster* vor allem in bezug auf Induktionsvorgänge untersucht (HADORN[2], HADORN und BERTANI[3], FUNG und GOWEN[4]). Im Jahre 1951 konnten HADORN und MITCHELL[5] sodann zeigen, daß die Hoden von Drosophila reich an fluoreszierenden Stoffen sind. Die meisten dieser Verbindungen wurden später als Pterine identifiziert (FORREST und MITCHELL[6], VISCONTINI et al.[7,8]).

Die Hodenpigmentierung variiert einerseits stark bei verschiedenen Arten der Gattung Drosophila. Andererseits ist seit langem bekannt, daß bei vielen Augenfarb-Mutanten auch die Farbe der Hodenhüllzellen betroffen ist (vgl. BRIDGES und BREHME[9]). Dagegen fand FROTA-PESSOA[10] eine Mutation von *Drosophila pseudoobscura*, die zwar die Hodenpigmentierung, nicht aber die Augenfarbe verändert. HADORN und SCHWINCK[11] zeigten, wie sich das Pterin-Muster der Mutante *rosy*^{2} (*ry*^{2}) von *Drosophila melanogaster* vom Wildtyp unterscheidet und daß sich die *ry*^{2}-Pterinphäne im Transplantations-Experiment nicht-autonom verhalten. Im einzelnen wird der Pteringehalt der Augen (HADORN und GRAF[12]), wie auch derjenige der Hoden (HADORN, GRAF und URSPRUNG[13]) in reziproken Austausch-Transplantationen, die zwischen *ry*^{2} und *ry*$^+$ ausgeführt wurden, vollständig durch den Genotypus des Wirtes bestimmt.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit entwicklungsphysiologischen und genphysiologischen Problemen, wie sie sich aus der Untersuchung der Hoden-Pterine verschiedener Drosophila-Arten und verschiedener Mutanten von *Drosophila melanogaster* ergeben. Über einige Befunde wurde bereits kurz berichtet (GRAF und HADORN[14]).

Material und Methodik

Drosophila melanogaster wurde bei $25 \pm 0{,}5^\circ$ C gehalten; die anderen Arten züchteten wir bei tieferen Temperaturen ($19 \pm 2^\circ$ C). Die übliche Maismehl-Zucker-Hefe-Agar-Mischung wurde als Kulturmedium verwendet. Einen Wildstamm von *Drosophila hydei* hat uns in freundlicher Weise Herr A. E. BASDEN (Edinburgh) zur Verfügung gestellt. Nach der Methode von HADORN und MITCHELL[5] wurden die frei sezierten Hoden direkt als Startflecken in das Chromatographiepapier eingerieben. Alle Angaben beziehen sich auf imaginale Hoden aus mindestens drei Tage alten Fliegen. Chromatographiert wurde im Dunkeln mit einem 2 : 1-Gemisch von n-Propanol : 5-proz. Ammoniak.

Da in eindimensionalen Chromatogrammen die verschiedenen Pterine nicht vollständig getrennt werden, beziehen sich unsere Angaben auf vier Gruppen von fluoreszierenden Stoffen; für eine eingehende Beschreibung der beteiligten Verbindungen sei auf die Arbeit

* Aided by a postdoctoral fellowship of the American Cancer Society.

** Ausgeführt mit Unterstützung der „Karl Heschler-Stiftung".

[1] C. STERN u. E. HADORN, Genetics **24**, 162 [1939].
[2] E. HADORN, Rev. Suisse Zool. **53**, 486 [1946].
[3] E. HADORN u. G. BERTANI, Rev. Suisse Zool. **55**, 232 [1948].
[4] S. FUNG u. J. GOWEN, J. exp. Zoology **135**, 5 [1957].
[5] E. HADORN u. H. K. MITCHELL, Proc. nat. Acad. Sci. USA **35**, 650 [1951].
[6] H. FORREST u. H. K. MITCHELL, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5656 [1954]; **77**, 4865 [1955].
[7] M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER u. E. HADORN, Helv. chim. Acta **38**, 397 [1955].
[8] M. VISCONTINI, E. LOESER, P. KARRER u. E. HADORN, Helv. chim. Acta **38**, 1222 u. 2034 [1955].
[9] C. BRIDGES u. K. BREHME, Carnegie Inst. Wash. Publ. **552**, 1 [1944].
[10] O. FROTA-PESSOA, Amer. Naturalist **90**, 133 [1956].
[11] E. HADORN u. I. SCHWINCK, Z. Vererbungslehre **87**, 528 [1956].
[12] E. HADORN u. G. E. GRAF, Zool. Anz. **160**, 231 [1958].
[13] E. HADORN, G. E. GRAF u. H. URSPRUNG, Rev. Suisse Zool. **65**, 335 [1958].
[14] G. E. GRAF u. E. HADORN, D. I. S. **31**, 122 [1957].

von ZIEGLER-GÜNDER und HADORN [15] verwiesen. Die als Degradationsprodukt auftretende 2-Amino-6-hydroxypteridin-8-carbonsäure wurde nicht gemessen. Zur quantitativen Bestimmung der Pterinmengen verwendeten wir nach der Methode von HADORN und KÜHN [16] das direkt vom Papierfleck emittierte Fluoreszenzlicht. Alle Meßwerte der vorliegenden Arbeit sind auf willkürlich gewählte Einheiten bezogen.

Ergebnisse

a) Wildtyp von *Drosophila melanogaster*

In Bestätigung der Angaben von HADORN und MITCHELL [5] fanden sich in den Hoden von *Drosophila melanogaster* große Mengen an IX = Isoxanthopterin (Fl. 3) und ansehnliche Quantitäten von HB-Pterinen (Fl. 4) sowie eine gelb fluoreszierende Fraktion, die wahrscheinlich zur Hauptsache aus SP = Sepiapterin (Fl. 5) besteht, eventuell aber auch Riboflavin enthalten hönnte. Überdies wurde eine fahl gelb fluoreszierende Verbindung festgestellt, die etwas weiter wandert, als die HB-Pterine (Fl. 7?).

Die Meßwerte entsprechender Flecken von Einzelköpfen und Hodenpaaren sind in Tab. 1 aufgeführt.

Köpfe, deren Pterine fast ausschließlich in den Augen lokalisiert sind, unterscheiden sich bei *Drosophila melanogaster* von den Hoden in folgenden Belangen. Drosopterine finden sich nur in den Augen. Hoden enthalten ein Vielfaches an Isoxanthopterin im Vergleich zu Augen. Die diesbezüglichen Meßwerte der Tab. 1 sind dabei nicht maßgebend, da die Fluoreszenz der IX-Gruppe der Augen zur Hauptsache vom mitgemessenen Xanthopterin bestimmt ist, während die Hoden fast nur Isoxanthopterin enthalten. Hoden enthalten überdies bedeutend mehr Fl. 7-Substanz als Augen. Dagegen liefern Köpfe und Hoden annähernd gleichviel SP- und HB-Mengen.

	n	IX	SP	HB
Köpfe (Augen)	14	$30{,}8 \pm 1{,}2$	$33{,}5 \pm 1{,}5$	$14{,}3 \pm 0{,}5$
Hoden	14	$110{,}8 \pm 3{,}1$	$34{,}6 \pm 1{,}6$	$15{,}2 \pm 0{,}6$

Tab. 1. Vergleich der Fluoreszenzwerte für Köpfe und Hoden bei n Männchen (vier Tage alte Imagines) von *Drosophila melanogaster*.

b) Mutanten von *Drosophila melanogaster*

Vergleichende Messungen der Hodenpterine verschiedener Mutanten, bezogen auf die Mengen, die ein Wildtypus (Stamm Sevelen) enthält, sind in Tab. 2 aufgeführt. Die Hoden stammen aus 3 bis 5 Tage alten Fliegen. Für jede der n Serien wird der Mittelwert von 3 bis 15 Hodenpaaren, die einzeln chromatographiert und gemessen wurden, verglichen mit den Mittelwerten von mindestens 5 Hodenpaaren des Wildtypus, die ebenfalls einzeln verarbeitet wurden. Mutanten und Kontrollen wurden je nebeneinander auf dem gleichen Blatt chromatographiert.

Einige der Augenfarbmutanten verändern das Pterininventar der Hoden in charakteristischer Weise. Während die w^a-Mutante die SP-Fraktion stark herabsetzt, kommt es bei *sed* zu einer außergewöhnlichen Vermehrung. Dagegen übt die Mutation *se*, wenn überhaupt, so nur einen sehr geringen Einfluß auf die Hodenpterine aus. Dies ist um so überraschender, da das *sepia*-Gen die Augenpterine außerordentlich stark beeinflußt (HADORN und ZIEGLER-GÜNDER [17]) und sogar in heterozygoter Vertre-

	n	IX	SP	HB
sepia (*se*)	9	$95{,}4 \pm 6{,}2$	$109{,}2 \pm 5{,}3$	$95{,}7 \pm 3{,}1$
sepiaoid (*sed*)	7	$26{,}3 \pm 3{,}7$	$334{,}7 \pm 22{,}1$	$203{,}6 \pm 4{,}0$
claret (*ca*)	8	$77{,}5 \pm 2{,}3$	$64{,}5 \pm 4{,}3$	$70{,}6 \pm 4{,}3$
white apricot (w^a)	2	$9{,}0 \pm 2{,}0$	$19{,}0 \pm 0{,}7$	$19{,}5 \pm 2{,}5$
pink peach (p^p)	6	$42{,}2 \pm 1{,}2$	$41{,}2 \pm 3{,}7$	$55{,}2 \pm 2{,}7$
cinnabar (*cn*)	5	$73{,}8 \pm 2{,}9$	$78{,}0 \pm 4{,}4$	$106{,}6 \pm 6{,}1$
vermillion (*v*)	4	$92{,}8 \pm 1{,}4$	$117{,}0 \pm 6{,}3$	$121{,}3 \pm 5{,}8$

Tab. 2. Fluoreszierende Substanzen in mutierten Hoden. Meßwerte angegeben in % von Wildtyp-Kontrollen.

[15] I. ZIEGLER-GÜNDER u. E. HADORN, Z. Vererbungslehre **89**, 235 [1958].

[16] E. HADORN u. A. KÜHN, Z. Naturforschg. **8b**, 582 [1953].

[17] E. HADORN u. I. ZIEGLER-GÜNDER, Z. Vererbungslehre **89**, 221 [1958].

tung sich manifestiert (ZIEGLER-GÜNDER und HADORN[15]). *Sed*-Hoden enthalten auch mehr Fl. 7 als der Wildtyp und die übrigen geprüften Mutanten.

Da sich zwischen *sed* und dem Wildtyp so große Unterschiede zeigten, wurden die Stoffmengen in heterozygoten *sed*/+-Hoden gemessen (Tab. 3). Eine signifikante Manifestation des *sed*-Gens ist nicht festzustellen. Auch dieses Ergebnis überrascht, weil anderweitige Untersuchungen (G. E. GRAF unveröffentlicht) gezeigt haben, daß in den Augen von +/*sed*-Heterozygoten 1,5- bis 2-mal mehr SP vorkommt als in +/+-Augen.

Genotyp	*n*	IX	SP	HB
+/+	12	112,5 ± 2,8	34,9 ± 1,1	18,6 ± 0,8
+/*sed*	17	107,3 ± 1,8	35,0 ± 0,9	20,0 ± 0,8

Tab. 3. Vergleich von +/+- und +/*sed*-Hoden.

c) Verschiedene Species

Die chromatographischen Untersuchungen an 5 Arten der Gattung Drosophila zeigen, daß – mit Ausnahme der DP-Fraktion – das fluoreszierende Stoffmuster der Hoden qualitativ überall übereinstimmt. Die drei Arten *D. obscura*, *D. subobscura* und *D. pseudoobscura*, deren Hoden rot pigmentiert sind, liefern im Chromatogramm eine Fraktion, die auffallend mit den roten Augenpigmenten übereinstimmt, welche als Drosopterin (DP) isoliert und identifiziert sind (VISCONTINI, HADORN und KARRER[18]).

Abgesehen vom Vorkommen dieser Drosopterine ergeben sich zwischen den verschiedenen Species typische Unterschiede in den Quantitäten der übrigen Pterine (Tab. 4), so daß die Arten leicht auf Grund des Stoffmusters zu unterscheiden sind. Dabei sind allerdings die Unterschiede z. T. durch verschiedene Hodengröße bedingt. So finden sich alle Fraktionen im großen *hydei*-Hoden gegenüber *melanogaster* stark vermehrt. Andererseits muß der geringe IX-Gehalt bei *subobscura* auffallen. In der *obscura*-Gruppe scheint zudem der Meßwert der IX-Fraktion viel stärker durch Xanthopterin beeinflußt als bei *melanogaster*, wo fast ausschließlich Isoxanthopterin gemessen wird. Die Zahlen der Tab. 3 und 4 sind nicht direkt vergleichbar, da sie sich auf verschiedene Meßeinheiten beziehen.

Die roten Hoden-Pigmente der *obscura*-Gruppe wurden vergleichsweise neben Drosopterinen aus *melanogaster*-Augen chromatographiert. In folgenden Lösungsmitteln konnten keine Unterschiede festgestellt werden: Propanol – 5-proz. Ammoniak (2 : 1) und (2 : 3); wassergesättigtes Phenol, 5-proz. Essigsäure und 20-proz. KCl. Überall zeigten sich die gleichen Fluoreszenzfarben. Überdies wurde festgestellt, daß neben den orange fluoreszierenden Verbindungen, die als Drosopterin und Isodrosopterin bekannt sind, in den Hoden auch das rötliche Neodrosopterin erscheint. Danach sind wahrscheinlich die roten Hodenpigmente der drei untersuchten Arten identisch mit den Drosopterinen, die aus Augen von *D. melanogaster* isoliert wurden.

Diskussion

Nach den vorliegenden Untersuchungen stimmen die Pterininventare der Augen und Hoden von Drosophila in qualitativer Hinsicht weitgehend überein (Tab. 1). Diese beiden Organsysteme, zusammen mit den Malpighischen Gefäßen, liefern den Hauptbeitrag an die Gesamtmenge fluoreszierenden Materials, das im Drosophila-Körper vorkommt (HADORN und MITCHELL[5]). Daher kann der Pterin-Stoffwechsel vergleichsweise an diesen Zellsystemen studiert werden. Die Ähnlichkeit der Stoffmuster der Augen und der Hoden ist besonders auffallend bei den Arten mit roten Hoden (Tab. 4). Falls die Drosopterine der Hoden tatsächlich mit denjenigen der Augen identisch sind, erhebt sich die Frage, warum einzelne Arten diese Pterine nur in den Augen,

Species	*n*	DP	IX	SP	HB
D. melanogaster	21	–	58,5 ± 1,1	18,0 ± 0,6	9,7 ± 0,3
D. hydei	8	–	108,5 ± 1,8	88,8 ± 8,4	50,4 ± 5,8
D. subobscura	16	7,9 ± 0,5	7,3 ± 0,5	5,4 ± 0,3	3,0 ± 0,2
D. pseudoobscura	16	11,5 ± 0,5	39,4 ± 1,3	6,8 ± 0,3	5,0 ± 0,3
D. obscura	13	18,4 ± 1,1	46,8 ± 3,8	18,8 ± 2,2	16,5 ± 1,4

Tab. 4. Meßwerte fluoreszierender Stoffgruppen aus Hoden verschiedener Drosophila-Arten.

[18] M. VISCONTINI, E. HADORN u. P. KARRER, Helv. chim. Acta **40**, 579 [1957].

andere Arten aber auch in den Hodenzellen bilden. Dabei läßt sich der *melanogaster*-Hoden vergleichen mit dem Zellsystem der Augen bei der Mutante *sepia*, wo auch keine Drosopterine entstehen. Dies könnte in beiden Fällen auf einer Unfähigkeit beruhen, eine nahe Vorstufe, vielleicht Sepiapterin (SP) oder Biopterin (HB 2) in Drosopterin umzuwandeln.

Auf Grund der gegenwärtig verfügbaren Kenntnisse wäre es allerdings verfrüht, diesem Vergleich allzu große Bedeutung zuzumessen. Immerhin sei hervorgehoben, daß die Mutante *sepia* sich vom Wilttyp in den Hoden viel weniger unterscheidet als in den Augen. Jedenfalls dürfte es interessant sein, die Pterine der Hoden und Augen erneut zu vergleichen, wenn Näheres über den Stoffwechsel dieser Verbindungen und die daran beteiligten Enzymsysteme bekannt sein wird.

Die überraschende Wirkung von *sepiaoid (sed)* auf den Pterin-Gehalt der Hoden eröffnet weitere interessante Fragestellungen. Hier gleicht das genbedingte Stoffmuster weitgehend der Manifestation in den Augen (HADORN und MITCHELL[5], und unveröffentlichte Feststellungen). Trotz der phänotypischen Ähnlichkeit von *sepiaoid* und *sepia* ist das Pterin-Muster der beiden Mutanten recht verschieden, so besonders im Zellsystem der Hoden. NAWA, SAKAGUCHI und TAIRA[19] haben *sepiaoid* mit *rosy (ry)* verglichen und darauf hingewiesen, daß bei beiden Genotypen die Bildung der Xanthin-Dehydrogenase betroffen ist (vgl. HADORN und GRAF[12]). Obschon bei *sepiaoid* im Gegensatz zu *rosy* etwas Isoxanthopterin auftritt, ist die Menge dieses Stoffwechselproduktes deutlich vermindert. Dies zeigt sich vor allem in den Hoden (Tab. 2). Überdies gleicht *sed* der *rosy*-Mutante auch insofern als in den Augen gesteigerte Mengen an Sepiapterin und HB-Verbindungen auftreten bei gleichzeitiger Abnahme der Drosopterine. Transplantations-Experimente und Bestimmung der Enzymaktivität dürften zeigen, inwiefern *sed* und *rosy* stoffwechselphysiologisch vergleichbar sind.

[19] S. NAWA, B. SAKAGUCHI u. T. TAIRA, Nat. Inst. Genetics Japan, Annu. Report **7**, 32 [1956].

Untersuchungen über Aggregatbildung und Inaktivierung des Virus der Maul- und Klauenseuche

Von TH. ZIMMERMANN

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen a. N.

(Z. Naturforschg. **14 b**, 17—24 [1959]; eingegangen am 28. Juli 1958)

„Eingefäß-verdünnte" Lössungen des Virus der Maul- und Klauenseuche von +4° C zeigten im Laufe ihrer Lagerung Infektiositäts-Schwankungen von 0,60—0,85 log, die eine Frequenz von ca. 4 Tagen hatten.

In ruhig aufbewahrten Viruslösungen von +4° C, die vor der Probeentnahme zur Titration nicht durchmischt wurden, war das Virus gleichmäßig verteilt. Ein Durchmischen der Lösungen bewirkte in periodischem Wechsel eine Titererhöhung bzw. Erniedrigung im Sinne einer vermehrten Aggregation bzw. Desaggregation von Virus.

Die Volumenabhängigkeit der Infektiositäts-Abnahme von MKS-Viruslösungen wird durch mindestens zwei Faktoren verursacht. Sie wird einmal bedingt durch eine relativ größere Oberflächenreaktion bei Lösungen mit kleineren Volumen, zum anderen aber durch weitere noch unbekannte Faktoren. Bei Virus-Inaktivierungs-Versuchen mit Testlösungen von mindestens 100,0 cm^3 ist die Volumenabhängigkeit der Infektiositäts-Abnahme von geringerem Einfluß auf die Ergebnisse.

Die Stabilität des Virus der Maul- und Klauenseuche (MKS) beim Einfrieren und Auftauen prüfte STORZ[7], der auch mit verdünnten Lösungen arbeitete. Außerdem wurde die Inaktivierungs-Geschwindigkeit von MKS-Kulturvirus des Typs A unter der Einwirkung verschieden hoher Temperaturen bereits eingehend durch BACHRACH und Mitarbb.[1] bestimmt. Die von ihnen verwendeten Lösungen enthielten bei Versuchsbeginn ca. $10^{6,5}$ kulturinfektiöse Einheiten (KIE).

Untersuchungen von PYL[4] mit MKS-Viruslösungen und eigene Versuche mit verschiedenartig verdünnten und gekühlten Lösungen des Virus der ansteckenden Schweinelähmung (Teschener Krankheit)[8] ließen darüber hinaus auf das Vorkommen eines Gleichgewichts in Viruslösungen schließen, an