

FUNKTIONSSTRUKTUREN IM OOCYTENKERN VON LOCUSTA MIGRATORIA*

WERNER KUNZ

Zoologisches Institut der Universität Münster (Westf.)

Eingegangen am 1. August 1966

Abstract. Examination of living oocyte nuclei of *Locusta migratoria* has revealed the presence of thread-like structures. They are paired and are thought to be the uncoiled chromosomes since they are broken into fragments by treatment with DNase. The greater part of the threads carries lateral loops like the lampbrush chromosomes of *Amphibia* (Fig. 14). A smaller part has no loops but bears a series of conspicuous granules with bright appearance under positive phase contrast optics (pearl-string segments) (Fig. 2). — The visibility of the chromosomes has been investigated in solutions with several ions. In hypertonic media the chromosomes contract, the granules fuse, and the pearl-string segments become lumpy (Fig. 21). In nitrogenous atmosphere and if kept at low temperature the pearl-string structures are likewise transformed into a few lumps (Fig. 19). After return to normal conditions they reconstitute their characteristic beaded appearance. — In autoradiographs obtained by injection of H^3 -uridine into the body cavity and by incubation of isolated nuclei in vitro, a rather uniformly distributed labelling occurs over the oocyte nuclei up to 30 min incubation time (Fig. 23). With prolonged incubation the activity of the pearl-string segments becomes more intense than the labelling of the lampbrush chromosomes (Fig. 24). After treatment with actinomycin RNA synthesis is stopped, the pearl-string axes and the lampbrush chromosomes contract, and the granules disappear more and more (Figs. 25—28). — The pearl-string segments look very much like the nucleoli in the oocytes of *Amphibia*, where the nucleolar substance is likewise distributed as a series of beads of rather uniform size on an axis. Therefore, the pearl-string structures may have nucleolar function in *Locusta* too. If so, the only difference to the Amphibian nucleoli would be the continued attachment to the lampbrush chromosomes. (Zusammenfassung see p. 367).

I. Einleitung

Neben den Polytänychromosomen der Dipteren geben die Lampenbürstenchromosomen Aufschluß über die Lokalisation der Gene und über die Funktionsstrukturen der Chromosomen höherer Organismen. Die Lampenbürstenchromosomen sind stark entspiralisierte, fadenförmige Chromosomen, die in linearer Folge zu Chromomeren verdickt sind, von denen seitlich paarige Schlingen (loops) auslaufen. Chromosomen dieses Typs wurden in den Oocytenkernen von Amphibien und Selachiern gefunden und bei Molchen eingehend analysiert (CALLAN u. LLOYD, 1960). Viele Beobachtungen sprechen dafür, daß auch die reifenden Eizellen von Wirbellosen sehr ähnliche Strukturen enthalten, jedoch wurden die wesentlichen Merkmale der Lampenbürstenchromosomen, Chromomeren

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

und seitliche Schleifen, bisher nur bei *Sepia* und bei der Meeresassel *Anilocra* festgestellt (CALLAN, 1957).

Die Angaben über das Vorkommen von Lampenbürstenchromosomen bei Insekten beschränken sich auf die Beschreibung diffuser, gewundener Stränge von lampenbürstenartigem Aussehen, die in den Eikernen der panoistischen Ovarien von Schaben und Libellen gefunden wurden (BONHAG, 1959; ZALOKAR, 1961; SESHACHAR u. BAGGA, 1963). Weiterhin gelang die Darstellung von Lampenbürstenschleifen am Y-Chromosom in den Spermatocyten verschiedener *Drosophila*-Arten (MEYER, 1963).

CALLAN (1957) sieht im Lampenbürststadium den grundlegenden Organisationstyp aller Keimbahnchromosomen vor der Reifeteilungen; NEBEL u. COULON (1962) und HENDERSON (1964) vermuten diese Chromosomenstruktur auch in somatischen Zellen. Wieweit diese Verallgemeinerungen tatsächlich zutreffen, kann nur die Analyse der Chromosomen zahlreicher Tiergruppen bestätigen. Die folgenden Untersuchungen hatten zum Ziel, die Struktur der Chromosomen aus Oocytenkernen eines panoistischen Insektenovars zu analysieren und auf ihre Übereinstimmung mit den Lampenbürstenchromosomen der Amphibien zu überprüfen.

II. Material und Methode

Tierhaltung. Es wurden Wanderheuschrecken der Art *Locusta migratoria* L. bei annähernd gleichbleibender Temperatur von etwa 30°C unter Dauerbeleuchtung gehalten. Als Nahrung standen zu allen Jahreszeiten Feldsalat, Weizenkleie und Möhren zur Verfügung, im Sommer und Herbst auch verschiedene Gräser, vorwiegend *Glyceria maxima*. Obwohl die Tiere mit allen möglichen Grasarten, Kohl- und Salatarten aufgezogen werden können, empfiehlt es sich nicht, das Futter öfter als notwendig zu ändern, weil sich die Tiere nur schwer umgewöhnen lassen. Zur Eiablage wurden den Heuschrecken Blumentöpfe mit Sand geboten, der gleichmäßig feucht gehalten werden muß, da sonst die Schlüpfrate der Jungtiere erheblich absinkt.

Cytologische Technik. Fixiermittel wirken auf die Chromosomen in den Heuschrecken-Oocytenkernen quellend oder verklebend ein. Daher sind die folgenden Untersuchungen vor allem an Lebendmaterial in verschiedenen Insekten-Ringerlösungen durchgeführt worden. Die Ringergemische verändern die Chromosomen und ihre Produkte in unterschiedlicher Weise. Diese Möglichkeiten der Strukturbeeinflussung führten im einzelnen zur Aufklärung des Chromosomenbaus, und deshalb wird die Zusammensetzung der physiologischen Medien später im Zusammenhang mit den Strukturuntersuchungen angegeben.

Obwohl ein Teil der Strukturen bereits in den freigelegten Ovariolen deutlich erkennbar ist, müssen die Oocytenkerne zur optimalen Beobachtung sauber isoliert werden. Zunächst muß die peritoneale Hülle entfernt werden, die sich wie ein Handschuhfinger von der Ovariole herunterziehen läßt. Anschließend werden die Follikel der so freigelegten Ovariole unter dem Binokular mit einer feinen Augenschere durchgeschnitten, worauf Kern und Cytoplasma meist schon von selbst aus der Oocyte herausquellen. Nun läßt sich das Keimbläschen von anhaftendem Ooplasma befreien, indem es mit zwei Uhrmacherpinzetten Nr. 5 vorsichtig auf dem Gefäßboden entlanggerollt und mit einer kleinen Glaspipette mehrmals eingesaugt und ausgestoßen wird. Dieser Reinigungsprozeß ist der schwierigste und langwierigste Teil des

Präparationsganges. Je nach Ziel der Untersuchung können zur Isolation verschiedene Ringergemische verwandt werden. Falls eine schnelle Kernpräparation erforderlich ist, empfiehlt es sich, den Kern nicht im normalen Calcium-Ringer (Ca-Ringer, s. S. 342), sondern in einer Ca-freien Lösung (Kalium-Ringer = K-Ringer) zu isolieren, weil sich das Cytoplasma in diesem K-Ringer leichter von der Kernmembran abtrennen läßt. Allerdings müssen in der K-Ringerlösung einige Veränderungen der Kernstruktur gegenüber dem Vitalaspekt in Kauf genommen werden (vgl. S. 342). Bei der Serienherstellung von Totalkern-Präparaten für die Autoradiographie wird die Verwendung des K-Ringers zu einer Notwendigkeit, da andernfalls die Inkubationszeit des Ovars zu sehr in die Länge gezogen würde, ehe die nötige Anzahl präparierter Kerne erreicht ist.

Nach der Isolierung wird der Kern mit der Pipette in einen Tropfen des gewünschten Mediums (Fixiermittel, Ringerlösung oder Aqua dest.) auf einen Objektträger übertragen. Nach vorsichtiger Auflage des Deckgläschens gelingt es durch langsames Absaugen der Flüssigkeit mit Filtrierpapier, den Kern faltenfrei so weit zu quetschen, daß alle Strukturen annähernd plan liegen. Zu starker und plötzlicher Druck muß dabei auf jeden Fall vermieden werden, weil sonst unspezifische Veränderungen in kurzer Zeit den Kerninhalt unkenntlich machen. Wird die Verdunstung der Flüssigkeit durch gelegentliche Zugabe eines Wassertropfens ausgeglichen, so läßt sich der Kern mehrere Stunden unverändert unter dem Deckglas erhalten.

Zur Verfolgung der RNS- und Eiweißbildung wurden Tritium-markierte Vorstufen dieser Verbindungen ventral durch die Intersegmentalhäute in die Leibeshöhle der Heuschreckenweibchen injiziert und nach verschiedenen Inkubationszeiten autoradiographisch ermittelt. (Angaben über die Mengen und spezifischen Aktivitäten der radioaktiven Substanzen finden sich in den Abbildungslegenden und auf S. 356.) Die Autoradiographie erfolgte mit Kodak AR 10 Stripping-Film. Um die totalen Kerne mit dem Film zu überdecken, müssen die Präparate fixiert und anschließend abgedeckelt werden. Es erscheint sinnvoll, den radioaktiven Kern gleich im Fixiermittel zu quetschen. In der Regel geht durch den Fixierprozeß jedoch die Vitalstruktur verloren; denn die meisten Fixiermittel führen zu einer Trübung des Kernsaftes, saure Fixiergemische zu einer zusätzlichen starken Quellung der Kernstrukturen und sind daher ungeeignet. Neutralformol (in 10%iger Lösung mit primärem und sekundärem Natriumphosphat gepuffert) erhält die Chromosomen zwar annähernd im lebenden Aspekt, verhindert aber nicht die tiefgreifenden Schädigungen der Kernstruktur bei zu starkem Quetschen durch übermäßigen Flüssigkeitsentzug unter dem Deckglas. In Neutralformol muß daher jeder einzelne Kern wie in der Ringerlösung unter Kontrolle gequetscht werden, was bei Serienarbeiten sehr zeitraubend ist. Auf der Suche nach besseren Fixiermitteln wurden schließlich mit neutraler 6,5%iger Glutaraldehydlösung optimale Erfolge erzielt (26 g 25%iger Glutaraldehyd, 10,7 ml 0,93% CaCl_2 , Aqua dest. ad 100 ml; mit n/10 Na-Barbital auf pH 7,2 gepuffert). Die Chromosomen der in Glutaraldehyd fixierten Kerne kommen dem Vitalaussehen sehr nahe. Sie behalten diese Struktur auch nach beliebig starker Quetschung bei.

Ist der Oocytenkern durch das Absaugen des Fixiermittels hinreichend gequetscht worden, so muß das Deckglas für den anschließenden Strippvorgang entfernt werden. Dazu wird der Objektträger gestürzt und auf zwei randliche Sockel in eine Petrischale mit Formol oder Glutaraldehyd gelegt, worauf das Deckglas nach etwa 1 min absinkt. Wenn man Glück hat, bleibt der Kern bei diesem Vorgang am Objektträger hängen. In vielen Fällen haftet er jedoch auf dem Deckglas, ist dann für die Autoradiographie aber nicht verloren, denn das Deckglas kann mit Eukitt — Kern nach oben — auf einen Objektträger geklebt und dort mit dem Stripping-Film bedeckt werden. Um dieses recht umständliche Verfahren zu umgehen, wurde nach

einer Methode gesucht, das Ankleben des Kerns an das Deckglas zu verhindern, d. h. den Kern während des Quetschprozesses ausschließlich an den Objektträger zu binden. Dazu muß die Oberfläche des Objektträgers vor der Auflage des Kerns mit Eiweißglycerin bestrichen werden, das man in der Bunsenflamme bis zum völligen Eintrocknen ankoagulieren läßt.

Klebt der fixierte, gequetschte Kern schließlich auf dem Objektträger und ist das Deckglas entfernt, so wird das Präparat in 5%iger Trichloressigsäure 15 min lang bei 40°C ausgewaschen, getrocknet und in Chromalaungelatine getaucht. Die Gelatineschicht hat den Zweck, den Stripping-Film festzuhalten, der anschließend auf dem Objektträger über den Kern aufgezogen wird. Diese zwischen Präparat und Film liegende sehr dünne Schicht absorbiert nur einen geringen Anteil der schwachen β -Strahlung des Tritiums.

Nach den entsprechenden Expositionszeiten werden die Präparate entwickelt und in dem wasserlöslichen Einschlußmittel W15 (Zeiss) im feuchten Zustand eingedeckt. Um den Oocytenkern bei der Durchmusterung der Präparate schnell wiederzufinden, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, ihn immer in einem vorher auf der Unterseite des Objektträgers eingeritzten Kreis zu lokalisieren.

Bei starker Markierung wird die Kernstruktur durch die Silbergrana verdeckt. In diesen Fällen gelingt es nicht, bestimmte Kernbereiche, etwa die Perlschnurstränge, zu erkennen. Um die Stoffwechselsintensität einzelner Kernkomponenten zu erfassen, muß der Stripping-Film wieder entfernt werden, nachdem das Bild der autoradiographischen Markierung photographiert worden ist. Nach einem von BIANCHI, LIMA-DE-FARIA u. JAWORSKA (1964) beschriebenen Verfahren kann der Film durch Trypsin aufgelöst werden. Diese Methode läßt sich auf die *Locusta*-Kerne aber nicht übertragen, da das Ferment auch das Präparat zerstört. Die folgende Behandlung hat sich als brauchbar erwiesen: Der mit dem Stripping-Film bedeckte Objektträger wird 10 min in Aqua dest. gekocht, wobei sich das Eindeckmittel (W15) und der Film lösen. Einige Silberkörner bleiben auf dem Präparat haften und können in einer frisch angesetzten Lösung aus Kaliumcyanoferrat-(III) (= rotes Blutlaugensalz) und Natriumthiosulfat (jeweils 10 g ad 100 ml) entfernt werden. Der gequetschte, in Formol oder Glutaraldehyd fixierte Kern übersteht diese Behandlung ohne Schädigung.

III. Ergebnisse

1. Die Kernstruktur während der Wachstumsphase der Oocyte

a) Die „Perlschnurstruktur“ und die α -Kugeln

Bei Lebenduntersuchungen an den Ovarien von *Locusta migratoria* fielen bereits in den Oocytenkernen von Totalpräparaten der Ovariolen perlschnurartige, an vielen Stellen geknäuelte Stränge auf (Abb. 1). Nach Isolation der Kerne erwiesen sich diese Strukturen als Schnüre aus linear hintereinander aufgereihten Kügelchen übereinstimmender Größe (Abb. 2, 6). Die Stränge laufen an allen klar erkennbaren Stellen zu zweit recht eng nebeneinanderher und treten gelegentlich höchstens 8 μ weit auseinander. Im paarigen Verlauf erinnern sie an die bivalenten Chromosomen der meiotischen Prophase. Sie sollen als „Perlschnurchromosomen“ bezeichnet werden; die Chromosomennatur dieser Stränge wird im folgenden nachgewiesen. Die beiden Partnerstränge laufen nicht durchweg parallel nebeneinanderher, sondern überkreuzen sich an vielen Stellen.



Abb. 1. Zwei junge Follikel von *Locusta migratoria* mit Oocytenkernen, in denen die Perlschnursegmente sichtbar sind. Lebendpräparat in Ca-Ringerlösung. 300 ×

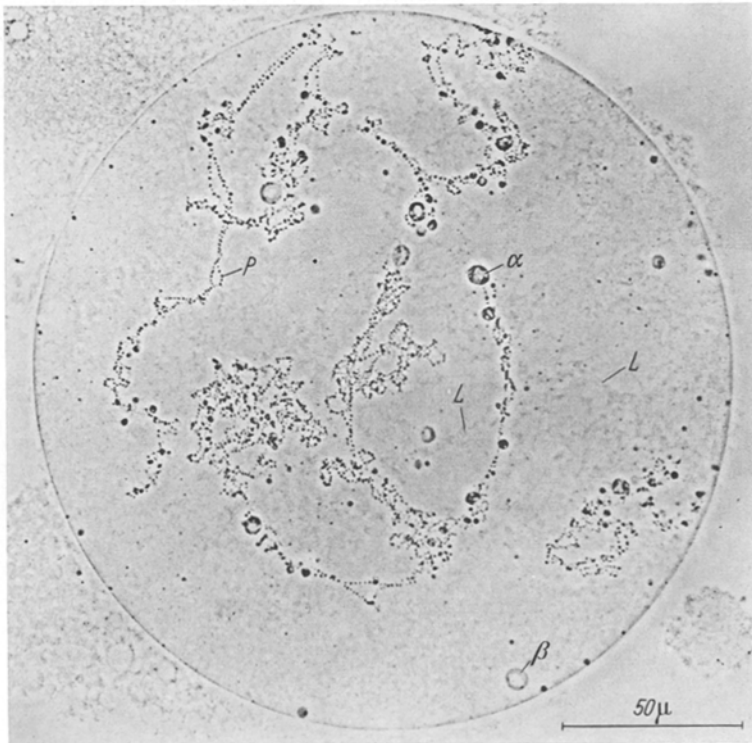


Abb. 2. Isolierter, unfixierter Oocytenkern mit stark lichtbrechenden Perlschnurabschnitten (P) und schwach erkennbaren Lampenbürstenchromosomen (L). Die Perlschnurstränge verlaufen paarweise. α = α -Kugel, β = β -Kugel. Kern in Aqua dest. gequetscht. Aufnahme mit Zeiss-Photomikroskop, Objektiv Apo 40/1,0 Öl Phasenkontrast. 480 ×

Da Chiasmen in so hoher Anzahl nicht zu erwarten sind, scheinen die Kreuzungspunkte daher zu rühren, daß die homologen Chromosomen vielfach umeinander gewunden sind.

Nur in den geräumigen Kernen der großen Oocyten (Kerndurchmesser 50—100 μ , im gequetschten Zustand 100—200 μ) liegen die Stränge so weit gesondert vor, daß man einzelne Abschnitte über längere Strecken verfolgen kann (in günstigen Fällen fast 150 μ weit; vgl. Abb. 6). In den kleinen Kernen in der Nähe des Germariums (Durchmesser im gequetschten Zustand 40—100 μ) sind die Perlschnurchromosomen dagegen zu Knäueln zusammengeballt (Abb. 5). Sie ähneln dann den Strukturen in den Oocytenkernen anderer Insektenarten mit panoistischen Ovarien, an denen vergleichende Untersuchungen durchgeführt werden (BLER, KUNZ u. RIBBERT, in Vorbereitung).

Geraten die Perlschnurchromosomen durch manipulierte Verformungen des Oocytenkerns in Bewegung, so verhalten sich die Kügelchen (die „Perlen“) in einer Weise, als säßen sie in gleichen Abständen auf einer gemeinsamen, elastischen Achse. Diese wird sichtbar, wenn man die Chromosomen mit einer feinen Glasnadel aus dem Kern herauszieht. Die Achse kann wie ein Gummiband um das Fünffache ihrer Länge gedehnt werden und zieht sich wieder zusammen, wenn der Zug nachläßt.

Die kleinen, etwa 0,6 μ dicken Kügelchen, die „Axialgranula“, liegen in vivo fast lückenlos hintereinander, rücken jedoch voneinander ab, wenn der Kern in hypotoner Lösung Wasser aufnimmt. Die Ursache dieser Achsenstreckung braucht nicht unmittelbar in einer Einwirkung auf den Spiralisationsgrad der Achse zu liegen. Denn da die Chromosomen an mehreren Stellen an der Kernmembran festhängen (s. S. 343), werden infolge der Volumenzunahme des Kerns einzelne Perlschnurabschnitte passiv in die Länge gezogen. Die Kügelchen neigen an vielen Stellen zur Verschmelzung, häufig mit den Granula desselben Strangs über Entfernungen bis zu 20 μ , wodurch Schleifen entstehen, die zunächst mit den Lateralschleifen (loops) der Lampenbürstenchromosomen verwechselt werden könnten (Abb. 7). Andererseits kleben die Kügelchen auch mit den homologen und nicht-homologen Granula des Partnerchromosoms zusammen. Dadurch kommt es zu vielen Kontaktstellen, die äußerlich nicht von Chiasmen zu unterscheiden sind. Diese vielfältigen Granulaverschmelzungen führen zu unübersichtlichen Knäueln vernetzter Perlschnurstränge und machen die Abgrenzung einzelner Abschnitte unmöglich (Abb. 2, 7). Die gesamte Perlschnurstruktur eines Oocytenkerns gleicht mehr oder weniger einer kontinuierlich fortlaufenden Doppelschnur (Abb. 3, 6).

Die auffälligsten Bildungen an den Perlschnurchromosomen sind Kugeln verschiedener Struktur und Größe, die zur Unterscheidung von einem an späterer Stelle noch zu besprechenden andersartigen Kugeltyp als „ α -Kugeln“ bezeichnet werden sollen (s. Abb. 4, 7). Sie haben im vitalen

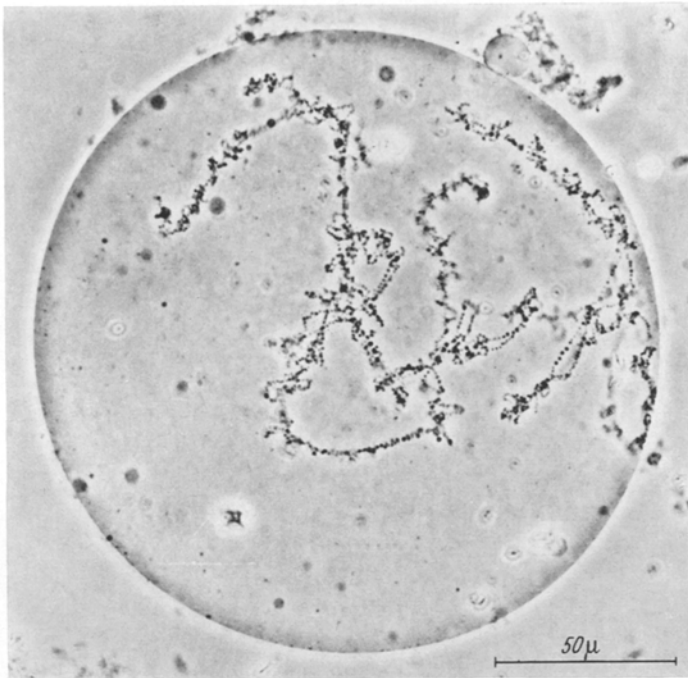


Abb. 3. Oocytenkern aus einer Larve mit nur sehr wenigen α -Kugeln. Die Perlschnurstruktur gleicht einer kontinuierlich fortlaufenden Doppelschnur. Technik wie Abb. 2, jedoch Aufnahme mit Objektiv Neofluar 25/0,60 Phasenkontrast. 475 $\times$

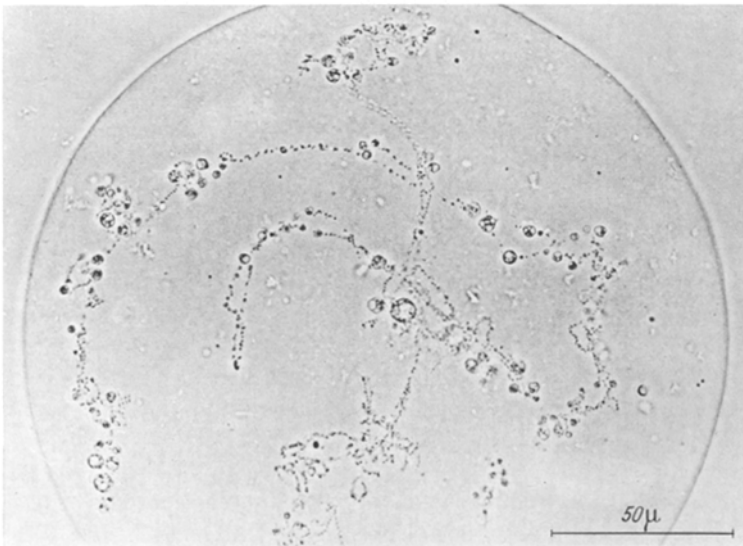


Abb. 4. Oocytenkern aus einem adulten Tier mit vielen α -Kugeln. Technik wie Abb. 2. 480 $\times$

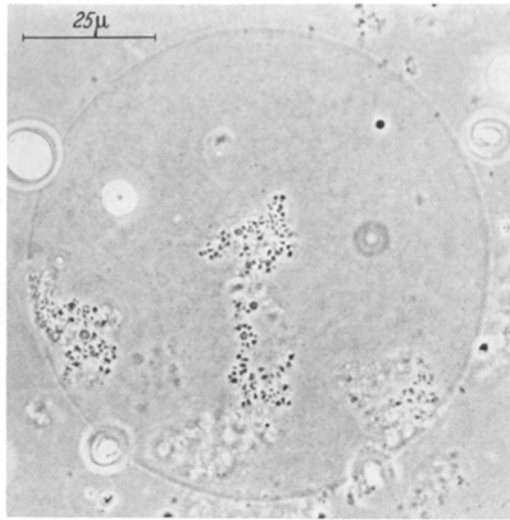


Abb. 5. In den kleinen Kernen der jungen Oocyten sind die Perlschnurstrukturen noch zu Knäueln zusammengeballt. Technik wie Abb. 2. 700 ×

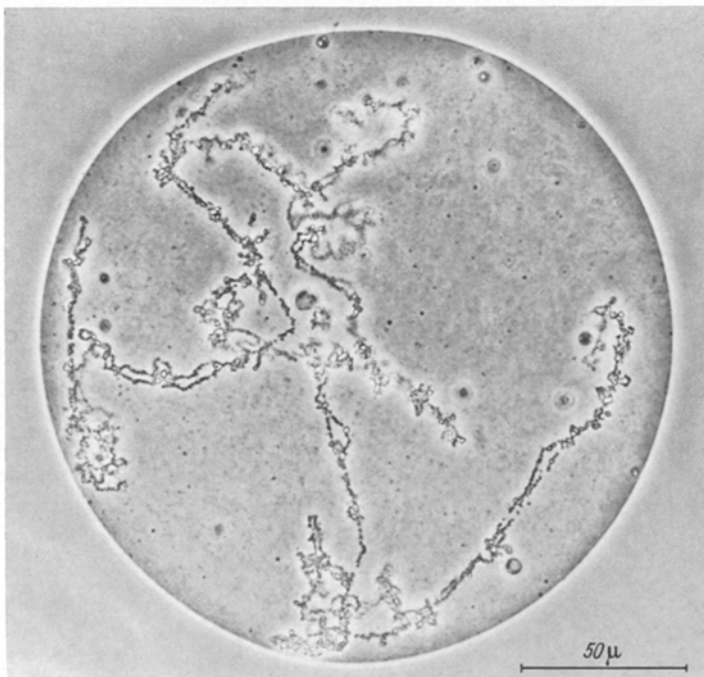


Abb. 6. In den großen Oocytenkernen älterer Follikel ist der Aufbau der Perlschnurstränge aus linear hintereinander aufgereihten Granula deutlich. Technik wie Abb. 3. 440 ×

Zustand Durchmesser von 2—8 μ und enthalten je nach Ausdehnung eine unterschiedlich große Anzahl heller Blasen, die den homogenen Kugelinhalt bis auf schmale Zwischenwände zurückdrängen. Diese Wabenstruktur gibt jeder α -Kugel eine individuelle Gestalt. Laufen die beiden homologen Chromosomen in hinreichendem Abstand nebeneinanderher, so liegt

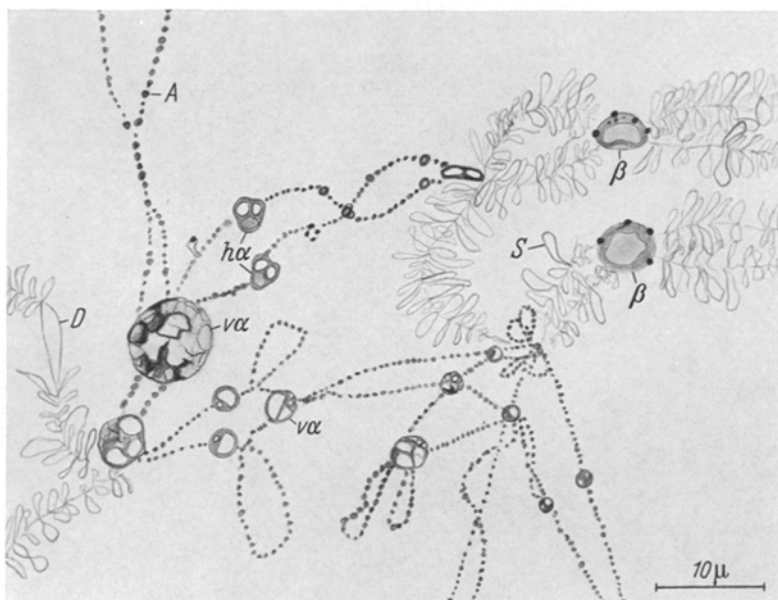


Abb. 7. Leicht schematisierte Darstellung eines Ausschnittes aus einem Oocytenkern von *Locusta*. Die Perlschnurstränge sind durch Granulaverschmelzung auf verschiedene Weise miteinander verklebt. Auch zwischen den Perlschnursegmenten und den Lampenbürstenchromosomen (= feinfädiges Material) bestehen Haftpunkte. A Axialgranulum, $h\alpha$ homologe α -Kugeln, $v\alpha$ verschmolzene α -Kugeln, β β -Kugel, S Schleife (loop), D Doppel-loop-Brücke. 1440 $\times$

jeder Kugel eine gleichartig aussehende Partnerkugel an entsprechender Stelle gegenüber. Ist die Distanz der Homologen aber — wie in den meisten Fällen — zu gering, so umfaßt eine einzige α -Kugel beide Stränge und stellt wahrscheinlich das Verschmelzungsprodukt der ursprünglich gesondert angelegten homologen Kugeln dar. Die Hoffnung, in den α -Kugeln konstante Markierungspunkte für eine Chromosomenkartierung gefunden zu haben, etwa analog den „landmark loops“ der Amphibien-Lampenbürstenchromosomen (CALLAN u. LLOYD, 1960), hat sich nicht erfüllt. Die Kugeln treten vielmehr von Kern zu Kern in wechselnder Anzahl und Größe auf und neigen in unterschiedlichem Ausmaß zur Fusion mit benachbarten Strukturen.

Viele Zwischenstufen leiten zwanglos von den großen α -Kugeln zu den Axialgranula über. Vermutlich unterscheiden sich die α -Kugeln und Axialgranula nicht qualitativ, sondern nur in der Substanzmenge. Unter

Energiemangel und in hypertoner Lösung (vgl. S. 351 ff.) verschmelzen Axialgranula und α -Kugeln miteinander in einem solchen Ausmaß, daß die gesamten Perlschnurchromosomen zu großen wurst- bis kugelförmigen Klumpen zusammenschrumpfen (Abb. 19, 20, 21). Diese Gebilde erinnern in ihrer typischen Blasenstruktur an normale α -Kugeln, wenn sie

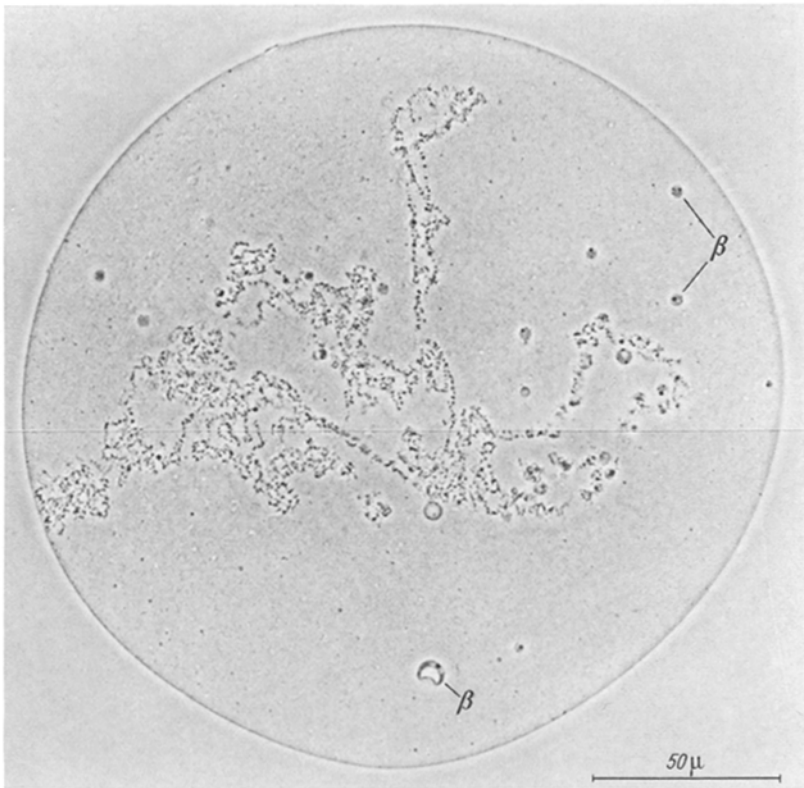


Abb. 8. Oocytenkern: Im Gegensatz zu den α -Kugeln liegen die β -Kugeln (β) nicht auf dem Perlschnurmateriale. Technik wie Abb. 2. 500 $\times$

auch in ihren Dimensionen über das gewohnte Maß hinausgehen. Die Struktur dieser künstlich eingeleiteten Fusionen läßt daran denken, daß auch die normalen α -Kugeln aus der Verschmelzung mehrerer Axialgranula hervorgehen könnten. In der Tat finden sich für diese Hypothese weitere Anhaltspunkte, wenn die Kontraste durch Färbung mit Karmin-Essigsäure erhöht werden. Dann lassen sich in wenigen günstigen Fällen Fadenabschnitte mit kleinen Granula erkennen, die schleifenförmig durch die α -Kugel hindurchziehen.

In den Oocytenkernen adulter Tiere kommen die α -Kugeln in größerer Anzahl vor als in den Eikernen der Larven (vgl. Abb. 4 mit 3).

b) Das feinfädige Material und die β -Kugeln

Nach Präparation und Aufbewahrung des Ovars in der bereits erwähnten Ca-Ringerlösung (5 g NaCl, 0,42 g KCl, 0,25 g CaCl_2 , Aqua dest. ad 1000) bleibt die Perlschnurstruktur im heilen Kern optimal erhalten. Der übrige Kernraum erscheint bis auf einige Kugeln von charakteristischem Aufbau (β -Kugeln) homogen ohne besondere Einschlüsse (Abb. 8).

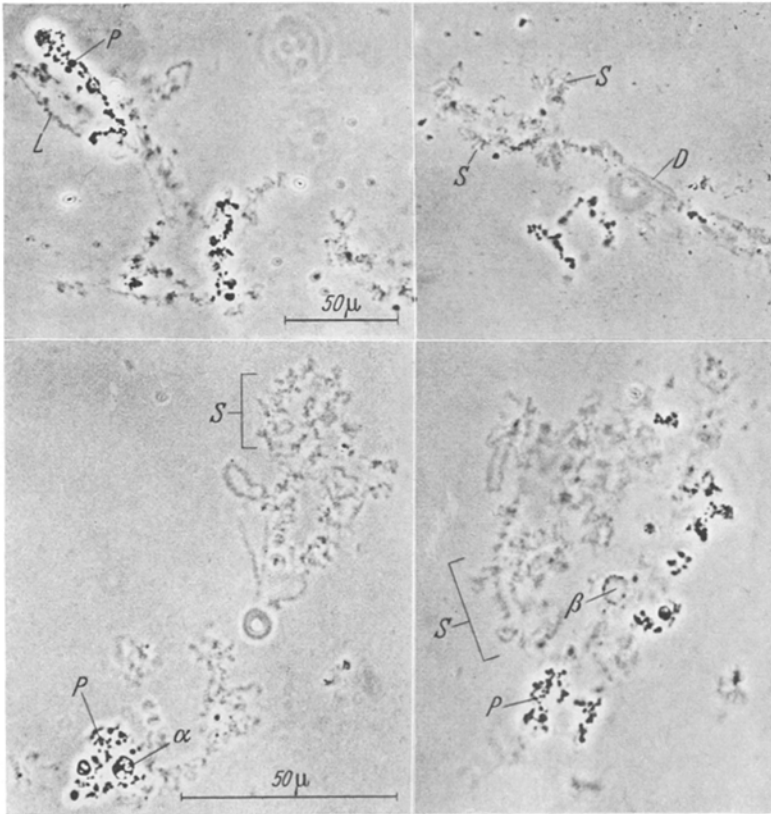


Abb. 9. Teilstücke freipräparierter Chromosomen in Ca-Ringerlösung. Die stark lichtbrechende Perlschnurstruktur (P) hebt sich deutlich von den Lampenbürstenchromosomen (L) ab. Die Schleifen (S) der Lampenbürstenchromosomen sind nur unscharf dargestellt. α α -Kugel, β β -Kugel, D Doppelloop-Brücke. Technik wie Abb. 2. Oben 300 $\times$, unten 575 $\times$

Diese übersichtlichen Verhältnisse ändern sich nach Übertragung des Ovars in eine andere Ringerlösung, in der das Calciumchlorid durch eine äquivalente Menge Kaliumchlorid ersetzt worden ist (K-Ringer: 5 g NaCl, 0,67 g KCl, Aqua dest. ad 1000). In diesem Medium tritt nach etwa 10 min eine sehr langsam fortschreitende Verkürzung der Perlschnurstränge ein. Da die Schnüre an vielen Haftpunkten miteinander verklebt

sind und an mindestens einer Stelle an der Kernmembran festhängen, wird während der Schrumpfung häufig das gesamte Perlschnurmateriale im Laufe von etwa 45 min an den Rand des Kerns gezogen. Im übrigen Kernraum fallen ungefähr 10 min nach dem Einlegen des Ovars in den K-Ringer zahlreiche diffuse Stränge auf, die an mehreren Stellen an den Perlschnurchromosomen ansetzen, aber auch untereinander und mit der

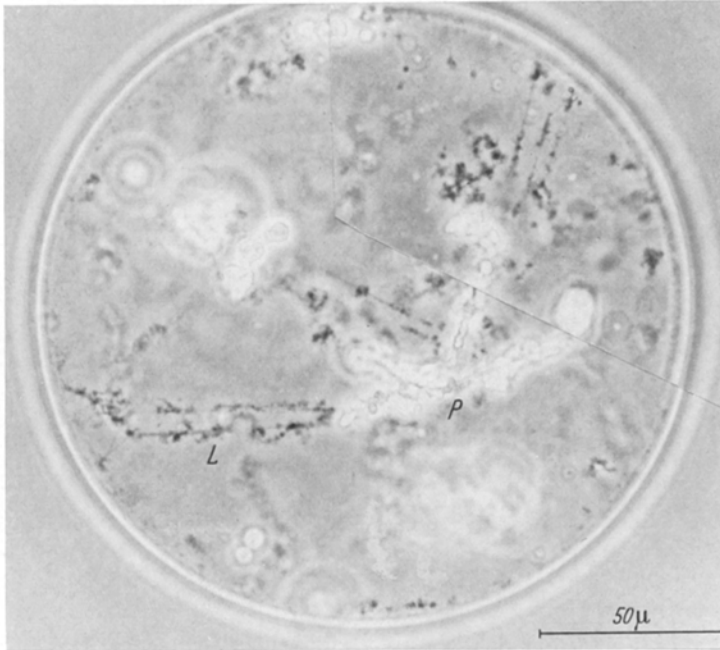


Abb. 10. Oocytenkern mit Lampenbürstenchromosomen (*L*), die zwischen der Kernmembran und den durch Kältebehandlung kontrahierten Perlschnursegmenten (*P*; im Phasenkontrast überstrahlt) ausgespannt sind. Lampenbürstenchromosomen in K-Ringerlösung sichtbar gemacht, durch Veronal-Ringer im Kontrast erhöht. Phasenkontrast, 490 ×

Kernmembran verknüpft sind, so daß sie als weites Maschenwerk den Kern erfüllen (Abb. 10, 11, 12).

Unübersichtliche Verknäuelungen und die gedrängte Fülle dieses feinfädigen Materials verhindern eine detaillierte Analyse des Strangaufbaus. Daher wurde der Kern mit Glasnadeln angestochen, worauf der Inhalt zum Teil selbständig herausfloß, zum anderen Teil mit den Nadeln herausgezogen werden mußte. Diese Präparationsmethode macht zwar die Verknüpfungen zwischen den Perlschnurchromosomen und dem feinfädigen Material recht deutlich und erlaubt auch eine angenäherte Abschätzung der Gesamtausdehnung der diffusen Strukturen (Abb. 13), bringt aber wenig Aufschluß über den Feinbau, da die unvermeidlichen Zerrungen bei der Chromosomenisolation das fragile Fadenwerk übermäßig

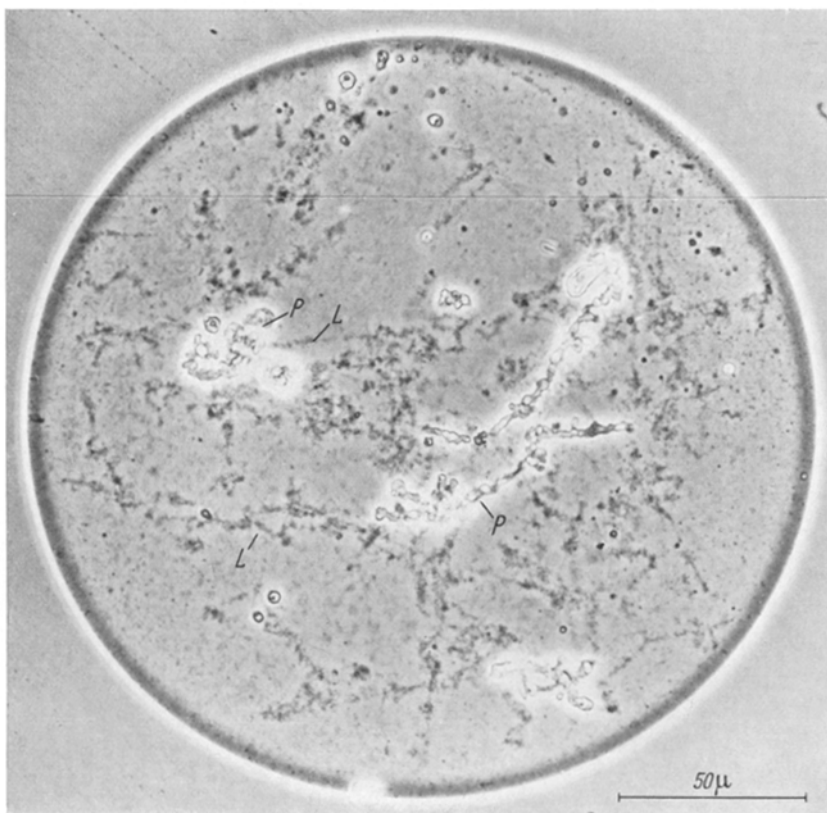


Abb. 11. Derselbe Kern (wie in Abb. 10) stärker gequetscht, wodurch alle Lampenbürstenstränge in eine optische Ebene gebracht wurden. Darstellungsverfahren und Bezeichnungen wie in Abb. 10. 490 ×

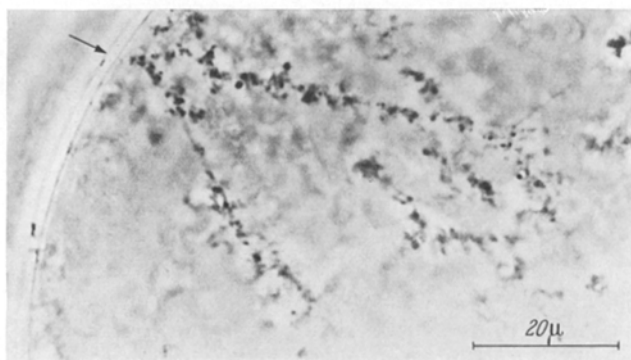


Abb. 12. Teil eines Oocytenkerns mit einem Lampenbürstenchromosom, das an einer Stelle (→) an der Kernmembran haftet. Darstellung in K-Ringerlösung. Phasenkontrast. 960 ×

strecken und an vielen Stellen zerreißen. Nur in einigen seltenen, besonders günstigen Fällen bleiben Teile des feinfädigen Materials angenähert im unverletzten Zustand erhalten und zeigen dann folgenden Aufbau: Von einer Achse zweigen seitlich zahlreiche in sich zurücklaufende Schlingen ab (Abb. 9, 14), die den „normal-loops“ der Amphibien-Lampenbürstenchromosomen (CALLAN u. LLOYD, 1960) ähnlich sind. Sie entfernen sich jedoch durchschnittlich nur 5μ weit von der Achse, sind also etwa viermal kürzer als die „normal-loops“ der Amphibienchromosomen. Gelegentlich laufen anstelle der Schleifen auch zwei kurze gestreckte Fäden in Richtung der Achse parallel nebeneinanderher (Abb. 15). Es hat den Anschein, als würden sie eine Lücke in der Achse überbrücken. Vermutlich handelt es sich um Paare gestreckter Schleifenstränge, die an Stellen starker Zugbeanspruchung mechanisch erzeugte Brüche überbrücken. Sollte es sich tatsächlich um „Doppel-loop-Brücken“ handeln, so wäre das neben den Schleifen ein weiteres mit den Amphibien-Lampenbürstenchromosomen übereinstimmendes Merkmal. Auf Grund der Ähnlichkeit dieser charakteristischen Kennzeichen soll das feinfädige Material als „Lampenbürstenchromosomen“ bezeichnet werden.

Da es noch nicht gelungen ist, die isolierten Chromosomen exakt in eine

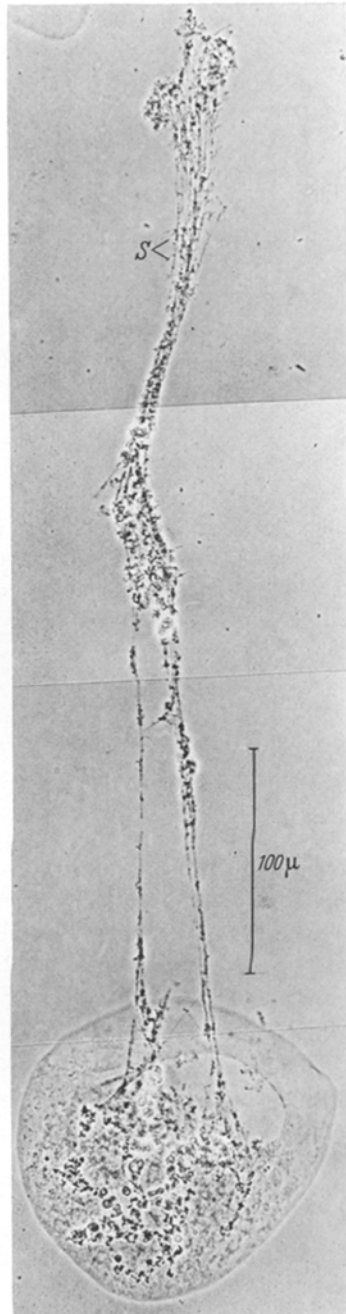


Abb. 13. Die Lampenbürstenchromosomen sind etwa zur Hälfte aus dem Kern herausgezogen worden, während das Perlschnurmaterial größtenteils im aufgeplatzten Kern zurückgeblieben ist. Die Perlschnurabschnitte erscheinen nicht als einzelne Segmente innerhalb der Lampenbürstenchromosomen, sondern als zusammenhängende Einheit. Die Schleifen (S) sind bei der Präparation zerrissen oder in die Länge gestreckt worden. Präparation in K-Ringerlösung. $300\times$

optische Ebene zu legen und die Schleifen außerdem von der Brownschen Molekularbewegung heftig hin- und hergerissen werden, geben die Photographien die Chromosomenstruktur nur unscharf wieder. Die Lampenbürstenchromosomen lassen sich mit feinen Glasnadeln um ihre zehnfache Länge bis auf eine elastische Fibrille ausdehnen, die nach dem Zerreißen zusammenschnurrt. Diese Fibrille liegt an der Grenze der Sichtbarkeit und erscheint gleichmäßig ohne seitliche Abzweigungen, aber mit kleinen, unregelmäßig aufeinanderfolgenden Pünktchen, die an Chromomeren erinnern. Unter der Zugbeanspruchung bei derartigen Mikromanipulationen reißen wahrscheinlich alle Doppelschleifen an ihren Ansatzpunkten auf und werden zwischen den Abschnitten der Zentralachse ausgespannt. Die Fibrille bestünde dann alternierend aus Achsenstückchen und gestreckten loops.

Die bisher geschilderten Präparationsmethoden ermöglichen allerdings nur in seltenen Glücksfällen eine überzeugende Darstellung der Lampenbürstchenstruktur. Einer detaillierten Beobachtung stehen folgende Schwierigkeiten im Wege: Einerseits drängen sich die Chromosomen im engen Kernraum des unverletzten Keimbläschens derart, daß die einzelnen Stränge nur über kurze Abschnitte verfolgt werden können. Andererseits zerreißen die Chromosomen beim Versuch ihrer Isolation. Klarere Verhältnisse schufen schließlich verschiedene Eingriffe (Energie-mangelzustände), die zu einer extremen Verkürzung der Perlschnurabschnitte führten, wodurch der übrige Kernraum einigermaßen gelichtet wurde (s. S. 351 ff.). Die deutlich zwischen den verklumpten Perlschnurchromosomen und der Kernmembran ausgespannten Stränge des feinfädigen Materials (Abb. 10) werden nach dieser Behandlung wie im Normalfall erst nach einigen Minuten im K-Ringer sichtbar. Da die Schleifen der Lampenbürstenchromosomen im K-Ringer die Neigung haben, mit der Achse zu verkleben, wurde der Kern nach 15 min Aufenthalt im K-Ringer in Veronal-Ringer übertragen (Ca-Ringer mit $n/10$ Natrium-Diäthylbarbiturat auf pH 7,2 gepuffert). Diese neutrale Ringerlösung verhindert die störenden Matrixverquellungen, so daß die Schleifen in optimaler Schärfe hervortreten (Abb. 15).

Beim nachträglichen Vergleich mit anderen Insekten mit panoistischen Ovarien hat sich herausgestellt, daß *Locusta* zwar als ein hervorragendes Objekt zum Studium der Perlschnurstruktur gelten kann, für die Analyse der Lampenbürstenchromosomen dagegen weniger günstig ist. Bei der grünen Laubheuschrecke *Tettigonia viridissima* sind die Chromosomen offenbar stabiler. Hier gelang es bereits beim ersten Versuch der Isolation von Lampenbürstenchromosomen, viele loops unzerstört zu erhalten (Abb. 14a).

Neben den α -Kugeln kommen in allen Kernen von *Locusta* noch andersartige Kugeln vor, die niemals auf den Perlschnurabschnitten liegen

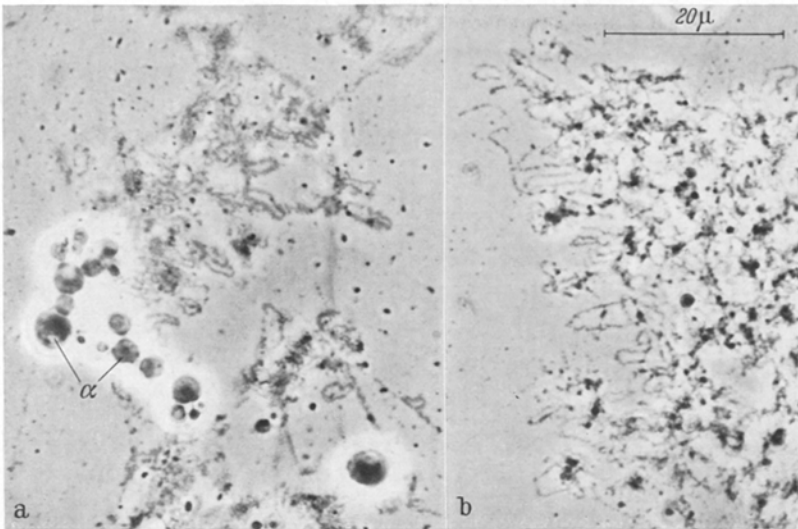


Abb. 14 a u. b. Schleifen (loops) der Lampenbürstenchromosomen von *Tettigonia viridissima* (a) und *Locusta migratoria* (b). Das feinfädige Material ist bei *Locusta* bis auf die Randbezirke stark verknäueln. α α -Kugeln von *Tettigonia*. Darstellungsverfahren wie Abb. 13; Chromosomen freipräpariert. 1200 $\times$

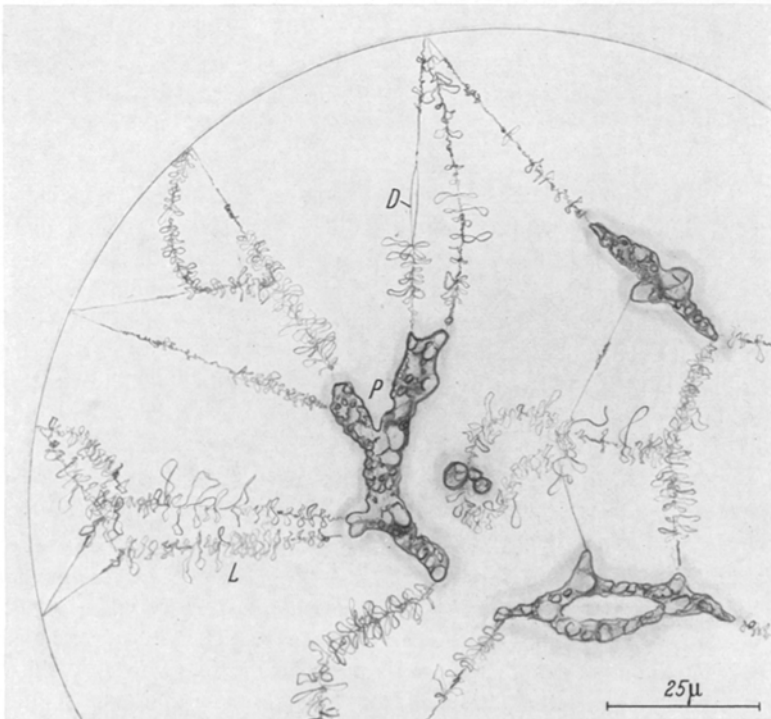


Abb. 15. Teil eines Oocytenkernes, in dem das Perlschnurmateriel (P) durch Kältebehandlung kontrahiert ist. Die Lampenbürstenchromosomen (L) haften an der Kernwand und an den Perlschnursegmenten. D Doppel-loop-Brücke. Zeichnung mit Wild Forschungsmikroskop M 20 mit Zeichentubus. 800 $\times$

und als β -Kugeln bezeichnet werden. Nach der Chromosomenisolation und anderen Darstellungsmethoden des feinfädigen Materials (K-Ringer, Hypertonlösung) hat sich gezeigt, daß die β -Kugeln nicht frei im Kernsaft schwimmen, sondern an den Strängen des feinfädigen Materials, d. h. an den eigentlichen Lampenbürstenchromosomen haften. Sie treten in wechselnder Anzahl von einigen wenigen bis fast dreißig Kugeln pro Kern ohne deutlichen Bezug zum Eientwicklungsstadium auf. Die β -Kugeln häufen sich an der Peripherie des Oocytenkerns. Sie haben im Gegensatz zu den α -Kugeln keine individuelle Struktur, sondern variieren nur in der Größe

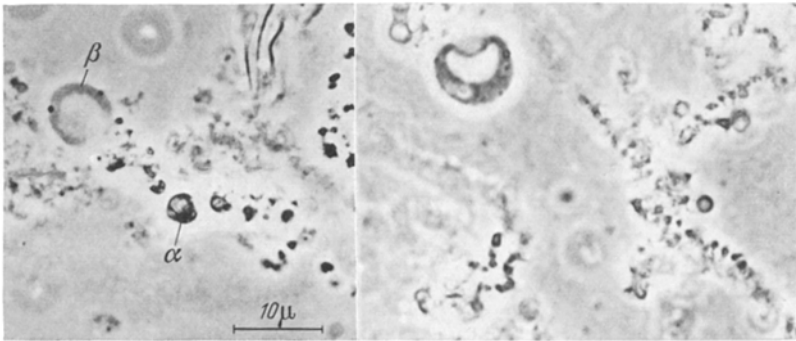


Abb. 16. β -Kugeln von *Locusta migratoria* im isolierten Zustand (links) und im unverletzten Oocytenkern (rechts). Rechts ist die Rindenschicht der β -Kugel artifiziell in den Innenraum eingedrückt worden. Präparation in Aqua dest. 1200 $\times$

von 2—7 μ Durchmesser (Messungen im Vitalzustand). Die kleinen β -Kugeln sind homogen mit wenigen, außen an der Peripherie sitzenden Granula. Bei den größeren β -Kugeln heben sich eine etwa 2 μ dicke, optisch dichtere und stärker basophile Rindenschicht und ein lichtdurchlässiger, schwach basophiler Innenraum deutlich voneinander ab (Abb. 16). Die Außenschicht der β -Kugel läßt sich wie die Wand eines Gummiballs eindellen (Abb. 16). Über die Oberfläche verteilen sich etwa zehn Granula, die 0,5 μ dick sind und deutlich aus der Kugel herausragen (Abb. 7). In Karmin-Essigsäure-gefärbten Präparaten wird in günstigen Fällen deutlich, daß eine mit dem feinfädigen Material in Verbindung stehende Fibrille schleifenförmig durch die β -Kugel hindurchläuft. Im Gegensatz zu den α -Kugeln treten die β -Kugeln niemals paarig auf.

Das Chromosomenmaterial der wachsenden Oocyte von *Locusta* tritt also in zwei Strukturtypen auf. Der überwiegende Teil des Fadengerüsts entspricht den Amphibien-Lampenbürstenchromosomen; ein kleinerer Teil weicht von diesem Grundtyp ab und gleicht einer gewundenen und verknäuelten Perlschnur. Sowohl die Perlschnurstränge als auch die Lampenbürstenchromosomen laufen paarig nebeneinanderher und sind umeinander gewunden. Das entspricht den Erwartungen; denn da das

„Perlschnurstadium“ dem Pachytän folgt, sollten sich die Chromosomen in einem dem Diplotän entsprechenden Stadium befinden. Da die Perlschnurfäden und die Lampenbürstenabschnitte an zahlreichen Haftpunkten miteinander im Zusammenhang stehen, gelang es nicht zu entscheiden, ob die Perlschnurstruktur ein einziger zusammenhängender Doppelfaden ist oder ob sie sich aus mehreren Abschnitten aus vielleicht verschiedenen Chromosomen zusammensetzt.

Die Gesamtlänge der Perlschnursegmente, bezogen auf den haploiden Satz, erreicht etwa 2,5 mm. Die Achsenlänge der feinfädigen Lampenbürstenchromosomen beträgt nach groben Schätzungen das Zehnfache. Werden schließlich noch die Schleifen dazugerechnet, so erhöht sich die Länge wahrscheinlich mindestens um eine weitere Zehnerpotenz. Dieser Wert entspricht den Erwartungen; denn an den Lampenbürstenchromosomen von *Triturus*, dessen DNS-Menge mehr als zehnmal größer als die der übrigen Metazoen ist, wurde von GALL u. CALLAN (1962) eine Gesamtschnurlänge des haploiden Satzes von 10 m errechnet.

2. Entwicklung der Lampenbürstenstruktur während der Oogenese und Ontogenese

Bei den beschriebenen Perlschnur- und Lampenbürstenstrukturen handelt es sich um funktionsbedingte Chromosomenmodifikationen, die während der meiotischen Prophase auftreten und in das Schema des Meioseablaufs einzuordnen sind.

Die ersten drei Prophasestadien der weiblichen Reifeteilung — Leptobis Pachytän — beschränken sich bei *Locusta* vorwiegend auf die Larvalentwicklung. Bei adulten Tieren treten nur noch in den ersten Tagen nach der Imaginalhäutung einige Zygo- und Pachytänkerne auf, dann sind die frühen meiotischen Prophasestadien aller künftigen Eier bereits durchlaufen. Es folgt die Wachstumsphase der primären Oocyten mit Kernstrukturen, die in charakteristischer Weise vom vielfach untersuchten „Normalverlauf“ der männlichen Meiose abweichen.

Noch im Pachytän gleichen die Chromosomen der Männchen und Weibchen einander fast vollständig und zeigen auch einen übereinstimmenden Nukleolus, der an einem deutlichen Chromomer angeheftet ist (vgl. Abb. 17a mit Fig. 5 in JOHN u. HENDERSON, 1962). Im Vergleich zur Zellgröße (Durchmesser etwa $30 \mu^1$) haben die Kerne im Zygo- und Pachytän den relativ beachtlichen Durchmesser von 25μ (Abb. 17). Aus den Lagebeziehungen im Germarium ist zu ersehen, daß auf das Pachytänstadium die Phase des ooplasmatischen Wachstums der Oocyten folgt. Gleichzeitig mit dem Beginn des Plasmawachstums bilden die

¹ Durchmesser jeweils an lebenden Ovariolen im ungequetschten Zustand gemessen.

Chromosomen die Lampenbürstenstruktur aus und behalten sie bis zum Ende der Oogenese bei. Die auffälligen Perlschnurchromosomen und das feinfädige Material sind die mit dem Oocytenwachstum verknüpften Chromosomenstrukturen.

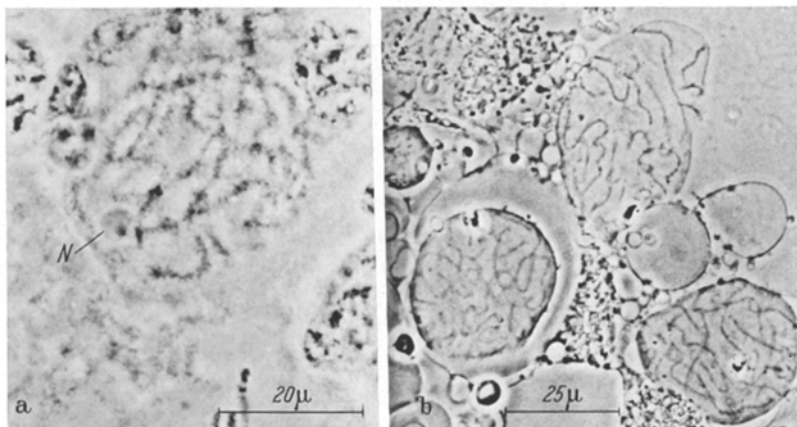


Abb. 17 a u. b. Pachytän- (a) und Zygotänkerne (b) aus dem Germarium von Larven. a Karmin-Essigsäure-Quetschpräparat, b Germarium lebend in Ca-Ringerlösung gequetscht. N Nukleolus. Links 960 $\times$, rechts 616 $\times$

Die Entstehung der Perlschnurstränge erfolgt zunächst in Form einzelner Klumpen, die in Kernen von 25 μ Durchmesser bei einer Zellgröße von 40—50 μ in Erscheinung treten (Abb. 18). Der Nukleolus

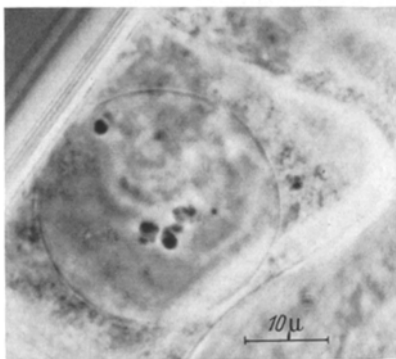


Abb. 18. Junge Oocyte im Germarium; im Kern zeigen sich die ersten Perlschnurstrukturen. Lebendpräparat in Ca-Ringerlösung. 1120 $\times$

ist nicht mehr sichtbar, wenn sich die Perlschnurchromosomen herausbilden. Er zeigt somit ein mit den Verhältnissen in der Spermatogenese übereinstimmendes Verhalten, wo der Nukleolus in den späteren Prophasestadien ebenfalls nicht mehr zu erkennen ist (HENDERSON, 1964). Dem Verschwinden des echten Nukleolus folgt also die Ausbildung der Perlschnurabschnitte. Beide Strukturen scheinen sich auszuschließen, vielleicht funktionell einander zu vertreten.

Die ooplasmatische Wachstumsphase ist je nach dem Alter des Tieres verschieden lang. Die ersten größeren Oocyten treten im zweiten Larvalstadium auf. Da bereits einige Tage nach der Imaginalhäutung sämtliche Eier, die ein Tier zur Ablage bringt, mit dem Wachstum begonnen haben,

legen die jungen Tiere Eier mit kürzeren Wachstumszeiten ab als die alten Weibchen. Die reifen Oocyten einer jungen Heuschrecke sind während der Larvalzeit gewachsen, bei 30°C etwa vier Wochen lang, die Eier sehr alter Weibchen haben dagegen Wachstumszeiten bis zu acht Wochen hinter sich. Im Verlauf dieser Wachstumsperiode einschließlich der achttägigen Endphase, d. h. der Dottereinlagerung, behalten die Oocytenchromosomen ihre Struktur im wesentlichen unverändert bei, während der Kern von 25 μ bis auf 100 μ im Durchmesser anwächst. Die Grundzüge der Chromosomenstruktur ändern sich weder mit dem Alter des Tieres noch mit dem Stadium des Oocytenwachstums, wenn man von geringfügigen Unterschieden absieht, die bereits beschrieben worden sind (S. 337 u. 341). Diese Verschiedenheiten betreffen lediglich das Ausmaß der Perlschnurverknäuelung und die Anzahl der α -Kugeln.

3. Experimentelle Beeinflussung der Kernstruktur als Hilfsmittel der Chromosomenanalyse

In der Hoffnung, Syntheserate und Transportgeschwindigkeit in unterschiedlichem Ausmaß zu verzögern und dadurch eventuell an bestimmten Chromosomenorten Genproduktanreicherungen zu erzielen, wurde das Verhalten der Funktionsstrukturen unter eingeschränkter Energieversorgung geprüft. Energiemangelzustände bei erniedrigter Temperatur (0°C) und unter Sauerstoffentzug im Stickstoffmilieu führen zu einer reversiblen Ballung der Perlschnursegmente zu fünf bis zehn stark verkürzten, länglichen, gekrümmten Klumpen, deren vakuoliger Aufbau mit der Struktur der α -Kugeln übereinstimmt (Abb. 19). Werden die Ovarien von der Tracheenzuleitung abgeschnitten und mehrere Stunden lang isoliert gehalten, so verklumpt das Perlschnurmateriel wie bei der Stickstoff- und Kältebehandlung. Dabei spielt es keine Rolle, ob die losgelösten Ovarien in der Leibeshöhle desselben Tieres gelassen, in andere Individuen transplantiert oder in vitro in Ca-Ringerlösung aufbewahrt werden. Dieser unter verschiedenen Versuchsbedingungen einheitlichen Reaktionsweise der Perlschnurchromosomen könnte eine ebenso einheitliche Ursache zugrunde liegen: eine mehr oder minder starke Einschränkung der Energiezufuhr.

Das feinfädige Material scheint gegenüber einer Drosselung der Energieversorgung weniger empfindlich zu sein. Bei einer gleichartigen Zusammenballung wie bei den Perlschnurchromosomen müßten die feinfädigen Lampenbürstenstränge im unversehrten Kern in Ca-Ringerlösung sichtbar werden. Sie lassen sich aber wie im Normalzustand erst im Ca-freien K-Ringer oder nach Verletzung der Kernmembran darstellen und erscheinen dann — wenn überhaupt — nur wenig kontrahiert (vgl. Abb. 19c mit Abb. 21). Dieses unterschiedliche Verhalten verschiedener Abschnitte der Chromosomen läßt vermuten, daß der Verkürzung der

Perlschnurstränge nicht eine Spiralisierung der Chromosomenachse, sondern eine gesteigerte Verklebungstendenz der Axialgranula zugrunde liegt.

Die ersten starken Zusammenballungen des Perlschnurmateri als treten im Stickstoffmilieu oder unter normalen atmosphärischen Bedingun-

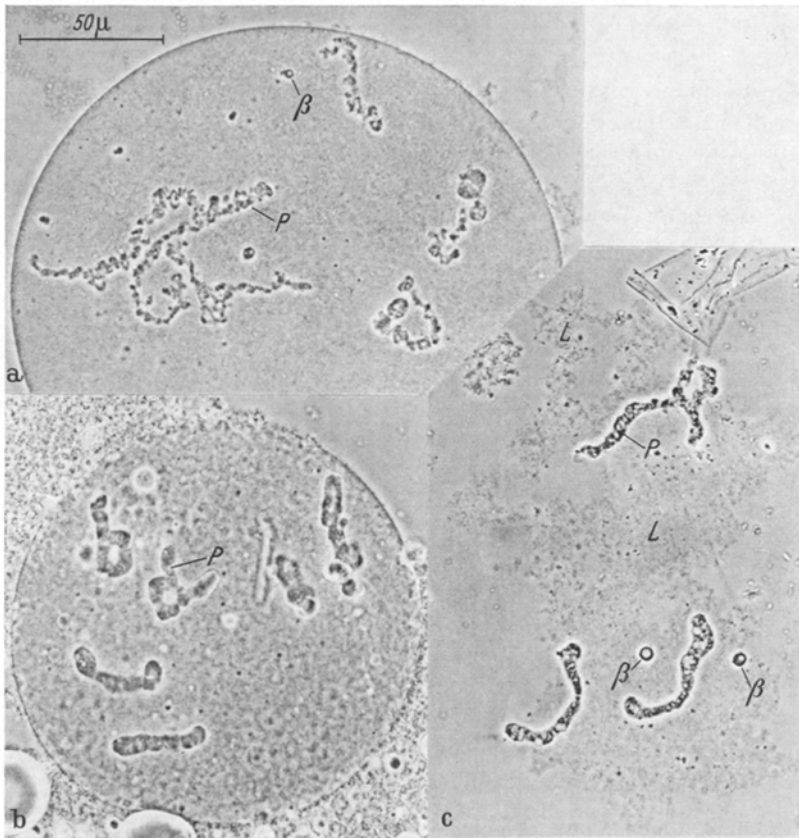


Abb. 19a—c. Oocytenkerne aus Tieren, die 1—3 Tage bei 0°C gehalten wurden. Die Perlschnurabschnitte (P) haben sich zu kurzen wurstförmigen Klumpen zusammengeballt; die Lampenbürstenchromosomen (L) und die β -Kugeln (β) scheinen vom Kälteeinfluß weniger stark betroffen zu sein. a 1 Tag, b 2 Tage, c 3 Tage Kältebehandlung. c Chromosomenmaterial mit dem Kernsaft aus dem geplatzen Keimbläschen herausgeflossen. Präparation in Ca-Ringerlösung. 390 $\times$

gen bei 0°C schon nach drei Stunden auf und betreffen zunächst nur die jungen Kerne im Anfangsabschnitt der Ovariole. Mit auffallenden Zeitdifferenzen von Kern zu Kern werden dann in den folgenden Stunden in unregelmäßiger Folge auch die Kerne der älteren Oocyten von der Kontraktion erfaßt. Einige Grad über Null wirkt sich der Kälteeffekt weniger deutlich aus: Bei 6°C machen sich erst nach drei Tagen mäßige Verkürzungen der Perlschnurchromosomen bemerkbar.

Die Verklumpung der Perlschnurstränge ist vollständig reversibel. Wenn die Tiere in Normalverhältnisse zurückgeführt werden, beginnen sich die zusammengeballten Perlschnursegmente zu strecken und treten

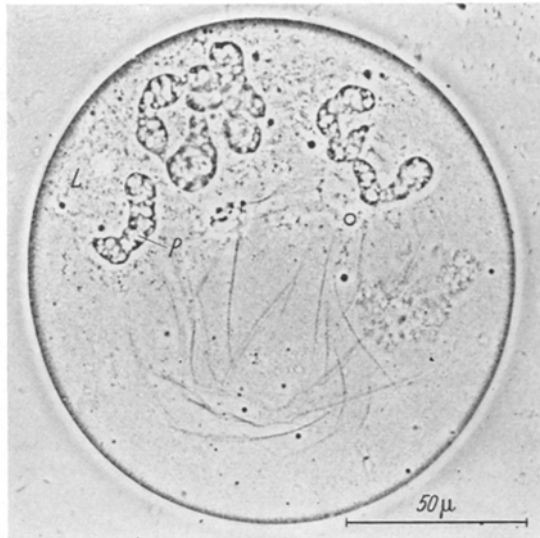


Abb. 20. Oocytenkern aus einem Ovar, das 9 h in hypertoner Lösung gelagert wurde, Perlschnur- (P) und feinfädiges Material (L) stark kontrahiert. Technik wie Abb. 2. 480 ×



Abb. 21. Oocytenkerne, in denen das Perlschnurmaterial (P) und die Lampenbürstenchromosomen (L) unter Einwirkung hypertoner Lösungen stark zusammengeschrumpft sind. Die vier großen Kugeln im rechten Bild, die in ihrer Struktur an α -Kugeln erinnern, sind aus den Perlschnursträngen hervorgegangen. Lebendquetschpräparate in Ca-Ringerlösung. Links 350 ×, rechts 750 ×

dann wieder als lange Fäden in Erscheinung, auf denen sich das Synthesematerial etwa wie die Tautropfen auf einer Spinnweben in kleinen Kügelchen gleichmäßig verteilt. Sogar nach drei Tagen Kältebehandlung bei

0°C stellen die Chromosomen in einigen Stunden ihren Perlschnuraspekt wieder her. Dabei fällt erneut die raschere Reaktion der jungen Oocytenkerne auf.

In hypotonischen Ringerlösungen quellen sämtliche Kernkomponenten so stark auf, daß die Oocytenkerne leer erscheinen. Werden die Ovarien nachträglich in isotone Lösungen zurückgeführt, so kommen die Perlschnurstrukturen und die β -Kugeln wieder zum Vorschein. Diese Quellungserscheinungen sind an das zelleigene Milieu gebunden; denn sie lassen sich an isolierten Kernen nur dann nachvollziehen, wenn diese noch von einer genügenden Menge Cytoplasma umgeben sind. Wird dagegen der vom Ooplasma befreite Kern in einen Tropfen hypotonischer Lösung oder sogar Aqua dest. überführt, so quellen die Axialgranula und die α -Kugeln nur einige Sekunden lang auf und treten dann besonders kontrastreich wieder in Erscheinung. Da gleichzeitig das Kernvolumen zunimmt und damit den Chromosomen mehr Platz zur Ausbreitung geboten wird, hat sich destilliertes Wasser als bestes Medium zur Analyse der Perlschnurstränge bewährt.

Andersartige Folgen stellen sich in hypertonischen Ringerlösungen ein. Bei plötzlicher Übertragung der Ovariole in eine solche Lösung kommt es innerhalb kurzer Zeit zu heftigen Schrumpfungen des Perlschnur- und feinfädigen Materials, verbunden mit unspezifischen Zerreißen und Koagulationen. Nur wenn die Konzentration der zunächst isotonen Ca-Ringerlösung ganz allmählich innerhalb von etwa einer Stunde erhöht wird, ziehen sich die Chromosomen gleichmäßig zusammen und verklumpen wie unter eingeschränkter Energieversorgung. Die Perlschnurstränge stimmen dann schon bei ungefähr doppelt erhöhter Konzentration der Ringerlösung in Struktur und Ausmaßen mit den länglichen Gebilden überein, die bei Stickstoff- und Kältebehandlung entstehen (vgl. Abb. 20 mit Abb. 19). In Lösungen noch höherer osmotischer Werte ist es sogar möglich, das gesamte Perlschnurmaterial zu vier bis fünfzehn großen Kugeln zu verdichten, die wie übergroße α -Kugeln aussehen (Abb. 21). Im Gegensatz zu den Folgen verminderter Energiezufuhr schrumpfen im hypertonischen Medium auch die feinfädigen Lampenbürstenchromosomen zu kompakten Strängen zusammen und werden an die Perlschnurabschnitte herangezogen, soweit es die Haftstellen an der Kernmembran zulassen (Abb. 21).

4. Histochemische Untersuchungen

Die Deutung der Perlschnurstränge und des feinfädigen Materials als Chromosomen stützt sich in morphologischer Hinsicht zunächst auf den paarigen Verlauf dieser Stränge. Ein entscheidender Beweis für die Chromosomennatur ist aber erst der Nachweis von DNS als zentralem Bauelement der Funktionsstrukturen. Die Feulgenreaktion war negativ: alle

Kernkomponenten blieben ungefärbt. Das war zu erwarten, da die chromosomale DNS offenbar in weitgehend entspiralisierter Form vorliegt. Auch bei den Lampenbürstenchromosomen der Molche mit ihrem extrem hohen DNS-Gehalt sind die Chromosomenachsen feulgennegativ; lediglich die Chromomeren zeigen eine schwach positive Reaktion (CALLAN u. MCGREGOR, 1958). Die *Locusta*-Chromosomen enthalten entweder gar keine Chromomeren, oder diese sind so klein, daß sie mit der Feulgenfärbung nicht nachgewiesen werden können.



Abb. 22. Oocytenkern, in dem die Perlschnurstränge durch DNase zerstückelt worden sind. Technik wie Abb. 3. 380 ×

Ein empfindlicheres DNS-Nachweisverfahren ist die Enzymbehandlung. An fixierten Präparaten bleibt die DNase-Einwirkung im allgemeinen unsichtbar, da die mit dem Fixierprozeß verbundenen Eiweißverklebungen den Chromosomenzusammenhalt zusätzlich verfestigen. Infolgedessen wurden die Verdauungsexperimente an lebenden Chromosomen durchgeführt. Kleine DNase-Kristalle wurden im Ca-freien K-Ringer (zusätzlich 0,1 g $MgCl_2$ ad 1000 ml) in die Nähe isolierter Kerne sowie auch freipräparierter Chromosomen geschoben. Schon nach 5 min läßt sich der eindrucksvolle Vorgang der Enzymwirkung unter dem Mikroskop verfolgen: Die Lampenbürstenchromosomen und die Perlschnurstränge zerbrechen schrittweise in immer kürzere Abschnitte, bis nach 25 min nur noch kleine Stückchen übrigbleiben (Abb. 22).

Dieses Ergebnis entspricht den Befunden von CALLAN u. MCGREGOR (1958) an Amphibien-Lampenbürstenchromosomen und von LEZZI (1965)

an Polytänchromosomen. Auch bei den Heuschreckenchromosomen erweist sich die DNS als die für den chromosomalen Längszusammenhalt entscheidende Substanz.

Alle Kernkomponenten (α - und β -Kugeln, Perlschnur- und feinfädiges Material) sind deutlich basophil und färben sich mit Galloeyanin an. Nach dreistündiger RNase-Einwirkung (0,5%, 37°C) geht die Anfärbbarkeit vollständig verloren, während die Follikelzellochromosomen noch in optimaler positiver Farbreaktion hervortreten. In Übereinstimmung mit der intensiven RNS- und Eiweißmarkierung über den Oocytenkomponenten autoradiographischer Präparate ist es sehr wahrscheinlich, daß die Funktionsstrukturen vornehmlich aus Ribonukleoproteiden bestehen.

5. Der RNS-Stoffwechsel im Oocytenkern (autoradiographische Untersuchungen)

a) Uridineinbau

Während des Perlschnur- bzw. Lampenbürstenstadiums nimmt das Oocytenvolumen fast um das 10⁶fache zu, der euplasmatistische Anteil um mehr als das 10⁴fache. Einen überzeugenden Eindruck von diesen gewaltigen Wachstumsvorgängen vermittelte die Tritium-Autoradiographie mit Hilfe von H³-Uridin und verschiedenen H³-Aminosäuren. In den Untersuchungen zeigte sich vom Beginn des Ooplasmawachstums bis zum Ende der Dottereinlagerung eine starke Markierung über den heranwachsenden Oocyten, die auf intensive RNS- und Eiweißsynthese schließen läßt. Auch der Stoffwechsel des Follikelepithels ist unverhältnismäßig hoch. Das läßt zunächst vermuten, daß die Follikelzellen direkt zur ooplasmatischen Eiweißbildung beitragen könnten. Ein unmittelbarer RNS- oder Proteinübertritt von den Follikelzellen ins Ooplasma der benachbarten Oocyte müßte sich in einem Markierungsgradienten ausdrücken. Doch gibt die Verteilung der Markierung in den Autoradiogrammen nach verschiedenen Inkubationszeiten keinerlei Anhaltspunkte für derartige Transportvorgänge. Da die Ovarien der Heuschrecken panoistisch sind, d.h. keine Nährzellen besitzen, bleibt für die Steuerung der gesamten Euplasmasynthese allein der Oocytenkern übrig, dessen Chromosomensatz zudem — weil in der Keimbahn — nicht polyploid werden kann.

Diese Überlegungen legen den Gedanken nahe, in der auffallenden Chromosomenstruktur der wachsenden Eizelle den Ausdruck intensiver Genfunktion zu sehen. Einen unmittelbaren Beweis für diese Vorstellung kann wiederum nur die Autoradiographie liefern. Mit dem Ziel, die nach Injektion von H³-Uridin (spez. Akt. bis 24400 mc/mM; 0,3 mc pro Tier) neu gebildete RNS direkt an den Perlschnur- und feinfädigen Strängen zu finden, wurden die Chromosomen mit Glasnadeln aus dem Keimbläschen

herausgezogen. Sie haften auch ohne Klebemittel gut auf dem Objektträger und können nach Formolfixierung mit einem Stripping-Film oder mit Photoemulsion (Ilford, K 2) überzogen werden. Dieses Verfahren hat schwerwiegende Nachteile, da offenbar merkliche RNS-Mengen bei der Präparation von den Chromosomen abgestreift werden und in unmittelbarer Nachbarschaft der isolierten Stränge auf dem Objektträger festkleben. Infolgedessen treten die markierten Perlschnur- und Lampenbürstenchromosomen in der Autoradiographie nicht scharf genug hervor, da die Aktivität der umgebenden RNS das Bild verwischt. Doch läßt sich die RNS-Synthese auch an Paraffinschnitten und noch besser an freipräparierten und gequetschten Totalkernen recht gut verfolgen, obwohl die Chromosomen im Kern so dicht liegen, daß die Markierung der einzelnen Stränge nicht gesondert zu erkennen ist. Nach Kurzzeitinkubationen (von 8 bis etwa 25 min bei 21°C) sind die Perlschnurchromosomen und das feinfädige Material etwa in gleicher Dichte markiert (Abb. 23), während nach längeren Inkubationszeiten die Schwärzung über den Perlschnursegmenten beträchtlich stärker zunimmt als die Markierung über den übrigen Kernstrukturen (Abb. 24). Es ist noch unentschieden, ob die RNS an den beiden Chromosomenabschnitten eine ungleich lange Verweildauer hat oder ob die im Kern gebildete RNS vor dem Abtransport ins Cytoplasma zunächst an den Perlschnursegmenten gesammelt wird. Die nach sehr kurzen Inkubationszeiten erhaltenen Autoradiogramme sprechen dagegen, daß die Perlschnursegmente nur Speicherfunktion haben. Solange keine direkten Hinweise für eine Wanderung der an den Lampenbürstenabschnitten erzeugten RNS zu den Perlschnurstrukturen vorliegen, wird man der einfacheren Hypothese den Vorzug geben, daß die an den Perlschnursegmenten synthetisierte RNS länger am Bildungsort verweilt.

Diese Beobachtungen wurden durch Versuche ergänzt, in denen es gelang, freipräparierte Kerne ohne Cytoplasma *in vitro* in einem Ringer- H^3 -Uridin-Gemisch zu inkubieren (1 mc pro 3 ml Veronal-Ringer mit Zusatz eines Kristalls $MgCl_2$). Nach 4–12 min *in-vitro*-Inkubation zeigte sich eine gleichmäßige Markierung über den Oocytenkernen. RNS-Synthese isolierter Kerne *in vitro* wurde schon mehrfach nachgewiesen (Literatur bei KUEHL, 1965), bisher allerdings nur nach Isolation der Kerne durch Zentrifugierung. In diesen Fällen kann nicht ausgeschlossen werden, daß geringe Cytoplasmaresten an den Kernen hängengeblieben sind.

b) Einwirkung von Actinomycin

Als ein anderer Weg zum Nachweis des funktionellen Zustands bestimmter Chromosomenabschnitte hat sich die Einwirkung von Actinomycin bewährt. Die RNS-Syntheseaktivität ist offensichtlich an den diffusen, weitgehend aufgelockerten Chromosomenzustand gebunden

(PELLING, 1959; GALL u. CALLAN, 1962; PRESCOTT u. BENDER, 1962; HENDERSON, 1964). Wird die Transcription an der DNS-Matrize durch Komplexbildung mit Actinomycin blockiert (KERSTEN u. KERSTEN, 1962), so

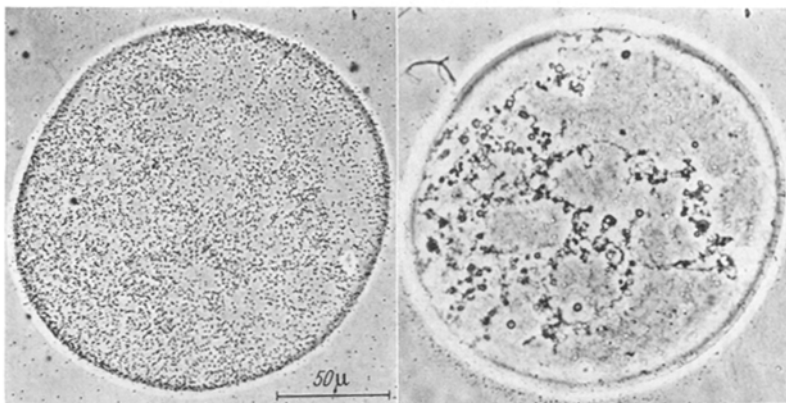


Abb. 23. Oocytenkern aus einem mit H^3 -Uridin behandelten Tier; Inkubationszeit 25 min bei $21^\circ C$; rechts nach Entfernung des Strippingfilms. Perlschnurbereich und übriger Kernraum (mit Lampenbürstenchromosomen) sind etwa in gleicher Dichte markiert. Isolierter Kern in Neutralformol gequetscht. Spez. Akt. 20000 mc/mM; 0,3 mc pro Tier; Exposition: 3 Monate. $300 \times$

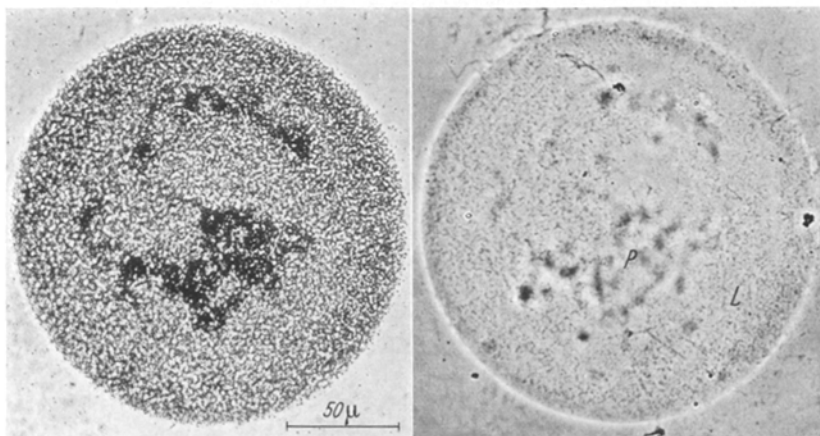


Abb. 24. RNS-Markierung über einem Oocytenkern nach 1 h Inkubation; rechts nach Entfernung des Strippingfilms. Der Perlschnurbereich (P) ist deutlich stärker markiert als die Lampenbürstenchromosomen (L). Technik und Expositionszeit wie Abb. 23. $300 \times$

werden die diffusen Chromosomenschleifen eingespult (IZAWA, ALLFREY u. MIRSKY, 1963; BEERMANN, 1964a, b; LAUFER, NAKASE u. VANDERBERG, 1964; MEYER u. HESS, 1965). An der durch Actinomycin verursachten Rückbildung entspiralisierter Chromosomenabschnitte, d.h. an deren Verdichtung, kann die funktionelle Natur dieser Strukturen erkannt werden.

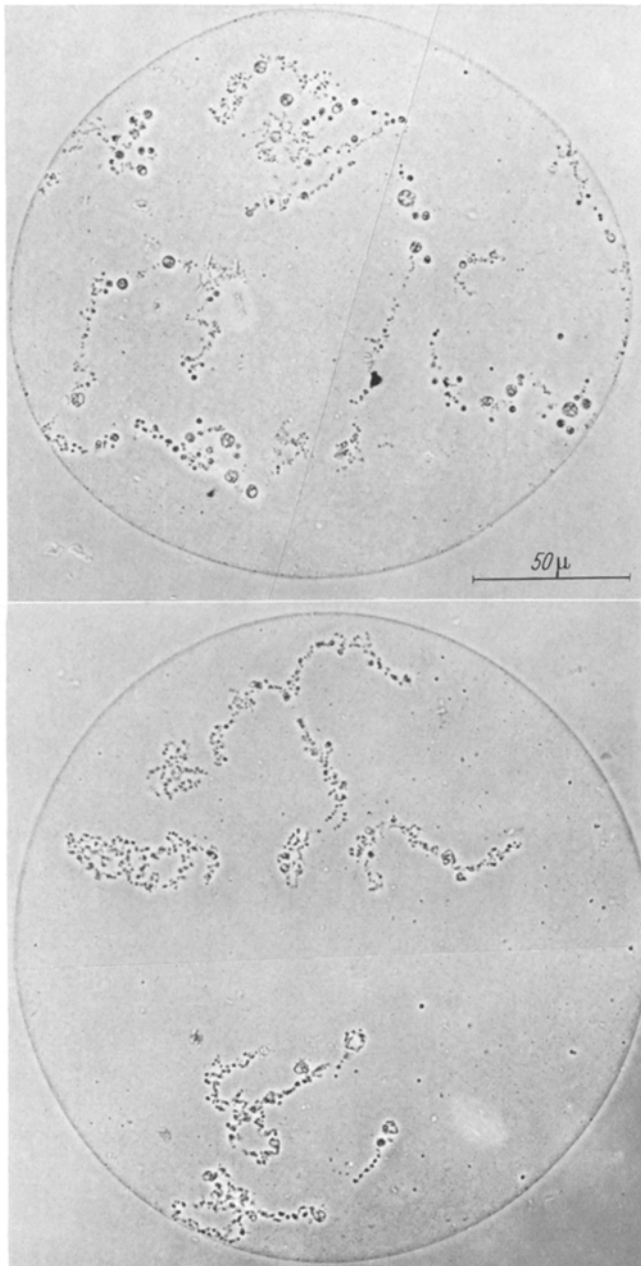


Abb. 25. Unter der Einwirkung von Actinomycin haben sich die Perlschnurabschnitte zusammengezogen und als einzelne Stücke voneinander gelöst. 2 μg Actinomycin pro Tier, 90 min Inkubation. Technik wie Abb. 2. 425 $\times$

Nach der Injektion von 1—50 μg Actinomycin C (Bayer, Leverkusen; Inkubationen bei 21°C und 30°C) wurde das Verhalten der Oocytenchromosomen an Lebendpräparaten untersucht und außerdem deren

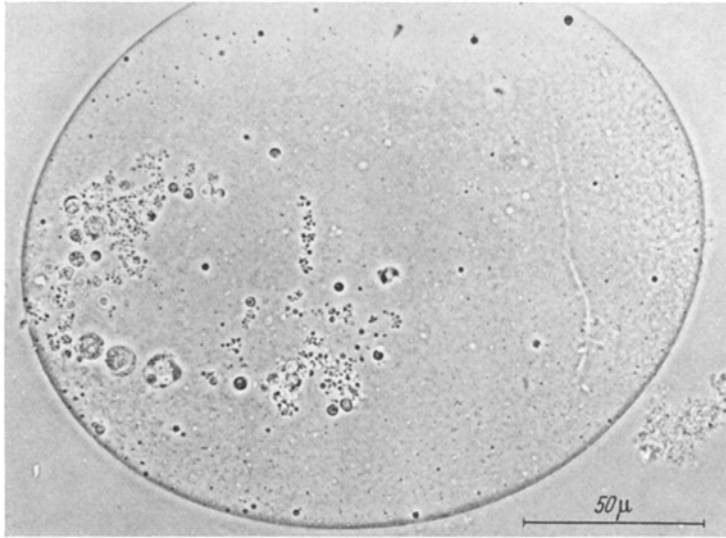


Abb. 26. Nach längerer Actinomycin-Behandlung (2 μg pro Tier, 22 h) knäueln sich die Perlschnurabschnitte zu einem Haufen an der Kernmembran zusammen. 480 $\times$

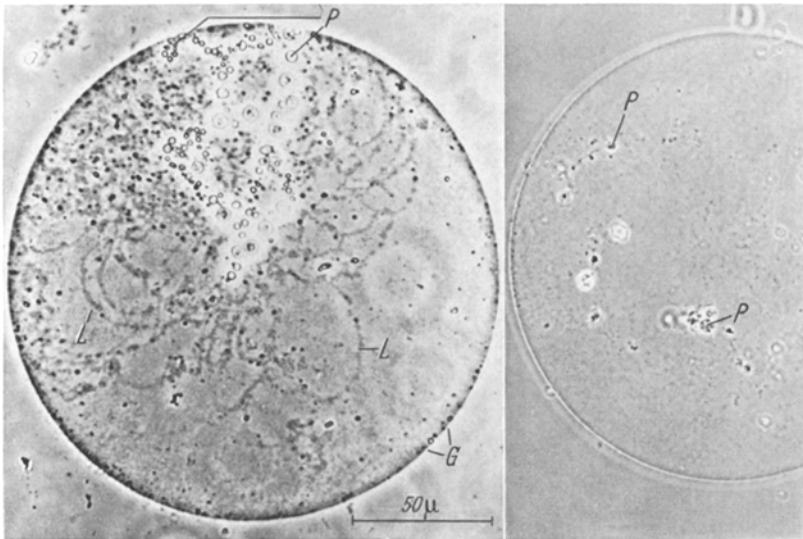


Abb. 27. Das Perlschnurmateriel (*P*) vermindert sich unter Actinomycin-Einwirkung (10 μg pro Tier, 7 h) in zunehmendem Maße, während sich an der Kernmembran gleichzeitig viele Granula (*G*) ansammeln. Die Lampenbürstenchromosomen (*L*) erscheinen im stark kontrahierten Zustand und werden an die Perlschnurabschnitte herangezogen. Technik wie Abb. 2 und 3. 375 $\times$

Syntheseleistung autoradiographisch verfolgt. 90 min nach der Injektion begannen die Kernstrukturen in bezeichnender Weise vom Normalaussehen abzuweichen. Die Geschwindigkeit des Ablaufs der durch Actinomycin verursachten Veränderungen an den Chromosomen kann durch Temperatur- und Dosissteigerung wesentlich erhöht werden, ohne daß die Art der Strukturveränderungen dadurch beeinträchtigt wird. In gleichem Maße wirken höhere Dosen durch beschleunigend auf die Blockierung der RNS-Synthese ein. Die folgenden Zeitangaben gelten für die als

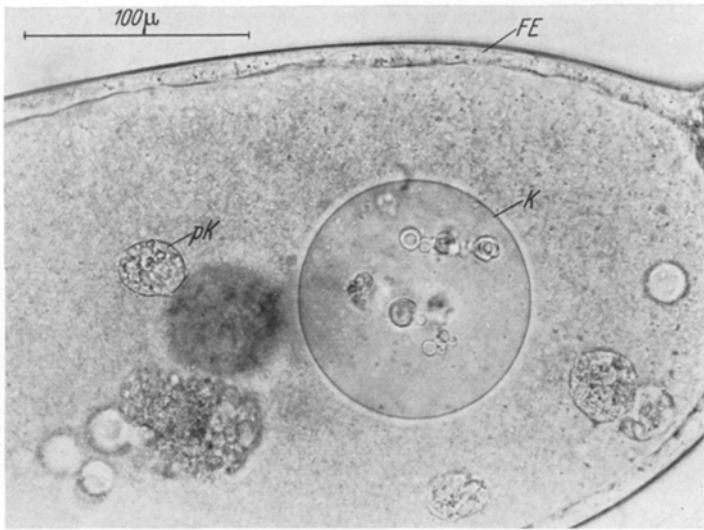


Abb. 28. Oocyte mit Oocytenkern (K) und pyknotischen Kernen (pK) nach mehrtägiger Actinomycin-Behandlung ($12 \mu\text{g}$ pro Tier, 3 Tage). Es bleiben nur noch Reste der Perlschnursegmente als große Kugeln erhalten. Das stark kontrahierte feinfädige Material ist in dieser Hellfeld-Aufnahme nicht sichtbar. Die Strukturen in den pyknotischen Kernen reagieren nicht auf Actinomycin.

FE Follikelepithel. Lebendpräparat in Ca-Ringerlösung. $300\times$

günstig befundene Dosis von $2 \mu\text{g}$ pro Tier bei einer Inkubationstemperatur von 21°C . Wie bei der Strukturbeeinflussung durch Kälte und Stickstoff reagieren verschieden große Oocytenkerne unterschiedlich schnell. Insgesamt läßt sich jedoch ein recht einheitlicher, reproduzierbarer Vorgang erkennen.

Die ersten charakteristischen Veränderungen fallen etwa 90 min nach der Injektion auf, zu einem Zeitpunkt, bei dem noch RNS gebildet wird. Die Perlschnurabschnitte haben sich in ihrer Längsachse zusammengezogen und dabei z. T. als Einzelstücke voneinander gelöst (Abb. 25). Die Zahl der Axialgranula scheint abgenommen zu haben; dem entspricht das Vorkommen von zahlreichen, etwa 1μ großen Kügelchen, die frei in der Karyolymphe schwimmen, sich an der Kernmembran häufen und vermutlich abgelöste Bildungen der Perlschnursegmente sind (Abb. 27).

Im Zeitraum von 6 bis 24 h nach der Injektion haben sich die Perlschnurchromosomen, deren Synthesematerial sich weiter vermindert hat, zu einem Haufen an der Kernwand zusammengezogen (Abb. 26). Im übrigen Kernraum erscheinen die ebenfalls stark kontrahierten Stränge der feinfädigen Lampenbürstenchromosomen, die — sofern sie nicht an der Kernmembran festhängen — an die Perlschnurchromosomen herangezogen werden (Abb. 27). Die RNS-Synthese hat deutlich abgenommen.

Nach etwa 2 Tagen sind in einigen Kernen fast sämtliche Axialgranula und α -Kugeln verschwunden, und auch die nach kürzeren Inkubationszeiten an der Kernmembran angesammelten Granula haben sich beträchtlich vermindert (Abb. 27, rechts). In anderen Kernen bleiben Reste der ehemaligen Perlschnurstränge in Form weniger, großer Kugeln von 3 bis 20 μ Durchmesser erhalten (Abb. 28), die das feinfädige Material mit den noch immer unveränderten β -Kugeln dicht an sich heranziehen. Die RNS-Synthese ist erloschen. In diesem Stadium können die Tiere in deutlich moribundem Zustand noch einige Tage überleben.

Eine Regeneration der Funktionsstrukturen konnte im Gegensatz zu den sonst weitgehend vergleichbaren Befunden von MEYER u. HESS (1965) an den Chromosomen von *Drosophila*-Spermatocyten bei *Locusta* nicht festgestellt werden, da die Versuchstiere gewöhnlich nach vier Tagen starben.

IV. Diskussion

1. Deutung der „Perlschnurstruktur“ als funktioneller Nukleolus

Die Chromosomennatur der in den unfixierten Oocytenkernen von *Locusta* darstellbaren fädigen Strukturen wird durch ihre Entwicklung, ihre Empfindlichkeit gegenüber DNase und durch die an ihnen ablaufenden Synthesen belegt. Es war jedoch nicht möglich, die Analyse des Kerninhalts bis zu den einzelnen Chromosomen voranzutreiben, da die chromosomalen Stränge zahlreiche Haftpunkte ausbilden, in denen sie miteinander und mit der Kernmembran verklebt sind. Die *Locusta*-Chromosomen sind, wie für einen Oocytenkern zu erwarten, stark gestreckt. Da sie eine lichtoptisch erfaßbare Feulgenfärbung nicht geben, muß ihre DNS-Achse weitgehend entspiralisiert sein. Sie sind im Mikroskop nur deshalb sichtbar, weil sie eine Matrix aus Ribonukleoproteiden tragen.

Der überwiegende Teil des Genoms hat typische Lampenbürstenstruktur mit Schleifen. Demgegenüber ist ein Bereich einheitlich modifiziert: An ihm konnten keine Schleifen dargestellt werden, sondern er trägt kompakte Kügelchen, die wie auf einer Perlschnur hintereinander aufgereiht sind. Diese Untergliederung des Genoms in zwei Abschnitte unterschiedlicher Struktur ist die auffälligste Erscheinung der *Locusta*-Chromosomen im Oocytenkern.

Beim Vergleich homologer Genorte an Lampenbürstenchromosomen hat sich bei Amphibien und *Drosophila* gezeigt, daß Gene gleicher Funktion morphologisch übereinstimmende Funktionsstrukturen ausbilden. Bestimmte Chromosomenorte können in verschiedenen Kernen an der typischen Gestalt ihrer loops wiedererkannt werden. Mutationen werden durch charakteristische Veränderungen der Schleifenmatrix unmittelbar sichtbar (CALLAN, 1963; HESS, 1964). Mit einiger Berechtigung kann daher vermutet werden, daß die strukturelle Einheitlichkeit der Perlschnurabschnitte von *Locusta* ein Ausdruck dafür ist, daß hier Gene ähnlicher, vielleicht sogar gleichartiger Funktion hintereinanderliegen, die gegenüber dem übrigen Genom eine Sonderstellung einnehmen. Auch im Modus ihres RNS-Umsatzes heben sich die Perlschnurbereiche von den übrigen Chromosomen ab; denn sie bilden eine RNS, die, wie es die autoradiographischen Versuche wahrscheinlich machen, länger am Synthesort verweilt als die am feinfädigen Material produzierte RNS-Fraktion.

Der Fall, daß sich einzelne Bereiche des Genoms aus zahlreichen identischen Teilstücken zusammensetzen, ist nicht neu; denn aus genetischen Versuchsergebnissen schloß BEERMANN bereits 1960, daß der Nukleolenbildungsort von *Chironomus* aus vielen gleichartigen Abschnitten besteht. Wie der Nukleolus, so ist auch die Perlschnurstruktur von *Locusta* ein in Gestalt und Funktion eigenständiger und auffälliger Teil des Genoms. Allerdings gibt es unter den genetisch und morphologisch erarbeiteten Chromosomenkarten bisher kein Beispiel, wonach funktionsverwandte Gene in einer solchen Anzahl hintereinander aufgereiht sind, daß sie als längere Chromosomenabschnitte hervortreten.

Seit den Untersuchungen an nukleolenlosen Mutanten (BROWN u. GURDON, 1964) ist bekannt, daß die ribosomale RNS für die frühe Embryogenese bereits in der Oogenese gebildet wird. Die Synthese der Ribosomen-RNS findet höchstwahrscheinlich am Nukleolusorganisator statt (PELLING, 1959; EDSTRÖM u. BEERMANN, 1962). Es ist daher rätselhaft, warum bei *Locusta* zu Beginn des Oocytenwachstums der im Zygotän noch sichtbare Nukleolus verschwindet, von dem man gerade in der Wachstumsphase eine besondere Aktivität erwarten sollte. Zwischen den Nukleolenbildungsorten, die offensichtlich aus selbständigen Untereinheiten bestehen können, und der Perlschnurstruktur von *Locusta* bestehen Gemeinsamkeiten, die an die Möglichkeit denken lassen, daß die Perlschnursegmente eine für die besonderen Erfordernisse der Oogenese entsprechend modifizierte Nukleolenregion darstellen.

Diese Hypothese findet eine Hauptstütze im Vergleich mit den Amphibien-Oocyten. In den Kernen der wachsenden Eizellen des Axolotls (CALLAN, 1966) und des Salamanders *Plethodon* (KEZER, briefl. Mitt.) liegen mehrere 100 Nukleolen an der Kernmembran, während die Chromosomen nur einen einzigen Nukleolusorganisator haben. Die vielen freien

Nukleolen stimmen in ihrem Aufbau mit den Strukturen am Nukleolusorganisator überein. Da die Nukleolen einen DNS-haltigen Faden enthalten (MILLER, 1964), wird angenommen, daß die DNS-Anlagen aller Nukleolen vom Nukleolusorganisator gebildet worden sind und sich abgelöst haben, bevor die Synthese nukleolären Materials einsetzte. Nur ein bis wenige Nukleolen bleiben am Bildungssegment haften und treten hier als interkalares Zwischenstück innerhalb eines Lampenbürstenchromosoms in Erscheinung.

Die freien wie die im Chromosomenverband verbleibenden Nukleolen vom Axolotl zeigen während des Oocytenwachstums zeitweise eine sehr auffällige Ähnlichkeit zu den Perlschnursträngen von *Locusta*. Die Axolotl-Nukleolen nehmen in mittleren Wachstumsstadien die Gestalt von langgestreckten Ringen an, auf denen kleine Kügelchen hintereinander aufgereiht sind (vgl. Fig. 23—25 in CALLAN, 1966). Diese stark lichtbrechenden Kügelchen gehen während der Streckung offensichtlich aus kompakteren Massen hervor; denn im weniger auseinandergezogenen Zustand tragen die Nukleolenringe größere Kugeln in geringerer Anzahl. Diese Kugeln sehen den α -Kugeln von *Locusta* ähnlich (s. Fig. 27 in CALLAN, 1966), die ebenfalls als Fusionsprodukte der kleinen Axialgranula gedeutet wurden.

Die Ähnlichkeit der Perlschnurstrukturen ist mit den Nukleolen am größten, die am Nukleolen-Bildungssegment interkalar im Chromosomenverband eingeschaltet bleiben. Denn diese Nukleolen bilden wie die Perlschnurstränge von *Locusta* verbindende Segmente innerhalb des eigentlichen Lampenbürstenchromosoms. In beiden Fällen sind diese Zwischenstücke nicht mit loops, sondern wie die freien Nukleolen mit stark lichtbrechenden Kugeln besetzt und treten daher als gesonderte Bereiche aus dem sonst einheitlich gestalteten Chromosomenverband hervor (vgl. Abb. 8a in HESS, 1966, und Fig. 34 und 43 in CALLAN, 1966, mit Abb. 9 oben, S. 342).

Hinsichtlich der morphologischen Erscheinungsform, der RNS-Synthese und durch das Vorkommen von DNS stimmen die *Locusta*-Perlschnurstränge mit den Axolotl-Nukleolen überein. Ein Unterschied scheint lediglich in der Anordnung der nukleolären DNS-Anlagen zu bestehen. Diese lösen sich beim Axolotl in einzelnen Segmenten von den Chromosomen ab, während sie bei *Locusta* in Form langer Schnüre am Bildungsort im Chromosomenverband eingegliedert bleiben müßten.

Allerdings darf nicht übersehen werden, daß auch in den *Locusta*-Kernen neben den Perlschnurabschnitten einzelne kugelförmige Strukturen vorkommen, nämlich die β -Kugeln. Die Ähnlichkeit mit den freien Amphibien-Nukleolen ist zwar insofern gering, als die β -Kugeln zu keinem Entwicklungszeitpunkt eine den Verhältnissen beim Axolotl analoge

Perlschnurstruktur annehmen, jedoch bestehen die β -Kugeln von *Locusta* wie viele Nukleolen (HERTL, 1957) aus Mark und Rindenschicht und tragen an der Peripherie stark lichtbrechende Granula. In Übereinstimmung mit den Amphibien-Nukleolen treten die β -Kugeln nahe an der Kernmembran auf und hängen auf noch ungeklärte Weise an den Lampenbürstenchromosomen. Da die β -Kugeln sehr klein sind, kann über ihren RNS-Stoffwechsel noch nichts ausgesagt werden. Im Gegensatz zu den Amphibien-Nukleolen erscheinen die β -Kugeln jedoch in stark variierender Anzahl, die keine Beziehung zu den verschiedenen Altersstufen der Oocyte aufweist. Da auch keine Abgabe der β -Kugeln in das Ooplasma beobachtet wurde, scheinen sie wirklich in unterschiedlicher Anzahl vorzukommen. Dieses würde gegen die funktionelle Wichtigkeit dieser Kernorganellen sprechen. Es können deshalb bei dem gegenwärtigen Stand der Untersuchungen eher die Perlstrukturstränge als die β -Kugeln mit der Nukleolenfunktion in Zusammenhang gebracht werden.

Einerseits ist aus theoretischen Erwägungen die Existenz eines Nukleolus für die ooplasmatische Wachstumsphase der *Locusta*-Oocyten zu fordern; andererseits ist die morphologische und funktionelle Ähnlichkeit zwischen den *Locusta*-Perlschnurchromosomen und den Axolotl-Nukleolen evident. Es steht jedoch noch aus, wie weit die Homologisierung vorgenommen werden kann.

Folgende Denkmöglichkeiten sind gegeben:

1. Die den Perlschnurstrukturen zugrunde liegenden Chromosomenabschnitte sind ein in allen Zellen vorhandener Bestandteil des Genoms.

2. Es handelt sich um eine besondere Keimbahn-DNS, die etwa wie bei *Ascaris megalocephala* jeweils in den prospektiven Somazellen diminiert wird.

3. Eine von der normalen Chromosomenreplikation unabhängige DNS-Synthese führt, während die Gesamtheit der übrigen Gene den physiologisch tetraploiden Zustand beibehält, zu Beginn jeder Oogenese zur Vervielfachung eines oder weniger Genorte, die im Falle von *Locusta* nach Beladung mit Ribonukleoproteiden als Perlschnurstränge in Erscheinung treten. Ähnliche Verhältnisse scheinen neben den Amphibien (MILLER, 1964; CALLAN, 1966) auch bei Dytisciden (URBANI u. RUSSO-CAIA, 1964) und Tipuliden (BAYREUTHER, 1956; LIMA-DE-FARIA, 1962) vorzuliegen, wo auffällige DNS-Keimbahnkörper gebildet werden, die zumindest im Falle der Dytisciden am RNS-Stoffwechsel des Oocytenkerns beteiligt sind (BIER u. RIBBERT, 1966). Bei *Locusta* werden weitere Versuche durchgeführt, die entscheiden sollen, ob die DNS der Perlschnursegmente zu Beginn jeder Oogenese neu gebildet wird. Sollte dies zutreffen, so wäre zu prüfen, wann die Perlschnurabschnitte wieder aus dem übrigen Genbestand entfernt werden und ob es sich um terminale

oder interkalare Segmente handelt. Im Falle der Abgliederung interkalarer Chromosomenabschnitte besteht das Problem, auf welche Weise der Zusammenhalt der Chromosomen erhalten bleibt.

2. *Vergleich der Lampenbürstenchromosomen mit den entsprechenden Strukturen der Amphibien und Gegenüberstellung zu den Funktionsstrukturen von Drosophila*

Ein Vergleich der Lampenbürstenchromosomen von *Locusta* mit den sehr genau untersuchten Amphibienchromosomen (CALLAN u. LLOYD, 1960) kann ebenso zum Verständnis der Heuschrecken-Oocytenchromosomen beitragen wie eine Gegenüberstellung mit den Funktionsstrukturen in den Spermatocytenkernen von *Drosophila* (MEYER, 1963), die bisher den einzigen überzeugenden Nachweis der Lampenbürstenstruktur bei Insekten darstellen. Die *Locusta*-Lampenbürstenchromosomen bestehen wie die der Amphibien aus einer Achse mit seitlichen Schleifen. Die Schleifen gleichen den „normal-loops“ der Molche, sind aber, vermutlich im Zusammenhang mit dem geringeren DNS-Gehalt des Genoms, etwa viermal kleiner. Aus diesem Grunde stößt die Analyse der Heuschreckenchromosomen auf erhebliche Schwierigkeiten. Sichere Hinweise auf die Paarigkeit der Schlingen liegen noch nicht vor; ebenso fehlen eindeutig nachgewiesene Chromomeren. Die *Locusta*-Chromosomen haben keine Riesenschleifen (giant granular loops, giant fusing loops), die für die Amphibien-Lampenbürstenchromosomen charakteristisch sind und dort als besonders auffällige Markierungspunkte die Identifizierung bestimmter Chromosomenabschnitte ermöglichen.

Die Chromosomen in den Oocyten von *Locusta* gleichen hinsichtlich der Vielzahl ihrer Schleifen viel mehr den Lampenbürstenchromosomen der Molche als den Strukturen in den Spermatocytenkernen von *Drosophila*, wo nur wenige loops nachgewiesen wurden. Die Ähnlichkeit chromosomaler Funktionsstrukturen scheint eher vom Aufgabenbereich der Zellkerne als vom Verwandtschaftsgrad der Tierarten abzuhängen. Der auffällige Unterschied zwischen den Oocyten und den Spermatocyten hinsichtlich ihrer Kerngröße und der Chromosomenstruktur läßt sich wahrscheinlich auf eine unterschiedliche funktionelle Beanspruchung des Genoms zurückführen.

Die Zunahme des Kernvolumens bei vermehrter RNS-Synthese ist plausibel. Da offensichtlich nur aufgelockerte Chromosomenbereiche zur RNS-Bildung befähigt sind (PELLING, 1959, 1964, 1966; GALL u. CALLAN, 1962; PRESCOTT u. BENDER, 1962; HENDERSON, 1964), muß durch Erweiterung des Kerns Raum für feinfibrilläre Ausspülungen geschaffen werden. Außerdem erfordert eine verstärkte RNS-Bildung einen größeren Pool an Vorstufen für die Syntheseprodukte. In Übereinstimmung damit enthalten bei ein und demselben Tier die großen Kerne meist ein diffus

verteiltes Chromatin, die kleinen mehr kompakte Strukturen. Für diese Regel liefert besonders der Vergleich der großen Oocytenkerne mit den viel kleineren Kernen der Spermatocyten ein eindrucksvolles Beispiel. In beiden Fällen liegt ein bereits reduplizierter Chromosomensatz vor, jedoch sind die Oocytenchromosomen vollständig aufgelockerte Lampenbürstenchromosomen, die Spermatocyten-Bivalenten dagegen meist kompakte, stark feulgenpositive Strukturen. Bei *Drosophila* enthalten die Spermatocytenkerne zwar ebenfalls Lampenbürstenschleifen, jedoch nur in geringer Anzahl als Bildungen eines einzigen Chromosoms.

Diese morphologischen Unterschiede gehen offensichtlich auf eine verschiedene funktionelle Beanspruchung der Kerne zurück. Die Spermatocyten haben wie die Somazellen einen recht begrenzten Aufgabenbereich. Selbst bei intensivem Stoffwechsel braucht nur ein Teil des Genoms Funktionsstrukturen auszubilden. Die wachsenden Eizellen sind dagegen weniger spezialisiert; denn die Aufgabe des Oocytenkerns besteht in der Steuerung des Aufbaus der noch weitgehend undifferenzierten Cytoplasmamenge eines Embryos, der zunächst in Form der einkernigen Eizelle heranwächst, bevor er nach der Befruchtung des Eikerns in rasch aufeinanderfolgenden Mitosen und Furchungen in Einzelzellen zergliedert wird. Im Laufe des Oocytenwachstums wird das Cytoplasma eines ganzen Keimes aufgebaut, dessen Einzelzellen vom Beginn der Embryogenese an arbeitsfähig sein müssen, aber erst relativ später mit einer eigenen RNS-Synthese beginnen (GROSS, 1964). Deshalb muß während der Oogenese nicht nur eine große Menge, sondern auch eine beachtliche Vielzahl verschiedenartiger Proteine gebildet werden, damit die Embryonalzellen über alle Fermentsysteme des Grundstoffwechsels verfügen. Dieser Forderung entsprechen die morphologischen und autoradiographischen Ergebnisse an Lampenbürstenchromosomen, an denen die Entfaltung und Syntheseaktivität eines Großteils aller Gene wahrscheinlich gemacht werden konnten (GALL u. CALLAN, 1962; vgl. S. 356 ff.). Der ungewöhnlich große Kernraum des Oocytenkeimbläschens ist vermutlich eine Voraussetzung für chromosomale Auflockerungen und Syntheseprozesse derartigen Umfangs.

Zusammenfassung

1. Die Kerne der wachsenden Oocyten von *Locusta migratoria* wurden isoliert und im unfixierten Zustand mit Phasenkontrastoptik untersucht. Sie enthalten fädige Strukturen, die paarig angeordnet sind. Ihre Chromosomennatur wird durch die Empfindlichkeit gegenüber DNase wahrscheinlich gemacht. Die Chromosomenfäden tragen größtenteils wie die Lampenbürstenchromosomen der Amphibien zahlreiche seitliche Schleifen (loops). Ein kleinerer Teil, dem die loops fehlen, ist mit stark lichtbrechenden Grana besetzt (Perlschnurabschnitt). Die lichtmikroskopisch

sichtbare Basophilie der Kernstrukturen verschwindet nach RNase-Behandlung.

2. Der Einfluß des Ionengehaltes verschiedener Salzlösungen auf die Sichtbarkeit der Chromosomen im isolierten Kern wurde geprüft. In hypertonen Medien ziehen sich die Lampenbürstenchromosomen und die Perlschnurabschnitte stark zusammen. In Stickstoffatmosphäre und bei tiefer Temperatur verschmelzen die Perlschnursegmente durch Granaverklebungen zu wenigen großen Klumpen. Nach Zurückführung in Normalbedingungen wird der Ausgangszustand wieder hergestellt.

3. H^3 -Uridin wird in situ und in vitro bereits nach 8 min in deutlichem Umfang in die RNS an den Chromosomenfäden eingebaut. Nach längeren Inkubationszeiten sind die Perlschnurstränge stärker markiert als die Lampenbürstenchromosomen.

4. Durch Actinomycin wird die RNS-Synthese allmählich blockiert. Dabei ziehen sich die Perlschnurstränge und die Lampenbürstenchromosomen in fortschreitendem Maße zusammen. Im Gegensatz zu der durch Kälte und Hypertonlösung hervorgerufenen Chromosomenkontraktion kommt es hierbei aber nur zu geringfügigen Verschmelzungen der Perlschnurgrana. Nach längerer Einwirkungsdauer des Actinomycins vermindern sich die RNS-haltigen Grana der Perlschnurabschnitte in zunehmendem Ausmaß.

5. Die funktionelle Bedeutung der Perlschnursegmente wird diskutiert. Auf Grund ihrer einheitlichen Struktur, der Ähnlichkeit mit den Amphibiennukleolen und der Eigentümlichkeit ihres RNS-Stoffwechsels wird vermutet, daß sie den Nukleolen der Amphibien entsprechen, aber hintereinander im Chromosomenverband eingeschaltet sind.

Meinem verehrtem Lehrer, Prof. Dr. K. BIER, danke ich für die ständige Förderung der Arbeit. Weiterhin danken Prof. BIER und ich Herrn Prof. Dr. J. G. GALL für freundliche Hinweise und Herrn Prof. Dr. J. KEZER für die Mitteilung noch nicht veröffentlichter Beobachtungen.

Literatur

- BAYREUTHER, K.: Die Oogenese der Tipuliden. *Chromosoma* (Berl.) **7**, 508—557 (1956).
- BEERMANN, W.: Der Nukleolus als lebenswichtiger Bestandteil des Zellkernes. *Chromosoma* (Berl.) **11**, 263—296 (1960); — Kontrollierte RNS-Synthese in Riesenchromosomen. In: *Struktur und Funktion des genetischen Materials*, Erwin-Baur-Gedächtnisvorlesungen III, 211—223. Berlin: Akademie-Verlag 1964a; — Control of differentiation at the chromosomal level. *J. exp. Zool.* **157**, 49—61 (1964b).
- BIANCHI, N. O., A. LIMA-DE-FARIA, and H. JAWORSKA: A technique for removing silver grains and gelatin from tritium autoradiographs of human chromosomes. *Hereditas* (Lund) **51**, 207—211 (1964).
- BIER, K., u. D. RIEBERT: Struktur und genetische Aktivität des DNS-Keimbahnkörpers von *Dytiscus*. *Naturwissenschaften* **53**, 115 (1966).

- BONHAG, P. F.: Histological and histochemical studies on the ovary of the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). Univ. Calif. Publ. Entomol. **16**, 81—124 (1959).
- BROWN, D., and I. GURDON: Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutante of *Xenopus laevis*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **51**, 139—146 (1964).
- CALLAN, H. G.: The lampbrush chromosomes of *Sepia officinalis* L., *Anilocra physodes* L. and *Scyllium cabulus* Cuv. and their structural relationship to the lampbrush chromosomes of *Amphibia*. Pubbl. Staz. zool. Napoli **29**, 329—346 (1957); — The nature of lampbrush chromosomes. Int. Rev. Cytol. **15**, 1—33 (1963); — Chromosomes and nucleoli of the Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. J. Cell. Sci. **1**, 85—108 (1966).
- , and L. LLOYD: Lampbrush chromosomes of crested newts *Triturus cristatus* (LAURENTI). Phil. Trans. B **243**, 135—219 (1960).
- , and H. C. MCGREGOR: Action of deoxyribonuclease on lampbrush chromosomes. Nature (Lond.) **181**, 1479—1480 (1958).
- EDSTRÖM, J. E., and W. BEERMANN: The base composition of nucleic acids in chromosomes, puffs, nucleoli, and cytoplasm of *Chironomus* salivary gland cells. J. Cell Biol. **14**, 371—380 (1962).
- GALL, J. G., and H. G. CALLAN: H³ uridine incorporation in lampbrush chromosomes. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **48**, 562—570 (1962).
- GROSS, P. R.: The immediacy of genomic control during early development. J. exp. Zool. **157**, 21—38 (1964).
- HENDERSON, S. A.: RNA synthesis during male meiosis and spermatogenesis. Chromosoma (Berl.) **15**, 345—366 (1964).
- HERTL, M.: Zum Nukleolus-Problem. Z. Zellforsch. **46**, 18—51 (1957).
- HESS, O.: Struktur-Differenzierungen im Y-Chromosom von *Drosophila hydei* und ihre Beziehungen zu Gen-Aktivitäten. I. Mutanten der Funktionsstrukturen. Verh. Dtsch. Zool. Ges., Zool. Anz., Suppl. **28** (1964); — Funktionelle und strukturelle Organisation der Lampenbürsten-Chromosomen. In: Probleme der biologischen Reduplikation (3. wiss. Konf. Ges. Deutscher Naturf. u. Ärzte, Semmering bei Wien 1965). Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1966.
- IZAWA, M., V. G. ALLFREY, and A. E. MIRSKY: The relationship between RNA synthesis and loop structure in lampbrush chromosomes. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **49**, 544—551 (1963).
- JOHN, B., and S. A. HENDERSON: Asynapsis and polyploidie in *Schistocerca gregaria*. Chromosoma (Berl.) **13**, 111—147 (1962).
- KERSTEN, W., u. H. KERSTEN: Zur Wirkungsweise von Actinomycinen. Bindung von Actinomycin C an Nucleinsäuren und Nucleotide. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **330**, 21—30 (1962).
- KUEHL, L. R.: Ribonucleic acid synthesis in isolated tobacco leaf nuclei. Z. Vererbungsl. **96**, 93—104 (1965).
- LAUFER, H., Y. NAKASE, and J. VANDERBERG: Developmental studies of the Dip-teran salivary gland. I. The effects of actinomycin D on larval development, enzyme activity, and chromosomal differentiation in *Chironomus thummi*. Develop. Biol. **9**, 367—384 (1964).
- LEZZI, M.: Die Wirkung von DNase auf isolierte Polytänchromosomen. Exp. Cell Res. **39**, 289—292 (1965).
- LIMA-DE-FARIA, A.: Metabolic DNA in *Tipula oleracea*. Chromosoma (Berl.) **13**, 47—59 (1962).
- MEYER, G. F.: Die Funktionsstrukturen des Y-Chromosoms in den Spermatocytenkernen von *Drosophila hydei*, *D. neohydei*, *D. repleta* und einigen anderen *Drosophila*-Arten. Chromosoma (Berl.) **14**, 207—255 (1963).

- MEYER, G. F., u. O. HESS: Struktur-Differenzierungen im Y-Chromosom von *Drosophila hydei* und ihre Beziehungen zu Gen-Aktivitäten. II. Effekt der RNS-Synthese-Hemmung durch Actinomycin. *Chromosoma* (Berl.) **16**, 249—270 (1965).
- MILLER, O. L.: Extrachromosomal nucleolar DNA in amphibian oocytes. *J. Cell. Biol.* **23**, 60 A (1964).
- NEBEL, B. R., and E. M. COULON: The fine structure of chromosomes in pigeon spermatocytes. *Chromosoma* (Berl.) **13**, 272—291 (1962).
- PELLING, C.: Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by the incorporation of uridine labelled with tritium. *Nature* (Lond.) **184**, 655—656 (1959); — Ribonucleinsäuresynthese an Riesenchromosomen. Autoradiographische Untersuchungen an *Chironomus tentans*. *Chromosoma* (Berl.) **15**, 71—122 (1964); — A replicative and synthetic chromosomal unit — the modern concept of the chromomere. *Proc. roy. Soc. B* **164**, 279—289 (1966).
- PRESCOTT, D. M., and M. A. BENDER: Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells. *Exp. Cell Res.* **26**, 260—268 (1962).
- SESHACHAR, B. R., and S. BAGGA: A cytochemical study of oogenesis in the dragonfly *Pantala flavescens* (FABRICIUS). *Growth* **27**, 225—246 (1963).
- URBANI, E., e S. RUSSO-CAIA: Osservazioni citochimiche e autoradiografiche sul metabolismo degli acidi nucleici nella oogenesi di *Dytiscus marginalis* L. *Rend. Ist. Sci. Univ. Camerino* **5**, 19—50 (1964).
- ZALOKAR, M.: Ribonucleic acid and the control of cellular processes. In: *Control mechanisms in cellular processes* (ed. J. BONNER). New York: Ronald Press 1961.

Dr. WERNER KUNZ
Zoologisches Institut
44 Münster (Westf.), Badestr. 9