

ZOOL. ANZ., SUPPL.-BD. 33, VERH. ZOOL. GES. 1969 S. 39—46

3. WERNER KUNZ:

**Multiple Oocytennucleolen und ihre DNS-Anlagen
bei *Locusta migratoria* und *Gryllus domesticus*¹**

(Mit 4 Abbildungen)

Multiple Oocyte Nucleoli and their DNA Anlagen in
Locusta migratoria and *Gryllus domesticus*

Abstract

About one thousand multiple nucleoli in the oocyte nucleus of *Locusta* are connected in series by an axis of DNA (Fig. 2). There are DNA containing intervals (internucleolar segments) integrated in these polynucleolar strings which are not surrounded by nucleolar material.

¹ Herrn Professor Dr. K. BIER (†) in Dankbarkeit gewidmet.

Consequently it is proposed that these segments correspond to that part of satellite DNA which does not code for ribosomal RNA (GALL 1969). Nucleoli and internucleolar segments alternate with one another in constant distances (1,2 μm ; Figs. 3 d–g and 4). — Autoradiographs of *Locusta* nuclei which have been incubated with ^3H thymidine at various stages of meiosis, and microspectrophotometric measurements of the Feulgen dye contents of *Gryllus* nuclei at oogonial prophase and pachytene, reveal that the amplified ribosomal genes are not synthesized during meiosis, in contrast to the results found with *Xenopus*. The origin of these many supernumerary copies of the nucleolus organizer region in the germ line of *Gryllus* and *Locusta* is unknown. The content of rDNA in late oogonial stages and in the oocytes of the cricket is similar to the DNA amount of the haploid chromosome complement.

Cytologische Untersuchungen an Amphibien (CALLAN 1966) und Orthopteren (KUNZ 1967 a, 1967 b) haben gezeigt, daß die Oocytenkerne vieler Tierarten tausend-

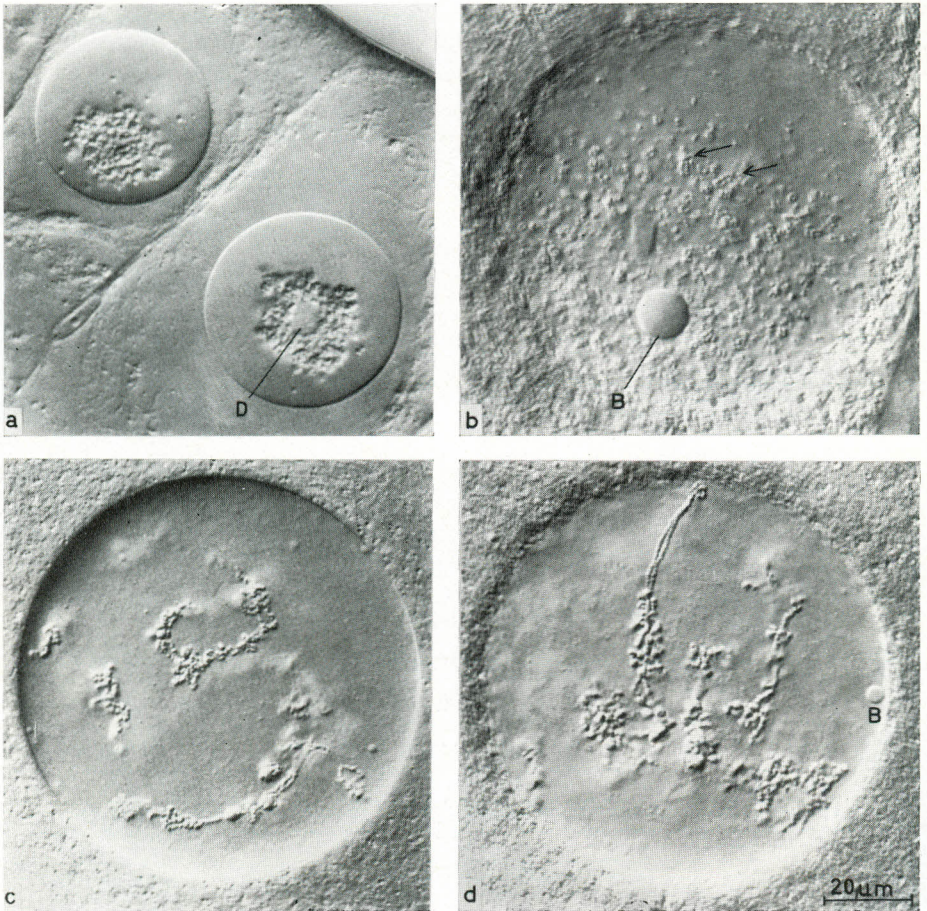


Abb. 1. Oocytenkerne von *Gryllus domesticus* (a, b) und *Locusta migratoria* (c, d); Lebendaufnahmen nach dem Nomarski-Phasenkontrastverfahren. Die multiplen Nucleolen sind bei *Gryllus* zu vielen kleinen Ringen (\rightarrow), bei *Locusta* zu langen Strängen geordnet. Bei *Gryllus* ist in jüngeren Oocyten (a) im Zentrum der Nucleolenwolke ein Teil der ribosomalen DNS noch nicht entspiralisiert (= DNS-Körper = D). B = Binnenkörper (Proteinkugel; s. BIER, KUNZ und RIBBERT 1967).

mal so viele Nukleolen enthalten wie ein somatischer Zellkern. Bei den Orthopteren sind die multiplen Oocytennukleolen entweder zu kleinen, von den Chromosomen abgelösten Ringen geordnet (wie bei *Gryllus*), oder sie liegen perlschnurförmig in langen Ketten hintereinander (wie bei *Locusta*) (Abb. 1, 2 und 3). Als Funktionsstruktur ist der Nukleolus in der Interphase und der meiotischen Prophase lichtmikroskopisch sichtbar, wohingegen die ihm zugrunde liegenden Gene (der sog. Nukleolen-

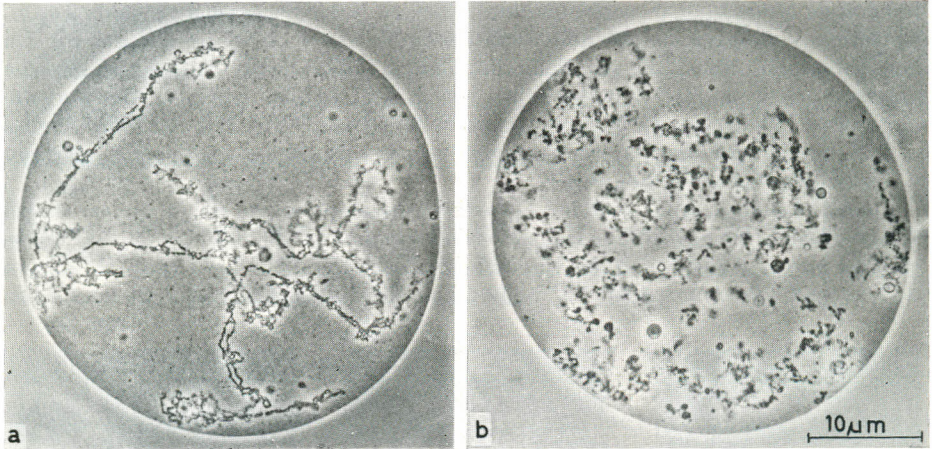


Abb. 2. Die zusammenhängenden Nukleolenketten (a) im *Locusta*-Oocytenkern werden durch DNase zerbrochen (b). Phasenkontrastaufnahmen von unfixierten, isolierten Oocytenkernen.

bildungsort) unsichtbar sind, weil die DNS während der Transkription entspiralisiert ist. Es ist jedoch möglich, die Nukleolen-DNS in den multiplen Oocytennukleolen indirekt nachzuweisen, indem man DNase zusetzt, wodurch die kettenförmigen Nukleolenverbände für die Dauer der Enzymeinwirkung auseinandergebrochen werden (Abb. 2).

1. Entstehung der amplifizierten Nukleolen-DNS

Die während des Oocytenwachstums entspiralisierte Nukleolen-DNS ist bei *Gryllus* zu Beginn der Meiose zu einer großen Kugel zusammengeballt. Dieser DNS-Körper ist nur von einigen Nukleolen umgeben; größtenteils ist er außer Funktion (KUNZ 1969).

Da die Nukleolen-DNS (rDNS) in der Oocyte gegenüber einer Somazelle etwa vertausendfacht ist, fragt sich, auf welchem Stadium der Keimzellenentwicklung die nukleolenbildenden Gene vervielfacht werden. Bei den Amphibien findet diese rDNS-Amplifikation hauptsächlich im Pachytän statt (GALL 1967, 1968; MACGREGOR 1968), während die Oogonien nur wenig mehr rDNS enthalten als vergleichbare somatische Kerne (GALL und PARDUE 1969). Im Unterschied dazu gibt es bei *Gryllus* mit autoradiographischer Methodik keine wirklich überzeugenden Beweise für Extrareplikationen in der Meiose (KUNZ 1969); außerdem lassen sich die DNS-Körper bei den Grillen noch deutlich bis in die Teilungsstadien der Oogonien zurückverfolgen. Dabei wird eine von den Chromosomen abgelöste DNS über Mitoseschritte weitergegeben und auf die Tochterkerne verteilt, ein bemerkenswerter Prozeß, für den es bei Amphibien keine Parallelen gibt.

Der Unterschied in der Frühooogenese zwischen Amphibien und *Gryllus* (Extrasynthese einerseits, DNS-Körper andererseits) erforderte vergleichende Untersuchungen an weiteren Insektenarten. Diese Untersuchungen wurden an *Locusta migratoria* durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß es bei *Locusta* keine so auffälligen DNS-Körper wie bei den Grillen gibt (Abb. 3 c). Es wurde daraufhin angenommen, daß eine schon so frühzeitig vorhandene vervielfachte rDNS, wie sie bei *Gryllus* in Form des DNS-Körpers in Erscheinung tritt, einen Ausnahmefall darstellt. Da die Oogonien und frühen Meiosestadien von *Locusta* nur wenige Nukleolen enthalten (Abb. 3 a, b), lag auch von dieser Seite her nahe, daß die amplifizierte rDNS bei *Locusta* wie bei den Amphibien erst kurz vor ihrer Funktion gebildet wird. Autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -Thymidin haben jedoch das Gegenteil bewiesen. Der *Locusta*-Oocytenkern baut nach der prämeiotischen S-Phase kein Thymidin mehr ein, woraus zu schließen ist, daß die Extrareplikationen — wenn überhaupt — allenfalls synchron mit der S-Phase ablaufen könnten.

Sowohl bei *Gryllus* als auch bei *Locusta* ist die amplifizierte rDNS (anders als bei *Xenopus*) schon lange vor ihrer Hauptaktivität vorhanden. *Gryllus* und *Locusta* unterscheiden sich nur darin, daß die vervielfachte Nukleolen-DNS bei *Gryllus* in jungen Stadien stark zusammengeballt ist, während sie sich bei *Locusta* mehr über den Kern

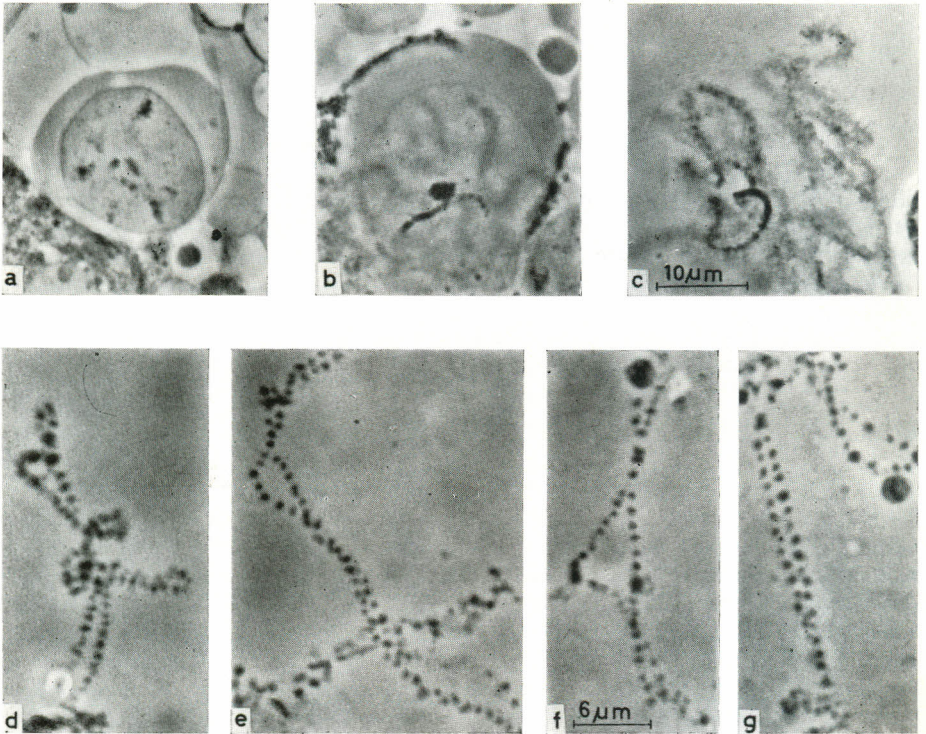


Abb. 3. a—c) Im Vergleich zu den wachsenden Oocytenkernen enthalten die Oogonien (a) und Pachytänstadien (b) von *Locusta* nur wenige Nukleolen. In einigen Fällen liegt an den Nukleolen im Pachytän ein heterochromatischer DNS-Abschnitt, der als Segment in ein Chromosom eingeschaltet ist (c). — d—g) Im *Locusta*-Polynukleolenstrang alternieren Nukleolen und Internukleolen in konstanten Abständen ($1,2 \mu\text{m}$). — a, b und d—g) Phasenkontrastaufnahmen von lebenden Oocytenkernen; c) Feulgen-Quetschpräparat.

verteilt. Die Frage nach ihrer Entstehung (Extrasynthesen oder eventuell ein konstanter Keimbahnbestandteil) kann nur mit mikrophotometrischer Technik gelöst werden.

Einige orientierende Messungen mit dem Zeiss-UMSP geben bei *Gryllus* bereits interessante Aufschlüsse:

Objekt: <i>Gryllus domesticus</i> ♀	DNS-Wert (Mittel) in Arbeitseinheiten (AE)	Zahl der gemessenen Zellkerne	Standard- abweichung
DNS-Körper im Pachytän	62	8	6
4n-Genom im Pachytän (ohne DNS-Körper)	216	2	
Gesamter DNS-Gehalt im Pachytän	278		
Prophase einer prämeiotischen Oogonie	281	1	
2n-Soma-Zellkern (Follikelzelle)	115	1	

1. Der DNS-Gehalt verschiedener DNS-Körper im Pachytän ist gleich groß (er ist etwa so hoch wie der DNS-Wert des haploiden Chromosomensatzes).
2. Der DNS-Gehalt der Keimbahn ist von den späten Oogonien bis ins Pachytän wahrscheinlich konstant.
3. Das Soma enthält keine amplifizierte rDNS.

Unter den Meßwerten zeichnete sich ein DNS-Körper durch doppelt so hohen DNS-Wert aus (135 AE), was wohl auf einen überzähligen Replikationsschritt gegenüber der Norm zurückgeht. Diese Beobachtung läßt es möglich erscheinen, daß die postulierten Extrareplikationen in der Keimbahn auch normalerweise in genauen Verdoppelungsschritten ablaufen, jedoch bei *Gryllus* und *Locusta* nicht wie bei *Xenopus* in einer kurzen Phase. Es könnte sein, daß der Prozeß der rDNS-Gen-Amplifikation bis in die Embryogenese zurückreicht.

2. Anordnung der Polynukleolen im *Locusta*-Oocytenkern

Die Polynukleolenstränge im Kern der wachsenden *Locusta*-Oocyte gliedern sich in periodisch aufeinanderfolgende Nukleolen und Zwischenglieder, an denen sich keine sichtbaren Syntheseprodukte anreichern (Abb. 3 d—g). Da die durch DNase hervorgerufenen Bruchstellen auch zwischen den Nukleolenkugeln liegen, folgt daraus, daß auch die internukleolären Abschnitte aus DNS bestehen. Der Aufbau ist so regelmäßig, daß es lohnend erschien, die Nukleolenabstände in größerer Zahl auszumessen und miteinander zu vergleichen (Abb. 4).

Die Messungen wurden an starken photographischen Vergrößerungen durchgeführt. Es ergab sich ein mittlerer Nukleolenabstand von $1,2 \mu\text{m}$. Aus den Meßwerten wurde eine Standardabweichung von $s = 0,17 \mu\text{m}$ errechnet. Das bedeutet, daß die im Nukleolenstrang hintereinanderliegenden Einzelnukleolen innerhalb der lichtmikroskopischen Meßgenauigkeit gleich weit voneinander entfernt sind.

Die Gliederung der Nukleolenstränge in Nukleolen und Internukleolen erinnert an den Aufbau des Eukaryotenchromosoms aus Chromomeren und Interchromomeren. An den Lampenbürstenchromosomen von *Triturus* hat MILLER (1965) eine spezielle

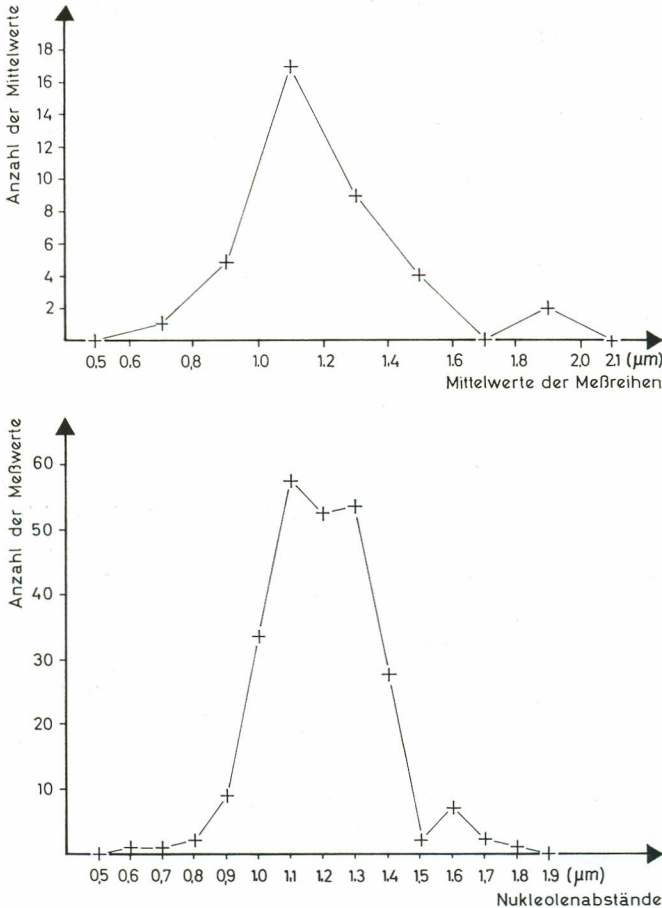


Abb. 4. Im Polynukleolenstrang von *Locusta* folgen die Einzelnukleolen einander in konstantem Abstand ($1,2 \mu\text{m}$). Die Nukleolenabstände wurden an verschiedenen Nukleolensträngen gemessen. Die obere Kurve zeigt die Verteilung der Mittelwerte dieser Meßreihen. Aus der Zufallsverteilung der Mittelwerte wurde geschlossen, daß die Unterschiede zwischen den Nukleolensträngen auf präparationsbedingte Streckungen bzw. Stauchungen zurückzuführen sind, denen gegenüber dem Gesamtmittelwert „Streckungsfaktoren“ zugrunde liegen. Durch Multiplikation mit den Streckungsfaktoren wurden die Nukleolenabstände der verschiedenen Meßreihen korrigiert. Die untere Kurve gibt die Häufigkeitsverteilung aller gemessenen Nukleolenabstände nach Korrektur mit den Streckungsfaktoren an.

Technik entwickelt, mit der er elektronenmikroskopisch zeigen konnte, daß die Interchromomeren keine Matrix tragen und möglicherweise nicht an der RNS-Synthese beteiligt sind. Analoge Verhältnisse im Aufbau der multiplen Nukleolenstränge wären von besonderem Interesse, weil die Nukleolen-DNS im Gegensatz zur normalen chromosomalen DNS viele gleichartige Gene enthält. Der rDNS-Bereich eines somatischen Zellkerns besteht aus einigen hundert (BIRNSTIEL, WALLACE, SIRLIN und FISCHBERG

1966), die multiple (amplifizierte) ribosomale DNS eines Oocytenkerns aus einigen hunderttausend Genen für die Erzeugung der 28 S und 18 S rRNS (BROWN und DAWID 1968; GALL 1969). Man kann bei den multiplen Nukleolensträngen also nicht wie bei den normalen Chromosomensträngen davon ausgehen, daß durch die Interchromomeren verschiedene Operationseinheiten voneinander getrennt werden. Allerdings ist die rDNS keinesfalls quantitativ mit ribosomaler RNS hybridisierbar, sondern in die alternierend angeordneten 28 S- und 18 S-rDNS-Cistronen ist noch eine schwere DNS integriert, die keine stabile rRNS codiert (BIRNSTIEL, SPEIRS, PURDOM, JONES und LOENING 1968; GALL 1969; GALL, MACGREGOR und KIDSTON 1969). Diese DNS könnte inaktiv sein und den internukleolären Segmenten entsprechen.

D i s k u s s i o n

FRAU E. HANSEN-DELKESKAMP: Haben Sie aus den autoradiographischen Befunden Hinweise erhalten, was aus der DNS des DNS-Körpers bei *Gryllus* in späteren Reifestadien der Oocyte und in der frühen Embryogenese wird?

W. KUNZ: Nein; spätere Reifestadien solcher Oocyten, denen zu Beginn der Meiose ^3H -Thymidin zum Einbau geboten wurde, waren bisher stets unmarkiert. Diese Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen.

H. SAUER: Im cytoplasmaarmen Grillenei befindet sich wenig rRNS, daher die Frage, ob der DNA-body wirklich aus rDNA besteht und rRNA codiert oder andere RNA-Arten, z. B. solche, die *DUSPIVA* für Wanzenoocyten findet.

W. KUNZ: Alle multiplen Oocytennukleolen von *Gryllus* entstehen an der DNS des sich entspiralisierenden DNS-Körpers (KUNZ 1969). Im Autoradiogramm sind die Nukleolen auf allen Oogenesestadien stärker RNS-markiert als die Lampenbürstenchromosomen, was die hohe RNS-Synthese an den Nukleolenbildungsorten belegt. Die Entstehung anderer RNS-Arten an den Nukleolenbildungsorten widerspricht den verbreiteten Befunden über die Funktion des Nukleolus. Es ist möglich, daß ein Großteil der rRNS noch vor der Eiablage verbraucht wird, zumal die ooplasmatische Proteinsynthese bis zur Chorionbildung sehr hoch ist.

G. CZIHAK: Aus den Diskussionsbemerkungen muß ich schließen, daß die Bezeichnung rDNS allgemein noch etwas verfrüht ist.

W. KUNZ: Das ist richtig und geht aus meinen Ausführungen über die Internukleolen hervor. BIRNSTIEL bezeichnet trotzdem die gesamte schwere DNS als rDNS.

Zusatz bei der Korrektur. Inzwischen konnte die rDNS-Natur des *Gryllus*-DNS-Körpers von LIMA-DE-FARIA, BIRNSTIEL und JAWORSKA auch mit Hilfe der Hybridisierungstechnik bestätigt werden (LIMA-DE-FARIA, A., M. BIRNSTIEL, and H. JAWORSKA: Amplification of ribosomal cistrons in the heterochromatin of *Acheta*. *Genetics* **61**, 145–160, 1969).

S c h r i f t t u m

- BIER, K., W. KUNZ und D. RIBBERT: Struktur und Funktion der Oocytenchromosomen und Nukleolen sowie der Extra-DNS während der Oogenese panoistischer und meroistischer Insekten. *Chromosoma* **23** (1967) 214–254.
- BIRNSTIEL, M., J. SPEIRS, I. PURDOM, K. JONES und U. E. LOENING: Properties and composition of the isolated ribosomal DNA satellite of *Xenopus laevis*. *Nature* **219** (1968) 454–463.
- BIRNSTIEL, M., H. WALLACE, J. L. SIRLIN und M. FISCHBERG: Localization of the ribosomal DNA complements in the nucleolar organizer region of *Xenopus laevis*. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **23** (1966) 431–447.

- BROWN, D. D., und I. B. DAWID: Specific gene amplification in oocytes. *Science* **160** (1968) 272–280.
- CALLAN, H. G.: Chromosomes and nucleoli of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J. Cell Sci.* **1** (1966) 85–108.
- GALL, J. G.: Synthesis of nucleolar DNA in amphibian oocytes. *J. Cell Biol.* **35** (1967) 43 A bis 44 A.
- GALL, J. G.: Differential synthesis of the genes for ribosomal RNA during amphibian oogenesis. *Proc. nat. Acad. Sci.* **60** (1968) 553–560.
- GALL, J. G.: The genes for ribosomal RNA during oogenesis. *Genetics* **61** (1969) 121–132.
- GALL, J. G., H. C. MACGREGOR und M. E. KIDSTON: Gene amplification in the oocytes of Dytiscid water beetles. *Chromosoma* **26** (1969) 169–187.
- GALL, J. G., und M. L. PARDUE: The formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. nat. Acad. Sci.* **63** (1969) 378–383.
- KUNZ, W.: Funktionsstrukturen im Oocytenkern von *Locusta migratoria*. *Chromosoma* **20** (1967 a) 332–370.
- KUNZ, W.: Lampenbürstenchromosomen und multiple Nucleolen bei Orthopteren. *Chromosoma* **21** (1967 b) 446–462.
- KUNZ, W.: Die Entstehung multipler Oocytennucleolen aus akzessorischen DNS-Körpern bei *Gryllus domesticus*. *Chromosoma* **26** (1969) 41–75.
- MACGREGOR, H. C.: Nucleolar DNA in oocytes of *Xenopus laevis*. *J. Cell Sci.* **3** (1968) 437 bis 444.
- MILLER, O. L.: Fine structure of lampbrush chromosomes. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **18** (1965) 79–99.
- Die Untersuchungen werden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt. Verf. dankt Herrn Prof. Dr. K. BIER (†) für Ratschläge, Herrn Prof. Dr. C. BRESCH für Hinweise, Herrn Prof. Dr. H.-G. KEYL für Arbeitsmöglichkeit am Zeiss-UMSP und Frl. G. BOHR für technische Assistenz.

Dr. W. Kunz, Zoologisches Institut der Universität, 4400 Münster (Westf.), Badestraße 9