

## SYNTHESE, INTERZELLULÄRER TRANSPORT, UND ABBAU VON RIBONUKLEINSÄURE IM OVAR DER STUBENFLIEGE *MUSCA DOMESTICA*

KARLHEINZ BIER. Zoologisches Institut der Universität Münster, Germany

Im Dipteren-Ovar ist das wachsende Ei mit den ihm anliegenden, polyploiden Nährzellen durch Cytoplasmabrücken verbunden (8, 14). Nach elektronenoptischen Untersuchungen an *Drosophila* (10) bestehen diese sogenannten Fusome neben dem interzellulären Cytoplasmastrang aus einem in der Zellwand eingelagerten osmiophilen Ring, dem nach innen eine Verschlusssubstanz anliegen kann. Die Fusome von *Musca domestica* entsprechen in Bau und Anordnung denen von *Drosophila* (11). Sie erreichen nach eigenen unveröffentlichten Untersuchungen in heranwachsenden Follikeln der Stubenfliege Öffnungsweiten von  $7\mu\phi$ . Die Bedeutung dieser Pforten in den Zellwänden für den RNS-Stoffwechsel des Ei-Nährverbandes zeigt sich auf Autoradiographien nach Injektion von  $^3\text{H}$ -Cytidin und  $^3\text{H}$ -Uridin (spez. Akt. 1.0 bzw. 0.9 C/mm,  $\approx 3\mu\text{C}$  je Tier) in die Leibeshöhle. Hier wird über die typischen Einbaubilder aus Versuchsserien mit 63 Fliegenweibchen berichtet. Die Ovarien

wurden in Alkohol-Eisessig-Chloroform (8:1:1) fixiert. Die Expositionszeiten lagen zwischen 15–22 Tagen. An Färbungen kamen in Kontrollpräparaten Gallocyanin-Chromalaun und Toluidinblau zur Verwendung. Die Spezifität des Einbaus bzw. der Färbung wurde mit Ribonuclease (0.5 mg/ccm, 1 h. bei  $37^\circ\text{C}$ ) überprüft.

Bereits 5 min. nach der Injektion findet sich eine streng auf die Zellkerne beschränkte Aktivität, die von den Chromosomen und Nukleolen ausgeht. Nach Inkubationszeiten von 10–30 min. dringt die gegenüber RNase empfindliche Aktivität im Cytoplasma von den stark radioaktiven Nährzellkernen zu den Zellgrenzen vor, in deren Nachbarschaft die Markierung zunächst geringer ist (Fig. 1). Bei Inkubationszeiten bis zu 30 min. wurden keine Unterschiede zwischen den Einbauraten der distalen und proximalen Nährzellkerne beobachtet. Die kleineren, distalen Nährzellen synthetisieren also, auf ihr Volumen bezogen,

mit annähernd gleicher Intensität RNS wie die größeren, proximalen Nährzellen.

Wird 45 min. und länger inkubiert, so bildet sich im Plasma der Oocyte eine begrenzte, oft keilförmige Markierung, die von eng begrenzten Stellen in den Zellwänden zwischen den proximalen Nährzellen und der Oocyte ausgeht (Fig. 2). Die Ausgangspunkte der radioaktiven

(3, 16), war kein vergleichbares Verteilungsmuster zu sehen.

Nach 1–3-stündiger Inkubation beginnt sich die Aktivität in den Nährzellkernen und in auffälliger Weise im Cytoplasma der distalen Nährzellen zu verringern. Dadurch entsteht im Nährfach ein Gefälle mit oft scharfen, durch die Zellgrenzen gebildeten Stufen (Fig. 2). Im Plasma

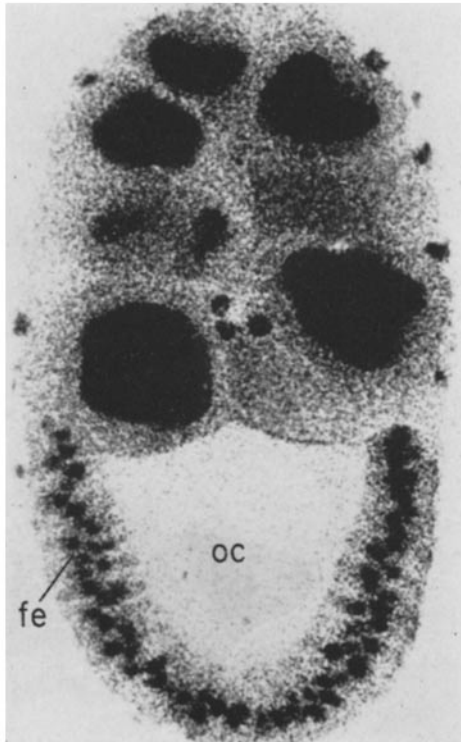


FIGURE 1

Follikel von *Musca domestica*, mit  $^3\text{H}$ -Cytidin 30 min. inkubiert. Im Nährfach (oben) sind fünf Nährzellkerne getroffen. Die markierte RNS nimmt zur Zellperipherie hin ab (intrazellulärer Gradient). oc, Oocyte, fe, Follikelepithel.  $\times 200$ .

Areale im Ooplasma stimmen mit der Lage der Fusome überein. Daraus ist zu schließen, daß die markierte RNS durch die Fusome in die Oocyte gelangt. Solche autoradiographischen Bilder wie in Fig. 2, die den Eindruck erwecken, als ob aus einer Düse Material in die Oocyte gedrückt würde, konnten bis zu 7 h. Inkubationsdauer beobachtet werden. Nach Injektion von  $^3\text{H}$ -Aminosäuren, die ebenfalls zu einer starken Markierung des Nährzell-Cytoplasmas führt

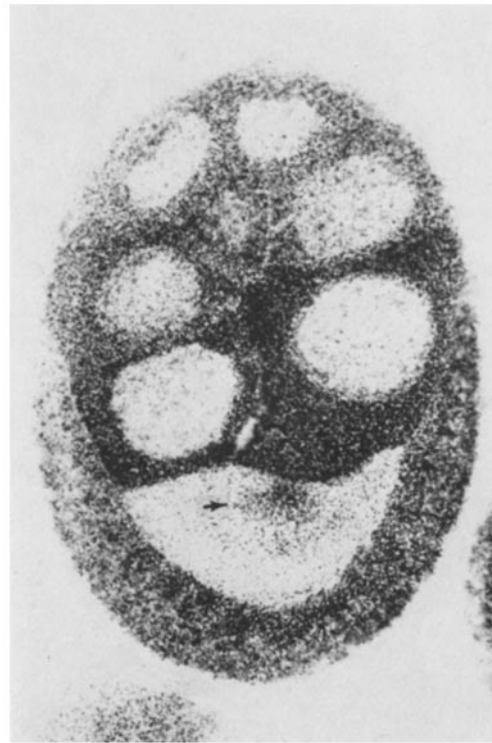


FIGURE 2

Dasselbe, 5 h. inkubiert. Die Nährzellkerne sind weitgehend von markierter RNS entleert, das Cytoplasma der proximalen Nährzellen ist besonders aktiv (interzellulärer Gradient).  $\rightarrow$ , die durch das Fusom in das Ooplasma einströmende RNS.  $\times 210$ .

der Oocyte sammelt sich, auch in den im Hinblick auf den intensiven Stoffwechsel des Fliegenovars langen Inkorporationszeiten von mehreren Stunden, gegenüber dem Nährfach wenig markierte RNS an. Die Zunahme der Aktivität im Ooplasma hängt nicht wesentlich von der Verlängerung der Inkubationszeit ab, sondern vom Entwicklungsstadium der Follikel. Erst im Zusammenhang mit der beginnenden Degenera-

tion des Nährfachs, wenn RNS-reiches Nährzellplasma auf breiter Front in die Oocyte eindringt, erhält das wachsende Ei in großem Umfang markierte RNS, die offenbar stabiler ist, als die vorher durch die Fusome gelieferte (Fig. 3). Nur auf diesem späten Stadium ist aus dem Nährfach einströmende RNS als zentral gelegener, breiter Streifen verstärkter Färbbarkeit in der Oocyte mit basischen Farbstoffen zu erfassen.

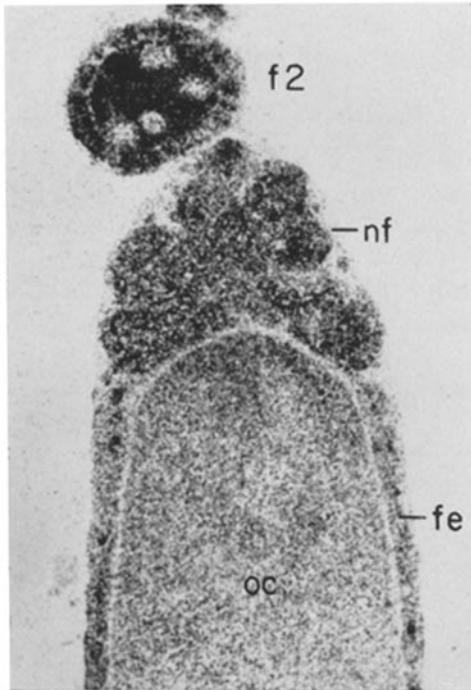


FIGURE 3

Obere Hälfte eines herangewachsenen Eifollikels mit degenerierendem Nährfach (*nf*), darüber ein zweiter, kleiner Follikel (*f 2*). Die Inkubationszeit mit <sup>3</sup>H-Cytidin beträgt 5 h. (vergl. Fig. 2). Das Nährfach ist geschrumpft, das stark markierte Cytoplasma der Nährzellen teilweise schon in die Oocyte übergetreten. *oc*, Oocyte, *fe*, Follikelepithel.  $\times 160$ .

In Übereinstimmung mit den autoradiographischen Befunden ist nach dem Einströmen des Nährzellplasmas die Oocyte deutlich basophiler als während der vorhergehenden Wachstumsphase, die den Figs. 1 und 2 entspricht. Die auf hohen RNS-Gehalt des übergetretenen Nährzellplasmas beruhende Basophilie wurde auch noch nach Abschluß der Chorionbildung beobachtet. Die auf früheren Wachstumsstadien autoradio-

graphisch dargestellten Fusomhöfe (vergl. Fig. 2) treten dagegen im Ooplasma nicht als Areale verstärkter Basophilie hervor.

Der Oocytenkern nimmt während der hier untersuchten Funktionsphase des Nährfachs an der RNS-Synthese nicht teil (Fig. 4). Auch für eine Abgabe von RNS aus dem Follikelepithel in die Oocyte liefern die autoradiographischen Bilder keine Anhaltspunkte.

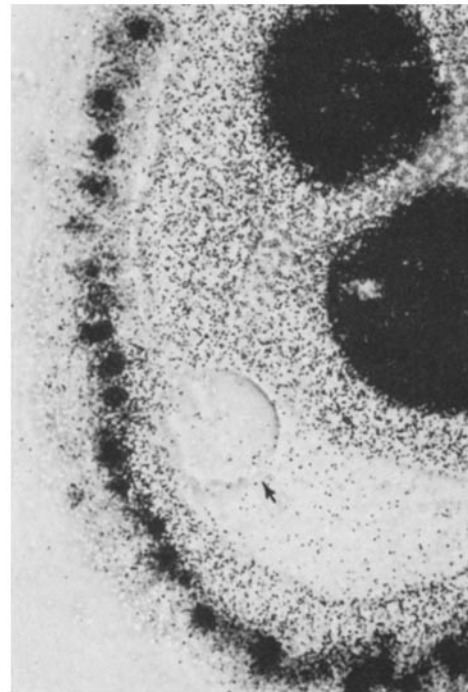


FIGURE 4

Ausschnitt aus einer jungen Oocyte mit 2 Nährzellkernen und Follikelepithel, 30 min. mit <sup>3</sup>H-Cytidin inkubiert. Der Oocytenkern ( $\rightarrow$ ) enthält keine markierte RNS.  $\times 260$  (Phasenkontrast).

#### DISKUSSION

Eine zusammenfassende Darstellung unserer Kenntnisse über die Insektenoogenese hat Bonhag (4) gegeben. Eine RNS-Lieferung vom Nährfach in die Oocyte ist meist als Strom von Nährzellplasma, der sich mit beginnender Degeneration des Nährfachs ergießt, bei verschiedenen holometabolen Insekten beschrieben worden (2, 5, 12, 13). In dieser Untersuchung wurde jedoch eine makromolekulare, in Wasser und Alkohol sowie Alkohol-Wassergemischen und kalter, 2 prozentiger Perchlorsäure praktisch unlösliche

RNS-Fraktion erfaßt, die anscheinend ohne Cytoplasma von frühen Wachstumsstadien an auf den Leitbahnen interzellulärer Brücken in die Oocyte übertritt. Die Ausbildung eines Gradienten im Nährfach und die von den Fusomen ausgehende Aktivität in der Oocyte lassen den Schluß zu, daß RNS aus allen Nährzellkernen in Richtung der Oocyte transportiert wird. Es bleibt offen, in welcher Form dies geschieht. Vielleicht gelangt die Masse der aus den distalen Nährzellen abgegebenen RNS-Moleküle nur in die mittleren und proximalen Nährzellen und wird dort in die Stoffwechselprozesse einbezogen. Die Zufuhr zellfremder RNS könnte dann die proximalen Nährzellen befähigen, ihrerseits größere RNS-Mengen an die Oocyte abzugeben. Dem wachsenden Ei wird jedenfalls, vielleicht mit zeitweiliger Unterbrechung durch Verschuß der Fusome (10), von der Formation des Follikels an bis zur Degeneration des Nährfachs RNS zugeführt. Der hohe RNS-Bedarf könnte im Zusammenhang stehen mit dem Cytoplasmareichtum des Fliegeniees, das außer durch Dottereinlagerung wahrscheinlich auch auf fortgeschrittenen Wachstumsstadien durch cytoplasmatische Proteinsynthese wächst.

Das Ergebnis der Zufuhr markierter Verbindungen müßte autoradiographisch als verstärkte Radioaktivität der Oocyte zu erfassen sein, vor allem während der jüngeren Entwicklungsstadien, wenn das Nährfach noch wesentlich größer ist als die Oocyte. Auch sollte sich bei fortwährendem Zustrom die RNS um die Fusome herum anreichern und mit fortschreitenden Inkubationszeiten die Oocyte in dem Maße erfüllen, wie sie sich im Nährfach verringert. Weil das aber nicht der Fall ist, muß angenommen werden, daß die durch die Fusome eingedrungene RNS größtenteils schnell abgebaut wird. Der RNS-Anteil mit der hohen Umsatzrate verhält sich somit wie es für die "Messenger"-RNS postuliert wird: Diese RNS-Makromoleküle, die sich in der Basenzusammensetzung von der Masse der cytoplasmatischen RNS unterscheiden, sollen depolymerisiert werden, nachdem sie die genetische Information zur Eiweißsynthese von den aktivierten Loci der Chromosomen in das Cytoplasma übertragen haben (1, 6, 7, 9). Einem nachfolgenden Übergang der markierten Bruchstücke in die beständigere ribosomale RNS-Fraktion, wie er für Bakterien beschrieben wurde (15), steht in der Oocyte das Fehlen eines aktiven

nuklearen Syntheseapparates entgegen, weshalb die hohe Umsatzrate autoradiographisch sichtbar wird. Die hier diskutierte Vorstellung, daß die Nährzellen während ihrer Funktionsperiode hauptsächlich Messenger-RNS und erst im Zusammenhang mit ihrer Degeneration Cytoplasma reich an ribosomaler RNS abgeben, erscheint unter der Annahme sinnvoll, daß einerseits die RNS-Fraktion mit hoher Umsatzrate den limitierenden Faktor für die Eiweißsynthese in der Oocyte bildet und andererseits die stabileren ribosomalen RNS-Moleküle ihre bisher rätselhafte Rolle bei der Proteinsynthese vielfach wiederholen können.

#### SUMMARY

Short time incubation with tritiated RNA-precursors up to 30 min. produces equally high levels of activity in all nurse cells. During this period, tritiated RNA streams from the heavily labeled nurse cell nuclei to the periphery of the trophocytes. Incorporation periods of 45 min. or more lead to spots of intense activity in the oocyte near the intercellular bridges (Fusomes) connecting the proximal nurse cells and the ooplasm. From 1 hr. after injection onward the activity diminishes in all nurse cell nuclei and in the cytoplasm of the smaller distal nurse cells. This is considered as evidence of RNA-transport from the nurse chamber into the growing oocyte. As the insoluble compound of the tracer (*i.e.*, RNA of high molecular weight) does not accumulate in the oocyte, a high turnover of RNA entering the oocyte *via* the intercellular bridges is assumed. It is pointed out that the processes described in this paper are similar to what is to be expected for messenger-RNA.

Der experimentelle Teil der Untersuchungen wurde im Zoologischen Institut der Universität Würzburg (Vorstand: Prof. Dr. G. Krause) durchgeführt. Der Autor ist der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe und Frl. K. Starkenberg für zuverlässige technische Assistenz zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 24. September 1962.

#### LITERATUR

1. BEERMANN, W., *Zool. Anz.*, 1962, **25**, suppl., 44.
2. BIER, K., *Zool. Anz.*, 1955, **18**, suppl., 422.
3. BIER, K., *Naturwissenschaften*, 1962, **49**, 332.

4. BONHAG, P. F., *Ann. Rev. Entomol.*, 1958, **3**, 137.
5. COLOMBO, G., *Arch. Zool. Ital.*, 1957, **42**, 309.
6. EDSTRÖM, J. E., GRAMPP, W., and SCHOR, N., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1961, **11**, 549.
7. JACOB, F., and MONOD, J., *J. Molecular Biol.*, 1961, **3**, 318.
8. KING, R. C., *Growth*, 1960, **24**, 265.
9. MATTHAEI, H. J., and NIRENBERG, M. W., *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1961, **47**, 1580.
10. MEYER, G. F., *Z. Zellforsch.*, 1961, **54**, 238.
11. Meyer, G. F., persönliche Mitteilung.
12. MORGENTHALER, H. U., *Arch. Julius-Klaus-Stift. Vererbungsforsch., Sozialanthropol. u. Rassenhyg.*, 1952, **27**, 206.
13. SIRLIN, J. L., and JACOB, J., *Exp. Cell Research*, 1960, **20**, 283.
14. VERHEIN, A., *Zool. Jahrb. Abt. Anat. u. Ontog. Tiere*, 1921, **42**, 149.
15. YCAS, M., *Internat. Rev. Cytol.*, 1962, **13**, 1.
16. ZALOKAR, M., *Exp. Cell Research*, 1960, **19**, 184.