

## Bau und Funktion der Nukleolen

Von H. STICH, Wilhelmshaven<sup>1</sup>

### I. Definition

Nukleolen sind extrachromosomal, mikroskopisch sichtbare, in den Kernen fast aller pflanzlichen und tierischen Zellen vorkommende, eiweißhaltige Körpchen. Gegenüber dem Kernsaft sind sie durch den kompakteren, gelartigen Aufbau ausgezeichnet. Von den Chromosomen können sie durch das Fehlen von Desoxyribonukleinsäure und dem Reichtum an Ribonukleinsäure unterschieden werden, sowie durch ihr Verhalten während der Mitose. In der Prophase, in der die Chromosomen durch ihre Spiralisierung deutlich hervortreten, lösen sich die Nukleolen meist vollkommen auf, fehlen die Ana- und frühe Telophase hindurch und entstehen erst wieder neu im Kern der Telophase und Interphase.

Da das Hauptinteresse der zytologischen Forschung, bedingt durch die weitreichenden Ergebnisse der Genetik, sich auf die Untersuchungen der Chromosomen richtete, blieb unsere Kenntnis über die Nukleolen sehr mangelhaft. Wohl finden sich öfters Angaben über Zahl und Form der Nukleolen, eine ausführliche Analyse steht jedoch bis jetzt noch aus. Deshalb erscheint es auch nicht verwunderlich, dass über ihre Bedeutung keine einheitliche Vorstellung herrscht. Einige der sich meist widersprechenden Hypothesen mögen hierfür einen Eindruck geben: der Nukleolus sollte ein nutzloses Endprodukt des Kernstoffwechsels sein<sup>2</sup>, für die Bildung der Chromosomen dienen<sup>3</sup>, eine Sekretfunktion besitzen<sup>4</sup>, als Fermentspeicher funktionieren<sup>5</sup>, in das Plasma übertragen und dort die Bildung verschiedenster Gebilde induzieren<sup>6</sup>, eine Melaninproduktion veranlassen<sup>7</sup>, die Desoxyribonukleinsäure der Chromosomen liefern<sup>8</sup>, seinen Inhalt in das Zytoplasma entleeren<sup>9</sup>, die vom Heterochromatin gebildeten Eiweiße sammeln und an das Zytoplasma abgeben<sup>10</sup>,

und schliesslich der Sitz einer Ribonukleinsäuresynthese sein<sup>11</sup>. Es erscheint deshalb erwünscht, eine kritische Sichtung der Befunde vorzunehmen, die Bedeutung des Nukleolus zu ermitteln und sie mit der Kernfunktion in Beziehung setzen.

### II. Aufbau und Zusammensetzung der Nukleolen

Zahl, Verteilung und Form der Nukleolen unterliegen grossen Variationen. Sie können art- oder organspezifisch sein, oder schliesslich nur den Ausdruck der augenblicklichen Zelltätigkeit darstellen. In den meisten Fällen gelangen alle drei Faktoren zur Wirkung. Die Artspezifität kann an Zellen mit gleicher Funktion demonstriert werden. So liegt zum Beispiel in den Oozytenkernen der Meduse *Eutimium*, bei vielen Hirudineen und Crustaceen nur jeweils ein Nukleolus vor, bei Tritonen hingegen mehrere hundert und über tausend bei verschiedenen Foraminiferen und Myriapoden. Ein demonstratives Beispiel für eine artspezifische Nukleolenform sind die verschiedenen nahverwandten einkernigen Acetabularien<sup>12</sup> (Abb. 1). Über die Art-

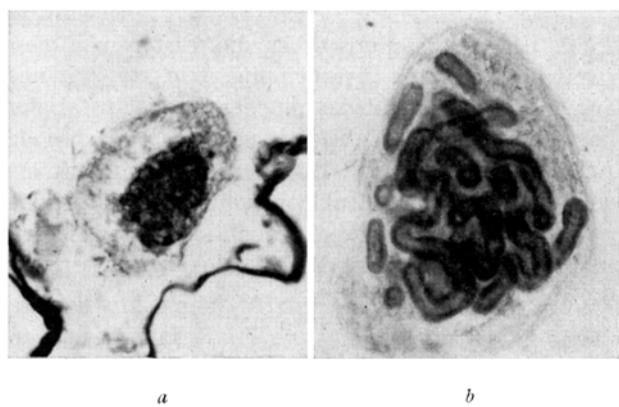


Abb. 1. Kerne von a) *Acetabularia Wettsteinii* und b) *Acetabularia mediterranea*. Anthrazensblaufärbung.

<sup>1</sup> Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Abt. Hämmerling, Wilhelmshaven.

<sup>2</sup> V. HAECKER, Arch. mikr. Anat. 42 (1893).

<sup>3</sup> E. ROBERTIS, W. NOWINSKI, und F. SAEZ, General Cytology (Saunders Comp. London, 1954).

<sup>4</sup> K. KONOPKA und H. ZIEGENSPECK, Protoplasma 7, 62 (1929).

<sup>5</sup> Ch. POSTELMANN und H. ZIEGENSPECK, Protoplasma 11, 298 (1930).

<sup>6</sup> B. WILSON, The Cell in Development and Heredity (New York, 1925).

<sup>7</sup> T. GODA, Fac. sci. Imp. Univ. Tokyo, Sect. 4, 2, 178 (1951).

<sup>8</sup> L. SHARP, Einführung in die Zytologie (Borntraeger, Berlin 1931).

<sup>9</sup> H. ALTMANN, Z. Naturf. 4b, 138 (1949).

<sup>10</sup> T. CASPERSSON, Cell Growth and Function (Norton, New York 1950).

spezifität lagert sich oft eine Organspezifität, wie aus einem Vergleich der Nukleolen einer Oozyte und einer Drüsenzelle bei *Polypphemus* (Cladocere) leicht ersichtlich ist (Abb. 2). Schliesslich sei noch an Acetabularien als Beispiel die Abhängigkeit der Nukleolenform und

<sup>11</sup> A. POLLISTER und C. LEUCHTENBERGER, Nature 163, 360 (1949). - H. STICH und J. HÄMMERLING, Z. Naturf. 8b, 329 (1953).

<sup>12</sup> J. HÄMMERLING, Arch. Protistenk. 97, 7 (1944).

des Nukleolenaufbaues vom Energiezustand der Zelle demonstriert (Abb. 6).

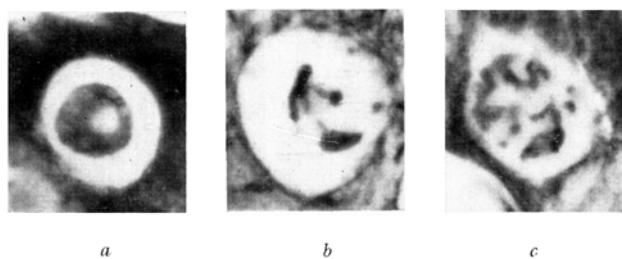


Abb. 2. Kerne einer *a* Oozyte und *b, c* von Drüsenzellen von *Polyphemus pediculus*. Toluidinblaufärbung.

Die meisten Nukleolen besitzen einen heterogenen Aufbau. Sie bestehen aus einer kompakteren, Ribonukleinsäure und Eiweise fürenden Schicht, die Bläschen flüssigen Inhaltes einschliesst. Diese Nukleoleneinschlüsse, die an einigen günstigen Objekten wie zum Beispiel *Corydalis*, *Mesembryanthemum*<sup>13</sup> und *Acetabularia*<sup>14</sup> im Leben beobachtet werden können, bewegen sich ständig innerhalb des Nukleolus, fliessen zu grösseren Einheiten zusammen und werden in den Kernsaft entleert, wobei die Nukleolusoberfläche amöboide Bewegungen ausführt. Grösse und Zahl der Nukleolusbläschen ändern sich während der Entwicklung einer Zelle. Mit dem Wachstum des Nukleolus nehmen sie zu, meist jedoch stärker als der restliche Nukleolusanteil: zum Beispiel betragen die Einschlüsse in den Nukleolen junger Oozyten bei *Diaptomus castor* (Copepode) nur rund 15% des Nukleolusvolumens, in ausgewachsenen Oozyten hingegen rund 75%. Eine Vorstellung über die Bedeutung dieser zweifellos wichtigen Erscheinung steht zur Zeit noch aus. Sie sind irgendwie mit der Nukleolustätigkeit korreliert. In den Nukleolen von stark wachsenden Acetabularien sind die Bläschen weniger stark entwickelt (um 50% des Nukleolusvolumens) als in Zellen mit gehemmtem Stoffwechsel und keinem Wachstum, in denen sich Kern und Nukleolus verkleinern (bis 90%).

Eine Reihe von Untersuchern nimmt eine direkte Entleerung der Nukleoleneinschlüsse in das Zytoplasma an<sup>9</sup>. Die Nukleolusoberfläche soll sich hierbei mit der Kernmembran verbinden, eine Erscheinung, die durch verschiedene Kontraktionszustände des Heterochromatins angeblich verursacht wird. Darauf entsteht ein Porus, durch den der Blaseninhalt in das Zytoplasma ausfliesst<sup>15</sup>. Da die Untersuchungen ausschliesslich an fixiertem Material ausgeführt wurden, konnte bisher der Einwand einer Artefaktbildung nicht ausgeschaltet werden. Bei *Acetabularia* und *Mesembryanthemum* findet mit Sicherheit diese Form der Blasenentleerung nicht statt.

Auch der bei normaler zytologischer Technik im Lichtmikroskop homogen erscheinende Nukleolusanteil besitzt offenbar eine komplexe Struktur. Bei der Ver-

grösserung im Elektronenmikroskop löst er sich, wie Abbildung 3 deutlich erkennen lässt, in einen Knäuel fädiger Elemente auf, deren Dicke zum Beispiel bei der Menschenleber von 90 bis 180  $\mu$  variiert<sup>16</sup>. Eine Innenstruktur lässt sich auch durch Anwendung besonderer Methoden sichtbar machen. So kann bei einigen Objekten nach einer Silber-Gold-Imprägnation nach CAJAL im Lichtmikroskop eine fädige Struktur erkannt werden<sup>17</sup>. Eine Identifizierung beider Arten von Nukleolensäden darf nicht erfolgen, da Strukturen aus zwei verschiedenen Grössendimensionen vorliegen. Auch müssen weitere Untersuchungen abgewartet werden, bevor die Realität dieser Nukleolonemen als gesicherte Gebilde angesehen werden können.

Betrachtet man die grosse Mannigfaltigkeit der Nukleolusformen und des Nukleolusaufbaues, so stellt sich unwillkürlich die Frage, ob denn alle extrachromosomalen Körper in den Zellkernen miteinander vergleichbar sind und unter den Begriff Nukleolus bzw. Nukleolarsubstanz zusammengefasst werden können, oder ob es sich um Gebilde verschiedener Art und Funktion handelt. Es lag nahe, in einer Analyse der stofflichen Zusammensetzung dieser extrachromosomalen Körper eine Auskunft zu suchen.

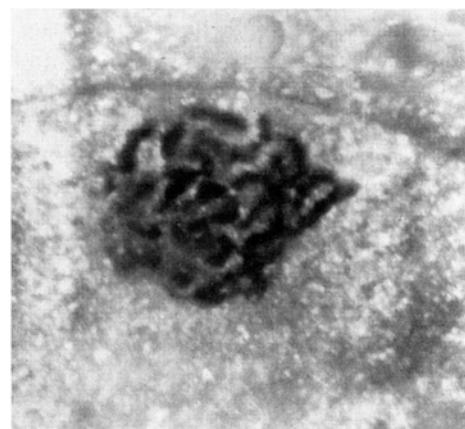


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Nukleolus aus der Leberzelle einer Ratte. 21000fache Vergrösserung (nach BERNHARD et al. 1952).

Die Hauptmasse der Nukleolen besteht aus verschiedenen Eiweisskörpern: aus Phosphorproteiden<sup>18</sup>, einfachen basischen Eiweissen und höheren Eiweissen vom Globulintyp. Über die Art der basischen Eiweisse besteht keine einheitliche Auffassung. Manche Forscher halten sie wegen ihres hohen Gehaltes an Diaminosäuren für ein Histon<sup>19</sup>, andere hingegen für ein Protamin<sup>19</sup>. Begründet wird die zweite Auffassung durch besondere Lösungsverhältnisse dieser Eiweiss-

<sup>13</sup> E. KÜSTER, *Die Pflanzenzelle* (Fischer, Jena 1951).

<sup>14</sup> H. STICH, *Z. Naturf.* 6b, 319 (1951).

<sup>15</sup> H. ALTMANN, *Naturwissenschaften* 6, 138 (1952).

<sup>16</sup> W. BERNHARD, F. HAGUENAU, A. GAUJIER und CH. OBERLING, *Z. Zellf.* 37, 281 (1952).

<sup>17</sup> C. ESTABLE und J. SOTELO, *Stain Techn.* 27, 307 (1952).

<sup>18</sup> M. GERSCH, *Z. Zellf.* 30, 483 (1940).

<sup>19</sup> S. VINCENT, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38, 139 (1952).

fraktion sowie ihre mengenmässige Zusammensetzung aus Glutaminsäure, Prolin, Arginin, Lysin, Histidin und Phenylalanin, die von derjenigen von Histonen erheblich abweicht. Mit einer bestimmten Eiweissfraktion sind Lipoide verbunden, die besonders an der Nukleolusoberfläche und in den Nukleoleneinschlüssen konzentriert erscheinen<sup>20</sup>. Ein im Verhältnis zu den Proteinen kleiner, aber stets auffindbarer Betrag wird von den Nukleinsäuren eingenommen und zwar von der Ribonukleinsäure. Nur ausnahmsweise, oft nur in ganz bestimmten Entwicklungsphasen gibt der Nukleolus eine positive Feulgenreaktion<sup>21</sup>, woraus auf die Anwesenheit einer Desoxyribonukleinsäure geschlossen wird. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass in diesen Fällen die DNS. von den Chromosomen abgestossen und an der Nukleolarsubstanz adsorbiert wurde, mit seiner Funktion und seinem Aufbau aber nichts zu tun hat. Die im Nukleolus auffindbare RNS. scheint nicht einheitlicher Natur zu sein<sup>22</sup>. Es lassen sich mehrere Polymerisationsstufen nachweisen, woraus auf eine RNS.-Synthese im Nukleolus geschlossen wurde. Da im Nukleolus einige der hierzu notwendigen Fermente bereits nachgewiesen wurden – eine alkalische Phosphatase<sup>23</sup>, Adenosintriphosphatase<sup>24</sup> und eine Metaphosphatase<sup>25</sup> – erlangt diese Anschauung eine weitere Wahrscheinlichkeit.

Mit diesen zytochemischen Methoden konnten auch gesicherte Unterschiede zwischen einzelnen Nukleolen nachgewiesen werden. So besitzen zum Beispiel die sechs Nukleolen eines Oozytenkernes einer Assel eine positive Gomorireaktion auf Monophosphatase, während nur in drei von ihnen eine Diphosphatase nachweisbar ist<sup>26</sup>. Die Oozytennukleolen von *Helix* und *Tachea* geben einen positiven Arginin-nachweis<sup>27</sup>, während er zum Beispiel bei *Acetabularia* negativ ist. Auf frühen Furchungsstadien von *Cyclops strenuus* sind die Nukleolen azidophil, besitzen also keine oder eine relativ geringe Menge an RNS., während sie später, auf älteren Entwicklungsstadien, basophil werden, sich also mit RNS. stark beladen. Diese Beispiele mögen genügen, um die Verschiedenheit in der Zusammensetzung der Nukleolen zu demonstrieren. Betrachtet man die chemischen, physiologischen und morphologischen Befunde, so lassen sie wohl die Schlussfolgerung zu, dass die Nukleolen keine gleichartigen und einheitlichen Gebilde darstellen. Eine Aufgliederung der Nukleolen erscheint jedoch zur Zeit unzweckmässig, besonders da hierfür notwendige, scharf definierbare Kriterien fehlen. Aber man wird stets in Betracht

ziehen müssen, dass die Funktion all der mit dem Namen Nukleolen belegten Kernkörperchen Unterschiede aufweisen kann.

### III. Entstehung von Nukleolen

Im Gegensatz zu Chromosomen, deren Zahl, Struktur und DNS.-Gehalt<sup>28</sup> konstant den ganzen Lebenszyklus einer Zelle hindurch erhalten bleiben und auch durch den Mechanismus der Mitose konstant weitergegeben werden, unterliegen die Nukleolen einem ständigen Wechsel zwischen Aufbau und Abbau, der bis zur vollständigen Auflösung in der Prophase führen kann. In der darauffolgenden Telophase und Interphase entstehen dann offenbar *de novo* eine gleiche Anzahl Nukleolen. Welche Faktoren determinieren diese Erscheinung?

HEITZ<sup>29</sup> fand wohl als erster an verschiedenen pflanzlichen Objekten die Abhängigkeit der Nukleolusbildung von der Anwesenheit bestimmter Einschnürrungen an den Chromosomen, den sogenannten «nucleolus organizer». Die Allgemeingültigkeit dieses Prinzips für fast alle tierischen und pflanzlichen Zellen wurde bald anerkannt. Die Bedeutung der Nukleolusbildungsstellen lässt sich instruktiv an Inversionen und Translokationen von Chromosomenstellen demonstrieren, bei denen der «nucleolus organizer» aus einanderbricht und die einzelnen Teile darauf getrennt voneinander zu liegen kommen. Da jeder Bruchteil die Fähigkeit zur Nukleolusbildung beibehält, kommt es zur Entstehung mehrerer Nukleolen<sup>30</sup>. Die einmal ausgebildeten Nukleolen können sich von den Nukleolusbildungsstellen der Chromosomen trennen und so ohne Zusammenhang mit den Chromosomen in den Kernsaft zu liegen kommen. Hierbei können sie wachsen, sich teilen und Nukleolblasen ausstossen. Aus dieser morphologischen Unabhängigkeit von den Chromosomen darf jedoch nicht auf eine physiologische geschlossen werden. Erwähnt müssen hier die akzessorischen Kerne<sup>31</sup> werden, die von dem Oozytenkern abgegeben werden, ein RNS.-haltiges Körperchen besitzen und eine negative Feulgenreaktion zeigen. Sie stellen eine Art von Kern mit Nukleolus, aber ohne Chromosomen dar<sup>32</sup>. Leider fehlen weitere zytochemische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen, so dass zur Zeit eine Beziehung dieser akzessorischen Kerne zu dem Problem der Nukleolusentstehung nicht erkennbar ist.

Über Struktur und Aufbau der Nukleolusbildungsstellen sowie über die Art der Nukleolenentstehung ist zur Zeit schwer eine nur einigermassen zuverlässige

<sup>20</sup> H. CALLAN und S. TOMLIN, Proc. Roy. Soc. [B] 137, 367 (1950).

<sup>21</sup> H. BAUER, Z. Zellf. 18, 254 (1933).

<sup>22</sup> A. POLLISTER und C. LEUCHTENBERGER, Nature 163, 360 (1949).

<sup>23</sup> Zum Beispiel: E. KRUGELIS, Biol. Bull. 93, 215 (1947).

<sup>24</sup> CH. LANDSCHÜTZ, Exper. 6, 232 (1950).

<sup>25</sup> M. ROSS und J. ELY, Exp. Cell Res. 2, 339 (1951).

<sup>26</sup> M. DE NICOLA, Micr. Sci. 90, 391 (1949).

<sup>27</sup> J. SERRA und A. QUEIROZ-LOPES, Chromosoma 2, 576 (1944).

<sup>28</sup> H. SWIFT, Rev. Cytology 2, 1 (1953).

<sup>29</sup> E. HEITZ, Planta 12, 775 (1931); 15, 495 (1931).

<sup>30</sup> B. MCCLINTOCK, Z. Zellf. 21, 284 (1934).

<sup>31</sup> P. BUCHNER, Arch. mikr. Anat. 91, 1 (1918).

<sup>32</sup> E. WOLF, *Moderne Biologie*, Festschr. NACHTSHEIM (Berlin, 1950).

Vorstellung zu entwickeln. Trotzdem möge hier versuchsweise eine allerdings sehr hypothetische Ansicht skizziert werden. Zuerst muss einmal zwischen zwei Alternativen unterschieden werden: der Nukleolus stellt eine Ansammlung von Stoffen dar, die an den verschiedensten Stellen der Chromosomen gebildet wurden, oder aber der Nukleolus entsteht aus einer spezifischen Substanz, die nur an bestimmten Stellen der Chromosomen, den Nukleolusbildungsstellen, lokalisiert ist.

Betrachten wir als Beispiel die Verhältnisse an den Riesenchromosomen der Dipteren. In den Zellkernen der Speicheldrüsen und der Malpighischen Gefässe sind ausser den meist in Ein- oder Zweizahl vorkommenden Hauptnukleolen noch sogenannte Nebennukleolen entwickelt<sup>33</sup>. Es sind dies kleine, bei Lebendbeobachtung dunkel erscheinende Tröpfchen, die an bestimmten Chromosomenorten gebildet werden, von wo sie in den Kernsaft abgestossen werden können, in dem sie sich dann früher oder später auflösen. Die Produktion der Nebennukleolen lässt sich oft auf eine Querbande zurückführen (Abb. 4). Diese enthält RNS, im Gegensatz zu allen anderen Querscheiben, die ausser der Eiweisskomponente hauptsächlich, wenn nicht ausschliesslich DNS, besitzen<sup>34</sup>. Übertragen wir diese an den Riesenchromosomen deutlich erkennbaren mikroskopischen Befunde in die molekulare Dimension, so lässt sich folgende Vorstellung von der Nukleolusbildung entwerfen. Zwischen den höchstwahrscheinlich am Aufbau der Gene beteiligten DNS-Molekülen liegen im Chromosom noch etliche RNS-Moleküle (Abb. 4). Entsprechend der Fähigkeit aller Nukleoproteide werden sich auch diese Ribonukleinsäure-Proteide unter geeigneten Bedingungen reduplizieren können (Abb. 4d). Auf diese Weise wird eine grössere Menge von Nukleoproteiden entstehen, welche die Nukleolarsubstanz ausmachen. Eine genügend starke

Anreicherung dieser Grundsubstanz ergibt schliesslich den mikroskopisch erkennbaren Nukleolus. Die im Chromosom lokalisierten Ribonukleoproteide verkörpern also den «nucleolus organizer». Wie die Desoxyribonukleoproteide der Gene werden auch die Ribonukleoproteide des «nucleolus organizer» konstant von Zelle auf Zelle weitergegeben, wodurch es zu der beobachteten Regelmässigkeit in der Nukleolusbildung kommt<sup>35</sup>.

Eine zweite an den Riesenchromosomen deutlich beobachtbare Erscheinung ist vielleicht weiter verbreitet, als bisher vermutet wurde, und zwar die unter bestimmten physiologischen Zuständen eintretende starke bzw. schwache Ausbildung verschiedener Nebennukleolenstellen<sup>36</sup>. Es ist denkbar, dass Kerne aus verschiedenen Geweben Nukleolen besitzen, die von verschiedenen Chromosomenstellen gebildet wurden. Da wegen der Kleinheit der meisten Kerne eine Lokalisation der Nukleolen zu bestimmten Nukleolusbildungsstellen der Chromosomen nicht möglich ist, könnten leicht Nukleolen verschiedener Ursprünge für ein und dieselben gehalten werden. Dass wirklich unter bestimmten Bedingungen Nukleolen an Chromosomen ausgebildet werden, an denen normalerweise keine mikroskopisch feststellbare Nukleolarsubstanz auffindbar ist, mögen folgende zwei Beispiele zeigen:

a) *Vicia faba* und *montana* haben in ihrem Chromosomensatz zwei sogenannte SAT-Chromosomen und infolgedessen auch zwei mikroskopisch erkennbare Nukleolen. Durch ab und zu vorkommende Aberration von Chromosomen in der Mitose kann es zur Bildung eines grösseren Hauptkernes kommen, in dem zwei Nukleolen liegen, und zur Entstehung eines kleineren Nebenkernes, der jedoch auch einen kleinen Nukleolus besitzt, obgleich er kein SAT-Chromosom enthält. Ein anderes Chromosom, das normalerweise keinen sichtbaren Nukleolus produziert, muss die Bildung dieses Nukleolus induziert haben<sup>37</sup>.

b) In manchen Zellkernen von Mais finden sich normalerweise zwei Nukleolen. Bei einer bestimmten Kombination von Translokationen von Chromosomenstellen entstehen neben den zwei Nukleolen an allen anderen Chromosomen noch mehr oder minder grosse Nukleolen<sup>38</sup>.

- <sup>33</sup> H. BAUER, Zool. Jb. 56, 239 (1936).  
<sup>34</sup> J. SCHULZ, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 12, (1949).
- <sup>35</sup> E. HEITZ, Planta 12, 775 (1931).  
<sup>36</sup> W. BEERMANN, Z. Naturforsch. 7, 237 (1952).  
<sup>37</sup> E. HEITZ, Planta 15, 495 (1931).

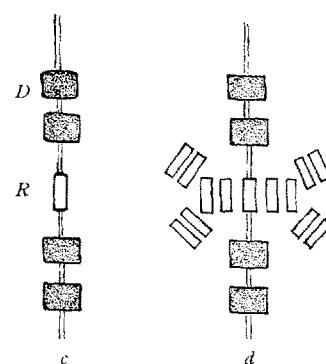
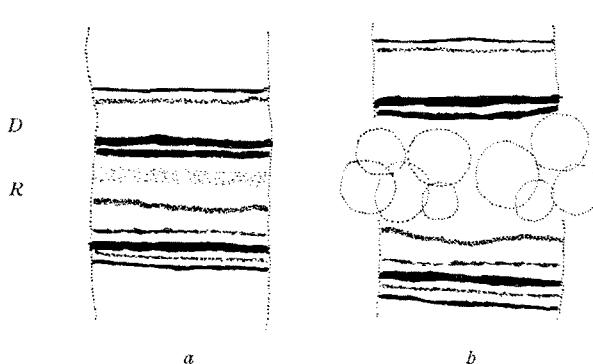


Abb. 4. Schema der Nukleolusbildung. a Riesenchromosomen mit DNS-haltigen Querbanden (D) und einer RNS-haltigen Querscheibe (R). b An der RNS-haltigen Querbande entsteht Nukleolarsubstanz. c Schema eines Chromatidenteiles mit DNS-haltigen Genloci und einer RNS-haltigen Stelle, die den «nucleolus organizer» repräsentiert. d Reduplikation der RNS-haltigen Nukleoproteide an dem «nucleolus organizer», was zur Entstehung der mikroskopisch sichtbaren Nukleolarsubstanz führt.

#### IV. Beziehung zwischen Nukleolus und Eiweißsynthese im Zellkern

In Zellkernen findet eine zum Teil recht erhebliche Synthese von Proteiden statt. Dies wurde teils aus zytochemischen Befunden erschlossen<sup>10</sup>, kann jedoch auch direkt durch Anwendung markierter Aminosäuren geprüft werden<sup>38</sup>. Sogar isolierte Kerne besitzen noch die Fähigkeit, angebotene Aminosäuren in Polypeptide einzubauen, vorausgesetzt, dass ihnen energiereiche Phosphate zur Verfügung stehen<sup>39</sup>. Allerdings bedürfen die an isolierten Kernen gemachten Befunde stets einer sehr kritischen Beurteilung, da, wie besonders aus den Versuchen von HOLTFRETER<sup>40</sup> ersichtlich ist, Diffusions- und Adsorptionsphänomene leicht zu falschen Schlussfolgerungen führen können. Nehmen wir die mit der Funktion des Interphasenkernes korrelierte Neubildung von Proteiden – nicht gemeint ist hier die zu einer Chromatidverdoppelung führende Proteinsynthese in den Chromosomen – als Tatsache an, so erhebt sich die Frage nach demjenigen Kernbestandteil, der hierzu befähigt ist. Um diesen ermitteln zu können, erscheint es vorerst nötig, diejenigen Eigenschaften kennenzulernen, die eiweißsynthetisierende Zellstrukturen auszeichnen.

Eines der konstantesten Merkmale von Zellen bzw. einzelner Zellstrukturen während einer Eiweißsynthese ist die Anwesenheit von Nukleinsäuren. Sowohl DNS. als auch RNS. können bei der Eiweissbildung beteiligt sein. Dies lässt sich besonders schön an Viren demonstrieren, von denen etliche in Pflanzen parasitierende ausschliesslich RNS. besitzen, viele in Bakterien und Tieren vorkommende anderseits nur DNS. aufweisen<sup>41</sup>. Als zweites Merkmal dient, dass die Menge der Nukleinsäure nach der Stärke der Eiweißsynthese variiert: je intensiver diese ist, um so grösser der Nukleinsäuregehalt<sup>10</sup>. Jede Reduplikation von Eiweissen scheint an

die Anwesenheit von Nukleinsäuren gebunden zu sein<sup>42</sup>. Eine weitere Präzisierung brachten Versuche mit verschiedenen markierten Vorstufen der Nukleinsäuren. Zellbezirke mit einer starken Eiweißsynthese besitzen nicht nur eine grosse Nukleinsäuremenge, sondern die einzelnen Nukleinsäuremoleküle sind durch einen schnellen Umsatz (turn over) ausgezeichnet<sup>41</sup>. Für diesen Nukleinsäureumsatz ist die Anwesenheit entsprechender Fermente eine notwendige Voraussetzung.

Suchen wir im Zellkern nach denjenigen Strukturen, die den soeben gestellten Anforderungen entsprechen, so kommen die DNS.-haltigen Chromosomen und die RNS.-haltigen Nukleolen in Betracht. Die folgenden Befunde lassen erkennen, dass der Nukleolus als Ort einer Eiweißsynthese im Kern angesehen werden kann. 1. Versuche mit <sup>32</sup>P und mit markierten (<sup>15</sup>N, <sup>14</sup>C und <sup>13</sup>C)-Purinvorstufen ergaben, dass die DNS. im wesentlichen nur dann einen Einbau aufweist, wenn eine Chromatidverdoppelung erfolgt, also stets vor einer Teilung<sup>43</sup>. Der <sup>32</sup>P-Einbau geht weitgehend proportional der Mitoserate<sup>43</sup>. Einmal in die DNS. aufgenommene Isotope werden nur sehr langsam ausgebaut<sup>43</sup>. Die DNS. kann infolgedessen als eine stabile Zellsubstanz mit geringer oder keiner Stofferneuerung angesehen werden. Demgegenüber weist die RNS. der Kerne eine ständige intensive Stofferneuerung auf<sup>43</sup>, die nicht mit der Kernteilung, sondern mit der Tätigkeit des Interphasenkernes in Zusammenhang gebracht werden kann. Da der grösste Teil, wenn nicht die gesamte RNS. in der Nukleolarsubstanz oder den Nukleolusbildungsstellen konzentriert ist, lässt sich hieraus auf eine starke Stofferneuerung der RNS. der Nukleolen schliessen.

An Speicheldrüsenkernen von *Chironomus Thummi* ist es gelungen, den RNS.-Umsatz im Nukleolus und den DNS.-Umsatz in den Chromosomen zu messen. Mit Hilfe von <sup>32</sup>P und der autoradiographischen Methode konnte an isolierten Chromosomen und Nukleolen der Einbau (Abb. 5a-c) und auch der Ausbau

<sup>38</sup> N. BORSOOK, C. DEASY, A. HAAGEN-SMITH, G. KEIGHLEY und P. LOWY, J. Biol. Chem. 184, 529 (1952).

<sup>39</sup> P. SIEKEVITZ, J. Biol. Chem. 195, 549 (1952).

<sup>40</sup> J. HOLTFRETER, Cop. Cell. Research 7, 95 (1954).

<sup>41</sup> Zum Beispiel: J. DAVIDSON, *The Biochemistry of Nucleic Acid* (Methuen's Monogr., London 1951).

<sup>42</sup> T. CASPERSSON, Naturwissenschaften 29, 33 (1941).

<sup>43</sup> Zum Beispiel: S. SMELLIE, *The Nucleic Acids II* (Acad. Press, New York 1955), S. 393.

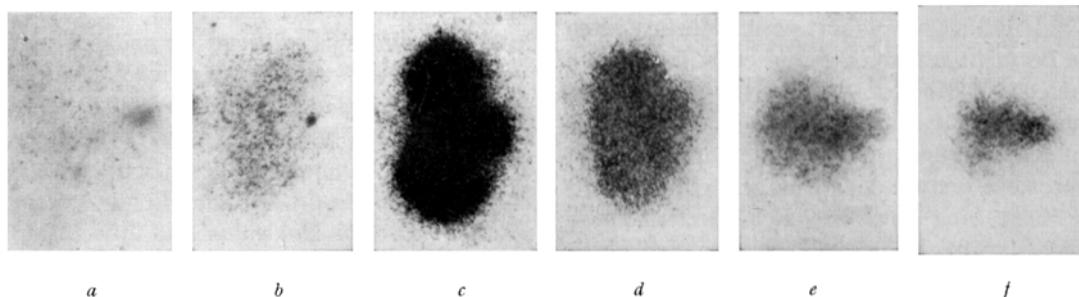


Abb. 5. Autoradiographische Aufnahmen des Einbaues von <sup>32</sup>P in isolierte Nukleolen (+ 4-Chromosom) von Speicheldrüsenzellen von *Chironomus Thummi*. a 12 h, b 24 h und c 3 Tage ständige <sup>32</sup>P-Applikation, d 3 Tage <sup>32</sup>P-Applikation und 3 Tage in gewöhnlichem Leitungswasser, e 3 Tage <sup>32</sup>P-Applikation und 7 Tage in gewöhnlichem Leitungswasser, f 3 Tage <sup>32</sup>P-Applikation und 10 Tage in gewöhnlichem Leitungswasser.

(Abb. 5c-f) bestimmt werden. Der Versuch lässt deutlich die schnelle Stofferneuerung in den ausgewachsenen Nukleolen erkennen. Eine starke RNS.-Synthese konnte auch an den Nukleolen des Acetabulariakernes<sup>44</sup> und des Oozytenkernes von Seeigeln<sup>45</sup> nachgewiesen werden.

2. In den Nukleolen von Kernen von *Zea mays* fanden POLLISTER und LEUCHTENBERGER<sup>12</sup> verschiedene Polymerisationsstufen der RNS. Aus diesen Versuchen und unseren Ergebnissen an *Acetabularia*<sup>44</sup> kann wohl der Schluss gezogen werden, dass in den Nukleolen eine Synthese der RNS. stattfindet, was auf eine Eiweißsynthese hinweist.

3. Das Vorhandensein einer alkalischen Phosphatase sowie von Adenosintriphosphatase im Nukleolus (siehe Kapitel II) entspricht ebenfalls der Vorstellung, die man von Zellstrukturen mit einer Nukleinsäuresynthese entwickelt hat.

4. Zellkerne von stark wachsenden sowie sezernierenden Zellen besitzen eine wesentlich grössere Produktion von Fermenten und Nukleoproteiden als Kerne in ausgewachsenen Zellen. Da eine starke Eiweissbildung stets eine Vergrösserung der Nukleinsäuremenge benötigt, müssten also diejenigen Strukturen im Zellkern, in denen eine Eiweissbildung stattfindet, eine Variation ihres Nukleinsäuregehaltes aufweisen. Die DNS.-haltigen Chromosomen können ausgeschlossen werden, da ihre Menge in der Interphase auch in Zellen mit starker Eiweissvermehrung konstant bleibt<sup>46</sup>. Demgegenüber entspricht das Verhalten der RNS.-Nukleoproteide des Nukleolus vollkommen der gestellten Forderung: sie nehmen in stark wachsenden sowie sezernierenden Zellen zu, bei nachlassender oder abgeschlossener Eiweissvermehrung wieder ab.

Aus den oben angeführten Gründen erscheint es berechtigt, den Nukleolus als Ort einer Eiweißsynthese im Kern anzusehen und nicht nur als einen Ort, an dem die vom Heterochromatin gebildeten Eiweisse gesammelt werden. Durch genetische Untersuchungen wurde anderseits die ausschlaggebende Bedeutung der Chromosomen für einen normalen Ablauf des Gesamtstoffwechsels und somit also auch des Proteinumsatzes demonstriert. Wir stehen hier vor der Aufgabe, eine Vorstellung zu entwickeln, welche beiden Befunden gerecht wird und sie vereinbart. Zwei Möglichkeiten müssen in Betracht gezogen werden: entweder werden die im Nukleolus synthetisierten Proteine direkt an das Zytosplasma weitergegeben, oder aber die Polypeptide verbleiben im Kern und werden in diesem für weitere Syntheseprozesse verwendet. Eine endgültige Entscheidung lässt sich zur Zeit nicht treffen, doch scheint folgende Ansicht grosse Wahrscheinlichkeit zu haben.

Aus Versuchen von HAUROWITZ<sup>47</sup> geht hervor, dass eine Aneinanderkettung von Aminosäuren zu Polypeptiden räumlich und zeitlich getrennt erfolgen kann von der folgenden Faltung dieser Polypeptidkette. Im ersten als auch im zweiten Schritt wird dem neu entstehenden Eiweissmolekül eine Spezifität aufgeprägt. Übertragen wir diese Befunde auf die Verhältnisse im Kern, so könnte man sich vorstellen, dass im Kern selbst eine Arbeitsteilung erfolgte in Orte, in denen eine Neubildung von Polypeptiden erfolgt, und in Orte, an denen dieser Kette eine räumliche Spezifität verliehen wird. In den Nukleolen würde eine Verkettung der Aminosäuren zur Polypeptidkette erfolgen, was mit dem starken Stoffwechsel dieser Stellen gut vereinbar wäre. An den DNS.-haltigen Chromosomen würde die spezifische Faltung erfolgen, vielleicht in einer Art von Antigen-Antikörper-Reaktion.

In den oben erwähnten Ansichten wurde die RNS. des Nukleolus stets mit der Eiweißsynthese dieser Kernstruktur in Verbindung gebracht. Demgegenüber besteht die Hypothese, dass Kern und mithin Nukleolus als Produktionszentrum der RNS. der Zelle funktioniert. Als Stütze hierfür wurde der schnellere Umsatz der RNS. des Kernes im Vergleich zu der RNS. des Zytosplasmas angeführt<sup>48</sup>. Zwei Befunde lassen sich gegen diese Ansicht hervorbringen: erstens kann in kernlosen Zytosplasmateilen eine zum Teil recht beachtliche RNS.-Synthese stattfinden (zum Beispiel bei *Acetabularia*<sup>49</sup>), und zweitens müsste die molekulare Zusammensetzung der RNS. des Zytosplasmas der RNS. des Kernes entsprechen, was jedoch nicht der Fall ist<sup>48</sup>.

## V. Die Steuerung der Nukleolusfunktion durch den Energiezustand des Zytosplasmas

Die Ausprägung der Nukleolarsubstanz unterliegt in gleichen Geweben, sogar in der gleichen Zelle zu verschiedenen Zeiten grossen Volumenschwankungen. Eine gewisse Gesetzmässigkeit liess sich beim Vergleich von Zelltypen verschiedener Funktion erkennen. Embryonale, noch wachsende, sezernierende und regenerierende Zellen (zum Beispiel Nervenzellen) haben einen relativ grossen Kern mit stark entwickelter Nukleolarsubstanz, während in anderen auch «aktiven» Zellen, wie zum Beispiel in Muskeln, Bindegewebe, kernhaltigen Erythrozyten und weissen Blutkörperchen das Nukleolusvolumen sehr klein ist. Der wesentlichste Unterschied dieser Zelltypen liegt in der Stärke der Eiweissproduktion. Hieraus geht eine Korrelation zwischen Nukleolus und Eiweißsynthese im

<sup>47</sup> F. HAUROWITZ und J. CRAMPTON, Exp. Cell. Res. [Suppl.] 2, 45 (1952).

<sup>48</sup> J. BRACHET, *Nucleic Acids II* (Acad. Press, New York 1955), S. 476.

<sup>49</sup> F. VANDERHAEGHE und D. SZAFARZ, Arch. Intern. Physiol. Biochim. 63, 267 (1955).

<sup>44</sup> H. STICH und J. HÄMMERLING, Z. Naturf. 8b, 329 (1953).

<sup>45</sup> A. FICQ, Exper. 9, 377 (1953).

<sup>46</sup> F. SCHIRADER und C. LEUCHTENBERGER, Exp. Cell. Res. 1, 421 (1950).

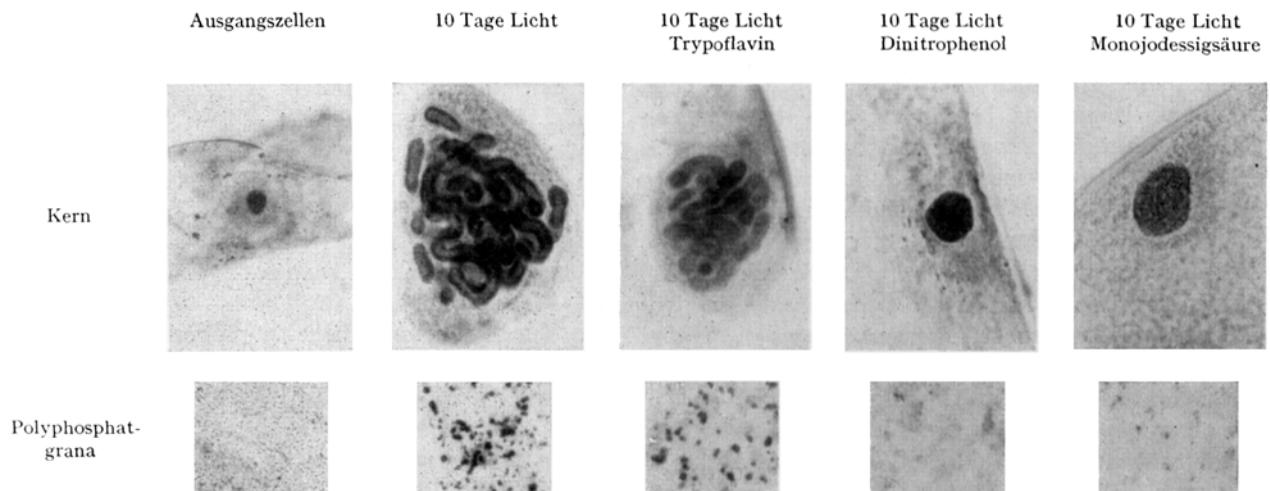


Abb. 6. Das Verhalten der Kerne und Polyphosphate im Zytoplasma von *Acetabularia mediterranea* nach 10tägiger Belichtung und bei gleichzeitiger Applikation von Giften. (Die auf der Abbildung des Zytoplasmas der Ausgangszellen sichtbaren Strukturen sind Plastiden, nicht Polyphosphatgrana wie auf den folgenden Photos.)

Zytoplasma hervor<sup>10</sup>. Diese gilt gleichermaßen für autotrophe und heterotrophe Zellen.

Über die Art dieser Beziehung lassen sich zwei verschiedene Ansichten aussäern: entweder bewirkt der grössere Kern und Nukleolus eine stärkere Eiweissynthese im Zytoplasma, oder aber die grössere Zytoplasmataktigkeit bestimmt eine Vergrösserung des Kern- und Nukleolusvolumens. Berücksichtigt man die biochemischen Befunde über den Stoffwechsel einzelner Zellstrukturen, so lässt sich folgende Vorstellung über den Einfluss des Zytosplasmas auf die Kern- und Nukleolustätigkeit machen. In den Mitochondrien wird durch die oxydativen Vorgänge des Krebszyklus Energie frei, die ursprünglich zum grössten Teil in Form von energiereichen Phosphaten gebunden wird<sup>50</sup>. Diese energiereichen Phosphorverbindungen gelangen nun in die Zelle und liefern für die im Kern ablaufenden endogenen Vorgänge, wie zum Beispiel die Synthese von Nukleinsäuren, Proteiden, Lipoiden die Energie. Die für eine Spaltung der energiereichen Phosphate notwendigen Fermente sowie die ATP. selbst konnten im Kern nachgewiesen werden<sup>51</sup>. Die Annahme liegt nahe, dass die Kerntätigkeit durch diesen Nachschub aus dem Zytosplasma gesteuert wird.

Durch Versuche an *Acetabularia* konnten die aus biochemischen Befunden abgeleiteten Anschauungen weitgehend bewiesen werden. Unterband man bei *Acetabularia* durch 2,4-Dinitrophenol, Monojodessigsäure oder Verdunkelung die Synthese von energiereichen Phosphorverbindungen<sup>52</sup>, die in Form von Polyphosphaten nachgewiesen wurden<sup>53</sup>, so führte dies

zu einer Verkleinerung der Zellkerne. Beginnt man den Versuch an kleinen Zellen mit kleinem Kern und Nukleolus und prüft die Ausbildung der Polyphosphatgrana sowie die Vergrösserung des Zellkernes und des Nukleolus, so erkennt man, dass nur in Zellen mit vielen Polyphosphatgrana ein grosser Kern vorkommt, während in Zellen mit keinen oder wenigen Polyphos-

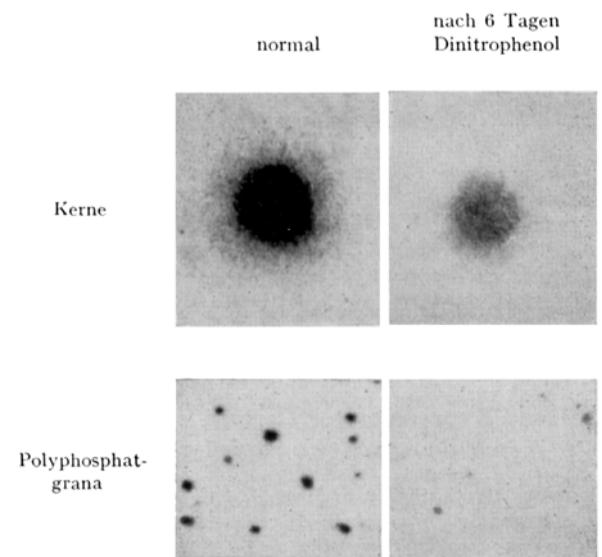


Abb. 7. Der Einbau von  $^{32}\text{P}$  (2 Tage) in normale und mit 2,4-Dinitrophenol behandelte Kerne und Polyphosphatgrana von *Acetabularia mediterranea*.

phaten die Kerne klein sind (Abb. 6). Diese morphologischen Befunde konnten durch eine Messung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus in Zellkern und Polyphosphatgrana erweitert werden. Nach 2,4-Dinitrophenol und Verdunkelung wurde einerseits der  $^{32}\text{P}$ -Einbau in die Polyphosphatgrana stark reduziert, andererseits nimmt auch die  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung in die organischen Substanzen

<sup>50</sup> O. LINDBERG und L. ERNSTER, *Protoplasmatologia* 3A, 4 (1954).

<sup>51</sup> K. LANG und G. SIEBERT, *Der Stoffwechsel*, Bd. 1 (Springer-Verlag, Berlin 1954), S. 1064.

<sup>52</sup> H. STICH, *Z. Naturf.* 6b, 319 (1951); *Chromosoma* (1955) (in press).

<sup>53</sup> H. STICH, *Z. Naturf.* 8b, 36 (1953).

des Zellkernes stark ab, wie aus Abbildung 7 deutlich erkennbar ist.

Aus diesen Befunden lässt sich die oben gemachte Annahme weitgehend begründen, dass die morphologischen Kernänderungen, der Umsatz des Kernes und des Nukleolus sowie schliesslich auch der Wirkungsgrad des Kernes und des Nukleolus, worauf ausdrücklich von HÄMMERLING<sup>54</sup> hingewiesen wird, vom Zytosoma aus über die Menge der energiereichen Phosphorverbindungen gesteuert wird. Anderseits ist, wie zahlreiche Versuche erkennen lassen, die Kertätigkeit Voraussetzung eines normalen Stoffwechsels des Zytosomas. Dies lässt sich deutlich an Zellen demonstrieren, bei denen der Kern entfernt wird. Im Verhältnis zu den kernhaltigen Zellen werden in den kernlosen Teilen früher oder später viele Syntheseprozesse reduziert, was schliesslich zum Tode dieser Teile führt<sup>55</sup>. Die Befunde zeigen, dass innerhalb der Zelle eine enge Wechselwirkung zwischen Kern und Zytosoma besteht: der Kern ist von der Energie abhängig, die ihm durch die Mitochondrien zur Ver-

fügung gestellt wird, während anderseits die Vorgänge des Zytosomas die Tätigkeit des Kernes benötigen. Für eine eingehende Darstellung dieser Kreisprozesse sei auf HÄMMERLING<sup>54</sup> verwiesen.

### Summary

In previous years the composition and function of chromosomes have been analyzed to a considerable extent, in contrast to the small number of investigations that have been made on nucleoli. There exist at present many conflicting opinions about the structure and function of the nucleolus, and therefore a critical survey of the facts and theories about the nucleolar substance appears necessary.

The structure, chemical composition and metabolism of the nucleoli of various cells are described in this publication. The regulation of the size and function of the nucleolus is also discussed.

It is concluded that the size and structure of the nucleolus is organ- and species-specific. A rapid synthesis of RNA and proteins occurs in the nucleolus. After a short interval, this disappears; and it is therefore concluded that the nucleolus must have a high turnover of these substances. The size and function of the nucleoli depends on the energy state of the cytoplasm.

It appears that the nucleolus can synthesize proteins which can be utilized by the chromosomes during their genetic function.

<sup>54</sup> J. HÄMMERLING, Rapp. Comm. 8me Congr. intern. Bot., Paris 1954 (im Druck).

<sup>55</sup> J. HÄMMERLING, Naturwissenschaften 33, 337 und 361 (1946); Rev. Cytology 2, 475 (1953). – J. BRACHET, *The Nucleic Acids II* (Acad. Press, New York 1955), S. 476.

## Brèves communications – Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

### A Closed Expression for Certain Probabilities in Wilcoxon's two Sample Test

Consider two samples of sizes  $n_1$  and  $n_2$  respectively, drawn from two univariate distributions. Call a value observed in the first sample a 1-value, and a value observed in the second sample a 2-value. Suppose that no 1-value equals any 2-value (when the underlying distributions are continuous, the probability of this occurrence is one). Form all possible pairs consisting of one 1-value and one 2-value. There are  $n_1 n_2$  such pairs. Call those pairs among them in which the 1-value is smaller than the 2-value 1-2-pairs, and the pairs in which the 2-value is smaller than the 1-value 2-1-pairs. Denote the number of 1-2-pairs by  $U_{12}$  and the number of 2-1-pairs by  $U_{21}$ . Then:

$$U_{12} \geq 0, \quad U_{21} \geq 0, \quad \text{and} \quad U_{12} + U_{21} = n_1 n_2.$$

If one repeatedly draws two samples of sizes  $n_1$  and  $n_2$  from two (univariate) distributions, one will not find

the same number of 1-2-pairs with each repetition. Let  $P(U_{12} = u; n_1, n_2)$  denote the probability that the number of 1-2-pairs to be formed from two samples of sizes  $n_1$  and  $n_2$  is  $u$ , this probability being understood to be calculated under the hypothesis tested by Wilcoxon's two sample test (of which hypothesis the hypothesis that the  $N = n_1 + n_2$  values are independently drawn from two identical distributions is a particular case). After this definition the definition of  $P(U_{21} = u; n_1, n_2)$ ,  $P(U_{12} \leq u; n_1, n_2)$  and  $P(U_{21} \leq u; n_1, n_2)$  will be immediately clear. The last-named probability has been tabulated (in a triple-entry table of course) by MANN and WHITNEY<sup>1</sup> for  $n_2 \leq n_1 \leq 8$ , by VAN DER VAART<sup>2</sup>

<sup>1</sup> H. B. MANN and D. R. WHITNEY, Ann. Math. Stat. 18, 50 (1947).

<sup>2</sup> H. R. VAN DER VAART, *Gebruiksaanwijzing voor de tests van Wilcoxon*, Rapport S 32 (M4) van de Statistische Afdeling van het Mathematisch Centrum, Amsterdam, with tables (1950), obtainable from the Mathematisch Centrum, Amsterdam; cf. the more detailed Rapport S 176 (M 65) van de Stat. Afd. v. h. Math. Centr., obtainable