

reactive granules tend to be distributed preponderantly in the cytoplasm of chief cells (Figure 4). However, it deserves attention that a small amount of HNAH diazo blue B reactive granules is localized outside the monkey parathyroid cells. With regard to the morphology of HNAH diazo blue B reactive granules, the quail parathyroid cells appear identical with chief cells of the monkey parathyroid gland, thus containing a preponderant distribution of the granules, while denoting the extracellular location of their small amount (Figure 5). Further, HNAH diazo blue B reactive granules are more prominent in amount and stainability in laying quails than in non-laying birds (Figure 6), pointing, therefore, to a parallelism of both properties of the granules to the secretory function of the parathyroid cells.

Previous thioglycolate reduction cannot decidedly increase the staining intensity of DDD diazo blue B reactive granules, and prior N-ethyl maleimide potassium cyanide sequence fails to yield a significantly intense reaction of the granules. Accordingly, protein bound sulfhydryl groups are primarily responsible for the reaction of the granules. HNAH diazo blue B reactive granules nearly fail to colour when the staining technique is accompanied by sodium hydroxide or ethanol treatment. Therefore, their stainability is considered to be due mainly to protein bound side chain carboxyl groups.

The present morphological examination of the two types of protein granules in different cell types and under varied conditions and the characterization of the granular reactions have provided an important clue to the accurate recognition of the cytophysiological significance of the granules. From their morphological features, DDD diazo blue B reactive granules can be conceived to reflect to an appreciable extent the cellular activity of secretion. This concept is particularly plausible in view of the recent electronmicroscopic evidence that in the human and deer parathyroid glands secretory granules can morphologically be followed from their formation in the glandular cells almost to their extrusion into the blood⁹. Moreover, in the light of the biologically activating effect of a sulf-

hydryl group containing reducing reagents like cysteine upon parathyroid hormone preparations^{10,11}, the chemical nature of the groups responsible for the granular reaction gives support to the theory that the granules exist in association with the hormone. The possibility that the granules display mitochondrial figures should be denied, because despite their extreme mitochondrial abundance⁸ oxyphil cells have been shown to contain a relatively small amount of the granules in the monkey parathyroid gland. The morphology of HNAH diazo blue B reactive granules may indicate that their majority represents a mitochondrial pattern, whereas the extracellular presence of their small number is suggestive of their possible participation in the secretory function of the cells. In connection with the latter idea, the biochemical data may deserve attention in that parathyroid hormone preparations involve a significant number of glutamic and aspartic acid residues¹¹ and, therefore, of side chain carboxyls, which are found here to be the very groups responsible for the stainability of HNAH diazo blue B reactive granules.

Zusammenfassung. In Parenchymzellen der Epithelkörperchen von Affen (*Macaca cyclopis*) und Wachteln (*Coturnix coturnix japonica*) lassen sich zwei Typen von Proteingranula histochemisch unterscheiden. Die cytophysiologische Wertung dieser Granula wurde diskutiert.

K. YAMADA

Department of Anatomy, School of Medicine,
University of Nagoya (Japan),
April 14, 1964.

⁹ B. L. MUNGER and S. I. ROTH, J. Cell Biol. 16, 379 (1963).

¹⁰ H. RASMUSSEN, Science 128, 1847 (1958).

¹¹ H. RASMUSSEN, *The Parathyroids* (Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Ill. 1961).

Einbau von H³-D-Glucose während der Oogenese bei *Apis mellifica* L.

In die wachsenden Oocyten der Insekten werden erhebliche Mengen verschiedenartiger Reservestoffe eingelagert, die insgesamt als Dotter bezeichnet werden können. Die Eizellen erreichen dadurch – meist in wenigen Tagen – in cytologischen Dimensionen betrachtet riesenhafte Ausmasse. Wie neuere, vor allem mit autoradiographischer¹ und serologischer² Methodik durchgeführte Untersuchungen über die Bildung der Proteinkomponenten des Dottersystems gezeigt haben, werden die hierbei erforderlichen Syntheseleistungen nicht von der Oocyte allein vollbracht: Die bei ihrem euplasmatischen Eiweissaufbau verbrauchte RNS stammt aus den polyploiden Nährzellen, und die Proteine der Dotterschollen werden bereits als Makromoleküle aus der Haemolymph aufgenommen³, wodurch das ausserordentlich schnelle Wachstum der Oocyten verständlich wird⁴. Über Kohlenhydrate liegen noch keinerlei entsprechende Befunde vor. Die vorhandenen Angaben sind vorwiegend deskriptiv

und beziehen sich auf das weitverbreitete Vorkommen von Glykogen meist im Eizellplasma später Oogenesestadien^{5,6}, von PAS-positiven Dotterschollen^{5,7-10} oder auch beidem nebeneinander^{5,11-13}. Unter Verwendung von Glucose als Tracer wurde mit autoradiographischer Technik erstmals versucht, den genauen Zeitpunkt und

¹ K. BIER, Roux' Arch. Entwicklungsmech. 154, 552 (1963).

² W. H. TELFER and M. E. MELIUS JR., Amer. Zool. 3, 185 (1963).

³ K. BIER und P. S. RAMAMURTY, Naturwiss. 51, 223 (1964).

⁴ K. BIER, Zool. Anz. Suppl. 27, 84 (1964).

⁵ PH. F. BONHAG, Ann. Rev. Ent. 3, 137 (1958).

⁶ O. E. KUGLER, P. W. FRANKENSTEIN und K. A. RAFFERTY JR., J. Morph. 98, 235 (1956).

⁷ PH. F. BONHAG, Univ. Calif. Publ. Ent. 16, 81 (1959).

⁸ S. K. AGGARWAL, Res. Bull. (N.S.) Panjab Univ. 11, 147 (1960).

⁹ R. C. KING, Growth 24, 265 (1960).

¹⁰ A. V. KRAFT, Zool. Jb. Anat. 78, 457 (1960).

¹¹ G. COLOMBO, Arch. Zool. Ital. 42, 309 (1957).

¹² Z. BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA, Zool. Polon. 10, 131 (1959/60).

¹³ S. K. AGGARWAL, Res. Bull. (N.S.) Panjab Univ. 13, 47 (1962).

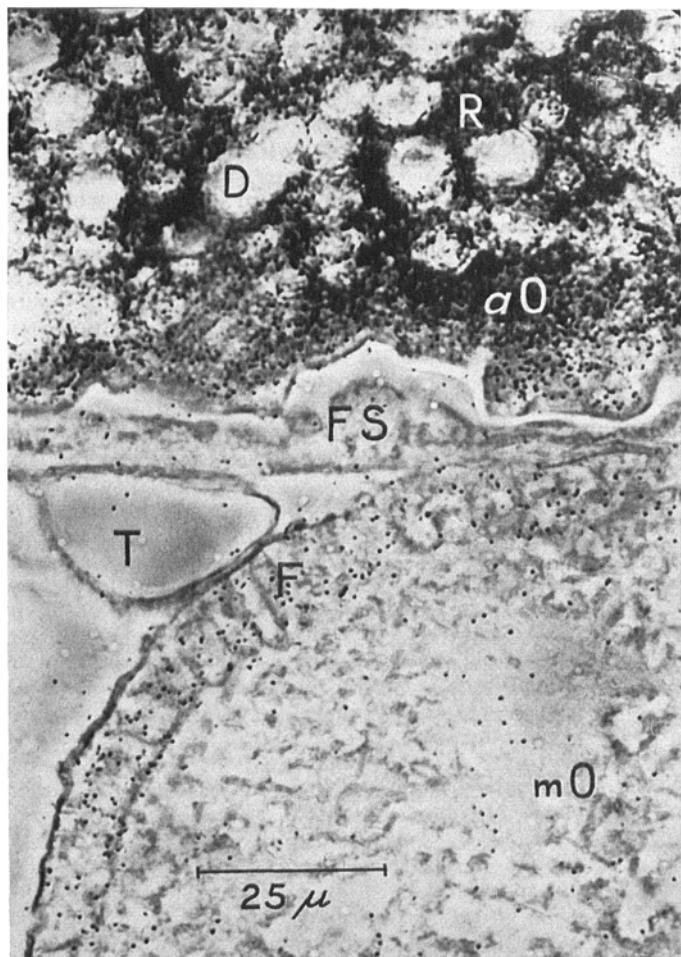


Fig. 1. Autoradiogramm eines Bienenovars, 24 min nach Injektion von H^3 -Glucose. Teil eines Längsschnittes, Phasenkontrast. Oben alte Oocyte (ao) mit stark markiertem, glykogenreichem Reticuloplasma (R); Dotterschollen (D) sowie zugehöriges Follikelepithel (Sägezahnstadium, FS) frei von Markierung. Unten Oocyte mittleren Stadiums (mo), Glucoseeinbau nur im Follikelepithel (F). Links Trachee (T) angeschnitten.

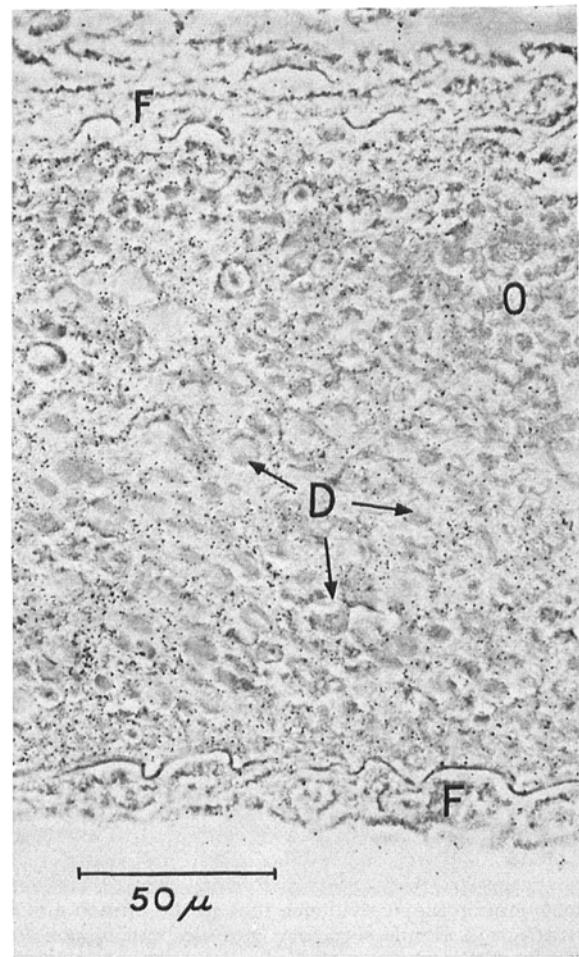


Fig. 2. Autoradiogramm eines 3 min in Tracerlösung getauchten Ovars. Gleichmässiger Einbau im gesamten Reticuloplasma von der Peripherie bis zum Zentrum, Eizelle (O) in der Phase stärkster Glykogeneinlagerung. Dotterschollen (D) wie auch Follikelepithel (F, mit beginnender Sägezahn-Ausbildung) frei von Aktivität. Phasenkontrast.

Ort der Synthese von Reservekohlenhydraten im Verlauf der Oogenese zu ermitteln und damit zugleich die Frage zu beantworten, ob Glykogen in der Oocyte selbst aufgebaut werden kann.

Wir injizierten Bienenköniginnen in voller Legetätigkeit unter kurzfristiger CO_2 -Narkose aquatische Lösung von H^3 -D-Glucose ins Haemocoel. Bei einigen Kurzzeitversuchen tauchten wir lediglich frisch explantierte Ovarien in Tracerlösung. Nach Inkubationszeiten von 3 min bis 48 h fixierten wir die Ovarien zwecks optimaler Kohlenhydraterhaltung in kaltem Gendre'schen Gemisch¹⁴. Die Autoradiogramme stellten wir von 7 μ dicken Paraffinschnitten her.

In die Zellelemente eines Einährverbandes des polytroph-meroistischen Hymenopterenovars erfolgt der Glucoseeinbau bei *Apis* während mittlerer und später Oogenesestadien¹⁵. Kurz vor Bildung der ersten Dotterschollen im peripheren Eiplasma, das ebenso wie das gesamte Nährfach autoradiographisch noch unmarkiert bleibt, erscheint das Follikelepithel nach 24 min Inkubation deutlich radioaktiv (Figur 1). Bei längeren Zeiten bis zu 5 h nimmt die Markierung zu, danach wieder ab.

Die Einbaurate des Follikelepithels, dessen Zellen sich ins Ooplasma vorzuwölben beginnen, steigt parallel zu der fortschreitenden Vermehrung deutoplasmatischer Dotterschollen zunächst noch weiter an. Ungefähr auf dem gleichen Stadium lässt sich bald erstmals eine Einlagerung von Kohlenhydraten in der Oocyte selbst nachweisen, wo sie nur im Reticuloplasma mit spezifischen Glykogenfärbungen wie auch mit der PAS-Reaktion in Form kleiner Grana dargestellt werden können. Nach Behandlung der Schnitte mit Malz-Diastase verschwindet diese Anfärbbarkeit ebenso wie die in gleicher Weise lokalisierte Aktivität entsprechender Autoradiogramme, so dass hier als Speicherform Glykogen vorliegen dürfte, dessen Menge bald beträchtlich vermehrt wird. Auf dem Höhepunkt der strukturellen Ausbildung des Nährfaches kann vorübergehend das Plasma der Trophocyten eine starke Markierung aufweisen, die jedoch – wie auch die zuvor

¹⁴ W. GRAUMANN, Histochem. 1, 97 (1958).

¹⁵ K. BIER, Zool. Anz. Suppl. 18, 422 (1955).

für das Follikelepithel beschriebene – nach Diastasebehandlung abgeschwächt bestehen bleibt. Nach Abschluss der Vitellogenese bilden die Follikelzellen zur Oocyte hin sägezahnartige Fortsätze (Figur 1) aus^{15,16}. Das Stadium, auf dem diese Umwandlung soeben beginnt, erweist sich in Kurzzeitexperimenten mit 3 min (Figur 2) bis $\frac{1}{2}$ h Inkubationsdauer als die Phase der stärksten Kohlenhydrateinlagerung in die Eizelle. In Präparaten, mit denen vor Herstellung der Autoradiogramme zusätzlich die PAS-Reaktion durchgeführt wurde, sind solche Oocytes deutlich von etwas älteren, voll ausgebildeten Sägezahnstadien (Figur 1) zu unterscheiden; bei diesen hat der Umsatz des Tracers bereits nachgelassen, der färberisch sichtbare Gehalt an Glykogen dagegen zunommen. Der Glucoseeinbau hält schwächer werdend bis zur beginnenden Auflösung der grossen Eiweißdotter-schollen an, wie nach Inkubationszeiten von 24 bis 80 min festzustellen ist, und hört erst mit der Chorionbildung auf. Danach ist die Deposition von Reservestoffen überhaupt und damit das Wachstum der Oocyte beendet.

Sehr lange Einbauzeiten (10 bis 48 h) führen zu einer zunehmend gleichförmigen Verteilung der Radioaktivität in den Präparaten. Den relativ stärksten Einbau weisen zwar noch die Sägezahnstadien auf, doch sind mit Ausnahme des Germariums und der jüngsten Follikel alle Abschnitte des Ovars diffus markiert. Da diese Markierung zu einem grossen Teil diastaseresistent ist, röhrt sie wahrscheinlich von metabolisch verwerteter H^3 -Glucose her. Die Aktivität kann dabei sowohl in Proteine wie auch in Lipide, woraus sie während der histologischen Bearbeitung allerdings grösstenteils extrahiert wird, gelangt sein.

Die Synthese des Glykogens der Eizellen erfolgt sehr wahrscheinlich direkt in ihrem Reticuloplasma. Dafür spricht dessen völlig gleichmässige Markierung bereits nach 3 min Inkubationszeit in Oocytes fortgeschrittenen Stadien von immerhin $200 \mu \text{Ci}$ (Figur 2). Der Tauchversuch zeigt weiterhin, dass Bienenovarier Glucose als Ausgangsprodukt für ihre Reservekohlenhydrate dienen kann. Es muss angenommen werden, dass *in vivo* der Weg aus der Haemolyphe kommender Zucker ohne Einschaltung von Transportvorgängen *per diffusionem* in die Oocyte führt, da sonst zumindest in Kurzzeitversuchen ein Markierungsgradient sichtbar werden müsste, der nirgends beobachtet werden konnte. Die Glucose dringt ebenso schnell wie andere organische Verbindungen ähnlichen Molekulargewichts (Aminosäuren, Nucleoside^{1,17}) in das Ooplasm ein. Das gebildete Glykogen bleibt vermutlich am Syntheseort liegen.

Die auf mittleren Stadien im Follikelepithel nachweisbaren, relativ geringen Mengen von ihrer Diastaseresistenz wegen zum Teil wohl proteingebundenen Kohlenhydraten

werden vielleicht von den Follikelzellen selbst, die ja erhebliche morphologische Veränderungen durchmachen, energetisch verwertet und aufgebraucht, wie das in ähnlicher Weise auch für die vorübergehend über dem Nährfach auftretende Markierung angenommen werden kann.

In der Eizelle folgt das Maximum der Glykogeneinlagerung zeitlich dem Abfall der euplasmatischen Eiweißbildung¹⁶. Daraus kann die zellphysiologisch allgemein wichtige Hypothese abgeleitet werden, dass Protein- und Polysaccharidsynthese Funktionsleistungen des Cytoplasmas sind, die nicht gleichzeitig maximal auftreten und denen sehr wahrscheinlich verschiedene Arbeitsstrukturen im Ultrabereich zugrunde liegen, wie elektro-nenoptische Befunde an Leberzellen der Vertebraten¹⁸ bereits vermuten lassen. Ein Antagonismus von Protein- und Glykogensynthese würde die oft beobachtete Einlagerung der Reservekohlenhydrate erst gegen Ende der Oogenese physiologisch verständlich machen¹⁹.

Eine ausführliche Darstellung der Untersuchungen²⁰, die weitergeführt werden, erfolgt später anderwärts²¹.

Summary. The incorporation of tritiated glucose into the ovary of honey bee queens was studied by autoradiography. During the last stages of oogenesis, the synthesis of respectable amounts of glycogen was found in the reticuloplasm of the developing eggs. The follicle epithelium and also the nurse cells only appeared more lightly and transitory labelled at medium stages. An hypothesis was established concerning an antagonism of protein and polysaccharide formation in the cytoplasm corresponding to the rather late occurrence of glycogen in insect oogenesis.

W. ENGELS und W. DRESCHER

Zoologisches Institut der Universität Münster (Deutschland) und Institut für Bienenkunde der Universität Bonn (Deutschland), 23. März 1964.

¹⁶ W. PAULCKE, Zool. Jb. Anat. 14, 177 (1901).

¹⁷ M. ZALOKAR, Exp. Cell Res. 19, 184 (1960).

¹⁸ H. THEMANN, Veröff. morph. Pathol. vol. 66 (Stuttgart 1963).

¹⁹ Während der Drucklegung erschien eine elektronenoptische Untersuchung²¹ über die Glykogenbildung im Trophoblastenstadium der menschlichen Plazenta. Dort kommt es erst in solchen Zellen zur Glykogenanhäufung, an deren endoplasmatischem Reticulum bereits degenerative Veränderungen beobachtet werden können. Diese Befunde stützen unsere oben geäusserte Hypothese über ein zeitliches Nacheinander der Protein- und Polysaccharidsynthese im Entwicklungszyklus von Zellen oder Zellbereichen.

²⁰ Y. YOSHIDA, Exp. Cell Res. 34, 293 (1964).

²¹ Herrn Prof. Dr. K. BIER verdanken wir viele Anregungen und kritische Hinweise.

Presence of 'RNA Immuno-Carrier' in Immune Rabbits' Serum

In 1950 one of us¹ showed the importance of immune nucleoproteins in antibody-globulin production, and advanced the hypothesis that the initial step of the antibody synthesis was localized in the nuclear and mitochondrial nucleic acids². It is commonly assumed that immune response is related to the joint actions of two types of cells³: the R.E.S. cells with high phagocytic and enzymat-

ic activities which analyse the antigenic substances, and the lymphatic system cells which, after having received the information transmitted by R.E.S. cells, produce specific antibodies. In fact, according to morphological studies, it seems unlikely that the antibody-globulin pro-

¹ L. MICHELAZZI, Boll. Ist. sieroter. milan. 29, 28 (1950).

² L. MICHELAZZI, Boll. Ist. sieroter. milan. 30, 105 (1951).

³ B. H. WAKSMAN, Ann. Inst. Past. 106, 465 (1963).