

etwas Quarzsand und Nährmedium für Gewebekulturen fein zerrieben. Die anfallende Aufschwemmung wird danach bei 2000 Touren und 10°C zentrifugiert. Der virus-haltige Überstand wird mit dem Nährmedium weiter verdünnt, damit eine Infektionsdosis entsprechend 100mal der LD₅₀ pro 0,05 ml erreicht wird. Unter diesen Bedingungen sterben die Kontrolltiere am 4. oder 5. Tag nach der Infektion. Die Aktivität der zu prüfenden Substanzen wird am 6., 10. und 21. Tage nach der Infektion durch den Vergleich der Überlebensdauer der behandelten Tiere mit derjenigen der Kontrolltiere auf prozentualer Basis ermittelt. Die Präparate werden 1 h vor sowie 1, 5, 24, 30, 48 und 72 h nach der Infektion verabreicht. Für die orale Applikation mit der Schlundsonde sind die Verbindungen in Gummiarabikum suspendiert; parenteral werden sie, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, injiziert. Die Einzeldosis entspricht etwa $1/10$ der DL₁₀¹.

Darstellung der Verbindungen. Die zur Darstellung der Verbindungen 1–42 verwendeten Methoden A–N sind in den Tabellen I und II angegeben; sie lassen sich wie folgt kurz skizzieren: A) Reduktion von Campher-Oxim mit Raney-Nickel nach H. ADKINS und C. F. WINAUS²; Isolierung nach W. HÜCKEL und P. RIECKMANN³. B) rac-N-2-Bornyl-N-methyl-p-toluolsulfonamid wird in flüssigem Ammoniak bei –50°C mit Natrium behandelt. C) Verbindung 1 wird in Wasser mit Formaldehyd und Kaliumcyanid umgesetzt. D) rac-endo-2-Bornanamin wird in Azeton in Gegenwart von wasserfreiem Kaliumkarbonat mit Alkylhalogeniden umgesetzt. E) rac-endo-2-Bornanamin wird in Benzol in Gegenwart von N-Äthyl-diisopropylamin mit Alkylhalogeniden alkyliert. F) rac-

endo-2-Bornanamin wird in Pyridin mit Phenäthylchlorid alkyliert. G) Verbindung 38 wird mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert. H) Verbindung 42 wird mit konzentrierter Salzsäure behandelt. I) rac-endo-2-Bornanamin wird mit Dimethylsulfat-Natronlauge methyliert. J) rac-endo-2-Bornanamin wird mit Ameisensäure formyliert. K) rac-endo-2-Bornanamin wird in Pyridin mit den Säurehalogeniden umgesetzt. L) rac-endo-2-Bornanamin wird mit D-(–)-α-Hydroxy-β,β-dimethyl-γ-butyrolacton umgesetzt. M) rac-N-(2-Bornyl)-glycin wird in 2N Salzsäure nitrosiert. N) Verbindung 41 wird mit Trifluoressigsäureanhydrid behandelt.

Summary. rac-endo-2-Bornanamine (1) shows good activity against infections with influenza A₂ virus (Asia) in mice. None of 41 derivatives or analogues was superior to compound 1.

W. MOSIMANN, J. BORGULYA
und K. BERNAUER

*Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G.,
Basel (Schweiz), 28. April 1969.*

¹ DL₁₀ ist diejenige Dosis im akuten Toxizitätstest, bei der 10% der eingesetzten Tiere eingehen. Sie wurde nach der Probit-Methode von L. C. MILLER und M. L. TAINTER bestimmt [Proc. Soc. exp. Biol. Med. 57, 261 (1944)].

² H. ADKINS und C. F. WINAUS, J. Am. chem. Soc. 55, 2051 (1933).

³ W. HÜCKEL und P. RIECKMANN, Justus Liebigs Annln Chem. 625, 1 (1959).

Intranukleäre virusähnliche Partikeln in einem Mammakarzinom

Im Verlauf einer Untersuchungsreihe über die Ultrastruktur von Dysplasien und Tumoren der weiblichen Brustdrüse (BÄSSLER und SCHÄFER¹; SCHÄFER und BÄSSLER²) wurden in einem gut durchuntersuchten soliden Mammakarzinom ungewöhnliche Kerneinschlüsse beobachtet (SCHÄFER³), die hier näher beschrieben werden sollen.

Material und Methode. Das Untersuchungsmaterial entstammt einer 54 Jahre alten Frau, die seit 14 Tagen einen Knoten in der linken Brust bemerkte. Unmittelbar nach der operativen Entnahme erfolgte für die elektronenmikroskopische Untersuchung die Fixierung kleiner Teile des Tumors in 4,5%igem Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer pH 7,3. Spülung in 0,2M Cacodylat-Sucrose-Puffer. Nachfixierung in 2%iger gepufferter Osmiumsäure. Einbettung in Durcupan ACM (Fluka). Anfertigung der Schnitte auf Porter-Blum MT2. Schnittkontrastierung mit Uranylazetat und Bleizitrat. Untersuchung der Schnitte mit Siemens Elmiskop I.

Lichtmikroskopisch erweist sich der mandarinengrosse, derbe Tumor als ein überwiegend solides, teils intrakanalikulär wachsendes Karzinom, das in seiner grössten Ausdehnung szirröses Wachstum zeigt und nur in einzelnen Bezirken medullär erscheint.

Elektronenmikroskopische Befunde. In vielen Zellen des Tumorgewebes konnten in wechselndem Ausmasse folgende 3 Arten von Kerneinschlüssen beobachtet werden: a) grössere elektronendichte Partikeln; b) elektronendichte Granula und c) Bündel von Filamenten. Bei den grössten Kerneinschlüssen, die zugleich am häufigsten beobachtet wurden, handelt es sich um *elektronendichte Partikeln*, bei denen ein Durchmesser zwischen 54 und 80 nm gemessen

wurde und die regelmässig gegenüber dem umgebenden Chromatin durch einen gleichmässig breiten Hof einer schwach elektronendichten Substanz von etwa 20 nm Breite abgegrenzt sind (Figuren 1a und b). Die Topik dieser Partikeln, die weniger solitär, sondern in Verbänden bis zu 20 Exemplaren deponiert sind, weist innerhalb des Kernes gewisse Regelmässigkeiten auf: Sie konnten nie im Zentrum eines Kernes, sondern nur in dessen Randbezirken beobachtet werden und haben stets enge topische Beziehungen zu Chromatin. Auch in den perinukleolären Chromatinarealen sind sie häufig anzutreffen. Innerhalb ihrer Verbände sind die einzelnen Partikeln nur selten isoliert gelagert, sondern häufig eine paarweise und kettenförmige Anordnung. Bei stärkerer Vergrösserung erkennt man, dass diese Kerneinschlüsse nicht rund konturiert sind, sondern polygonale Formen aufweisen, wobei hexagonale Konturen vorherrschen (Figur 1b). Ihre Innenstruktur ist nicht homogen osmiophil, sondern setzt sich aus kleineren Einheiten mit einem Durchmesser von 40–45 Å zusammen.

Die zweite Art von Kerneinschlüssen, die wesentlich seltener als die erste beobachtet wurde, wird von Ansammlungen *elektronendichter Granula* dargestellt, die grössere Kernareale einnehmen können und in einer Matrix von weniger elektronendichtem Material deponiert sind (Figur 2a). Von diesen Granula lassen sich zwei For-

¹ R. BÄSSLER und A. SCHÄFER, Verh. Dt. Ges. Path. 52, 491 (1968).

² A. SCHÄFER und R. BÄSSLER, Virchows Arch. path. Anat. Physiol. A, 346, 269 (1969).

³ A. SCHÄFER, Zentbl. Path. 111, 473 (1968).

men unterscheiden: Mehr zentral gelegene, kleinere mit einem Durchmesser von 200–300 Å, die sehr dicht gelagert sind, und grössere Granula von 300–400 Å Durchmesser, die eine aufgelockerte Lagerung aufweisen. In den Randbezirken dieser granulären Ansammlungen treten häufig grössere Partikeln auf, die in ihrem Aussehen und ihrer Grösse der ersten Art intranukleärer Partikeln entsprechen. Bei stärkerer Vergrößerung sind, in den grösseren Granula deutlicher als in den kleineren, Querstreifungsmuster erkennbar, die aus 40–45 Å breiten, stark osmiophilen und ebenso breiten schwach osmiophilen Untereinheiten bestehen (Figur 2b).

In enger topischer Beziehung zu den intranukleären Granula und an deren Peripherie in der gleichen transparenten Matrix gelegen findet man als dritte Art von Kerneinschlüssen Bündel 170 Å breiter *Filamente* (Figur 2a). Diese weisen bei stärkerer Vergrößerung ebenfalls ein Muster auf, indem ihnen 40 Å breite elektronendichte Untereinheiten ein quergestreiftes Aussehen verleihen. Kurze Bruchstücke gleichartiger Filamente sind zwischen den beschriebenen Granula vorhanden und scheinen in diese kontinuierlich überzugehen.

Diskussion der Befunde. Die hier beschriebenen Kernbestandteile unterscheiden sich grundlegend von Kern-

veränderungen, wie sie bei physiologischen und pathologischen Modifikationen des Karyoplasmas auftreten (DAVID⁴), und können aufgrund ihrer Feinstruktur nicht als Degenerationsprodukte der Kernsubstanz angesehen werden. Die gemeinsame Feinstruktur dieser 3 Arten von Kerneinschlüssen aus 40–45 Å breiten Untereinheiten sowie deren engen topischen Beziehungen weisen auf morphogenetische Zusammenhänge hin, so dass sie bei der Deutung der Befunde als Einheit angesehen werden müssen.

Das Zusammentreffen von Kerneinschlüssen der gleichen Art ist aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen über die intranukleäre Entwicklung von Viren bekannt und sowohl in virusinfizierten Zellkulturen und Organzellen (GRANBOULAN, TOURNIER, WICKER und BERNHARD⁵; HOWATSON und ALMEIDA^{6,7}; MORGAN,

⁴ H. DAVID, Z. mikrosk. anat. Forsch. 71, 412 (1964).

⁵ N. GRANBOULAN, P. TOURNIER, R. WICKER und W. BERNHARD, J. Cell Biol. 17, 423 (1963).

⁶ A. F. HOWATSON und J. D. ALMEIDA, J. Biophys. biochem. Cytol. 7, 753 (1960).

⁷ A. F. HOWATSON und J. D. ALMEIDA, J. Cell Biol. 8, 828 (1960).

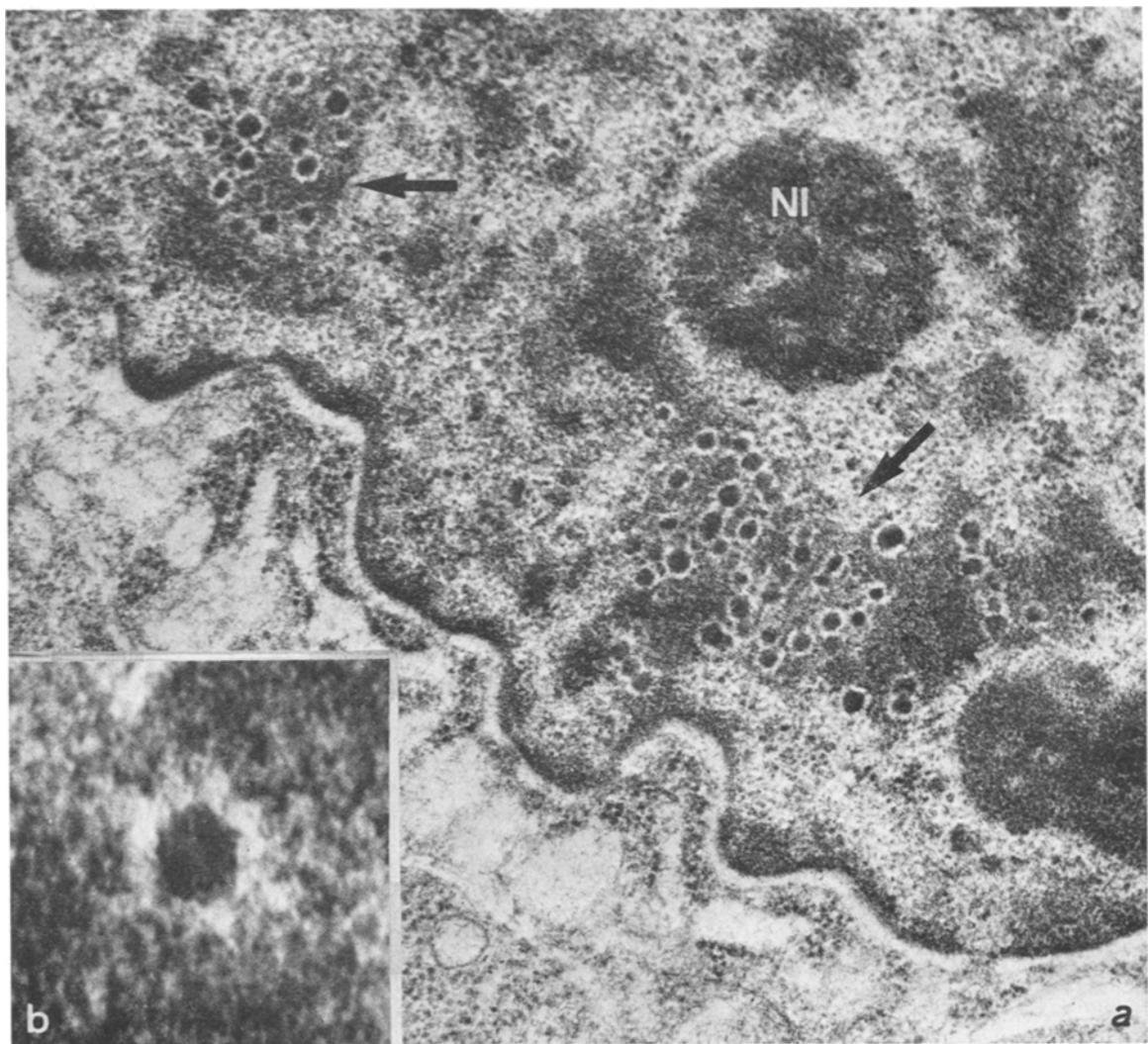


Fig. 1. a) Ausschnitt aus einem Zellkern einer Tumorzelle mit Ansammlungen grösserer elektronendichter Partikeln (Pfeile). Nucleolus (NI). Arch. Nr. 1763/67, EM-Vergr. 15000, $\times 60\,000$. b) Intranukleäre Partikel bei stärkerer Vergrößerung. Arch. Nr. 1773/67, EM-Vergr. 20000, $\times 200\,000$.

HOWE, ROSE und MOORE⁸; SUN⁹; TAWARA¹⁰; WATSON, WILDY und RUSSELL¹¹) als auch bei menschlichen Warzen (DUNN und OGILVIE¹²; SMITH, DOUGHERTY, MELNICK und RAPP¹³) häufig beschrieben worden.

Aus den Untersuchungen über den zeitlichen Ablauf von Virusinfektionen und der intranukleären Reduplikation von Adenoviren, Papovaviren und Herpesviren ergibt sich, dass den fertigen Viren das Auftreten von granulärem Material vorausgeht, das als unvollständige Vorstufe fertiger Viruspartikeln angesehen wird (MORGAN, HOWE, ROSE und MOORE⁸; SUN⁹). STICH, KALNINS, MACKINNON und YOHN¹⁴ konnten in Zellkernen von Amnionzellen, die mit Adenoviren Typ 12 infiziert worden waren, eine starke Anreicherung spezifischer Virusantikörper in derartigen Anhäufungen von Granula feststellen. Auch das intranukleäre Auftreten fibrillärer Strukturen wird im Zusammenhang mit der Entwicklung von Viruspartikeln beobachtet und als Ansammlung von Virusproteinuntereinheiten (Capsomeren) gedeutet (HOWATSON und ALMEIDA^{6,7}; NOYES¹⁵; SMITH, DOUGHERTY, MELNICK und RAPP¹³; WILLIAM, KASS und KNIGHT¹⁶).

Aus der Form der hier beobachteten grössten intranukleären Partikeln, die keine runden, sondern polygonale, vorwiegend hexagonale Konturen aufweisen, kann man

⁸ C. MORGAN, C. HOWE, H. ROSE und D. H. MOORE, *J. Biophys. biochem. Cytol.* 2, 351 (1956).

⁹ C. N. SUN, *Electron Microscopy* 1966, 6. Int. Congr. for Electron Microscopy (R. Uyeda, Tokyo 1966), vol. 2, p. 185.

¹⁰ J. TAWARA, *Electron Microscopy* 1966, 6. Int. Congr. for Electron Microscopy (R. Uyeda, Tokyo 1966), vol. 2, p. 187.

¹¹ D. H. WATSON, P. WILDY und W. C. RUSSELL, *Virology* 24, 523 (1964).

¹² A. E. G. DUNN und M. M. OGILVIE, *J. Ultrastruct. Res.* 22, 282 (1968).

¹³ K. O. SMITH, E. DOUGHERTY, J. L. MELNICK und F. RAPP, *J. Bact.* 90, 278 (1965).

¹⁴ H. F. STICH, V. J. KALNINS, E. MACKINNON und D. S. YOHN, *J. Ultrastruct. Res.* 19, 556 (1967).

¹⁵ W. F. NOYES, *Virology* 23, 65 (1964).

¹⁶ R. C. WILLIAM, S. J. KASS und C. A. KNIGHT, *Virology* 12, 48 (1960).

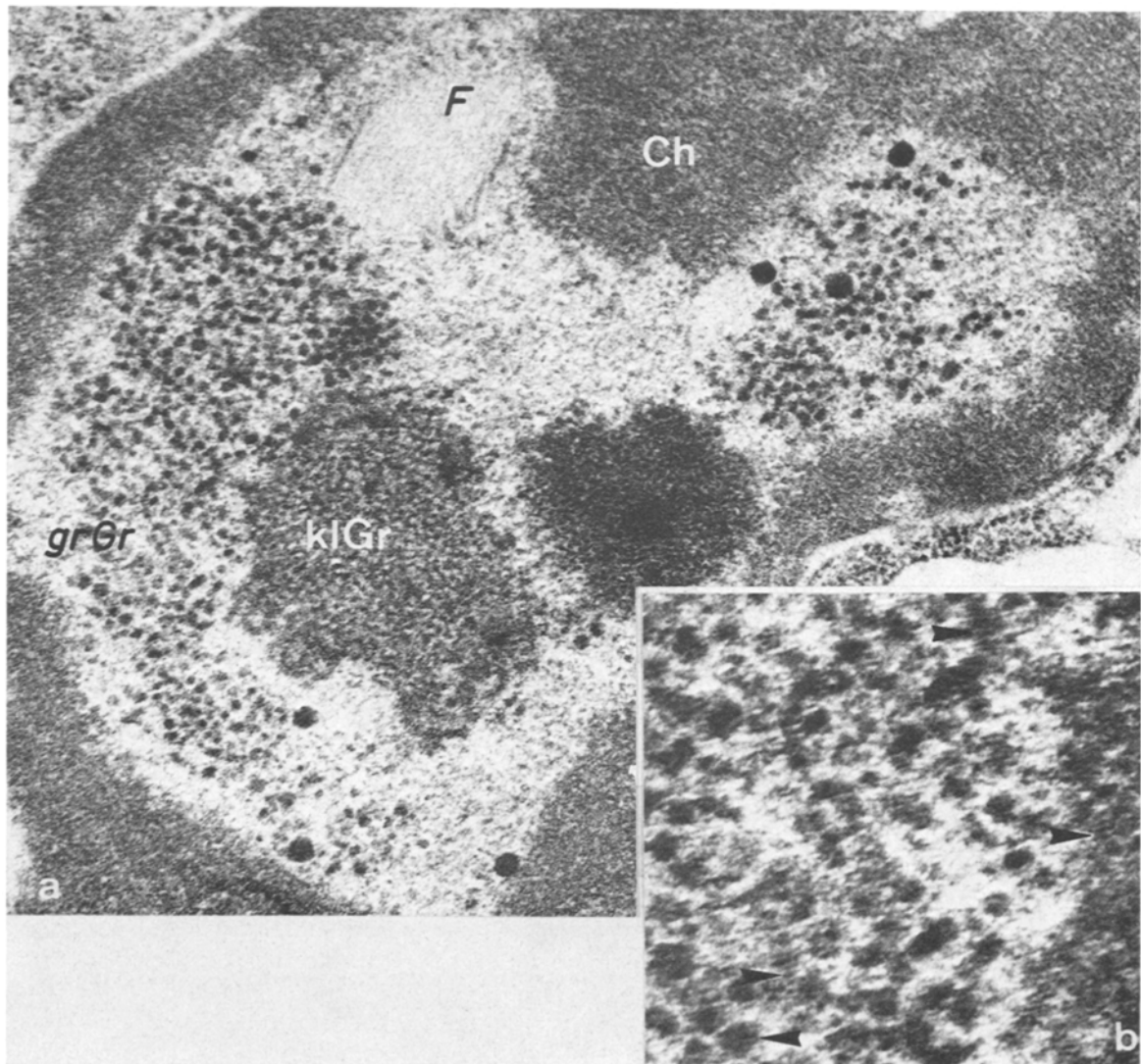


Fig. 2. a) Ausschnitt aus einem Zellkern einer Tumorzelle mit Anhäufungen grösserer Granula (gr Gr) und kleinerer Granula (kl Gr) sowie Filamenten (F). Chromatin (Ch). Arch. Nr. 1797/67, EM-Vergr. 15000, $\times 45000$. b) Granuläres Material bei stärkerer Vergrößerung. Die Pfeile weisen auf streifenförmige Untereinheiten. $\times 120000$.

vermuten, dass diese eine icosahedrale Struktur besitzen. Dieser Deutung lässt sich die Variationsbreite der festgestellten Durchmesser zwischen 54 und 80 nm zuordnen, da nach HOSAKA¹⁷ bei einem Icosaeder der Unterschied zwischen maximalem und minimalem Durchmesser 25% beträgt.

Eine Synopsis dieser Befunde legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den von uns beobachteten Kerneinschlüssen in Analogie zu den bekannten Untersuchungsergebnissen an virusinfizierten Zellen um fertige Viren, deren Vorstufen und um Virusproteinuntereinheiten handeln könnte. Nach ihrer Grösse und icosahedralen Struktur lassen sich die grössten Partikel in die Gruppe der Adenoviren einreihen (HAMPARIAN, HILLEMANN und KETLER¹⁸; HORNE, BRENNER, WATERSON und WILDY¹⁹), wobei natürlich morphologische Methoden allein keine endgültigen Schlussfolgerungen erlauben.

Summary. By electron microscopic examination of a solid, chiefly scirrhous mammary cancer, 3 kinds of unusual nuclear inclusions were found: (a) Electron dense particles of a 54–80 nm diameter, whose outlines appear

mainly hexagonal, which points at an icosahedral structure. (b) Clusters of granules with a diameter of 200–300 Å, respectively 300–400 Å, at whose circumference the larger particles appear. (c) Bundles of filaments in close association and continuous with the granules. In all 3 nuclear inclusions there are subunits of 40–45 Å. The comparison between these results and experiments published suggest that these nuclear inclusions are (a) virus particles, (b) virus at an early stage of development and (c) virus protein subunits.

A. SCHÄFER

*Pathologisches Institut der Universität,
6500 Mainz (Deutschland), 14. Februar 1969.*

¹⁷ Y. HOSAKA, *Biochim. Biophys. Acta* 104, 261 (1965).

¹⁸ V. V. HAMPARIAN, M. R. HILLEMANN und A. KETLER, *Proc. Soc. expl. Biol. Med.* 112, 1040 (1963).

¹⁹ R. W. HORNE, S. BRENNER, A. P. WATERSON und P. WILDY, *J. molec. Biol.* 7, 84 (1959).

²⁰ Frl. S. WALTER danke ich vielmals für ihre technische Hilfe.

A Model of Nucleolar Structure and Behaviour

In accordance with the behaviour of nucleoli of cells living in vitro, especially the effect of different substances on their morphology^{1–4}, we have attempted to set up a mathematical model of nucleolus. Our suggestion is based upon the results of nucleolar ultrastructure of fixed cells and our experience with nucleoli of tissue culture cells. We suggest that a nucleolus is essentially a nucleolonemal dynamic complex of its preribosomal granules joined with the fibrillar RNA and generated by the DNA template in its centre. The molecule of the fibrillar RNA is broken down during the time-period (once per each interval T) so that after time, $t = nT$, it fails to connect the granules together. The space corresponding to this last stage of the process is the nucleolar surface, since it is observed to be so characteristically sharp.

The equation (1) belongs to the radius of the homogenous and stationary nucleolus:

$$R = \sqrt[3]{\frac{3 v n T}{4 \pi}}; \quad n = \frac{\log l - \log l_c}{\log 2}; \quad l_c = \frac{1}{\text{const. } s} \quad (1)$$

v is the speed of production of nucleolar fibrillar RNA, l is the original length of its molecule, l_c is its critical length on the nucleolar surface, s is the density of nucleolar mass counted as number of granules joined by just one molecule of the fibrillar RNA. In this way, nucleolus would stimulate an open system (BERTALANFFY⁵) generated in its centre and degenerating along its radius. The nucleolar surface is the site of the revelation of this inner process of degeneration.

The equation (2) also belongs to the maximal radius of the elementary nucleolar sphere produced in the non-stationary but homogenous nucleolus:

$$R_{\max} = \sqrt[3]{\frac{3 T}{4 \pi} \int_{t_0}^{t_0 + n T} v(t) dt} \quad (2)$$

The density of the nucleolar superficial level in the non-homogenous nucleolus is described by the system of equations (3):

$$\begin{aligned} s &= f(r) \\ \tau &= nT - n \end{aligned} \quad (3)$$

where r is the radius of the elementary nucleolar sphere, and μ is its age, s corresponding to the maximal r for which $\tau \geq 0$ is the density of the nucleolar superficial level, and its r is the radius of the nucleolus.

Zusammenfassung. Ein mathematisches Modell wird beschrieben, wobei der Nukleolus als offenes System die fibrilläre RNS und die Ribonukleoproteingranula als Komplexstruktur aufgefasst werden. Die Formeln verwenden: Kerndurchmesser, Geschwindigkeit der Bildung von fibrillärer RNS, Moleküllänge, Halbwertszeit ihres Zerfalls sowie die Dichte der Ribonukleoproteingranula.

J. GAYER and V. PŮŽA

*Department of Biology, Medical Faculty,
Charles University, Hradec Králové (Czechoslovakia),
30 January 1969.*

¹ R. LETTRÉ, W. SIEBS und N. PAWELETZ, *Natn. Cancer Inst. Monogr.* 23, 107 (1966).

² K. IZUTSU und J. J. BIESELE, *Cancer Res.* 26, 910 (1966).

³ V. PŮŽA, J. GAYER und M. HROCH, *Folia biol., Praha* 15, 482 (1967).

⁴ K. SMETANA und M. POTMĚŠIL, *Zeitschr. Zellforsch.* 92, 62 (1968).

⁵ L. V. BERTALANFFY, *Biophysik des Fließgleichgewichts* (F. Vieweg und Son, Braunschweig 1953).