

Deuteriumoxid-induzierte Filamentaggregation im Mikronukleus eines Ciliaten

D₂O-Induced Filament Aggregation in the Micronucleus of a Ciliate

Manfred Hauser und Gernot Beinbrech

Lehrstuhl für Zellmorphologie und Lehrstuhl für Zellphysiologie der Ruhr-Universität Bochum

(Z. Naturforsch. 28 c, 339–341 [1973]; eingegangen am 1. Februar 1973)

Heavy water, paracrystals, filaments, microtubules

The large spindle-shaped micronucleus of *Paramecium bursaria* contains filaments of about 60 Å diameter between numerous highly condensed chromosomes. Following treatment for several hours with 70% heavy water the nucleus becomes stretched to several times its original length. The filaments, whose number increases noticeably, then appear as an aggregate, which exhibits a somewhat paracrystalline arrangement. An examination of the filament aggregate by means of a laser diffractometer yielded two diffraction lines corresponding to longitudinal periodicities of 91–99 and 160–195 Å. Since both periodicities are comparable to those reported for microtubular proteins, it is assumed the filaments reported here could be related to microtubular material.

Filamentaggregate, die einen parakristallinen Ordnungsgrad aufweisen, wurden u. a. schon in Interphasekernen und in meiotischen Spindelapparaten als normale Strukturelemente beschrieben^{4, 5, 3} oder sie konnten nach Behandlung nativer Objekte mit mitosehemmenden Vinca-Alkaloiden auch in Teilingszellen nachgewiesen werden^{2, 8, 9}. In all diesen Fällen wurden solche Parakristalle stets in Beziehung zu mikrotubulären Proteinen gebracht.

Bei *in vitro*-Experimenten mit gereinigten Mikrotubuloproteinen¹⁰ oder auch *in vivo* an Bündeln parallel geordneter Mikrotubuli in Einährsträngen telotropher Ovariole bei *Notonecta glauca*¹⁶ konnte z. B. dann schlüssig bewiesen werden, daß sich in Gegenwart von Vinca-Alkaloiden solche Proteine zu parakristallinen Filamentaggregaten umlagern können.

Da sich im interphasischen Mikronukleus von *Paramecium bursaria* neben Filamentmaterial auch stets Mikrotubuli nachweisen lassen – bei vielen Ciliaten trifft entweder das eine oder das andere zu (vgl. z. B. ^{4–6, 18}) –, bestand die Vermutung, daß auch hier zwischen Filamenten und Mikrotubuli eine Beziehung bestünde.

Um die Möglichkeit zu prüfen, ob es sich bei den Filamenten um fixierungsbedingt desintegrierte, besonders labile Mikrotubuli handelt, versuchten wir, eine Stabilisierung mit Deuteriumoxid (vgl. ¹⁹) durchzuführen, über die hier berichtet werden soll.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Manfred Hauser, D-4630 Bochum (BRD), Postfach 2148, Lehrstuhl für Zellmorphologie der Ruhr-Universität Bochum, Gebäude NDF 05/336.

Material und Methoden

Paramecium bursaria (Stamm B 1) wird in einer Erdlösung und einer Abkochung von Getreidekötern in Dauerkultur gehalten. Zur phasenkontrastmikroskopischen Voruntersuchung der Mikronuklei wurden die Ciliaten zunächst mit der Zentrifuge angereichert und in 1 ml 0,15 M KCl-Lösung resuspendiert. Danach wurde mit der Schwingsonde (Φ 4 mm) eines Ultraschallhomogenisators der Firma Braun (Sonic 125), Quigley-Rochester, Inc., Rochester, N. Y., USA, für 5 min auf niedrigster Energiestufe beschallt und die isolierten Kerne bei 2000 rpm 10 min lang abzentrifugiert.

Ein Teil der angereicherten Paramecien wurde vor der Kernisolierung 2–5 Std. lang in 70% Deuteriumoxid gehalten, dessen Isotonie mit KCl und einem Halbmikroosmometer der Firma H. Knauer, Berlin, eingestellt war.

Elektronenmikroskopisch untersucht wurden Tiere aus der normalen Kulturlösung und solche, die vorher in 70% D₂O wie angegeben gehalten worden waren. Die Fixierung erfolgte in 2,5% Glutaraldehyd mit 0,025 M s-Collidin (+ 0,02 mM Sucrose) auf pH 7,3 gepuffert während einer Stunde. Nach zweistündigem Auswaschen wurde mit 1% OsO₄-Collidinpuffer 30 min lang nachfixiert und über Äthanol in Epon 812 eingebettet. Sämtliche Ultra dünn schnitte wurden mit einem LKB-Ultrotom III angefertigt und mit dem Philips EM 300 G untersucht. Mit einem Laserstrahl-Diffraktometer der Firma LWU-Polaron, München, wurden von einigen elektronenmikroskopischen Negativen Beugungsdigramme hergestellt und auf Polaroidfilm aufgenommen.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Resultate und Diskussion

Der Mikronukleus von *Paramecium bursaria* ist im Gegensatz zu dem der meisten anderen Ciliaten besonders groß und von ungefähr spindelförmiger Gestalt. Er ist dem Vorderende des Makronukleus angelagert und mit diesem über Kernmembranbrücken verbunden (Hauser, persönliche Beobachtung), so daß beide Kerne meist zusammen isoliert werden (Abb. 1 a *, Inset). Er besitzt häufig einen abgerundeten und einen spitz zulaufenden Pol, letzterer wurde von Schwartz auch als „Primärpol“ bezeichnet, weil von ihm aus während der Prophase das Spindelwachstum erfolgt¹⁴.

Tatsächlich sind bereits am isolierten Ruhekern im Phasenkontrast häufig feine fibrilläre Strukturen zu erkennen (Abb. 1 a, Inset; Pfeil), die sich im elektronenmikroskopischen Bild als mehr oder minder umfangreiche Anhäufung von Mikrotubuli (Mt) erweisen (Abb. 1 a). Während der 25- bis 37-stündigen Interphase ist der übrige Kern sonst nur von filamentösem Material (fl) erfüllt, das zwischen den zahlreichen und hochkondensierten Chromosomen lokalisiert und wie diese in der Kernlängsachse ausgerichtet ist (Abb. 1 b). Die Chromosomen selbst sind vor allem im peripheren Kernbereich häufig ebenfalls von filamentösem, gitterartig angeordnetem Material (Abb. 2 b **, Klammer) umhüllt, das im Längsschnitt als leiterförmige Struktur erscheint (Abb. 2 a, Klammer).

Abb. 1 a. Mikrotubuli (Mt), die im Transversalschnitt durch den Bereich des „Primärpols“ teils längs, teils quer getroffen sind. Ch Chromosomen; MaN Makronukleus. 47 000.

Abb. 1 a, Inset. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme des isolierten Makro- (MaN) und Mikronukleus (MiN). Während der Interphase ist der Mikronukleus mit dem Makronukleus fest verbunden. Der Pfeil weist auf die faserigen Strukturen am „Primärpol“ (Pp) hin, auf den die Aufnahme fokussiert ist. Die unterbrochene Linie deutet die Schnittrichtung in Abb. 1 a an. 1080.

Abb. 1 b. Längsschnitt durch den mittleren Kernbereich. Ch Chromosomen; fl Filamente. 43 200.

Abb. 2 a. Hüllmaterial der Chromosomen, das im Längsschnitt eine leiterförmige Struktur (Klammer) aufweist

Abb. 2 b. Längsschnitt durch die Peripherie eines Kerns. In der Aufsicht (Klammer) besitzt das die Chromosomen umhüllende Material oft eine gitterartige Anordnung; fl Filamente. 34 200.

Abb. 2 c. Querschnitt durch einen Deuteriumoxid-behandelten Mikronukleus; flb Filamentbündel; Ch Chromosomen; Kp Kernporen. 43 200.

* Abb. 1 a u. 1 b siehe Tafel S. 340 a.

** Abb. 2 a—2 c siehe Tafel S. 340 b.

An entsprechenden Stadien Deuteriumoxid behandelter Kerne zeigte sich bereits eine im Phasenkontrast wahrnehmbare Veränderung: Die meisten der sonst $\approx 10 \mu\text{m}$ langen Kerne hatten sich teilweise um mehr als das Doppelte der ursprünglichen Länge gestreckt (Abb. 2 c, Inset). Bei der Dehnung des Kerns treten offensichtlich infolge der longitudinalen Ausrichtung der gebildeten Filamentaggregate Spannungen an der Kernmembran auf, die zu einer beträchtlichen Verformung des Mikronukleus führen. Im Ultradünnabschnitt äußert sich dies darin, daß im selben Schnitt neben zahlreichen Längs- auch stets etliche Querschnitte des Kerns zu finden waren. Nicht selten war dieser dabei auch noch um seine Längsachse tordiert (Abb. 3 a). Wie Abb. 2 c (Inset) beweist, konnten solche Deformationen auch noch an isolierten Kernen beobachtet werden.

Während, wie bereits erwähnt, Mikrotubuli normalerweise nur im Bereich des „Primärpols“ nachweisbar sind, treten sie nach D₂O-Behandlung in relativ geringer Anzahl nun auch im übrigen Kern verteilt auf. Vorwiegend sind sie allerdings im Bereich der Kernmembran lokalisiert und kommen nur vereinzelt im interchromosomal Raum vor. An Querschnitten wie Abb. 2 c wird die enge Anlage rung der Mikrotubuli an die Kernmembran deutlich; ihre Existenz ist dort über weite Bereiche durch Serienschnitte belegbar. Beträchtlich vermehrt erscheint allerdings die Anzahl der Filamente. Sie liegen nun auch oft in einem so hohen Ordnungsgrad

Abb. 2 e, Inset. Isolierter Mikronukleus nach Deuteriumoxid-Behandlung. Die unterbrochene Linie deutet den Kernumriß an und die durchgezogene Linie die ungefähre Schnittebene von Abb. 2 c. 1080.

Abb. 2 d. Längsschnitt durch den Endabschnitt eines Deuteriumoxid-behandelten Kerns; flb Filamentbündel; Ch Chromosom; Kp Kernporen, 25 000.

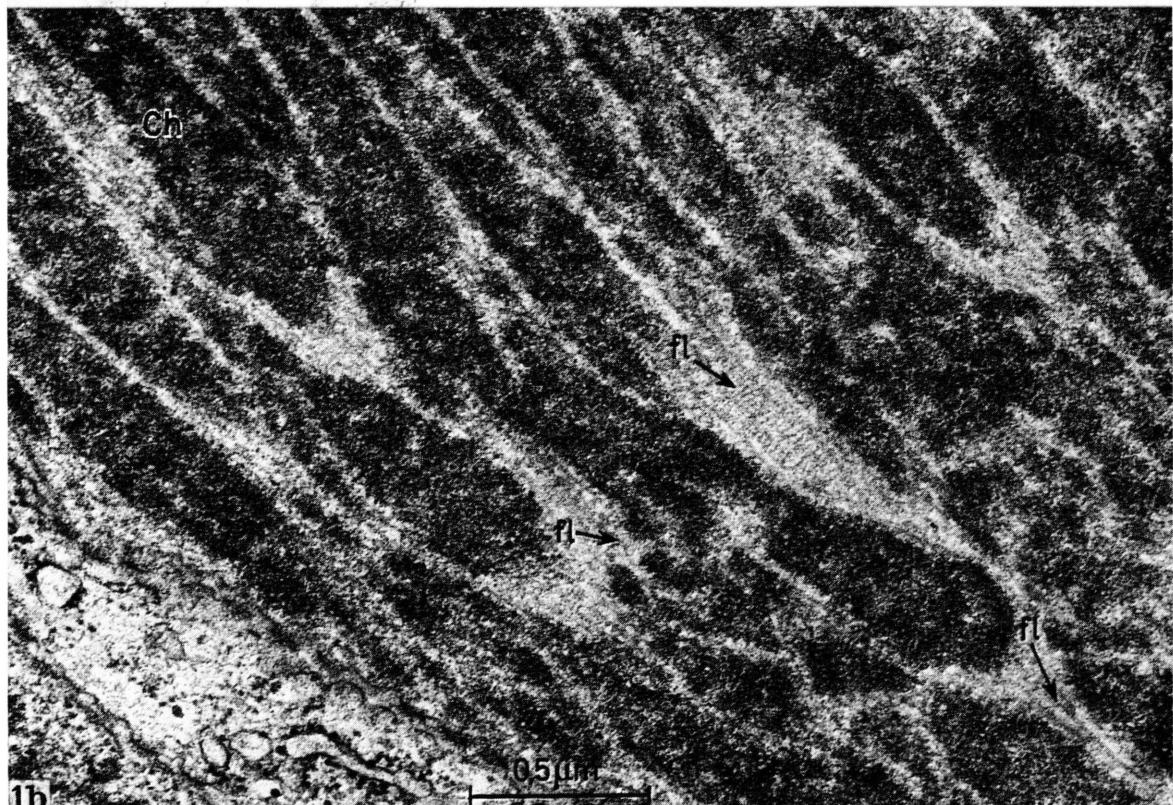
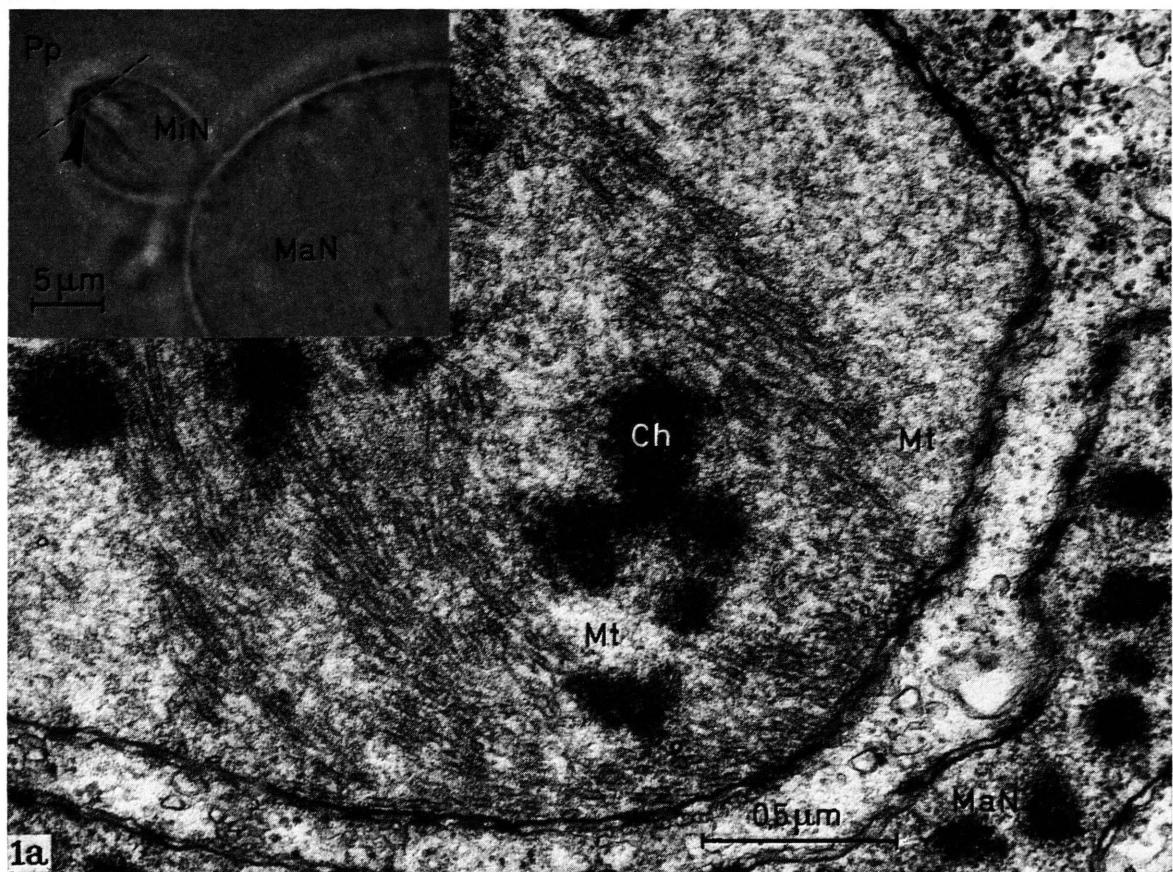
Abb. 3 a. Torsion im Bereich des langgestreckten Kernpols (vgl. Abb. 2 c, Inset); flb Filamentbündel; Kp Kernporen. 48 000.

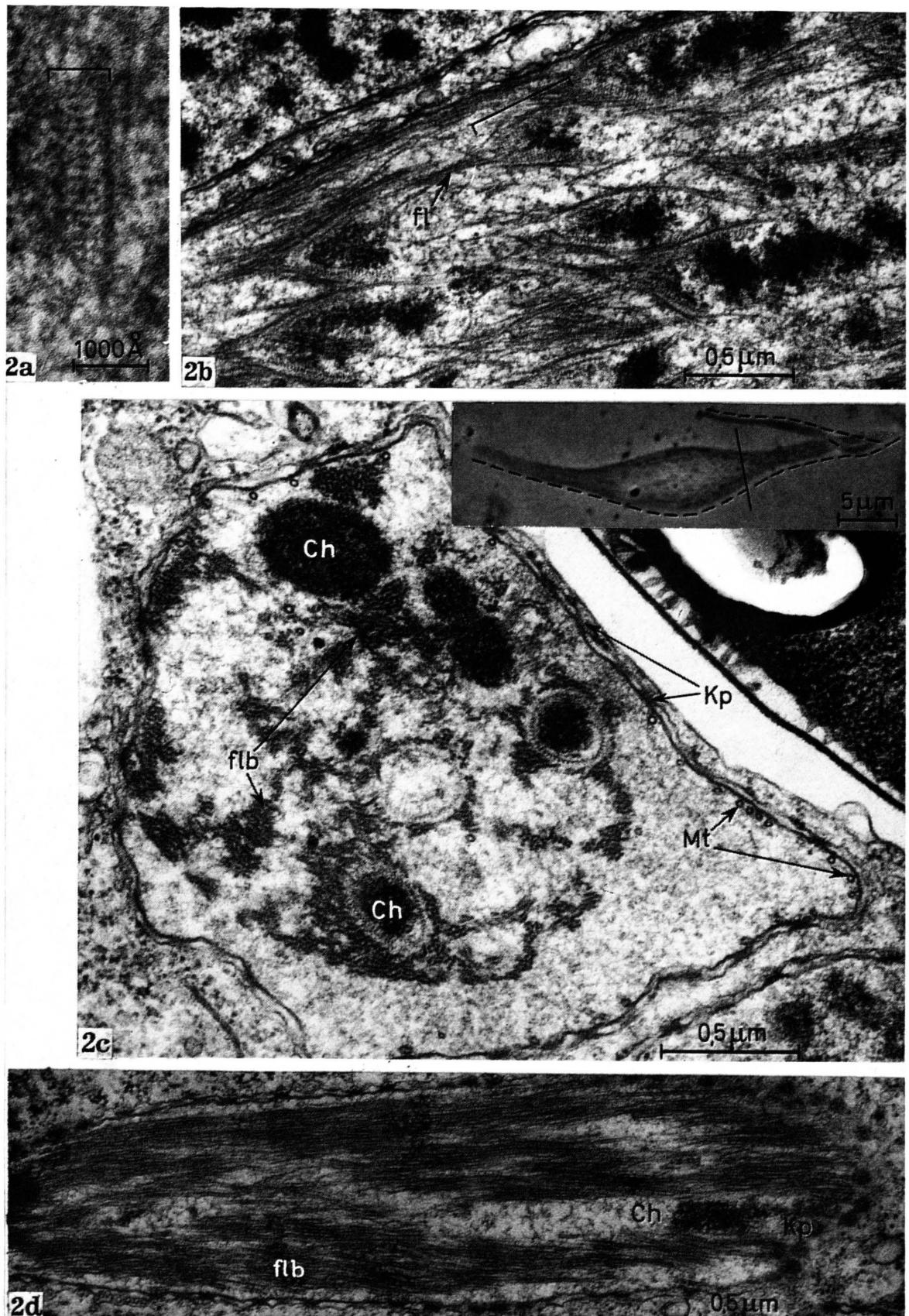
Abb. 3 b. Querschnitt der parakristallinen Filamentaggregate. Der Winkel bezeichnet gut sichtbare Quervernetzungen der Filamente; fl Filamente; Mt Mikrotubuli. 215 000.

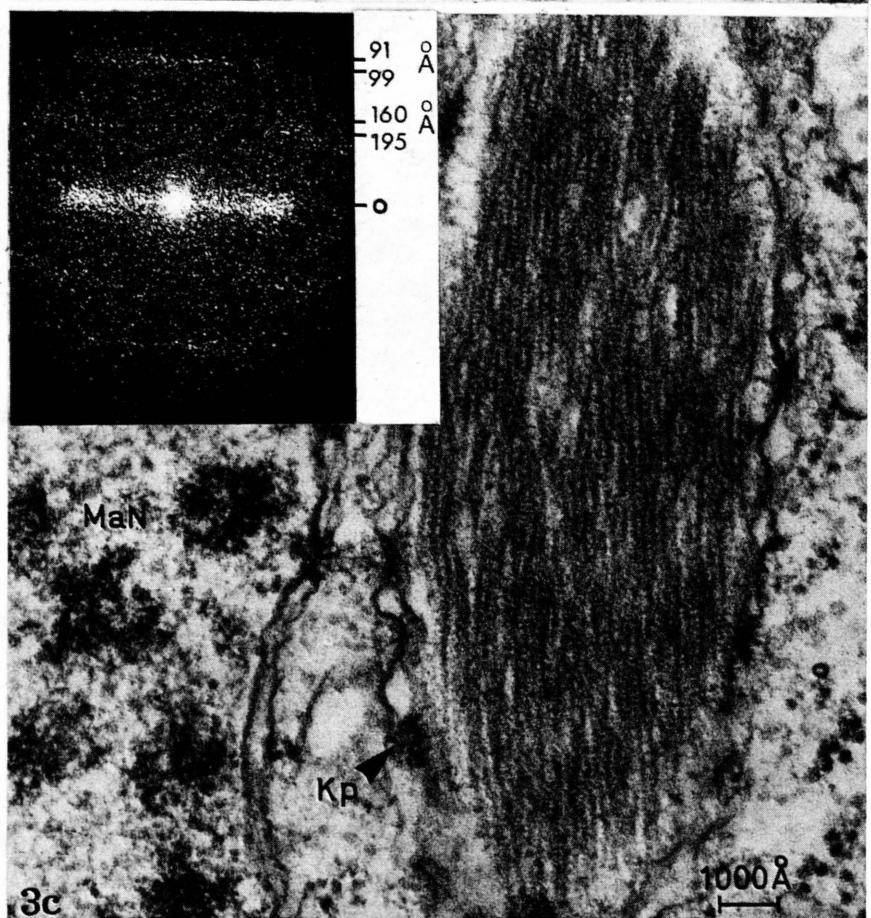
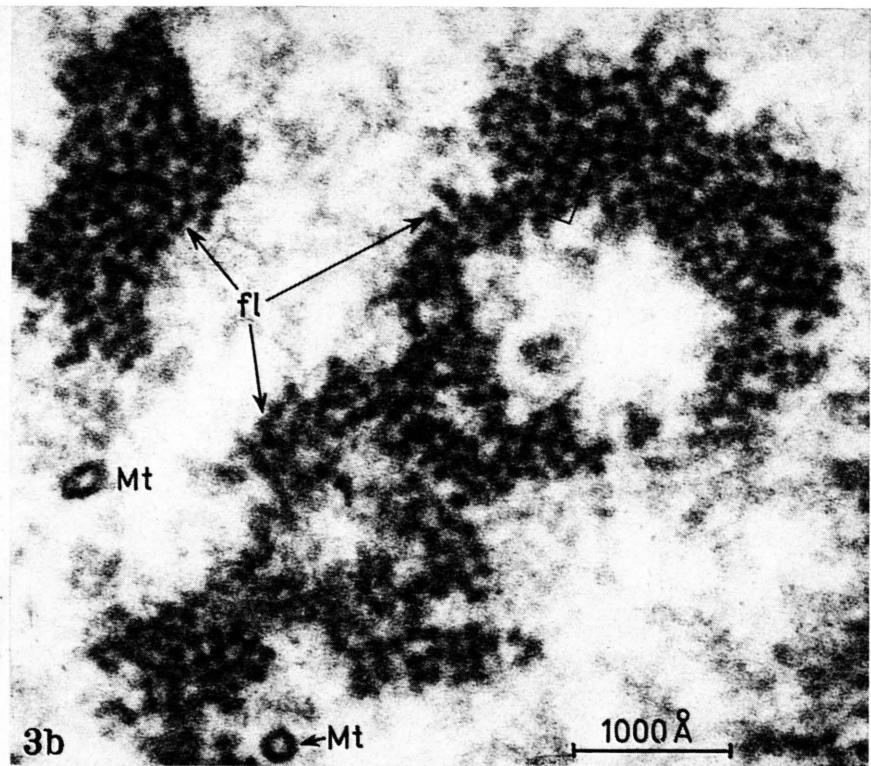
Abb. 3 c. Längsschnitt durch einen der beiden völlig von Filamenten ausgefüllten Kernpole. MaN Makronukleus; Kp Kernporen. 79 000.

Abb. 3 d, Inset. Beugungsmuster von Abb. 3 c. Der Abstand vom Primärstrahl zu den Endpunkten bei 0 entspricht dem Filamentabstand.

* Abb. 3 a—3 c siehe Tafel S. 340 c.







vor, daß er bereits als parakristallin bezeichnet werden kann (Abbn. 2 d und 3 a*). Besonders deutlich kommt dies in Abb. 3 b am Querschnitt eines solchen parakristallinen Filamentaggregates zum Ausdruck: Die Filamente, die unter sich noch quervernetzt sind (Klammer in Abb. 3 b), weisen einen Durchmesser von ca. 60 Å auf und besitzen einen ziemlich konstanten lateralen Abstand von ca. 100 Å. Charakteristisch für D₂O-behandelte Kerne ist auch die Tatsache, daß ihre Chromosomen während der Kernstreckung über den gesamten Kernraum verteilt wurden.

Um konkrete Hinweise auf die Natur dieser Filamente und einen möglichen Aufbau aus Untereinheiten zu erhalten, wurden mehrere Negative elektronenmikroskopischer Aufnahmen mit dem Laserstrahl-Diffraktometer untersucht. Das Beugungsmuster (Abb. 3 d, Inset) läßt klar zwei Beugungslinien erkennen, die auf Filamentperiodizitäten von 160 – 195 Å und 91 – 99 Å hindeuten. Die Unschärfe der Beugungslinien und die damit verbundene Streuung der errechneten Gitterabstände ist wahrscheinlich auf den nicht allzu hohen Ordnungsgrad in der Transversalebene der Filamentaggregate zurückzuführen, der sich auch darin äußert, daß die äquatorialen Beugungspunkte (laterale Filamentabstände) zu einer Linie verschmiert sind.

Auf Grund des Durchmessers könnte es sich bei den untersuchten Strukturen durchaus um Aktinfilamente handeln. In diesem Falle wären im Beugungsmuster eine starke Linie bei 59 Å und schwächere Linien bei 175 und 350 Å zu erwarten. Eine 59 Å-Linie des Aktins könnte allerdings der hier gefundenen Periodizität von 170 bis 195 Å entsprechen, während die 350 Å-Linie bei dem vorliegenden Ordnungsgrad wiederum zu fehlen scheint.

Nimmt man an, daß die Linie von 91 – 99 Å zum mindesten teilweise als Linie 2. Ordnung einer 170 – 195 Å-Periodizität interpretiert werden kann,

dann ist das Intensitätsmaximum sicherlich in der Linie 1. Ordnung zwischen 180 und 195 Å zu suchen. Zeigt man außerdem in Betracht, daß Aktinfilamente während der Präparation für die Elektronenmikroskopie durchschnittlich um mindestens 2% schrumpfen¹³ und eine Aktin-Periodizität zwischen 90 und 100 Å noch nicht nachgewiesen werden konnte, dann sprechen die Diffraktionsergebnisse allerdings gegen eine aktinartige Substruktur der Filamente.

Die gefundenen Beugungslinien von 91 – 99 und von 160 – 195 Å deuten deshalb eher auf andere Untereinheiten hin. So konnte aus isolierten Mitose-Spindeln ein 22 S-Protein mit einer Länge von 190 – 200 Å isoliert werden, das sich aus 8 Untereinheiten (Dimeren) zusammensetzen soll. Dieses Tubulin ist in der Lage, vermutlich unter Umlagerung seiner Untereinheiten, *in vitro* Filamente mit einem Durchmesser von 40 bis 60 Å zu bilden¹⁷. Dies entspricht sowohl dem Durchmesser der hier beschriebenen Filamente als auch den Dimensionen, die für Protofilamente der Mikrotubuli angegeben werden^{1, 3, 7}.

Ein weiterer Zusammenhang könnte auch zwischen der 91 – 99 Å-Beugungslinie und einer Longitudinal-Periodizität von 80 bis 90 Å in Flagellenmikrotubuli^{12, 15} bestehen. Die Abweichung unserer Meßergebnisse von beiden hier zitierten Angaben liegt noch innerhalb der experimentellen Fehlergrenze.

Da Parakristalle, die aus ähnlich dimensionierten filamentösen Untereinheiten bestehen, bereits im Mikronukleus eines Suktors beschrieben wurden, wo auch ein direkter struktureller Zusammenhang mit den sich ausbildenden Spindeltubuli nachweisbar war⁵, neigen wir zu der Ansicht, daß es sich hierbei um Mikrotubulus-Untereinheiten von der Art der Protofilamente handelt.

Frl. Helga van Eys danken wir für wertvolle Unterstützung.

- ¹ N. A. Barnicot, *J. Cell Sci.* **1**, 217 [1966].
- ² K. B. Bensch and S. E. Malawista, *J. Cell Biol.* **40**, 95 [1969].
- ³ H. Fuge, *Exp. Cell Res.* **60**, 309 [1970].
- ⁴ M. Hauser, *Z. Zellforsch.* **106**, 584 [1970].
- ⁵ M. Hauser, *Chromosoma* **36**, 158 [1972].
- ⁶ A. Jurand and G. G. Selman, *J. gen. Microbiol.* **60**, 357 [1970].
- ⁷ B. Kiefer, H. Sakai, A. J. Solari, and D. Mazia, *J. molecular Biol.* **20**, 75 [1966].
- ⁸ A. Krishan and D. Hsu, *J. Cell Biol.* **43**, 553 [1970].
- ⁹ S. E. Malawista and H. Sato, *J. Cell Biol.* **42**, 596 [1969].
- ¹⁰ R. Marantz and M. L. Shelanski, *J. Cell Biol.* **44**, 234 [1970].
- ¹¹ E. J. O'Brien, P. M. Bennett, and J. Hanson, *Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B* **261**, 201 [1971].
- ¹² D. C. Pease, *J. Cell Biol.* **18**, 313 [1963].
- ¹³ M. K. Reedy, *Am. Zool.* **7**, 405 [1967].
- ¹⁴ V. Schwartz, *Verh. dtsch. zool. Ges.* **123** [1964].
- ¹⁵ M. L. Shelanski and E. W. Taylor, *J. Cell Biol.* **38**, 304 [1968].
- ¹⁶ H. Stebbings, *J. Cell Sci.* **8**, 111 [1971].
- ¹⁷ R. E. Stephens, *J. Cell Biol.* **32**, 255 [1967].
- ¹⁸ J. Stevenson and F. P. Lloyd, *Austral. J. Biol. Sci.* **29**, 963 [1971].
- ¹⁹ L. G. Tilney, *Origin and Continuity of Cell Organells*, ed. J. Reinert and H. Ursprung, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1971.