INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

*Wissenschaftlicher Film B 1070/1973*

# Störung der Kernmigration von Micrasterias denticulata (Desmidiaceae) durch eine die Microtubuli beeinflussende Substanz Chlor-isopropyl-N-phenylcarbamat (CIPC)

Begleitveröffentlichung von

Prof. Dr. O. KIERMAYER, Salzburg

Mit 3 Abbildungen

GÖTTINGEN 1973

Film B 1070

# Störung der Kernmigration von Micrasterias denticulata (Desmidiaceae) durch eine die Microtubuli beeinflussende Substanz Chlor-isopropyl-N-phenylcarbamat (CIPC)

O. KIERMAYER und SYBILLE BEISENHERZ, Köln

Begleitveröffentlichung von O. KIERMAYER, Salzburg

## Allgemeine Vorbemerkungen[1]

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an wachsenden und nicht wachsenden Zellen von *Micrasterias denticulata* (KIERMAYER [2], [4], [5]) haben gezeigt, daß in der Zelle verschieden orientierte Microtubuli-Systeme vorhanden sind. Vier solcher Systeme konnten unterschieden werden (KIERMAYER [2]), und zwar:

1. ein Band im cortikalen Protoplasma der Isthmusregion, welches den Zellkern umgibt;
2. Bänder im Protoplasma nicht wachsender Zellen mit stabförmigen Verbindungsbrücken zwischen den einzelnen Microtubuli und zwischen den Microtubuli und dem Plasmalemma;
3. ein System von Tubuli in Nachbarschaft des Posttelophase-Zellkernes mit „intertubulären Strukturen" (möglicherweise Fibrillen);
4. Microtubuli im inneren und corticalen Protoplasma sich differenzierender Halbzellen.

Untersuchungen mit Stoffen, u. a. Colchizin, Velban, Isopropyl-N-phenylcarbamat und Trifluralin, welche eine spezielle desorganisierende Wirkung auf Microtubuli ausüben, zeigten, daß vor allem die postmitotische Kernmigration während der Cytomorphogenese stark beeinflußt wird (KIERMAYER [3], [7], [11]). Das läßt den Schluß zu, daß möglicherweise das dem Posttelophase-Kern anliegende Microtubuli-

[1] Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 11 u. 12.

System desorganisiert wird und der Kern dadurch sein Migrations-, Orientierungs- und Verankerungsvermögen verliert (KIERMAYER [4]). Auf Grund der erwähnten elektronenmikroskopischen und physiologischen Untersuchungen schien es interessant, das gestörte Bewegungs- und Wanderungsverhalten des Posttelophase-Kernes kinematographisch zu studieren, um genauere Rückschlüsse auf den Bewegungsmechanismus ziehen zu können.

### Material und Methodik

Zellen von *Micrasterias denticulata* Breb.[1] wurden in WARIS-Lösung (WARIS [8]) bei einem bestimmten Licht-Dunkelrhythmus und konstanter Temperatur (21 ° ± 1 ° C) semisteril gezüchtet (genaue Kulturmethode vgl. KIERMAYER [1], [5]). Frühe Teilungsstadien wurden mittels Mikropipetten unter dem Stereomikroskop den Kulturgefäßen entnommen und in Lösungen von Chlor-isopropyl-N-phenylcarbamat (CIPC, Fa. Calbiochem) unterschiedlicher Konzentration eingelegt. Die Entwicklung der Zellen (Zellformbildung, Wanderung des Zellkernes und der Chloroplasten) wurde kinematographisch mit Hilfe einer Zeitraffereinrichtung festgehalten. Um ein normales Wachstum der Zellen im abgeschlossenen, mikroskopischen Präparat zu gewährleisten, wurde den Zellen Moordetritus beigegeben (KIERMAYER [1], [10]).
Bei einem Teil der Untersuchungen wurden die sich entwickelnden Zellen in kleine Schälchen mit CICP-Lösungen übertragen, nach einer bestimmten Zeit in Nährlösung zurücküberführt und danach für die Filmaufnahmen präpariert.
Die Filmaufnahmen wurden mit Zeiss-Mikroskopen z.T. unter Verwendung der Zeiss-Interferenzkontrast-Einrichtung hergestellt. Als Filmmaterial diente Kodak Double X. Die jeweilige Zeitraffung ist im Abschnitt „Erläuterungen zum Film" angegeben.

### Ergebnis und Diskussion

Zellen von *Micrasterias denticulata*, die im Zustand der Zelldifferenzierung mit Lösungen von Chlor-isopropyl-N-phenylcarbamat (CIPC) behandelt wurden, zeigen in Zeitrafferaufnahmen eindeutig den starken Effekt dieser Substanz auf die postmitotische Kern- und Chloroplastenmigration.
Während bei unbehandelten Zellen der Kern geradlinig in die wachsende Halbzelle einwandert, weicht er bei behandelten Zellen bereits bei der Einwanderung sehr bald von der geradlinigen Bahn ab und bewegt sich seitlich in einen Seitenlappen hinein (vgl. Abb. 1a—d). In dieser

[1] Herkunftsort sind die Hochmoore in Sauerfeld bei Tamsweg, Salzburg, Österreich.

oder anderer Position (Abb. 2a) führt er starke Rotationen durch. Dies deutet darauf hin, daß der Zellkern, offenbar durch die Desorganisation des ihn umhüllenden Systems an Microtubuli mit intertubulären

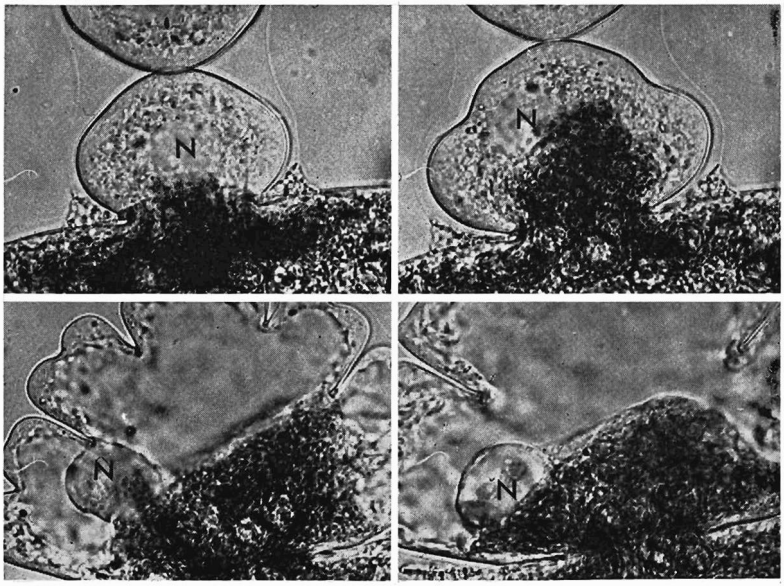


Abb. 1. *Micrasterias denticulata* Breb.; Entwicklungsfolge einer wachsenden Halbzelle in einer wäßrigen Lösung von $10^{-5}$ mol CIPC.
a: Der Zellkern (N) nimmt noch eine zentrale Lage in der Halbzelle ein; b: (45 Minuten nach a aufgenommen) der Kern ist bereits nach links verlagert (Orientierungsverlauf); c—d: der Kern liegt völlig anomal im linken Seitenlappen, wo er — wie der Film zeigt — Rotationen um seine eigene Achse durchführt. Auch der Chloroplast ist nicht vollständig in die Halbzelle eingewandert

Strukturen (möglicherweise Fibrillen), wie sie auf Abb. 3 schematisch dargestellt sind, seine Orientierung in der Zelle verliert und von der Plasmaströmung weggespült und rotiert werden kann. Microtubuli scheinen somit nicht nur die räumliche Position des Zellkernes festzulegen, sondern ihn auch in einer mehr oder minder starren Position im Isthmus zu halten. Besonders auffallend ist, daß der Zellkern, wenn er von der Plasmaströmung abnormal in das periphere Protoplasma getragen wird, sich dort verankern kann, und zwar meist an den Stellen

der tiefen Lappeneinschnürungen. Schon früher wurde darauf hingewiesen (KIERMAYER [1]), daß diese Plasmabereiche „Organisationszentren" für die Chloroplastendifferenzierung darstellen. Es scheint,

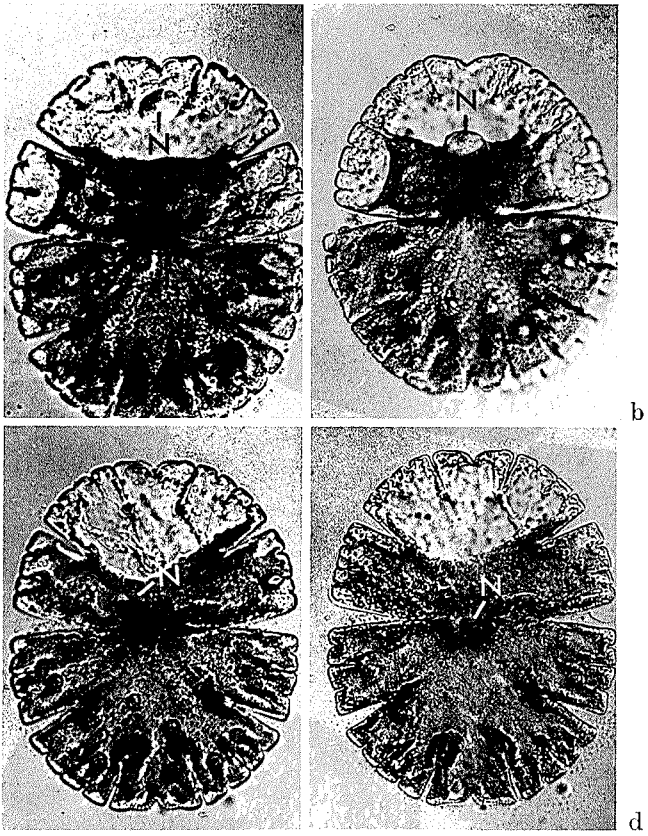


Abb. 2. a: Die Zelle wurde während ihrer Entwicklung mit $5 \times 10^{-4}$ und CIPC behandelt. Der Zellkern „schwebt" frei im Zellraum; der Chloroplast ist nur teilweise in die junge Halbzelle eingewandert. b: Der Zellkern hat sich anomal am Chloroplasten verankert. Behandlung $5 \times 10^{-4}$ mol CIPC. c—d: Die Zellen wurden nach einer Behandlung mit $5 \times 10^{-4}$ mol CIPC in Nährlösung überführt. Bei c liegt der Zellkern noch links seitlich verschoben; bei d hat er seine normale Position im Isthmus wieder eingenommen

daß diese „Organisationszentren" nun auch den Zellkern „einfangen" können und er dort — wie normalerweise der Chloroplast — einen festeren Kontakt eingeht. Die interessanten Kontaktphänomene zwischen peripherem Protoplasma und dem Chloroplasten während des Zellwachstums sind in einem anderen Zeitrafferfilm kinematographisch bearbeitet (KIERMAYER [11]). Durch den festen Kontakt des Zellkernes im peripheren Protoplasma an den Lappeneinschnitten kommt es zu einem typischen „Kernpendeln", oft verbunden mit gleichzeitiger Rotation des Kernes, hervorgerufen durch die starke Plasmaströmung.
Nach Überführung CIPC-behandelter Zellen in Nährlösung oder auch in schwach konzentrierte CIPC-Lösungen ($10^{-5}$ mol), kommt es zu einer Rückverlagerung des Kernes in den Isthmusbereich und dort zu einer normalen Verankerung (Abb. 2c—d). Das spricht dafür, daß bei Wegfall des Microtubuli-desorganisierenden Agens (CIPC) möglicherweise eine Restitution bestimmter MT-Systeme eintritt, die eine Rückwanderung des Zellkernes ermöglichen. Für die Verankerung im Isthmusbereich könnte das stark ausgebildete „Isthmusband of Microtubules" (KIERMAYER [2]) von Bedeutung sein.
Außer dem Zellkern zeigt auch der Chloroplast durch CIPC eine Störung der Einwanderung (vgl. die ähnliche Wirkung des Colchizins und Velbans, KIERMAYER [3]). Ob auch hier Microtubuli von funktioneller Bedeutung sind, kann z. Z. nicht gesagt werden.
Auffällig ist die starke Zerklüftung des Protoplasmas trotz starker Plasmaströmung bei mit CIPC-behandelten Zellen. Es ist zu vermuten, daß durch die Desorganisation cytoplasmatischer Microtubuli, die das Plasma in Form langer Röhren durchziehen (KIERMAYER [2]), bei deren Zusammenbrechen die plasmatische Gesamtstruktur eine Veränderung erfährt und in einzelne Portionen zerfällt. Microtubuli könnte somit auch die Funktion zukommen, als langgestreckte Elemente dem Plasmagel eine bestimmte Stabilität zu verleihen.

## Erläuterungen zum Film[1]

*Normale Migration und Verankerung des Zellkerns*
*Nährlösung*
*3 B/min*

1. Die Aufnahme zeigt im Interferenzkontrast wachsende Halbzellen von *Micrasterias denticulata* in Nährlösung, in denen der Zellkern geradlinig in die junge Halbzelle migriert und später vom Chloroplasten überdeckt wird. Die Rückwanderung des Zellkernes in den Isthmus ist wegen seiner Überdeckung durch den Chloroplasten nicht deutlich erkennbar.

[1] Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

*Orientierungs- und Verankerungsverlust (Kernrotation)*
*CIPC-Lösung ($10^{-5}$ mol)*
*6 und 10B/min*

2. Die Aufnahme zeigt ein sehr junges Entwicklungsstadium im Zustand des Zellwachstums. Die zuerst gleichmäßig einwandernden Zellkerne verlieren bald die Orientierung und bewegen sich in Richtung der Seitenlappen. Mit zunehmender Größe der Halbzellen werden große Vakuolen sichtbar; das Protoplasma ist in Portionen zerteilt. Der Chloroplast wandert in die Halbzellen ein, erfüllt aber nicht die gesamte Halbzelle.

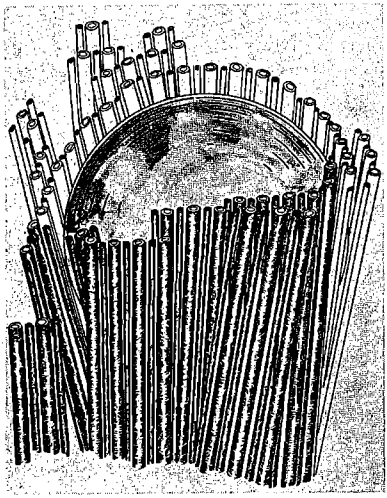

Abb. 3. Räumliche Darstellung einer möglichen Anordnung des Microtubuli-Fibrillen-Komplexes um den Posttelophase-Zellkern von Micrasterias denticulata (nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen; vgl. KIERMAYER [2]). Durch den Einfluß des CIPC's scheint dieser Komplex desorganisiert zu werden, wodurch es zu den im Film sichtbaren Veränderungen im Migrations- und Orientierungsverhalten des Zellkernes kommt

Der Zellkern einer Halbzelle liegt im unteren Seitenlappen, wo er deutliche Rotationen durchführt.
Interferenzkontrast (Inko); Behandlung: $10^{-5}$ mol CIPC; Aufn.-Freq. 6 B/min

3. Die Aufnahme zeigt anfänglich beide, etwas später nur eine wachsende Halbzelle, in welcher die abnorme Wanderung des Zellkernes erkennbar ist: Der Nucleus bewegt sich nach links in den unteren Seitenlappen und führt dort rasche Rotationen durch. Auffallend ist, daß der Zellkern zuerst beim Einwandern Kontakt im peripheren Protoplasma der rechten Halbzelle findet, diesen später aber wieder verliert. Der Chloroplast ist nur teilweise in die neue Halbzelle gewandert. Die Bildung von „Chloroplasten-Zungen" und deren Verankerung im peri-

pheren Protoplasma sind deutlich erkennbar. Der Chloroplast „erstarrt" und ist auch nach Beendigung des Zellwachstums nicht weiter in die Halbzelle eingewandert.
Hellfeld; Behandlung: $10^{-5}$ mol CIPC; Aufn.-Freq. 10 B/min

*Anomale Verankerung im peripheren Protoplasma (Kernpendeln)*

*CIPC-Lösung ($5 \times 10^{-4}$ mol)*

*2 B/s bis 6 B/min*

4. Der Zellkern liegt anomal im Polarlappen und führt starke Bewegungen durch; er ist nicht verankert, sondern „schwebt" im Zellraum (Abb. 2a).
Hellfeld; Behandlung: $5 \times 10^{-4}$ mol CIPC; Aufn.-Freq. 12 B/min

5. Der Zellkern hat sich anomal an einen Lappeneinschnitt im peripheren Protoplasma verankert und pendelt dort sehr stark hin und her, wobei er auch Rotationen ausführt. Der Chloroplast ist nicht vollständig eingewandert, er hat sich am Lappeneinschnitt im peripheren Protoplasma verankert. Das Protoplasma zeigt eine starke Zerklüftung.
Inko; Behandlung: $5 \times 10^{-4}$ mol CIPC; Aufn.-Freq. 12 B/min

6. Zellkern bei stärkerer Vergrößerung und geringerer Zeitraffung. Er „hängt" an einem Polarlappeneinschnitt. Die Plasmaströmung sowie die Portionierung des Cytoplasmas in einzelne sich verformende Plasmaklumpen sind deutlich erkennbar.
Hellfeld; Behandlung: $5 \times 10^{-4}$ mol CIPC; Aufn.-Freq. 2 B/min

7. Der Zellkern führt pendelnde Bewegungen und Rotation durch. Das Protoplasma erscheint portioniert; der Chloroplast ist nicht vollständig in die Halbzelle eingewandert, sondern er „hängt" an einer Stelle des Polarlappens.
Der Kern verliert seinen Kontakt an einem Polarlappeneinschnitt, pendelt hin und her und findet schließlich wieder Kontakt im peripheren Protoplasma des anderen Polarlappeneinschnittes (Wechsel der Kontaktzonen!).
Inko; Behandlung: $5 \times 10^{-4}$ mol CIPC; Aufn.-Freq. 12 B/min

8. Der Zellkern liegt zuerst frei in der Zelle, pendelt hin und her und findet schließlich Kontakt an einem Einschnitt des Hauptlappens. Der Chloroplast ist nur bis zu den Lappeneinschnitten 1. Ordnung eingewandert. Das Cytoplasma ist portioniert und zeigt „Plasmazungen" und „Plasmatentakeln", die vom Kern in Richtung Chloroplast verlaufen.
Inko; Behandlung: $5 \times 10^{-4}$ mol CIPC; Aufn.-Freq. 6 B/min

*Anomale Verankerung am Chloroplasten*
*CIPC-Lösung ($5 \times 10^{-4}$ mol)*
*6 B/min*

9. Der Chloroplast ist nicht vollständig in die neue Halbzelle eingewandert, sondern „hängt" an den Seitenlappeneinschnitten 1. Ordnung, wo er im peripheren Protoplasma verankert ist. Der Zellkern liegt median am Chloroplasten verankert.
Inko; Behandlung: $5 \times 10^{-4}$ mol CIPC; Aufn.-Freq. 6 B/min

*Reorientierung, Rückwanderung und normale Verankerung*
*CIPC-Lösung ($5 \times 10^{-4}$ mol)*
*Rückführung in Nährlösung*
*3 B/min*

10. Die letzte Aufnahme des Films zeigt den Zellkern teilweise verdeckt vom Chloroplasten, oberhalb des Isthmus liegend. Der Chloroplast ist nur bis zu den Seitenlappeneinschnitten 1. Ordnung eingewandert. Der Zellkern wandert bei diesen Zellen, die mit CIPC behandelt und danach in Nährlösung übertragen wurden, langsam in Richtung Isthmus zurück (Rückwanderung). Er ist nach einiger Zeit im Isthmus zwar noch immer vom Chloroplasten überdeckt, aber bereits als helle „Scheibe" sichtbar. Durch allmähliches Verschwinden der Chloroplastensubstanz wird der Zellkern immer deutlicher sichtbar. Dort bleibt er schließlich liegen (normale Verankerung) (Abb. 2c—d).
Inko; Behandlung: zuerst $5 \times 10^{-4}$ mol CIPC, danach Rückführung in Nährlösung; Aufn.-Freq. 6 B/min und 3 B/min

**Literatur und Filmveröffentlichungen**


[1] KIERMAYER, O.: Untersuchungen über die Morphogenese und Zellwandbildung bei Micrasterias denticulata Bréb. Protoplasma **59** (1964), 79—132.

[2] KIERMAYER, O.: The Distribution of Microtubules in Differentiating Cells of Micrasterias denticulata Bréb. Planta **83** (1968a), 223—236.

[3] KIERMAYER, O.: Hemmung der Kern- und Chloroplastenmigration durch Colchizin. Naturwiss. **55** (1968b), 299—300.

[4] KIERMAYER, O.: Microtubuli um den Posttelophase-Kern von Micrasterias und ihre mögliche Funktion. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **81** (1968), 319.

[5] KIERMAYER, O.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Cytomorphogenese von Micrasterias denticulata Bréb. I. Allgemeiner Überblick. Protoplasma **69** (1970), 97—132.

[6] KIERMAYER, O.: Beeinflussung der postmitotischen Kernmigration von Micrasterias denticulata Bréb. durch das Herbizid Trifluralin. Protoplasma **75** (1972), 421—426.
[7] KIERMAYER, O., and P. K. HEPLER: Hemmung der Kernmigration bei Jochalgen (Micrasterias) durch Isopropyl-N-phenylcarbamat. Naturwiss. **57** (1970), 252.
[8] WARIS, H.: Cytophysiological studies on Micrasterias. I. Nuclear and cell division. Physiol. Plantarum **3** (1950), 1—16.

[9] KIERMAYER, O.: Micrasterias denticulata (Desmidiaceae) — Morphogenese. Film E 868 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1965.
[10] KIERMAYER, O.: Differenzierung und Wachstum von Micrasterias denticulata (Conjugatae). Film C 924 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1966.
[11] KIERMAYER, O.: Micrasterias denticulata (Desmidiaceae) — Formbildung des Chloroplasten (in Vorbereitung).

## Angaben zum Film

Der Film wurde 1973 aus Forschungsaufnahmen zur Veröffentlichung der Ergebnisse zusammengestellt. Stummfilm, 16 mm, schwarzweiß, 85 m, 8 min (Vorführgeschw. 24 B/s).
Die Aufnahmen entstanden im Jahre 1971. Veröffentlichung aus dem Institut für Entwicklungsphysiologie der Universität Köln, Prof. Dr. O. KIERMAYER, SYBILLE BEISENHERZ, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. K.-H. GALLE; Aufnahme und Schnitt: C. LUDWIG.

## Inhalt des Films

Der Film zeigt die während des Zellwachstums von *Micrasterias denticulata* Breb. vor sich gehende Kernmigration sowie deren Beeinflussung durch Chlor-isopropyl-N-phenylcarbamat (CIPC), eine auf cytoplasmatische Microtubuli desorganisierend wirkende Substanz. In Zeitrafferaufnahmen wird gezeigt, wie der Zellkern unter dem Einfluß von CIPC seine normale Orientierungs- und Verankerungsfähigkeit verliert, von der Plasmaströmung dadurch in rotierende und pendelnde Bewegung versetzt wird und sich schließlich anomal im peripheren Protoplasma oder am Chloroplasten verankert. Bei Rückführung behandelter Zellen in Nährlösung oder in sehr schwachen CIPC-Konzentrationen erlangt der Zellkern seine normale Orientierungs- und Verankerungsfähigkeit wieder zurück.

## Summary of the Film

The film shows the cell growth of *Micrasterias denticulata* Breb. and how the nucleus migration takes place, as well as the influence on them of Chlor-isopropyl-N-phenylcarbamat (CIPC), a substance which has a disorganising affect on cytoplasmatic Microtubuli.

In quick motion apparatus exposures is shown, how the cell nucleus under the influence of CIPC loses its normal orientating and anchoring abilities. Because of this the nucleus is set into rotating and pendulating motion by the plasma stream and finally anchors itself abnormally in the peripherial protoplasma or on the chloroplast. By reintroduction of treated cells in nutrient solution or in very weak CIPC concentration the cell nucleus receives its normal orientating and anchoring abilities once again.

## Résumé du Film

Le film montre la migration du noyau qui survient au cours de la croissance de la cellule du *Micrasterias denticulata* Breb., ainsi que l'influence exercée sur elle par le Chlor-isopropyl-N-phénylcarbamate (CIPC), substance qui a pour effet de désorganiser les microtubes cytoplasmiques. On voit dans des prises de vues en accéléré le noyau de la cellule perdre sa faculté normale d'orientation et de fixation sous l'effet du CIPC, être déplacé en un mouvement de rotation et d'oscillation par le flot de plasma et se fixer enfin d'une manière anormale dans le protoplasme périphérique ou sur le chloroplaste. Si l'on replace les cellules traitées dans une solution nutritive ou de très faibles concentrations de CIPC, le noyau de la cellule recouvre sa faculté normale d'orientation et de fixation.