Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

Aus der zoologischen Abteilung (Prof. Dr. E. Bresslau) des Georg-Speyerhauses, Frankfurt a. M. (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. W. Kolle).

Die Kerne der Trypanosomen und ihr Verhalten zur Nuclealreaktion.

Von

Ernst Bresslau (Frankfurt a. M.) und **Luigi Scremin** (Padua).

(Hierzu Tafel 21.)

Vor einiger Zeit hat Feulgen in einer kurzen Mitteilung [1]) eine neue Methode zum Nachweis der Zellkerne beschrieben, die er Nuclealreaktion genannt hat. Der Reaktion liegt die von ihm gefundene Tatsache zugrunde, daß bei Abspaltung der Purinkörper durch milde saure Hydrolyse aus dem Molekül der Thymonucleinsäure, infolge der besonderen Beschaffenheit der Kohlehydratkomponente [2]) der letzteren, reduzierende Gruppen frei werden, die mit fuchsinschwefliger Säure die durch Auftreten einer intensiven Violettfärbung ausgezeichnete Schiff'sche Aldehydreaktion geben. Wie Feulgen ferner feststellte, werden, wenn man Präparate tierischer Zellen nur kurze Zeit in auf 60° erwärmter Normalsalzsäure hydrolysiert, die Purinkörper aus der stets Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure enthaltenden chromatischen Substanz der Kerne

---

[1]) R. Feulgen, Neue Wege zum biologisch-histologischen Studium der Zellkerne. a) Die Nuclealfärbung, ein mikrochemischer Nachweis der Thymonucleinsäure, b) über das Vorkommen von nuclealem und anuclealem Chromatin. Ber. ges. Physiol. 22, 1924 S. 489.

[2]) Vergl. R. Feulgen, Zeitschr. physiol. Chem. **92**, 1914 S. 157 u. **100**, 1917 S. 241.

abgespalten, ohne daß sich dabei die Kerne als morphologische Gebilde auflösen. Auch bleiben die freigewordenen Aldehydgruppen dabei in situ und lassen sich selbst durch langes Wässern nicht entfernen. Nachfolgende Behandlung der Präparate mit fuchsinschwefliger Säure liefert daher eine Kernfärbung von größter Elektivität (Nuclealfärbung). Im Gegensatz zu der Thymonucleinsäure und ihren Verwandten geben die pentosehaltigen Nucleinsäuren (z. B. Hefenucleinsäure) diese Reaktion nicht, weil ihr Kohlehydrat ein Zucker ist, der bei saurer Hydrolyse in seiner tautomeren Cykloform reagiert und keine Aldehydgruppen frei werden läßt.

Nach Feulgen sollen die Kerne sämtlicher tierischer Zellen und auch die Kerne der höheren Pflanzen die Nuclealfärbung geben, nicht dagegen Bakterien und Hefen. Außerdem gibt Feulgen an, daß er auch bei *Trypanosoma equiperdum* keine Nuclealfärbung erhalten konnte, was ihn vermuten läßt, daß die Trypanosomen „biochemisch vielleicht den Bakterien näher stehen als den Ciliaten".

Diese Angabe veranlaßte uns das Verhalten der Trypanosomen gegenüber der Nuclealreaktion einer Nachprüfung zu unterziehen. Als Versuchsmaterial dienten *Trypanosoma lewisi, equinum, equiperdum* und verschiedene Stämme von *brucei*. Die Technik war folgende: Die Blutausstriche auf Objektträgern wurden teils trocken, teils feucht 5—10 Minuten lang in Methyl- oder Sublimatalkohol fixiert, nach kurzem Wässern bzw. dem üblichen Auswaschen in Jodalkohol und Na-Thiosulfat für kurze Zeit, gewöhnlich für 4—7 Minuten, zur Hydrolyse in im Wasserbad auf 60° erwärmte Normalsalzsäurelösung gebracht und dann nach raschem Abspülen in destilliertem Wasser sofort in fuchsinschweflige Säure [1]) übergeführt. In dieser wurden sie 2 bis 20 Stunden belassen. Zum Schluß wurden die Präparate nach kurzem, aber gründlichem Waschen in fließendem Wasserleitungswasser [2]) entweder gleich getrocknet bzw. bei Feuchtfixierung über

---

[1]) Herstellung der fuchsinschwefligen Säure: man gebe zu 500 ccm wäßriger 0,1 proz. Fuchsinlösung 10 ccm 30 proz. Na-Bisulfitlösung, lasse 1 Stunde stehen und füge dann 5 ccm reine konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1,12) hinzu. Die nach kurzer Zeit farblos bis schwach gelblich werdende Lösung ist in gut verschlossener Flasche aufzubewahren (nach E. Schmidt, Pharmac. Chemie II, Org. Chem. S. 344 1922).

[2]) Wenn man die Präparate statt in fließendem Wasser in einem Gefäß mit Wasser auswäscht, wird man bemerken, daß sich die an dem Objektträger haftende geringe Menge fuchsinschwefliger Säure im Überschuß von Wasser in Fuchsin zurückverwandelt und ersteres rot färbt. Ein Einwand gegen die Nuclealreaktion — etwa im Sinne ihrer Deutung als einfache Fuchsinfärbung — läßt sich daraus

Alkohol und Xylol in Balsam eingeschlossen oder vorher noch kurz mit stark verdünnter Eosinlösung gefärbt. Die schwache Gegenfärbung des Plasmas ist deshalb empfehlenswert, weil selbst bei größeren Ciliaten die Protoplasmaleiber nach Aufhellung der Präparate in Cedernholzöl oder Canadabalsam kaum sichtbar sind, da sich die Nuclealfärbung ausschließlich auf die Kerne beschränkt.

Schon in Präparaten, die nur 2 Stunden mit fuchsinschwefliger Säure behandelt wurden, erkennt man zumeist, daß die Kerne der Trypanosomen schwach gefärbt sind, viel schwächer als die Kerne der Leucocyten, aber doch im gleichen violetten Farbenton. Nach der Hydrolyse in HCl nur mit Eosin gefärbte Kontrollpräparate zeigen diese Kernfärbung nicht, ebensowenig Präparate, die ohne vorherige Hydrolyse direkt in fuchsinschweflige Säure eingestellt wurden.

Läßt man die hydrolysierten Präparate länger in der fuchsinschwefligen Säure, so wird die Violettfärbung der Trypanosomenkerne allmählich deutlicher, wenn auch nie ganz so stark wie die Färbung der Kerne der weißen Blutkörperchen (Taf. 21 Fig. 1). Nach etwa 6—10stündigem Verweilen in der fuchsinschwefligen Säure scheint die Nuclealreaktion an den Kernen im wesentlichen beendet zu sein, wenigstens ergab noch längerer Aufenthalt der Präparate in der Säure keine nennenswerte Verstärkung der Färbung. Auch durch Variieren der Hydrolysedauer ließ sich die Färbung nicht weiter verbessern. Hydrolysiert man kürzer als 2 Minuten oder länger als 10—15 Minuten, so gelingt im Gegenteil die Reaktion noch nicht bzw. nicht mehr. Für die Leucocyten bildet die von Feulgen empfohlene Zeit von 4 Minuten entschieden das Optimum, für die Trypanosomen liegt das Optimum etwa bei 6—7 Minuten.

Nach diesen klaren, positiven Befunden, die bei allen 4 Trypanosomenarten übereinstimmend erhalten wurden, kann von einem Versagen der Nuclealreaktion bei Trypanosomen nicht

---

jedoch nicht ableiten. 1. erhält man, wenn man die Präparate nach der Hydrolyse statt in fuchsinschweflige Säure in eine durch Zersetzung von fuchsinchwefliger Säure in Wasser erhaltene rote Farblösung einstellt, keine der Nuclealfärbung entsprechende elektive Violettfärbung der Kerne, sondern eine diffuse Rotfärbung von Plasma und Kernen, die sich in mit Na-Bisulfit angesäuertem Wasser wieder auswaschen läßt, 2. kann man sich durch Untersuchung von Präparaten, die man aus der fuchsinschwefligen Säure direkt unter das Mikroskop bringt, ohne sie vorher ausgewaschen zu haben, überzeugen, daß hier bereits die Nuclealreaktion stattgefunden hat. — Durch Auswaschen der Präparate in fließendem Wasser, wie oben angegeben, oder in mit Na-Bisulfit angesäuertem Wasser wird jener Einwand natürlich von vornherein ausgeschaltet.

die Rede sein, ein Ergebnis, das wir von vornherein nicht anders erwartet hatten. Selbstverständlich fällt damit auch Feulgen's Vermutung über die biochemischen Beziehungen der Trypanosomen zu den Bakterien. Warum seine Färbungsversuche mißlangen, läßt sich ohne nähere Kenntnis des von ihm dabei verwandten Trypanosomenstammes und der Behandlung der Ausstriche nicht sagen. Vielleicht hängt der Mißerfolg mit einer zu kurzen Hydrolysierung der Präparate zusammen, da die Aufschließung der Trypanosomenkerne, wie schon angedeutet, etwas längere Zeit in Anspruch nimmt als die der Leucocyten. So kommt es z. B. vor, daß in Trockenpräparaten selbst nach 4 Minuten langer Hydrolyse die Nuclealreaktion nur an den Kernen der weißen Blutkörperchen, nicht dagegen an den Trypanosomenkernen gelingt, während sie in Parallelpräparaten, die 6 oder 7 Minuten lang hydrolysiert waren, auch an letzteren positiv ausfällt.

Die Betrachtung unserer Präparate lieferte noch einige weitere Befunde, die für die Cytologie der Trypanosomen von Bedeutung sind.

Zunächst ist hervorzuheben, daß in ruhenden Kernen der vier Trypanosomenarten der innere Kernraum, der dem Caryosom entspricht, stets ungefärbt bleibt, wie die auf Fig. 1—3 Taf. 21 erkennen lassen. Um diese helle Binnenkörperzone findet sich eine in Feuchtpräparaten vorwiegend mehr homogen, in Trockenpräparaten häufig aus einzelnen Körnchen zusammengesetzt erscheinende, violett gefärbte Randschicht, der Außenkern der Autoren, so daß also dieser das gesamte durch die Nuclealreaktion darstellbare Chromatin (nucleales Chromatin Feulgen) enthält. Ein besonders ausgezeichneter „Randkörper", wie ihn Kühn und v. Schuckmann [1]) in der Außenkernschicht mit Giemsa-Färbung darstellen konnten, trat in unseren Präparaten nicht hervor. Färbt man Kontrollpräparate nach der Hydrolyse, statt mit fuchsinschwefliger Säure, mit Giemsa-Lösung, so werden ebenfalls nur noch die Außenkerne dargestellt, die Binnenkörper bleiben dagegen hell, nehmen jedenfalls nicht den für sie charakteristischen blauen Ton an. Die Hydrolyse ändert also möglicherweise die chemische Beschaffenheit der Binnenkörper, löst vielleicht sogar einen Teil ihrer Substanz auf. Auch in Teilung begriffene Kerne zeigen, daß es stets nur der Außenkernanteil ist, der die für die Nuclealreaktion charakteristische Violettfärbung liefert.

---

[1]) Zool. Jahrb. Suppl. 15, 1912 S. 329.

Sodann ist das Verhalten der Blepharoplasten bemerkenswert. Bei *Tr. lewisi* und *equiperdum* (Fig. 2) wird durch die Nuclealreaktion auch der Blepharoplast stets ebenso rasch — oft sogar noch rascher — und ebenso stark violett gefärbt wie der Außenkern und zwar in seiner typischen Gestalt und Größe, was sich besonders bei *Tr. lewisi* gut feststellen läßt, wo er zumeist die charakteristische Form eines quer zur Längsachse des Flagellaten gestellten Stäbchens besitzt. In Vielteilungsstadien von *Tr. lewisi* wurden aber auch deutlich kernähnliche Blepharoplasten mit hellem Binnenkörper und violetter Außenzone gefunden (Fig. 3), was mit Rücksicht auf die viel umstrittenen Angaben Rosenbusch's[1]) besondere Beachtung verdient.

Ganz anders als diese beiden Arten verhält sich dagegen *Tr. equinum*. Hier bringt die Nuclealreaktion keine Blepharoplasten zur Darstellung, in gutem Einklang mit der Tatsache, daß diese Bildungen auch bei Giemsa-Färbung hier nicht in Erscheinung treten. Es bedarf also wohl erneuter Nachprüfung, ob die von Rosenbusch bei *Tr. equinum* mit Eisenhämatoxylin gefärbten und als Blepharoplasten gedeuteten Gebilde wirklich als solche anzusprechen sind.

Eine Mittelstellung nimmt *Tr. brucei* ein. Hier spielt sich die Nuclealreaktion, wie es scheint, zunächst nur an den Kernen ab. Der Blepharoplast wird, besonders in Trockenpräparaten, anfangs nicht gefärbt und erscheint erst nach längerer Einwirkung der fuchsinschwefligen Säure schwach violett angedeutet (Fig. 1). So scharf und deutlich wie bei *Tr. equiperdum* und *lewisi* konnten wir ihn nie erhalten. Hieran ist nicht etwa die Hydrolyse schuld, derart daß sie die Blepharoplasten zur Auflösung brächte. Denn mit Giemsa gefärbte Kontrollpräparate, die vorher genau ebensolange in Normalsalzsäure von 60° hydrolysiert waren, wie die danach mit fuchsinschwefliger Säure behandelten Präparate, zeigten den Blepharoplasten stets ebensogut gefärbt, wie die vorher nicht hydrolysierten Präparate. Nach Ausweis der Nuclealreaktion scheint also bei *Tr. brucei* zwischen dem nuclealen Chromatin des Außenkerns und den Blepharoplasten ein Unterschied zu bestehen, der mit Giemsa-Färbung nicht nachweisbar und bei *Tr. lewisi* und *equiperdum* nicht vorhanden ist. Möglicherweise wird sich dieser Befund zu differentialdiagnostischen Zwecken verwerten lassen. Bei dem in unserem Institut gezüchteten blepharoplastlosen *brucei*-Stamm ergab auch die Nuclealreaktion, wie selbstverständlich, keine Blepharoplasten.

---

[1]) Arch. f. Protistenk. **15**, 1909 S. 263.

Die geschilderten Befunde berechtigen, wie wir glauben, zu einigen Schlüssen auf die noch immer umstrittene Kernkonstitution der Trypanosomen.

Zunächst liefern sie u. E. zum ersten Male einen wirklichen Beweis für den Aufbau der Blepharoplasten aus Kernsubstanz. Zwar haben bisher schon zahlreiche Forscher diesen Gebilden Kernnatur zugeschrieben. Immer aber blieb zu bedenken, daß keine der Färbungsmethoden, mit denen bisher die Blepharoplasten zur Darstellung gebracht wurden, ein wirklich spezifisches Reagens auf Kernsubstanz — oder richtiger gesagt — auf eine der verschiedenen Kernsubstanzen, insbesondere auf „Chromatin" bildet. Dieser Mangel darf jetzt als behoben gelten, nachdem durch die Nuclealreaktion der Nachweis erbracht ist, daß die Blepharoplasten Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure enthalten, wie sie das nucleale Chromatin der Kerne charakterisiert.

Ebenso bedeutsam ist wohl das Zeugnis der Nuclealreaktion für die Beurteilung der beiden Kernbestandteile: Außenkern und Caryosom. Hier stehen sich zwei Auffassungen gegenüber, von denen die eine, hauptsächlich von Kühn und v. Schuckmann vertretene, in dem Außenkern die bei der Teilung den Chromosomen der Metazoenkerne entsprechende Chromatinkomponente, in dem Caryosom dagegen die achromatische, den Teilungsapparat liefernde Komponente lokalisiert, während die andere, hauptsächlich von Hartmann und seiner Schule vertretene Auffassung bei den Trypanosomen beide Komponenten im Caryosom enthalten sein läßt. In dem Widerstreit dieser beiden Anschaungen scheint uns jetzt die Nuclealreaktion, soweit die vier untersuchten Trypanosomenarten in Frage kommen, klar und eindeutig zugunsten der ersteren zu entscheiden. Nur der Außenkern verhält sich bei ihnen chemisch so wie die chromatische Substanz anderer Protozoen- und der Metazoenkerne, was wir auf Grund von Vergleichspräparaten, die wir uns von solchen nach der Feulgen'schen Methode herstellten, behaupten dürfen. Die Annahme, daß das Caryosom den Chromatinanteil enthält, läßt sich danach nicht mehr allgemein für die Trypanosomen aufrechterhalten.

Näher auf diese und andere Probleme der Trypanosomencytologie einzugehen, müssen wir uns versagen, da die hier mitgeteilten Untersuchungen ursprünglich gar nicht in der Absicht unternommen wurden, morphologische Kernstudien anzustellen. Bei der Bearbeitung solcher Fragen wird in Zukunft die von Feulgen angegebene Nuclealreaktion ein wertvolles Hilfsmittel bilden.

Zusatz bei der Korrektur: Erst nachträglich kommt uns eine inzwischen erschienene Arbeit von FRIEDA FEULGEN-BRAUNS (Untersuchungen über die Nuclealfärbung, PFLÜGERS Arch. **203**, 1924, S. 415) zu Gesicht, die die kurz gehaltenen Mitteilungen von FEULGEN, die unsere Untersuchung veranlaßten, in willkommener Weise ergänzt. Mit der Nuclealreaktion bei Trypanosomen beschäftigt sich F. FEULGEN-BRAUNS nicht, so daß der Gegenstand unserer Untersuchungen dadurch nicht berührt wird. Auf die Ergebnisse der Verf., die hinsichtlich des Optimums der Hydrolysedauer und der Einwirkungsdauer der fuchsinschwefligen Säure im allgemeinen mit unseren Erfahrungen übereinstimmen, braucht daher hier nicht eingegangen zu werden. Methodologisch bemerkenswert ist, daß für die Herstellung der fuchsinschwefligen Säure eine andere Vorschrift angegeben wird, als wir sie dem Handbuch von SCHMIDT entnommen haben. Der Unterschied besteht im wesentlichen darin, daß das von FEULGEN verwandte Reagens an Fuchsin konzentrierter (0,5 Proz. Fuchsin) ist, als das unsrige, das von einer nur 0,1 proz. Fuchsinlösung ausgeht.

Tafelerklärung.

Tafel 21.

Fig. 1. *Trypanosoma brucei.* Trockenausstrich, Methylalkoholfixierung, Nuclealfärbung, Nachfärbung mit Eosin. Zwischen den das weiße Blutkörperchen umgebenden Erythrocyten 4 Trypanosomen. Ihre Außenkerne dunkel, die Binnenkörper hell, Blepharoplasten nur ganz schwach erkennbar. Phot. 1500 ×.

Fig. 2. *Trypanosoma equiperdum.* Feuchtfixierung: Sublimatalkohol. Nur Nuclealfärbung, keine Nachfärbung mit Eosin. Flagellat in Teilung. Die beiden Blepharoplasten ebenso stark gefärbt wie die Außenkerne. Die Binnenkörper völlig ungefärbt. Phot. 3000 ×.

Fig. 3. *Trypanosoma lewisi.* Feuchtfixierung: Sublimatalkohol. Nuclealfärbung, Nachfärbung mit Eosin. Dreiteilungsstadium. Die Blepharoplasten zeigen das Aussehen kleiner Kerne mit violett gefärbter Außenzone und hellem Binnenkörper. Zeichnung auf der Grundlage eines Photogramms. 3000 ×.

Die Mikrophotogramme wurden von dem wiss. Photographen des Georg Speyerhauses, Herrn MAAS, aufgenommen.

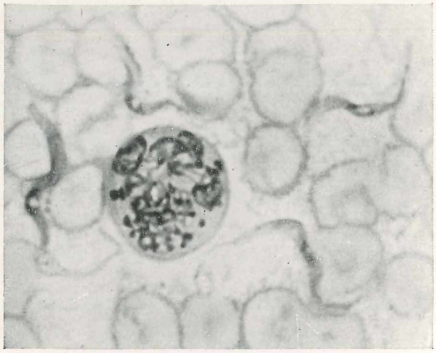

Fig. 1.

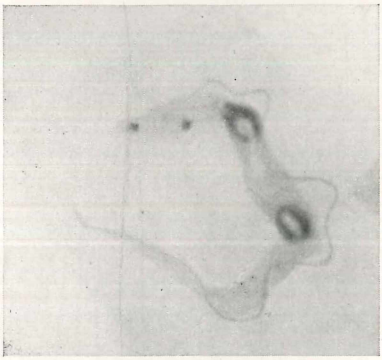

Fig. 2.

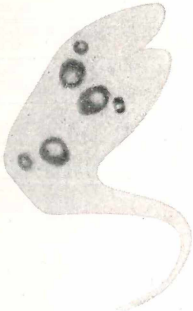

Fig. 3.

Bresslau u. Scremin.

Verlag von Gustav Fischer in Jena

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Archiv für Protistenkunde

Jahr/Year: 1924

Band/Volume: 48_1924

Autor(en)/Author(s): Bresslau Ernst, Scremin Luigi

Artikel/Article: Die Kerne der Trypanosomen und ihr Verhalten zur Nuclealreaktion 509-515