BAYERISCHE AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN
MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE KLASSE

SITZUNGSBERICHTE

JAHRGANG
1972

MÜNCHEN 1973

VERLAG DER BAYERISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN
In Komission bei der C. H. Beck'schen Verlagsbuchhandlung München

Das Puffmuster der Riesenchromosomen in den larvalen Speicheldrüsen von *Drosophila virilis*: seine Veränderungen in der Normalentwicklung und nach Injektion von Ecdyson*

Von Horst Kress

Zoologisches Institut der Universität München

A. Einleitung

In den Riesenchromosomen der larvalen Speicheldrüsen von Dipteren sind genetisch aktive Chromosomenorte als „Puffs" zu identifizieren. Dieser Umstand erlaubt es, Veränderungen der genetischen Aktivität im Laufe der Entwicklung zu beobachten und diese in eine zeitliche Korrelation zu bestimmten entwicklungsphysiologischen Vorgängen zu bringen.

Die erste eingehende Untersuchung in dieser Richtung wurde von Becker bei *Drosophila melanogaster* durchgeführt [1]. Er konnte nachweisen, daß wenige Stunden vor der Puppariumbildung drastische Änderungen des Puffmusters auftreten. Aus diesem Grunde bezeichnete er diesen Zeitraum als „puffing-Periode". Weiterhin erhielt er Hinweise dafür, daß diese Veränderungen mit der im gleichen Zeitraum stattfindenden Ausschüttung des Häutungshormons Ecdyson in Zusammenhang stehen [2]. Spätere Untersuchungen an derselben und an anderen Dipterenarten führten zu gleichartigen Ergebnissen. Sie sind in einem zusammenfassenden Artikel von M. Ashburner ausführlich diskutiert [3].

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden an Larven von *Drosophila virilis* vorgenommen. Mit Hilfe der Methylgrün-Pyronin-Färbung wurde das Puffmuster und seine Veränderungen in den letzten 11 Stunden vor der Puppariumbildung analysiert. Außerdem wurden die Veränderun-

* Herrn Prof. Dr. H. J. Becker danke ich für die Anregung zu den Untersuchungen sowie für sein ständiges Interesse.

gen der Puffaktivität nach Injektion von Ecdyson in die larvale Hämolymphe registriert.

B. Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an weiblichen Larven eines *D. virilis*-Wildstammes aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, durchgeführt. Die Tiere wurden in Kulturgläsern in einem Nährmedium aus Maisgrieß, Rübensirup, Agar, getrockneter Bierhefe und Wasser gehalten. In jedes Zuchtgefäß wurden 250 Eier eingezählt, die im Zeitraum zwischen 19 und 21 Uhr abgelegt worden waren. Die Aufzucht der aus den Eiern geschlüpften Larven erfolgte im Thermostaten bei 25,3°C und 60–70% Luftfeuchtigkeit. Für die Untersuchungen wurden Larven verwendet, die im Zeitraum von zwei Stunden das Futter verlassen hatten. Der Mittelwert dieses Zeitintervalls galt als Zeitpunkt Null. Bei derartig gewonnenen Larven trat die Puppariumbildung 11,2 ± 1,9 h nach dem Verlassen des Futters (n. d. V.) ein [4]. Im Vergleich zur gesamten Entwicklungsdauer, die unter den gegebenen Bedingungen bis zur Puppariumbildung rund 150 Stunden dauerte, war die beobachtete Altersstreuung sehr gering.

Für die Identifizierung der aktiven Chromosomenabschnitte erschien die Färbung mit Methylgrün-Pyronin am geeignetsten. Unter bestimmten Bedingungen ermöglicht diese Methode eine differentielle Färbung von RNA- und DNA-haltigen Strukturen u. a. auch in Riesenchromosomen [5–7], und somit eine Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Chromosomenabschnitten.

Die Speicheldrüsen wurden in einer 7,2%igen Saccharoselösung freipräpariert. Nach 5minütigem Fixieren in einem Gemisch von 55%iger Essigsäure und 96%igem Äthanol (1:3) wurden die Drüsen in einem Tropfen 45%iger Essigsäure unter einem Deckglas gequetscht. Das Absprengen des Deckglases erfolgte nach dem Gefrieren des Objektträgers in einem Gemisch aus CO_2-Schnee und Methanol. Sofort nach dem Absprengen wurde der noch kalte Objektträger in 100%igen Isopropanol überführt, von dort über eine Alkoholreihe in Wasser und daran anschließend in die Farblösung gebracht. Nach 2–3stündigem Färben bei Zim-

mertemperatur wurde das Präparat bei 30°C in t-Butanol gespült und in Euparal eingedeckt.

Für das Farbstoffgemisch wurden Methylgrün der Firma Merck, Darmstadt, und Pyronin GS der Chroma-Gesellschaft, Stuttgart, verwendet. Nach dem Ansatz der 2%igen wäßrigen Lösungen mußten diese mit Chloroform gewaschen werden. Die endgültige Farblösung wurde jeweils erst kurz vor Gebrauch hergestellt. Dazu wurden 3,2 ml Pyroninlösung, 1,8 ml Methylgrünlösung, 25 ml McIlvaine-Puffer, pH 5,8 und 20 ml H_2O dest. miteinander gemischt.

Bei der Auswertung der Präparate wurden die verschiedenen Aktivitätsgrade der Banden klassifiziert. Nach den Untersuchungen von Pelling [8] kann man die Größe eines Puffs als relatives Maß für seinen RNA-Gehalt betrachten. Es wurden deshalb zur Abschätzung der relativen Puffaktivitäten die einzelnen Klassen jeweils durch einen Aktivitätsindex charakterisiert. Jeder Puffaktivität wurde eine bestimmte Anzahl von Aktivitätseinheiten (AE) zugeordnet:

Klasse (Anzahl AE)	Charakterisierung
0	Querscheibe blau gefärbt
1	Qu. violett gefärbt
2	Qu. violett gefärbt, diffus
3	Qu. violett-rot gefärbt
4	Qu. violett-rot gefärbt, diffus
5	Qu. rot gefärbt
6	Qu. rot gefärbt, diffus
7	Qu. violett-rot gefärbt, stark diffus
8	Qu. rot gefärbt, stark diffus
9	Qu. rot gefärbt, beginnende Puffbildung
10	Qu. violett-rot gefärbt, großer Puff
11	Region rot gefärbt, mittelgroßer Puff
12	Region rot gefärbt, großer Puff
13	Region rot gefärbt, sehr großer Puff

Diese Betrachtungsweise läßt zwar keine Schlüsse auf die wirkliche Aktivität der Puffs zu, ermöglicht aber dennoch gewisse Aussagen über die Veränderungen ihrer Aktivität im Laufe der

Entwicklung. Für die exakte Klassifizierung wurde neben der Betrachtung im normalen Durchlicht die unterschiedliche Transmission aktiver Banden im Rotlicht (645 nm) und im Grünlicht (510 nm) zu Hilfe genommen. Die oben definierten Klassen tragen sowohl dem Verhältnis von Rot- und Blaufärbung innerhalb einer aktiven Bande als auch deren morphologischer Ausdehnung Rechnung. In Tafel I, Abb. 1 sind für einige der 14 Aktivitätsklassen Beispiele als solche angegeben.

Für die exakte Lokalisierung der aktiven Querbanden wurde eine Chromosomenkarte angefertigt. Als Arbeitsmaterial dienten Phasenkontrastphotographien von Chromosomen in ungefärbten Quetschpräparaten. Die Drüsen stammten von Larven, die zwei Stunden vor der Präparation das Futter verlassen hatten. Die Grenzen der Chromosomenabschnitte (Zahlen) und -unterabschnitte (Buchstaben) wurden mit geringfügigen Änderungen aus der Karte von Hughes [9] übernommen.

Für die Dosierung der in den Injektionsexperimenten verwendeten Lösungen wurde eine 10 µl-Hamilton-Mikrolitherspritze mit Dosiervorrichtung verwendet. Der am Kanülenende austretende Flüssigkeitstropfen von 0,2 µl Volumen wurde in die Injektionskanüle, die über einen mit Paraffinöl gefüllten PVC-Schlauch mit einem Vortrieb verbunden war, eingesaugt. Die Injektion erfolgte durch den After in die Hämolymphe der Larve. Die für die Injektion verwendeten Glaskanülen besaßen an der Spitze einen Durchmesser von 30 µ und waren schräg abgebrochen. Nach der Injektion wurde jede Larve in einem 1 ml-Zentrifugenröhrchen, dessen Öffnung mit einem feuchten Wattebausch verschlossen war, bis zum Zeitpunkt der Präparation der Speicheldrüsen im Thermostaten bei 25,3°C aufbewahrt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Speicheldrüsen in der oben geschilderten Weise präpariert und gefärbt.

Es wurden folgende Lösungen injiziert:

Kontrollösung: 0,2 µl H_2O dest.;

Testlösung: 0,1 µg synthetisches alpha-Ecdyson, gelöst in 0,2 µl H_2O dest.

Das verwendete Ecdyson war ein Geschenk von Dr. P. Hocks, Schering AG, Berlin.

C. Ergebnisse

1. *Das Puffmuster und seine Veränderungen in der Normalentwicklung.*

Für die Erstellung des gesamten Puffmusters standen Quetschpräparate von 29 Speicheldrüsenpaaren zur Verfügung. Die Stichproben wurden im Zeitraum von 1–10 h n. d. V. gemacht, wobei die Präparation der Drüsen von 15 min vor bis 15 min nach einem vorgegebenen Zeitpunkt durchgeführt wurde. Für die zeitliche Festlegung der Puffmusterveränderungen wurden 93 weitere Präparate verwertet, in denen die Analyse der Chromosomen auf bestimmte Loci beschränkt geblieben war, deren Aktivitätszustand als zeitliche Markierung für verschiedene Phasen der puffing-Periode diente. Das vollständige Puffmuster und seine Veränderungen im Laufe der ersten zehn Stunden nach dem Verlassen des Futters ist in den Tafeln II–VI, a wiedergegeben.

Insgesamt konnten im Zeitraum zwischen 1 h n. d. V. und der Puppariumbildung (11,2 h n. d. V.) 348 aktive Banden registriert werden, von denen in diesem Zeitintervall 319 (= 92%) ihre Aktivität veränderten. Die aktiven Banden lassen sich in fünf verschiedene Gruppen einordnen (Tab. 1). Summiert man innerhalb

Tabelle 1

Einordnung der aktiven Banden in verschiedene Gruppen.
Spalte A: Anzahl in Prozenten (100% = 348).
Spalten B und C: Die Gesamtaktivität der Puffs einer Gruppe in Prozenten der Gesamtaktivität des Genoms:
B: 1–5 h n. d. V. (100% = 562 AE);
C: 10–11,2 h n. d. V. (100% = 635 AE).

Gruppe	Charakterisierung	A	B	C
1	Loci mit abnehmender Aktivität	36,6	62,1	0,2
2	Loci mit zunehmender Aktivität:			
	a) vor der Aktivitätszunahme bereits aktiv	4,9	5,7	16,0
	b) vor der Aktivitätszunahme nicht aktiv	23,9	0	56,0
3	Loci mit vorübergehender Aktivitätszunahme:			
	a) vor der Aktivitätszunahme bereits aktiv	6,2	11,9	4,4
	b) vor der Aktivitätszunahme nicht aktiv	13,8	0	2,8
4	Loci mit vorübergehender Aktivitätsabnahme	6,3	8,7	9,1
5	Loci mit konstanter Aktivität	8,3	11,6	11,5

jeder dieser Gruppen die Aktivitätseinheiten aller aktiven Banden in aufeinanderfolgenden Zeitabschnitten, so ergeben sich charakteristische Aktivitätsmuster (Fig. 1), die es erlauben, die puffing-Periode in drei Phasen aufzugliedern.

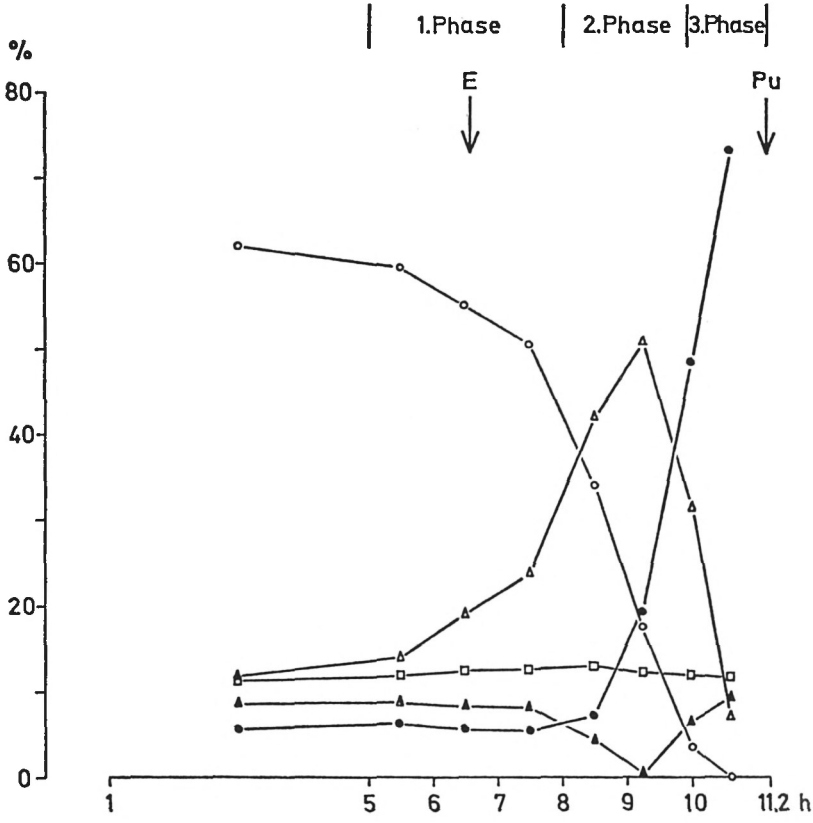


Fig. 1: Die zeitliche Beziehung zwischen den zu beobachtenden Änderungen der Aktivität in den Puffgruppen 1–5. Ordinate: Aktivität in Prozenten der jeweils vorhandenen Gesamtaktivität des Genoms; Abszisse: Stunden nach dem Verlassen des Futters; Loci der Gruppe 1 ○——○; 2 ●——●; 3 △——△; 4 ▲——▲; 5 □——□. *E* = Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung (s. S. 142); *Pu* = Zeitpunkt der Puppariumbildung (s. S. 130). Außerdem sind die Grenzen der ersten, zweiten und dritten Phase der puffing-Periode markiert.

In der *ersten Phase* der puffing-Periode überwiegt die Aktivität der Loci, die der Gruppe 1 angehören, d. h. derjenigen Loci, die

vor der Puppariumbildung inaktiv werden (Tafel I, Abb. 5). Der Beginn dieser Phase ist nicht genau festzulegen. Da jedoch im Zeitraum zwischen 5 und 6h n. d. V. drei Banden aktiv werden, die nur während der puffing-Periode aktiv sind (12B2, 29F6 und 68F3), wird der Beginn der ersten Phase auf 5h n. d. V. festgelegt.

In der *zweiten Phase*, die sich über einen Zeitraum von etwa zwei Stunden (8–10h n. d. V.) erstreckt, überwiegt die Aktivität der Loci mit vorübergehender Aktivitätszunahme (Gruppe 3; vgl. Tafel I, Abb. 2, Puffs 58C und 59A). Im gleichen Zeitraum weisen die Loci mit vorübergehender Aktivitätsabnahme (Gruppe 4) ein Aktivitätsminimum auf. Diese beiden Gruppen verhalten sich somit „spiegelbildlich".

In der *dritten Phase* schließlich, die ungefähr eine Stunde vor der Puppariumbildung beginnt, überwiegt die Aktivität der zur Gruppe 2 gehörenden Loci, d. h. der Loci mit Aktivitätszunahme. 78% dieser Aktivität sind auf Loci zurückzuführen, die erst 8h n. d. V. oder noch später aktiv werden (Tab. 1, Spalte C; vgl. auch Tafel I, Abb. 2, Puff 58F).

2. *Die Veränderungen des Puffmusters nach Injektion von Ecdyson.*

Die Injektionen wurden, wenn nicht anders angegeben, im Zeitraum von 1–2h n. d. V. durchgeführt. Die Präparation der Drüsen erfolgte entweder ½ oder 1h nach der Injektion. In die Kontrollarven wurde H_2O dest. injiziert.

Bereits eine halbe Stunde nach Injektion von Ecdyson wurden in sämtlichen Drüsen 67 der für die puffing-Periode charakteristischen Veränderungen beobachtet. Erfolgte die Präparation der Drüsen eine Stunde nach der Injektion, so wurden 72 derartige Veränderungen beobachtet. Insgesamt wurde nach Injektion von Ecdyson im Vergleich zu den Kontrollpräparaten an 83 verschiedenen Banden eine Veränderung der Puffaktivität festgestellt, wie sie auch in der Normalentwicklung während der puffing-Periode zu beobachten war (Tafeln II–VI, c; vgl. auch Tafel I, in Abb. 2 und 8 die Puffs 58C und 59A, in Abb. 5 und 6 den Puff 55E, in Abb. 3 und 4 den Puff 68F3).

Neben diesen „normalen" Veränderungen waren noch an 31 weiteren Banden Unterschiede zwischen den Kontroll- und den Testlarven zu verzeichnen

(Tab. 2). Diese durch die Injektion von Ecdyson induzierten Veränderungen waren in der Normalentwicklung nie beobachtet worden. Sie wurden daher als abnorm betrachtet und von den weiteren Betrachtungen ausgeschlossen.

Tabelle 2

Ecdyson-induzierte Veränderungen, die in der Normalentwicklung nicht beobachtet wurden. Die Einwirkungsdauer des Hormons betrug maximal 1 Std.

Verhalten in der Normalentwicklung	Aktivität nach Injektion von H_2O	Ecdyson	Anzahl	Hormoneffekt
konstant inaktiv	aktiv	inaktiv	3	stabilisiert
konstant inaktiv	inaktiv	aktiv	4	induziert
konstant aktiv	inaktiv	aktiv	4	stabilisiert
konstant aktiv	aktiv	inaktiv	2	reprimiert
inaktiv → aktiv	aktiv	inaktiv	3	stabilisiert
aktiv → inaktiv	aktiv	superaktiv	5	induziert
aktiv → inaktiv	inaktiv	aktiv	10	stabilisiert

D. Diskussion

In dem Zeitraum zwischen 1 h n. d. V. und der Puppariumbildung wurden insgesamt 348 aktive Querscheiben registriert. Vergleichbare Puffmusteranalysen bei anderen Drosophilaarten ergaben maximal 129 Puffs bei *D. melanogaster* [1, 10, 11, 12] und 148 Puffs bei *D. hydei* [13].

Der große Unterschied zwischen den Angaben für *D. virilis* und den beiden anderen Drosophilaarten ist ziemlich sicher auf methodische Ursachen zurückzuführen, da die zitierten Untersuchungen an Präparaten durchgeführt wurden, in denen aktive Banden nur an ihrer morphologischen Veränderung zu erkennen waren. Sehr viele aktive Banden sind jedoch morphologisch kaum verändert (s. u.), so daß sie auf diese Weise nicht erfaßt werden konnten.

Bei *Chironomus tentans* konnten mit Hilfe der Färbung mit Toluidinblau 275 aktive Querscheiben nachgewiesen werden [8]. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der für *D. virilis* gefundene Wert, so daß dieser doch plausibel erscheint.

Von den 348 Querbanden wiesen 319 in dem untersuchten Zeitraum unterschiedliche Aktivitätsintensitäten auf. Aus der in Fig. 2 dargestellten Kurve (Δ....Δ) ist zu ersehen, daß die Veränderun-

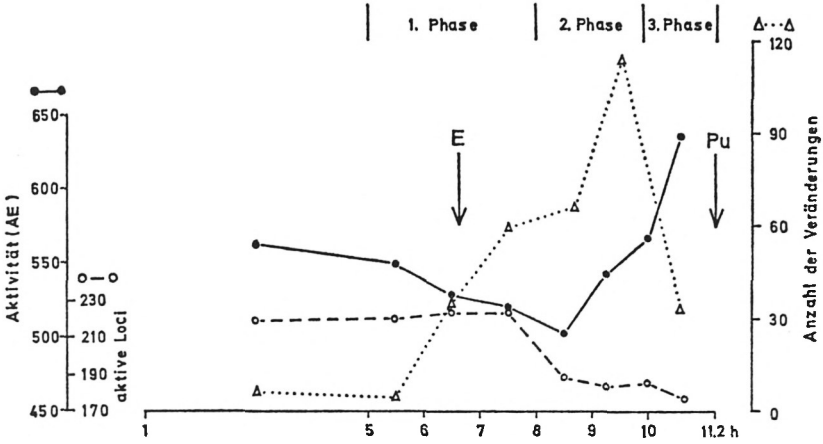


Fig. 2: Die Veränderungen der Puffaktivität in den Speicheldrüsenchromosomen von weiblichen Larven in den letzten elf Stunden vor der Puparium-bildung. Abszisse: Stunden nach dem Verlassen des Futters; *E* = Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung; *Pu* = Zeitpunkt der Puparium-bildung.

●——●: Gesamtaktivität des Genoms in AE (s. S. 131); ○ - - - ○: Anzahl aktiver Banden; △ . . . △: Anzahl der Banden, die in dem auf der Abszisse angegebenen Zeitraum mit der Änderung ihrer Aktivität begannen. Bei den Loci der Gruppen 3 und 4 (Tab. 1) ist nur der Beginn der ersten Veränderung in die Kurve aufgenommen. Bei Berücksichtigung der zweiten Veränderung müßten in die vier letzten Intervalle (7–11,2 h) die Werte 62, 70, 171 und 63 eingesetzt werden.

gen der Aktivität sich nicht gleichmäßig über den Beobachtungs-zeitraum erstreckten. Während in den ersten 6 Stunden n. d. V. relativ wenige Banden ihre Aktivität veränderten, war in dem sich anschließenden Zeitraum von vier Stunden eine sprunghafte Zunahme der sich verändernden Banden zu verzeichnen, die zwischen 9 und 10 h n. d. V. ein Maximum erreichte, um dann in der letzten Stunde vor der Puparium-bildung wieder stark abzusinken.

Verfolgt man im gleichen Zeitraum die Gesamtaktivität der Puffs, so war in der ersten Phase der puffing-Periode eine allgemeine Abnahme der Aktivität festzustellen, wogegen im Verlauf der zweiten und dritten Phase die Aktivität wieder anstieg (Fig. 2). Die Gesamtaktivität der Puffs war am Ende der puffing-Periode mit 635 AE (10–11,2 h n. d. V.) etwas höher als in dem Zeitraum vor Beginn der puffing-Periode (1–5 h n. d. V.), in dem 562 AE

registriert wurden. Die Zunahme der Puffaktivität im Verlauf der zweiten und dritten Phase beruhte im wesentlichen auf der Aktivierung von Querbanden, an denen vor Beginn der puffing-Periode keine Rotfärbung nachzuweisen war (vgl. Tab. 1, Gruppe 2b, Spalten B und C). Überraschend ist, daß trotz der Abnahme der Anzahl aktiver Loci von 221 auf 179 die Gesamtaktivität der Puffs zunahm (Fig. 2). Das liegt daran, daß im Verlauf der puffing-Periode der Anteil der aktiven Banden mit 1–4 AE abnahm und der Anteil der Puffs mit größeren Aktivitätsindices anstieg (Fig. 3). Es ergibt sich daraus eine Erhöhung der durchschnittlichen Aktivität pro aktiven Locus von 2,5 AE auf 3,5 AE.

Für *D. melanogaster* wurde für denselben Entwicklungsabschnitt eine Steigerung der Anzahl aktiver Querbanden um das 2,3-fache angegeben [10]. Dieser Unterschied in den Ergebnissen ist wahrscheinlich auf die Verschieden-

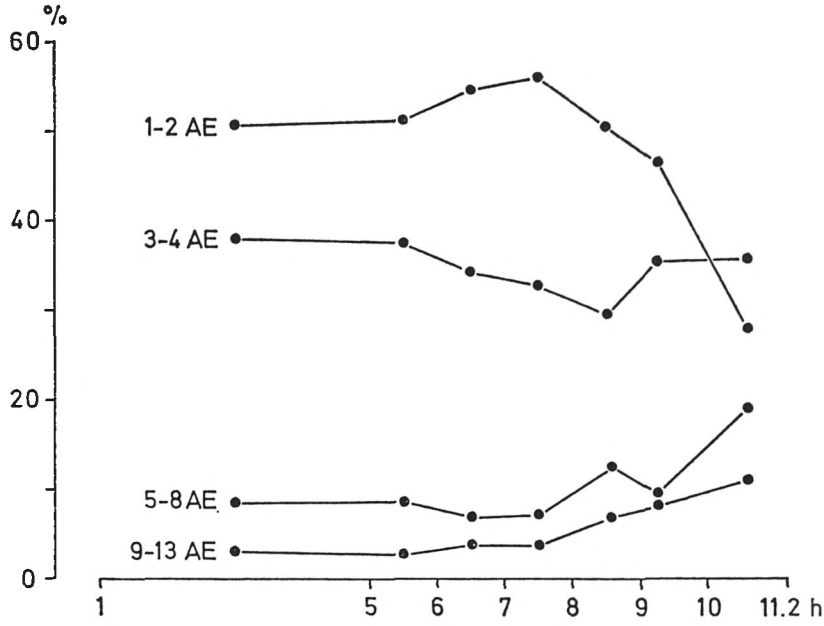


Fig. 3: Die Veränderung des Anteils von Banden bestimmter Aktivitätsklassen an der Gesamtanzahl aktiver Banden (Ordinate) im Laufe der ersten 11,2 h nach dem Verlassen des Futters (Abszisse). AE = Aktivitätseinheiten (vgl. S. 131).

artigkeit der angewandten Methoden zurückzuführen. Während Ashburner nur rein morphologische Kriterien (Aufschwellen und diffuse Natur der Chromomeren) verwendete, konnte mit der bei *D. virilis* angewendeten Methylgrün-Pyronin-Färbung Aktivität auch an Chromomeren festgestellt werden, die im ungefärbten Zustand wahrscheinlich keine mit Sicherheit nachzuweisende Veränderung erkennen lassen (Aktivitätsklassen mit 1 und 2 AE). Läßt man diese beiden Klassen in dem bei *D. virilis* gewonnenen Material unberücksichtigt (sie repräsentierten vor Beginn der puffing-Periode nicht weniger als 50% aller aktiven Loci; vgl. Fig. 3), so ergibt sich ein den Ashburner'schen Ergebnissen im Prinzip analoges Bild: die Anzahl aktiver Loci nimmt in dem zur Diskussion stehenden Zeitraum um das 1,2-fache zu.

Die Loci, die im Zeitraum zwischen dem Verlassen des Futters und der Puppariumbildung aktiv waren, wurden gemäß ihrem Verhalten in fünf verschiedene Gruppen aufgegliedert (Tab. 1). Ähnliche Unterschiede in der Aktivitätsveränderung einzelner Loci sind auch bei anderen Dipterenarten beschrieben worden [10, 13, 14, 15, 16]. Bei *D. virilis* traten diese Veränderungen in einer charakteristischen Reihenfolge auf, so daß drei aufeinanderfolgende Phasen postuliert wurden, in denen jeweils die Puffs einer bestimmten Gruppe in ihrer Aktivität dominierten (Fig. 1). Eine im Prinzip gleichartige Aufeinanderfolge verschiedener Phasen wurde auch bei *Chironomus* beschrieben [14].

Von den beobachteten Veränderungen genetischer Aktivität sind drei Gruppen von besonderer Bedeutung. Die Aktivität derjenigen Loci, die vor der Puppariumbildung inaktiv wurden (Gruppe 1; vgl. Tafel I, Abb. 5) und deren Aktivität in der *ersten Phase* der puffing-Periode dominierte, dürften wahrscheinlich im Zusammenhang mit Stoffwechselvorgängen stehen, die für die larvale Entwicklungsphase charakteristisch sind und die vor der Puppariumbildung zum Erlöschen kommen. Ein derartiger Vorgang ist z. B. bei *Drosophila* die in der zweiten Hälfte des dritten Larvenstadiums als Hauptfunktion der Speicheldrüse zu betrachtende Synthese des Sekrets, das kurz vor der Puppariumbildung in das Lumen ausgeschüttet wird [13, 17]. Man darf annehmen, daß diese Synthese vor oder während der Extrusion des Sekrets beendet wird. Bei *D. virilis* konnte gezeigt werden, daß die Extrusion 8,5 h n. d. V. beginnt, nach 30–40 min fast abgeklungen ist und sich auf ganz niedrigem Niveau wahrscheinlich bis zur Puppariumbildung hinzieht [4] (vgl. Fig. 4). Sie findet somit in dem

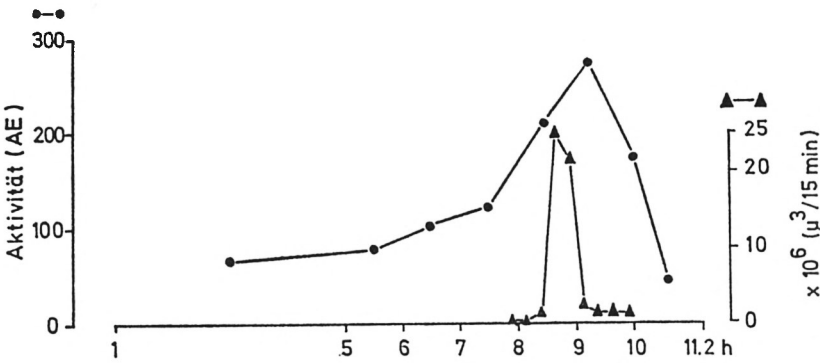


Fig. 4: Zeitliche Korrelation zwischen der Extrusion des Sekrets und der vorübergehenden Zunahme der Aktivität der zur Gruppe 3 gehörenden Puffs. Abszisse: Stunden nach dem Verlassen des Futters; ●——●: Gesamtaktivität der Puffs in AE; ▲——▲: Durchschnittliche Zunahme des Volumens im distalen Abschnitt des Speicheldrüsenlumens.

Zeitraum statt, in dem die Loci inaktiv werden, deren Aktivität vor der Sekretausschüttung 62% der gesamten Puffaktivität repräsentierten (Tab. 1, Gruppe 1; vgl. Fig. 1).

Die für die *zweite Phase* der puffing-Periode charakteristischen Veränderungen der Puffaktivität, nämlich die vorübergehende Aktivierung bzw. Inaktivierung der Loci der Gruppen 3 und 4 traten synchron mit der Extrusion des Sekrets auf (Fig. 4). Es ist naheliegend, einen kausalen Zusammenhang zwischen beiden Vorgängen zu suchen. Leider ist über die Biochemie der Extrusion bei Dipteren wenig bekannt. Es scheint jedoch allgemein für Zellen mit sekretorischer Funktion charakteristisch zu sein, daß ihr Energieverbrauch in beträchtlichem Maße auf Transportvorgänge zurückzuführen ist, während der Energieverbrauch bei der Sekretsynthese relativ gering sein dürfte [18]. Dies würde bedeuten, daß in der Phase der Extrusion mehr Energie verbraucht wird als in der vor ihr liegenden Periode der Sekretsynthese; es läge somit ein Übergang von einem relativ „inaktiven" in einen „aktiven" Zustand der Zellen vor. Vom biochemischen Standpunkt aus betrachtet ist ein derartiger Übergang u. a. durch die Steigerung des Elektronenflusses in der Atmungskette zum Sauerstoff hin gekennzeichnet, so daß die Redoxpartner der Kette vermehrt im oxydierten Zustand vorliegen [19]. Experimentell

lassen sich diese Bedingungen durch Behandlung mit Entkopplern der Atmungskette, z. B. Methylenblau oder Menadion erzeugen. Leenders [20] konnte bei *D. hydei* durch *in-vitro*-Inkubation von Drüsen in Medien, die diese Substanzen enthielten, u. a. zwei Puffs induzieren (2–48C und 2–36A), die in der Normalentwicklung vier Stunden vor der Puppariumbildung aktiv werden und kurz nach der Puppariumbildung ihre Aktivität wieder verlieren [13]. Vielleicht liegt hier ein experimenteller Hinweis dafür vor, daß vorübergehende Veränderungen des Puffmusters im Zeitraum der Puppariumbildung mit einer möglichen Intensivierung des Energiestoffwechsels im gleichen Zeitraum in Verbindung stehen könnten. Es ist daher denkbar, daß der in Fig. 4 dargestellten zeitlichen Korrelation zwischen der Extrusion und der vorübergehenden Aktivierung bestimmter Loci ein derartiger Zusammenhang zugrunde liegt. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß beide Vorgänge zwar gleichzeitig aber unabhängig voneinander durch verschiedene Faktoren stimuliert werden.

In der *dritten Phase* der puffing-Periode dominierte die Aktivität der Loci der zweiten Gruppe (Fig. 1), von denen rund 80% erst 8h n. d. V. oder noch später aktiv wurden (Tab. 1, Gruppe 2b). In dieser Phase scheinen die Grundlagen für biochemische Abläufe in der Speicheldrüse gelegt zu werden, die entweder für die Puppariumbildung oder für das sich anschließende Vorpuppenstadium charakteristisch sind. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, daß bei *D. melanogaster* nach der Puppariumbildung in der Speicheldrüse Vakuolen auftreten, die sich morphologisch deutlich von den während des dritten Larvenstadiums gebildeten Sekretgrana unterscheiden [17, 21]. Sollte dieses unterschiedliche Erscheinungsbild auf einer Verschiedenheit der biochemischen Zusammensetzung beruhen, dann wären die biochemischen Vorgänge, die sich im Verlauf der letzten Stunden des dritten Larvenstadiums bei *Drosophila* in der Speicheldrüse abspielen dadurch gekennzeichnet, daß vor der Puppariumbildung ein bis dahin aktives Syntheseprogramm stillgelegt wird, und nach der Puppariumbildung ein neues Syntheseprogramm in Gang gebracht wird. Diese hypothetische „Umfunktionierung" der Syntheseleistung der Drüse fände auf chromosomaler Ebene ihr Analogon in der Beobachtung, daß diejenigen Loci, deren Akti-

vität im Zeitraum von 1–5 h n. d. V. 62% der Gesamtaktivität des Genoms repräsentierten, vor der Puppariumbildung inaktiv wurden (Tab. 1, Gruppe 1) während im Zeitraum von 10–11,2 h n. d. V. 56% der Gesamtaktivität des Genoms (Tab. 1, Gruppe 2 b) auf Loci zurückzuführen waren, die erst 8 h n. d. V. oder noch später aktiv geworden waren. Mit anderen Worten: während die Aktivität eines Teils des Genoms in dem untersuchten Zeitraum anteilmäßig relativ unverändert geblieben war (Tab. 1, Gruppen 3, 4 und 5), wurde die Aktivität eines bis zur Extrusion des Sekrets aktiven Komplexes von Genen (Gruppe 1) durch die Aktivität eines völlig anderen Genkomplexes (Gruppe 2 b) ersetzt.

Die regulierenden Faktoren, welche diese komplizierten Veränderungen des Puffmusters steuern, sind uns unbekannt. Eine Ausnahme davon ist das Häutungshormon Ecdyson. Bei verschiedenen Dipterenarten konnten durch Injektion dieses Hormons Veränderungen des Puffmusters induziert werden, wie sie auch in der Normalentwicklung dieser Arten zu beobachten waren [3], so daß es naheliegend war, die Wirkung des Hormons für diese Veränderungen verantwortlich zu machen. Auch die hier vorliegenden Untersuchungen lieferten zwei verschiedene Hinweise für einen derartigen Zusammenhang.

Während in den ersten sechs Stunden nach dem Verlassen des Futters nur 10 Puffs ihre Aktivität veränderten, war in dem sich anschließenden Zeitraum eine sprunghafte Zunahme der Anzahl von Loci zu registrieren, die mit der Änderung ihrer Aktivität begannen (Fig. 2, Δ...Δ). Der Beginn dieser Zunahme lag zwischen 6 und 7 h n. d. V. Mit Hilfe von Schnürungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß genau in diesem Zeitabschnitt, nämlich 6,6 h n. d. V., die Ecdysonausschüttung erfolgt [4]. Diese ist somit zeitlich mit der starken Zunahme der Puffmusterveränderungen korreliert (Fig. 2, E).

Die 10 Loci, an denen schon früher als 6 h n. d. V. eine Aktivitätsveränderung auftrat, waren: 2F4, 3F4, 9B3, 12B2, 19A2, 29F6, 41E, 55E, 68F3 und 75C2. Es muß in diesem Zusammenhang betont werden, daß der durch die Schnürungen ermittelte Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung nur den Zeitpunkt repräsentiert, bei dem der Hormontiter in der Hämolymphe einen Wert erreicht hat, bei dem die Sklerotisierung der Kutikula im abgeschnürten distalen Teil der Larve auch ohne weitere Hormonzufuhr von der Ringdrüse her ablaufen kann. Es besteht somit keine Möglichkeit zu unterscheiden, ob die

Ausschüttung tatsächlich nur zu diesem Zeitpunkt erfolgt oder ob schon vor diesem Zeitpunkt ein allmählicher Anstieg des Hormontiters in der Hämolymphe erfolgt. Im letzten Falle könnten die oben genannten, früher als 6h n. d. V. aufgetretenen Veränderungen an Banden auftreten, die bereits auf geringe Hormonkonzentrationen mit einer Veränderung ihrer Aktivität reagieren. Daß zumindest sechs dieser Veränderungen (2F4, 9B3, 29F6, 41E, 55E und 68F3) auf Ecdyson reagieren, konnte in den Injektionsexperimenten gezeigt werden (s. Tafeln II bis V; vgl. auch Tafel I, Abb. 3 bis 7).

Diese zeitliche Korrelation ist allerdings kein Beweis für einen tatsächlichen kausalen Zusammenhang zwischen der Ecdysonausschüttung und dem Beginn der puffing-Periode. Weiterführend waren daher die Ergebnisse der Injektionsexperimente mit Ecdyson. Da nur auf die Erfassung „primärer" Puffs [22] Wert gelegt wurde, d. h. solcher, die unmittelbar auf Ecdyson reagieren, erfolgte die Präparation der Drüsen maximal eine Stunde nach der Injektion. In diesem Zeitraum wurden insgesamt 83 Veränderungen des Puffmusters beobachtet, die charakteristisch für die puffing-Periode sind (vgl. Tafeln II–VI, c). Von den sechs Veränderungen, die in der Normalentwicklung zwischen 1 und 5h n. d. V. auftraten, konnten vier durch Injektion von Ecdyson induziert werden (Fig. 5). Von den 99 in der ersten Phase der puffing-Periode auftretenden Veränderungen waren es 45 (= 45%) und von den 182 für die zweite Phase charakteristischen Veränderungen waren es 34 (= 19%). Veränderungen der dritten Phase traten nach Injektion von Ecdyson nicht auf.

Insgesamt konnten somit nur 48% aller Veränderungen, die in der Normalentwicklung kurz vor oder im Zeitraum der Ecdysonausschüttung (1–8h n. d. V.) zu beobachten waren, durch Injektion von Ecdyson induziert werden. Dieser Befund spricht dafür, daß zumindest diese 48% in einem relativ engen Zusammenhang zur Ausschüttung des Hormons stehen. Von den verbleibenden 55 Veränderungen dieses Zeitabschnitts wiesen 28 nach Injektion von Ecdyson keine Veränderung auf (bei den restlichen 27 Veränderungen war in den Kontrollinjektionen die gleiche Veränderung wie nach Injektion von Ecdyson eingetreten; diese Banden können daher nicht berücksichtigt werden). Die Wirkungslosigkeit des Ecdysons an diesen 28 Querscheiben könnte entweder darauf zurückzuführen sein, daß diese Veränderungen *in vivo* nicht durch Ecdyson, sondern durch andere Faktoren gesteuert

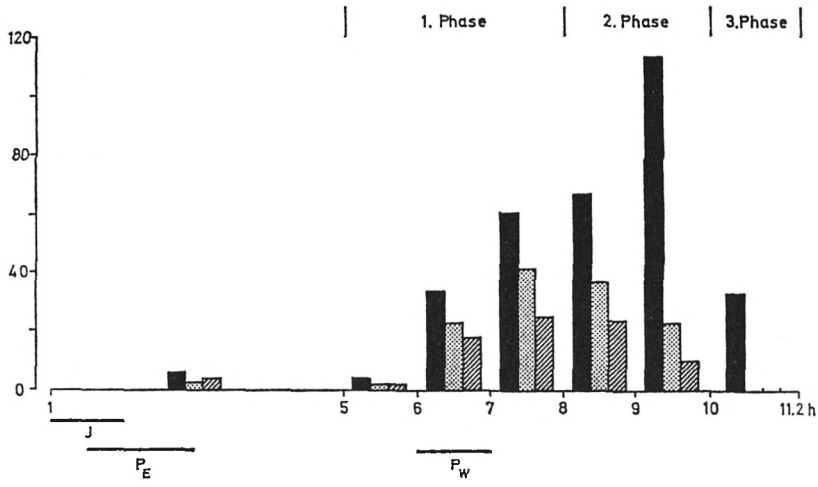


Fig. 5: Die nach Injektion von Ecdyson oder von H_2O beobachteten „normalen" Veränderungen (s. S. 135) der Puffaktivität und die zeitliche Verteilung ihres Auftretens in der Normalentwicklung.

Abszisse: Stunden nach Verlassen des Futters;

Ordinate: *Schwarze Säulen:* Anzahl der Loci, die in der Normalentwicklung in dem auf der Abszisse angegebenen Zeitintervall mit der Veränderung ihrer Aktivität begannen. Bei den Loci der Gruppen 3 und 4 (Tab. 1) ist nur der Beginn der ersten Veränderung berücksichtigt (vgl. Legende zu Fig. 2).

Punktierte Säulen: Anzahl der Veränderungen, die nach Injektion von 0,2 µl H_2O (1–2 h n. d. V.) und Präparation im Zeitraum der Ecdysonausschüttung (6–7 h n. d. V.) beobachtet wurden und in der Normalentwicklung in dem auf der Abszisse angegebenen Zeitintervall mit der Veränderung ihrer Aktivität begannen (s. S. 145).

Schraffierte Säulen: Anzahl der Veränderungen, die durch Injektion von 0,1 µg Ecdyson innerhalb von einer Stunde induziert wurden und in der Normalentwicklung in dem auf der Abszisse angegebenen Intervall mit der Änderung ihrer Aktivität begannen.

J = Injektionszeitraum;

P_E = Zeitraum, in dem die Drüsen nach 0,5- oder 1-stündiger Einwirkungsdauer von Ecdyson präpariert wurden;

P_W = Zeitraum, in dem die Drüsen fünf Stunden nach Injektion von 0,2 µl H_2O präpariert wurden.

werden, so daß sie im Experiment auf Ecdyson überhaupt nicht ansprechen können, oder darauf, daß durch die Injektion die

Reaktionsfähigkeit dieser Banden auf Ecdyson unterdrückt wurde.

Für die zuletzt genannte Interpretation sprechen auch experimentelle Befunde. Wurden im Zeitraum zwischen 1 und 2 h n. d. V. in Larven 0,2 µl H_2O injiziert und diese zwischen 6 und 7 h n. d. V., also im Zeitraum der Ecdysonausschüttung, präpariert, so konnten insgesamt nur 67 der 99 für die erste Phase der puffing-Periode charakteristischen Veränderungen gefunden werden (Fig. 5, punktierte Säulen; Tafeln II–VI, b). Man könnte daraus schließen, daß durch die Injektion die Reaktionsfähigkeit des Genoms auf die regulierenden Faktoren verändert wurde.

Im Zusammenhang mit einem anderen Versuchsergebnis ist dieser Schluß jedoch nicht unbedingt zwingend. Wurden Larven im Zeitraum zwischen 6 und 7 h n. d. V. geschnürt, die fünf Stunden vorher eine Injektion von 0,2 µl Tris/HCl-Puffer, 0,005 M, pH 6,9 erhalten hatten, so wiesen nur 4% der Larven ($n = 27$) eine Sklerotisierung hinter der Ligatur auf, während der Erwartungswert von der Normalentwicklung her zwischen 36% (für 6 h n. d. V.; $n = 47$) und 64% (für 7 h n. d. V.; $n = 45$) hätte liegen müssen. Die Erniedrigung der Sklerotisierungshäufigkeit nach Injektion könnte durch eine Verzögerung der Ecdysonausschüttung hervorgerufen worden sein. Daß fünf Stunden nach der Injektion von H_2O nicht alle Veränderungen der puffing-Periode beobachtet wurden, könnte demnach auch durch die Abwesenheit von Ecdyson oder zumindest durch einen stark reduzierten Hormontiter bedingt gewesen sein. Ob die Unvollständigkeit des Reaktionsmusters nach Injektion von H_2O auf die verminderte Reaktionsfähigkeit des Genoms oder auf einen reduzierten Hormontiter zurückzuführen ist, kann mit dem vorliegenden Material nicht geklärt werden.

Von den Veränderungen der zweiten Phase der puffing-Periode konnten nur 19% durch Injektion von Ecdyson induziert werden, von den Veränderungen der dritten Phase keine einzige (Fig. 5, schraffierte Säulen). Es gibt verschiedene Hinweise dafür, daß die Reaktionsfähigkeit des Genoms auf Injektion von Häutungshormon oder andere experimentelle Eingriffe bei Larven verschiedenen Alters unterschiedlich ist [1, 23]. Da in den vorliegenden Experimenten die Injektionen und die Präparation der Chromosomen im Zeitraum von 1–3 h n. d. V. erfolgten, die zweite Phase der puffing-Periode in der Normalentwicklung aber erst 8 h n. d. V. beginnt, war die Annahme berechtigt, daß zum Zeitpunkt der Injektion die Chromosomen für Veränderungen der zweiten und dritten Phase noch nicht kompetent waren. Die Kompetenz müßte jedoch mit der Annäherung des Injektionszeitpunktes an den Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung zunehmen.

Um diese Frage zu klären, wurde die Injektion von Ecdyson auch im Zeitraum von 6–7 h n. d. V. durchgeführt, die Präparation der Drüsen eine Stunde später. An 21 Banden war die Wirkung des Hormons stärker als sie nach Injektion zwischen 1 und 2 h n. d. V. beobachtet worden war, an einer Bande war sie schwächer. *Eine Erhöhung des Anteils von Veränderungen der zweiten und dritten Phase trat jedoch nicht ein.* Aus diesem Ergebnis ist zu schließen, daß sich die Kompetenz des Genoms für Ecdyson im Zeitraum von 1–8 h n. d. V. nicht veränderte. Da aber dennoch in diesem Zeitraum und in den folgenden Phasen der puffing-Periode der Anteil der durch Injektion von Ecdyson induzierbaren Veränderungen laufend sank (vgl. Fig. 5, schraffierte Säulen), ist anzunehmen, daß der Beginn der puffing-Periode im wesentlichen durch den steigenden Ecdysontiter induziert wird, während im weiteren Verlauf der Periode in zunehmendem Maße andere, bisher unbekannte Faktoren in den komplizierten Ablauf der Puffmusterveränderungen eingreifen.

E. Zusammenfassung

1. In den Riesenchromosomen der Speicheldrüsen von *Drosophila virilis*-Larven wurde im Zeitraum zwischen dem Verlassen des Futters und der Puppariumbildung an insgesamt 348 Querbanden Puffaktivität mit Hilfe der Methylgrün-Pyronin-Färbung festgestellt.

2. An 319 dieser Banden war in dem angegebenen Zeitraum eine Änderung der Aktivität zu registrieren. Diese puffing-Periode konnte in drei Phasen aufgegliedert werden. Die *erste Phase* dauert von 5–8 h nach dem Verlassen des Futters (= n. d. V.). In dieser Phase, in der auch die Ecdysonausschüttung stattfindet, steigt die Anzahl der sich verändernden Banden stark an; es dominiert die Aktivität von Loci, die vor Beginn der puffing-Periode 62% der Gesamtaktivität des Genoms repräsentieren, bis zur Puppariumbildung jedoch völlig inaktiv werden. In der *zweiten Phase*, die zwischen 8 und 10 h n. d. V. liegt, steigt die Anzahl der sich verändernden Banden weiter an; es dominiert die Aktivität von Loci, die vorübergehend ihre Aktivität erhöhen. In der *dritten Phase* schließlich, die eine Stunde vor der Puppariumbildung

beginnt, nimmt die Anzahl der sich verändernden Banden wieder ab; es dominiert die Aktivität von Loci, die erst 8h n. d. V. oder noch später aktiv geworden sind. Diese Loci repräsentieren 56% der Gesamtaktivität des Genoms in diesem Zeitabschnitt.

3. Im Zeitintervall von 1–2 h n. d. V. wurden 0,1 µg Ecdyson in die Hämolymphe injiziert. Im Zeitraum von einer Stunde nach Injektion des Hormons konnte an insgesamt 83 Loci eine Veränderung der Aktivität festgestellt werden, wie sie auch in der Normalentwicklung beobachtet worden war. Von den Veränderungen der ersten Phase der puffing-Periode wurden 45% induziert, von denjenigen der zweiten Phase nur 19%. Veränderungen der dritten Phase wurden nach Injektion von Ecdyson nicht beobachtet.

4. Die im Verlauf der puffing-Periode aufgetretenen Puffmusterveränderungen werden im Zusammenhang mit der sekretorischen Funktion der Drüsen diskutiert. Weiterhin wird festgestellt, daß der Beginn der puffing-Periode wahrscheinlich durch Ecdyson induziert wird, daß aber im weiteren Verlauf dieser Periode, d. h. während der zweiten und dritten Phase, in zunehmendem Maße andere, bisher unbekannte Faktoren in den komplizierten Ablauf der Puffmusterveränderungen eingreifen.

E. Summary

1) In the giant chromosomes of the salivary glands of *Drosophila virilis*-larvae puffing activity could be detected at 348 bands during the period between leaving the food and puparium formation by means of staining with methyl-green-pyronin.

2) At 319 of these loci a change of activity was registered during the aforementioned interval. This puffing-period could be timed in three succeeding phases. The *first phase* begins at about 5h after leaving food (= a. l. f.) and continues for three hours. In this phase, during which the release of ecdysone also takes place, the number of bands that change their activity increases. At the beginning of this period 62% of the total puffing activity are due to loci that become inactive during the puffing-period. During the *second phase* (8–10h a. l. f.) the number of bands with changing activity increases further. The activity of loci dominates which transiently increase their activity during the puffing-period. In the *third phase*, which begins one hour prior to puparium formation, the number of bands with changing activity decreases. The activity of loci dominates, which become active only 8h a. l. f. or even later. The activity of these loci represents 56% of the total puffing activity in this period.

3) Between 1–2 h a. l. f. 0.1 µg alpha-ecdysone was injected into the larval hemolymph. During the 1 h-interval after the injection a change of activity was observed at 83 loci, as it was also observed in normal development in the course of the puffing-period. 45% of the changes in activity occurring during the first phase of the puffing-period were induced after ecdysone treatment, while only 19% of the changes of the second phase were observed. Changes of the third phase were not induced after ecdysone treatment.

4) The changes in puffing activity occurring during the puffing-period are discussed in connection with the secretory function of the glands. Furtheron it is stated that the beginning of the puffing-period presumably is induced by ecdysone, while during the second and third phase of this period hitherto unknown factors come in action in an increasing proportion.

Literatur

[1] Becker, H. J.: Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I. Mitteilung: Beobachtungen zum Verhalten des Puffmusters im Normalstamm und bei zwei Mutanten, *giant* und *lethal-giant-larvae*. Chromosoma (Berl.) 10, 654–678 (1959).

[2] Becker, H. J.: II. Mitteilung: Die Auslösung der Puffbildung, ihre Spezifität und ihre Beziehung zur Funktion der Ringdrüse. Chromosoma (Berl.) 13, 341–384 (1962).

[3] Ashburner, M.: Function and structure of polytene chromosomes during insect development. Adv. Ins. Physiol. 7, 1–95 (1970).

[4] Kress, H.: In Vorbereitung.

[5] Kaufmann, B. P., McDonalt, M., Gay, H.: Enzymatic degradation of ribonucleoproteins of chromosomes, nucleoli and cytoplasm. Nature 162, 814–815 (1948).

[6] Brachet, J.: Biochemical cytology. Academic Press, New York, p. 120f. (1957).

[7] Breuer, M. E., Pavan, C.: Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Chromosoma (Berl.) 7, 371–381 (1955).

[8] Pelling, C.: Ribonukleinsäure-synthese der Riesenchromosomen. Autoradiographische Untersuchungen an *Chironomus tentans*. Chromosoma (Berl.) 15, 71–122 (1955).

[9] Hughes, R. D.: An analysis of the chromosomes of two subspecies *Drosophila virilis virilis* and *Drosophila virilis americana*. Genetics 24, 811–834 (1939).

[10] Ashburner, M.: Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma (Berl.) 21, 398–428 (1967).

[11] Ashburner, M.: II. The X-chromosome puffing patterns of *D. melanogaster* and *D. simulans*. Chromosoma (Berl.) 27, 47–63 (1969).

[12] Schultz, J.: in Lindsley, D. L., Grell, E. H.: Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publication, No. 627, p. 423f. (1968).

[13] Berendes, H. D.: Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei*. Chromosoma (Berl.) 17, 35–77 (1965).

[14] Clever, U.: Genaktivitäten in den Riesenchromosomen von *Chironomus tentans* und ihre Beziehungen zur Entwicklung. II. Das Verhalten der Puffs während des letzten Larvenstadiums und der Puppenhäutung. Chromosoma (Berl.) 13, 385–436 (1962).

[15] Whitten, J. M.: Coordinated development in the foot pad of the fly *Sarcophaga bullata* during metamorphosis: changing puffing patterns of the giant cell chromosomes. Chromosoma (Berl.) 26, 215–244 (1969).

[16] Ribbert, D.: Die Polytänchromosomen der Borstenbildungszellen von *Calliphora erythrocephala*. Chromosoma (Berl.) 21, 296–344 (1967).

[17] Lane, N. J., Carter, Y. R., Ashburner, M.: Puffs and salivary gland function: the fine structure of the larval and prepupal salivary gland. Wilhelm Roux' Archiv 169, 216–238 (1972).

[18] Junqueira, L. C. U.: Aspects of the biology of the animal cell secretion. In: Sekretion und Exkretion. 2. Wissenschaftliche Konferenz der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1965).

[19] Hess, B.: Koordination von Glykolyse und Atmung. In: Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle. Wissenschaftliche Konferenz der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1963).

[20] Leenders, H. J.: Temperature induced puffs in *Drosophila:* their possible physiological origin. Drosophila Information Service 46, 64 (1971).

[21] von Gaudecker, B.: Der Strukturwandel der larvalen Speicheldrüse von *Drosophila melanogaster*. Z. Zellforsch. 127, 50–86 (1972).

[22] Clever, U.: Actinomycin and puromycin: effects on sequential gene activation by ecdysone. Science 146, 794–795 (1964).

[23] Poels, C. L. M.: Time sequence in the expression of various developmental characters induced by ecdysterone in *Drosophila hydei*. Dev. Biol. 23, 210–225 (1970).

Tafeln

Tafel I

Photographien Methylgrün-Pyronin-gefärbter Präparate von Riesenchromosomen der larvalen Speicheldrüsen von *Drosophila virilis*.

Abb. 1: Die Basen der fünf langen Chromosomen (I–V). Die für verschiedene Puffaktivitäten charakteristischen Aktivitätsindices (in AE) sind bei einigen Loci angegeben. Nu = Nukleolus; Chr = Chromozentrum.

Abb. 2: Die Basis des III. Chromosoms im Verlauf der puffing-Periode.
a) früher als 5 h n. d. V.;
b) 7,6 h n. d. V.;
c) 9,2 h n. d. V.

Abb. 3: Der Puff 68 F 3 während der puffing-Periode.
a) früher als 5 h n. d. V.;
b) 6,4 h n. d. V.;
c) 7,9 h n. d. V.

Abb. 4: Der Puff 68 F 3.
a) 0,5 h nach Injektion von 0,2 µl H_2O;
b) 0,5 h nach Injektion von 0,1 µg Ecdyson.

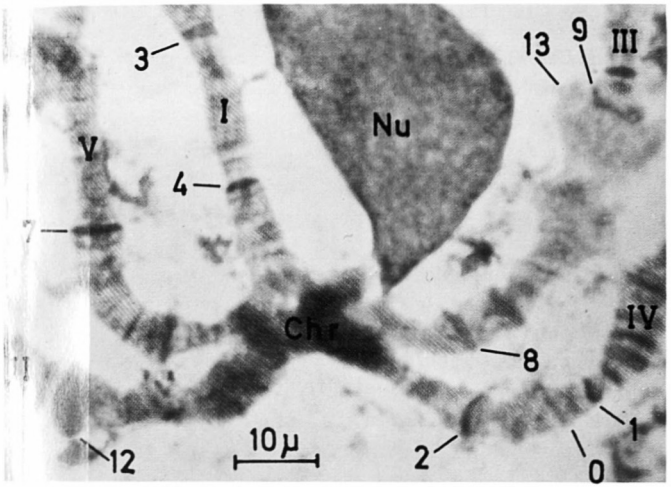
Abb. 5: Der Puff 55 E im Verlauf der puffing-Periode.
a) früher als 5 h n. d. V.;
b) 7,5 h n. d. V.;
c) 8,8 h n. d. V.

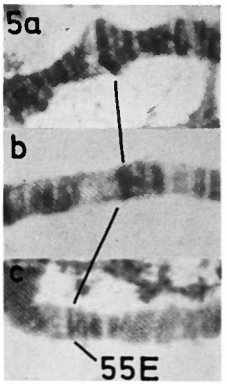
Abb. 6: Der Puff 55 E.
a) 1 h nach Injektion von 0,2 µl H_2O;
b) 1 h nach Injektion von 0,1 µg Ecdyson.

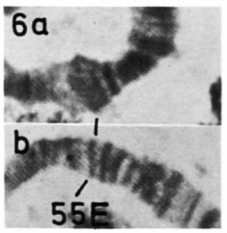
Abb. 7: Die Basis des II. Chromosoms.
a) 0,5 h nach Injektion von 0,2 µl H_2O;
b) 0,5 h nach Injektion von 0,1 µg Ecdyson.

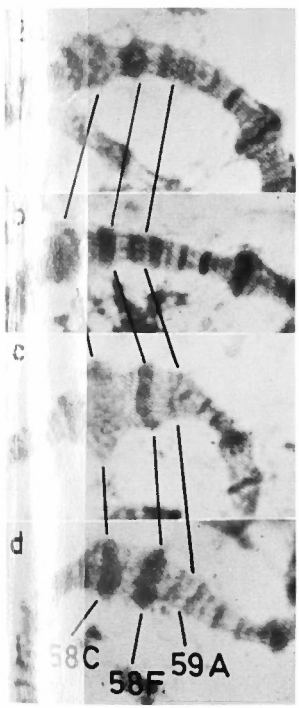
Abb. 8: Die Basis des III. Chromosoms.
a) 1 h nach Injektion von 0,2 µl H_2O;
b) 1 h nach Injektion von 0,1 µl Ecdyson.

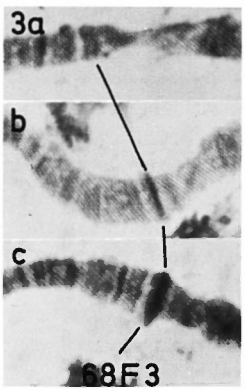
Der in Abb. 1 angegebene Maßstab besitzt für alle Abbildungen dieser Tafel Gültigkeit.

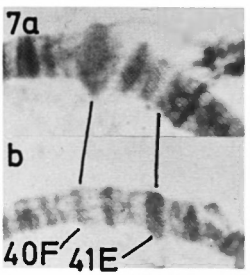

3
I
Nu
13
9
III
V
4
7
Chr
IV
8
1
12
10 µ
2
0

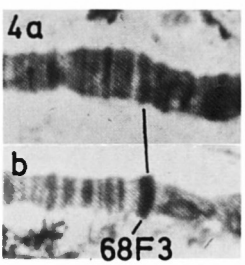

5a
b
c
55E

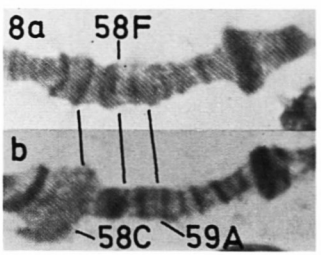

6a
b
55E


c
d
58C
58F
59A


3a
b
c
68F3


7a
b
40F
41E


4a
b
68F3


8a
58F
b
58C
59A

Tafeln II–VI

Das Puffmuster von *Drosophila virilis* und seine Veränderungen in der Normalentwicklung, nach Injektion von Ecdyson und von H_2O.

Diagramm auf der linken Seite:

Ordinate: Stunden nach Verlassen des Futters;

Abszisse: Volumenzunahme in der distalen Hälfte des Drüsenlumens (s. S. 139).

E = Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung (s. S. 142).

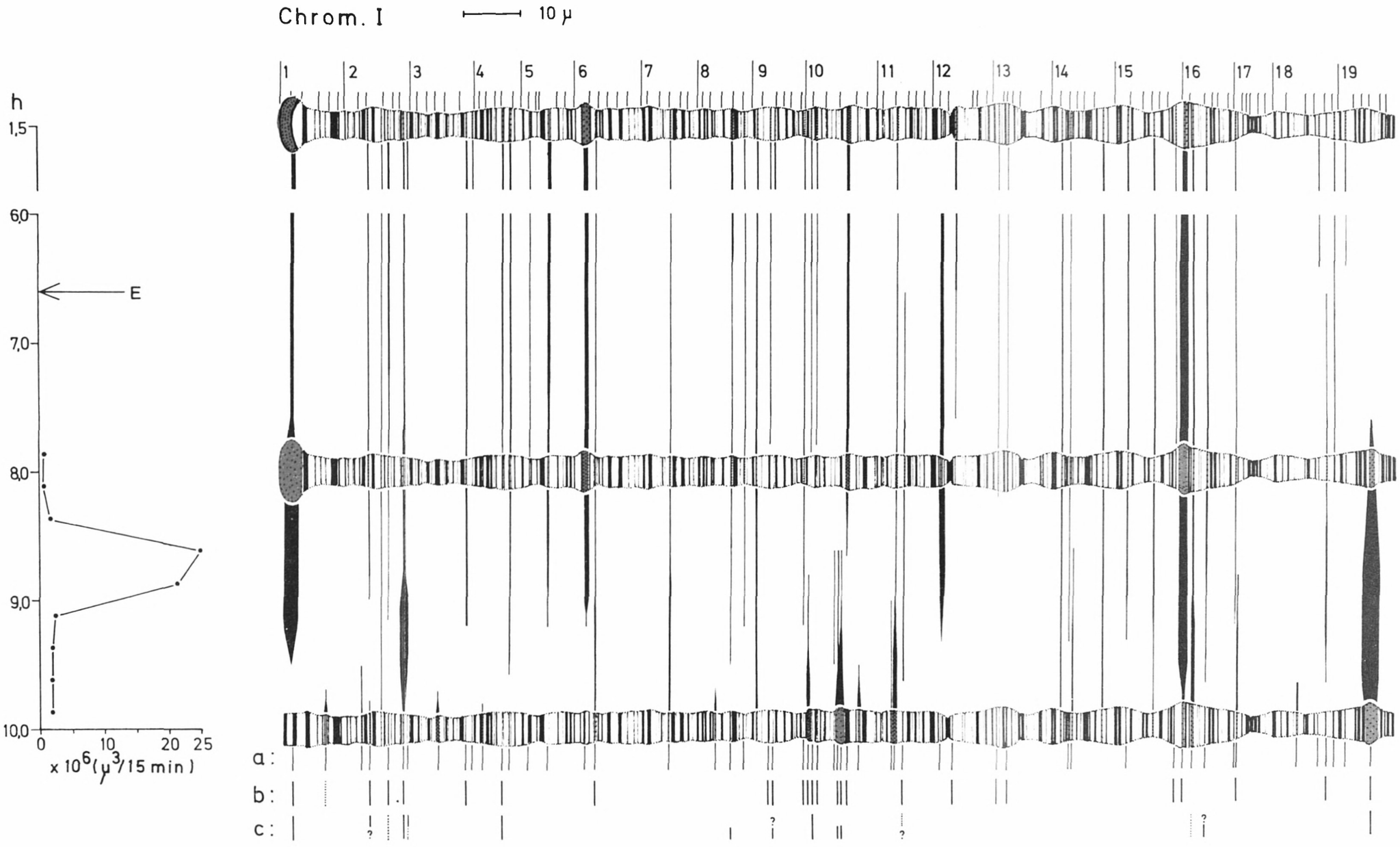
In der Chromosomenkarte sind inaktive Banden durch ausgezogene Striche gekennzeichnet, aktive Banden sind, je nach dem Grad ihrer Auflockerung, mehr oder weniger dicht punktiert. Außerdem ist ihr Auflockerungsbereich rot ausgefüllt, damit ein dem zytologischen Aussehen angenähertes Bild entsteht. Jede Linie zwischen den Chromosomen symbolisiert die Aktivität derjenigen Bande, die beim Verlängern der Linie von ihr berührt wird. Zunehmende Dicke der Linien bedeutet zunehmende Puffaktivität.

a) Jeder Strich kennzeichnet eine Bande, an der während der Normalentwicklung in dem auf der Ordinate angegebenen Zeitraum verschiedene Aktivitätsgrade registriert wurden.

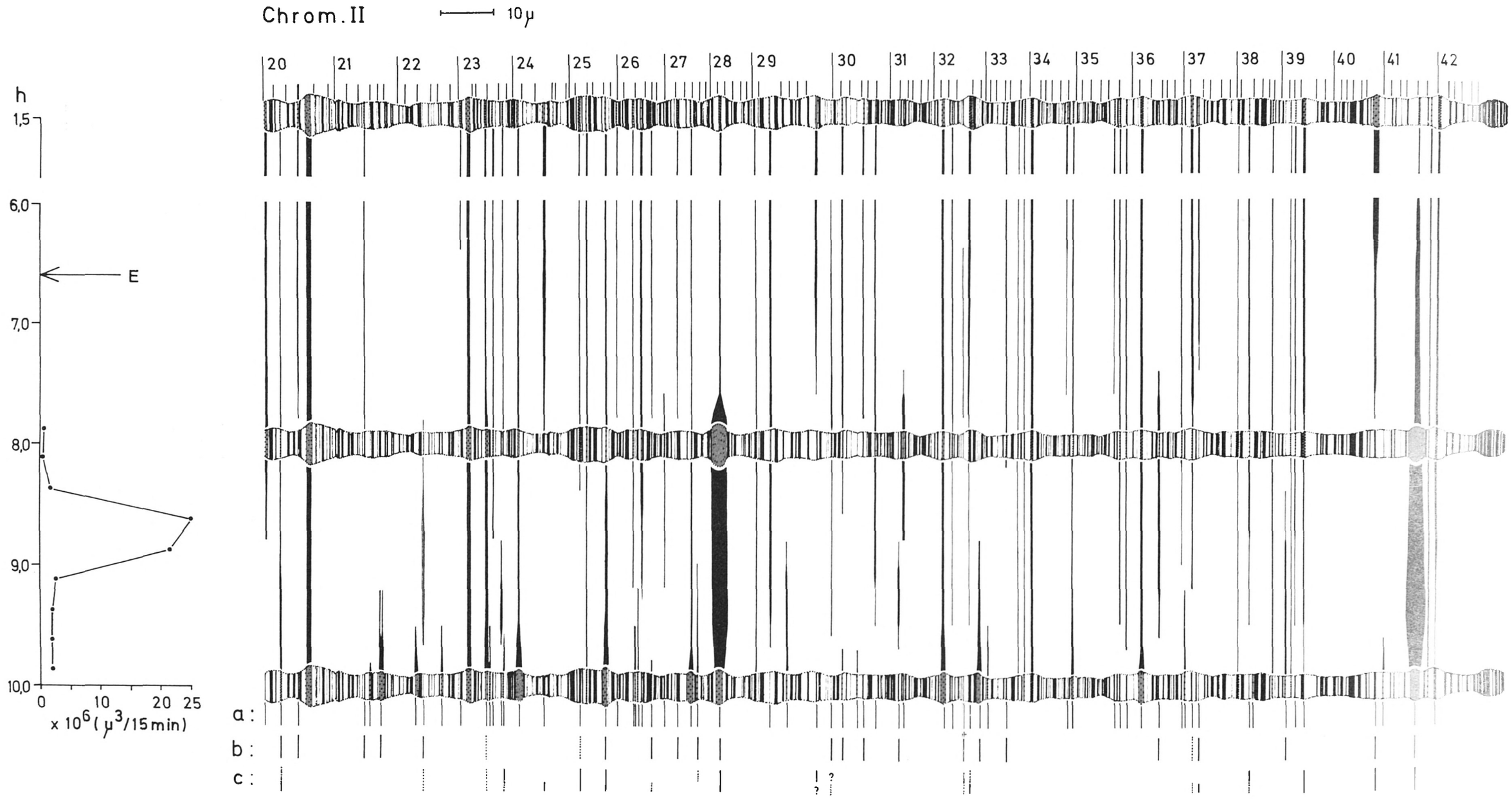
b) Jeder Strich kennzeichnet eine Bande, die nach Injektion von 0,2 µl H_2O (1–2 h n. d. V.) und Präparation im Zeitraum der Ecdysonausschüttung (6–7 h n. d. V.) normales Puffverhalten zeigte. An den Loci der Gruppen 3 und 4 (Tab. 1) wurde im allgemeinen nur die erste Veränderung festgestellt, die zweite Veränderung trat nur an zwei Banden (+) auf.

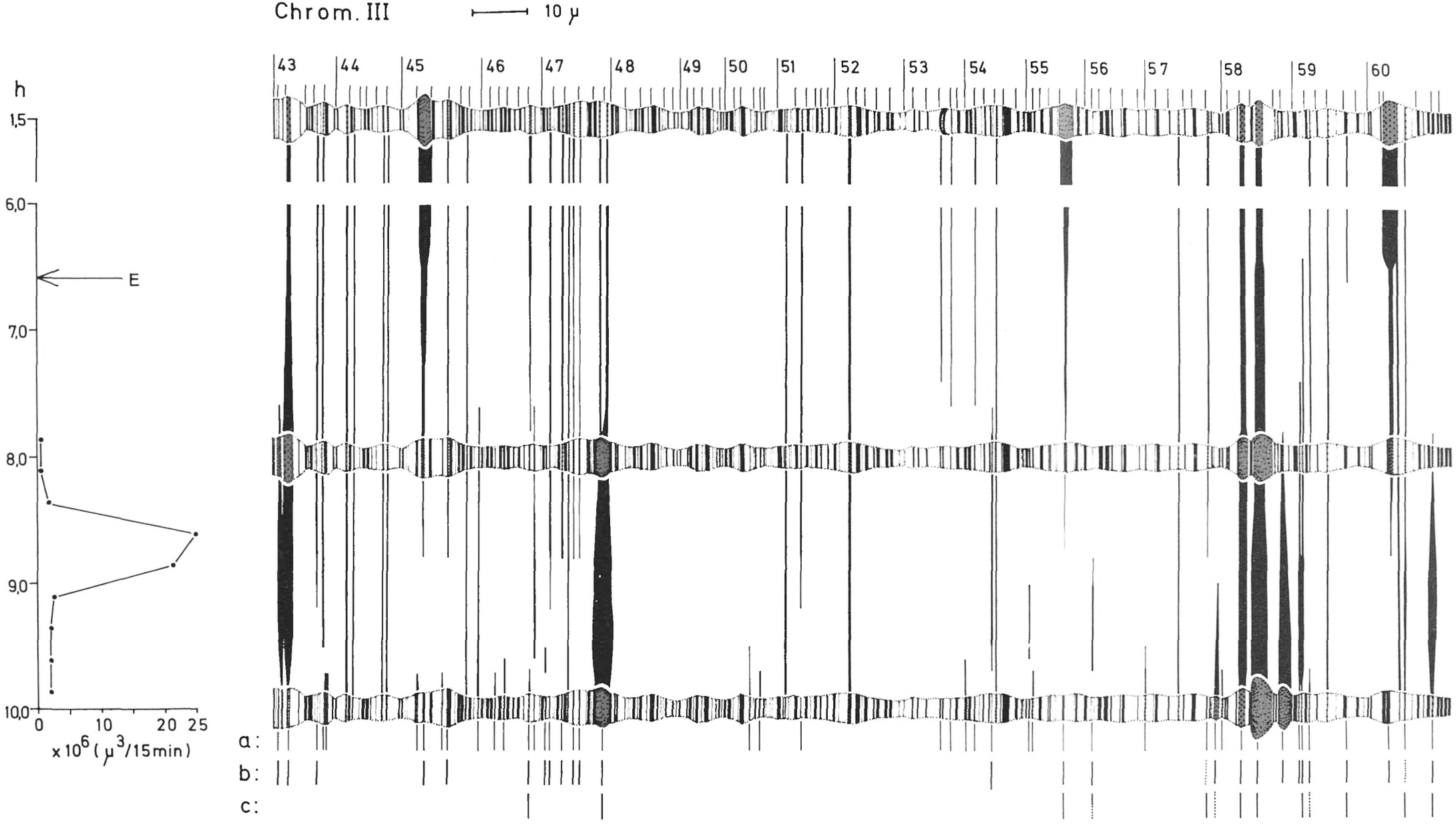
c) Jeder Strich kennzeichnet eine Bande, an der nach Injektion von 0,1 µg Ecdyson (1–2 h n. d. V.) innerhalb von einer Stunde eine Veränderung beobachtet wurde, wie sie in der Normalentwicklung auch auftrat, dort jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt. Die obere Hälfte der Striche symbolisiert die Reaktion nach einer Einwirkungsdauer von 0,5 h, die untere Hälfte diejenige nach einer Einwirkungsdauer von 1 h. Ein Fragezeichen besagt, daß auch in den Kontrollexperimenten eine gleichartige Veränderung der Puffaktivität beobachtet wurde.

Trat in den Injektionsexperimenten an einer Bande im Vergleich zur Normalentwicklung nur eine schwache Veränderung der Aktivität auf, so ist diese in b) und in c) mit einer punktierten Linie gekennzeichnet.

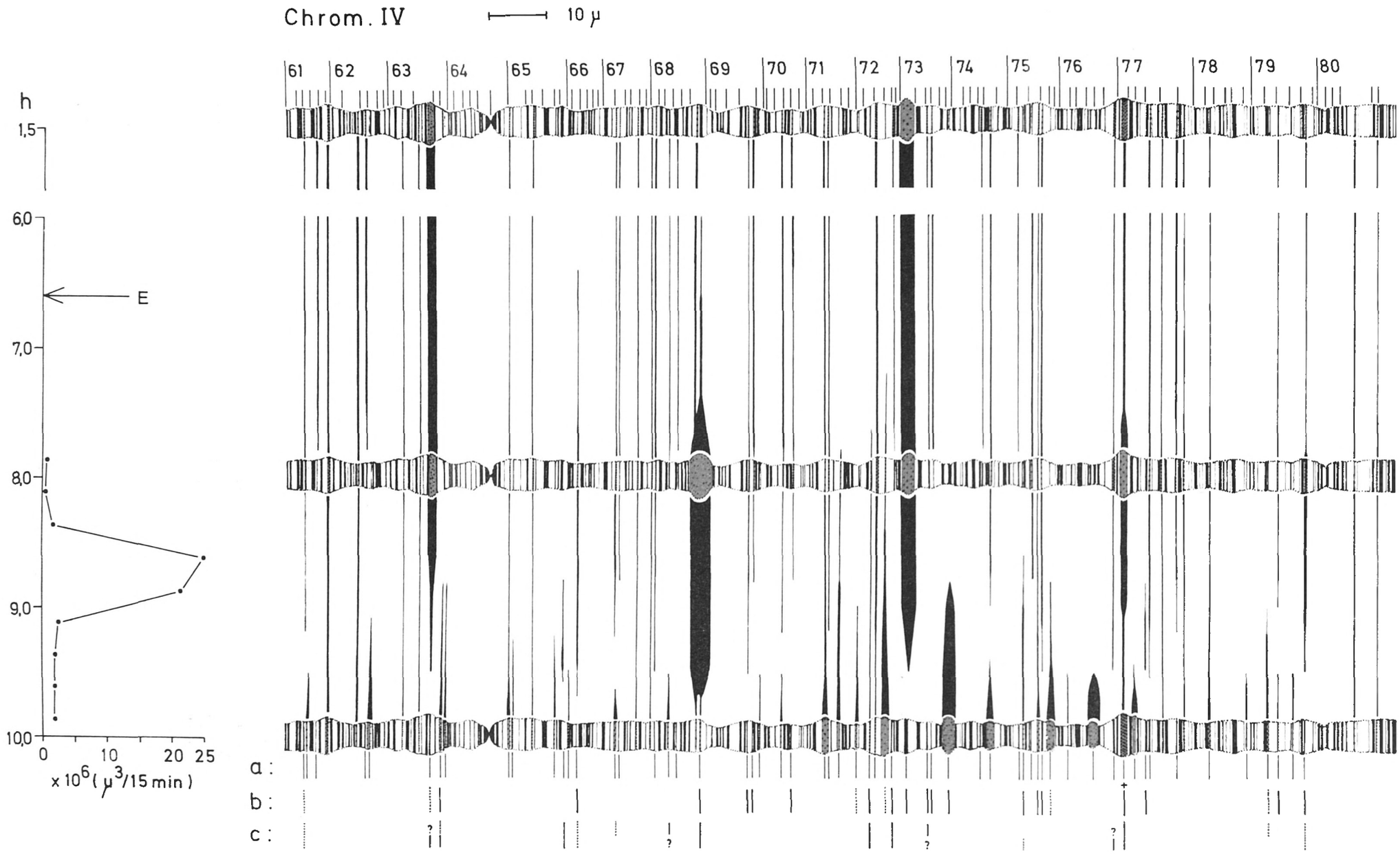

Chrom. I
10 µ
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
h
1,5
6,0
7,0
8,0
9,0
10,0
E
0
10
20
25
x 10⁶(µ³/15 min)
a:
b:
c:

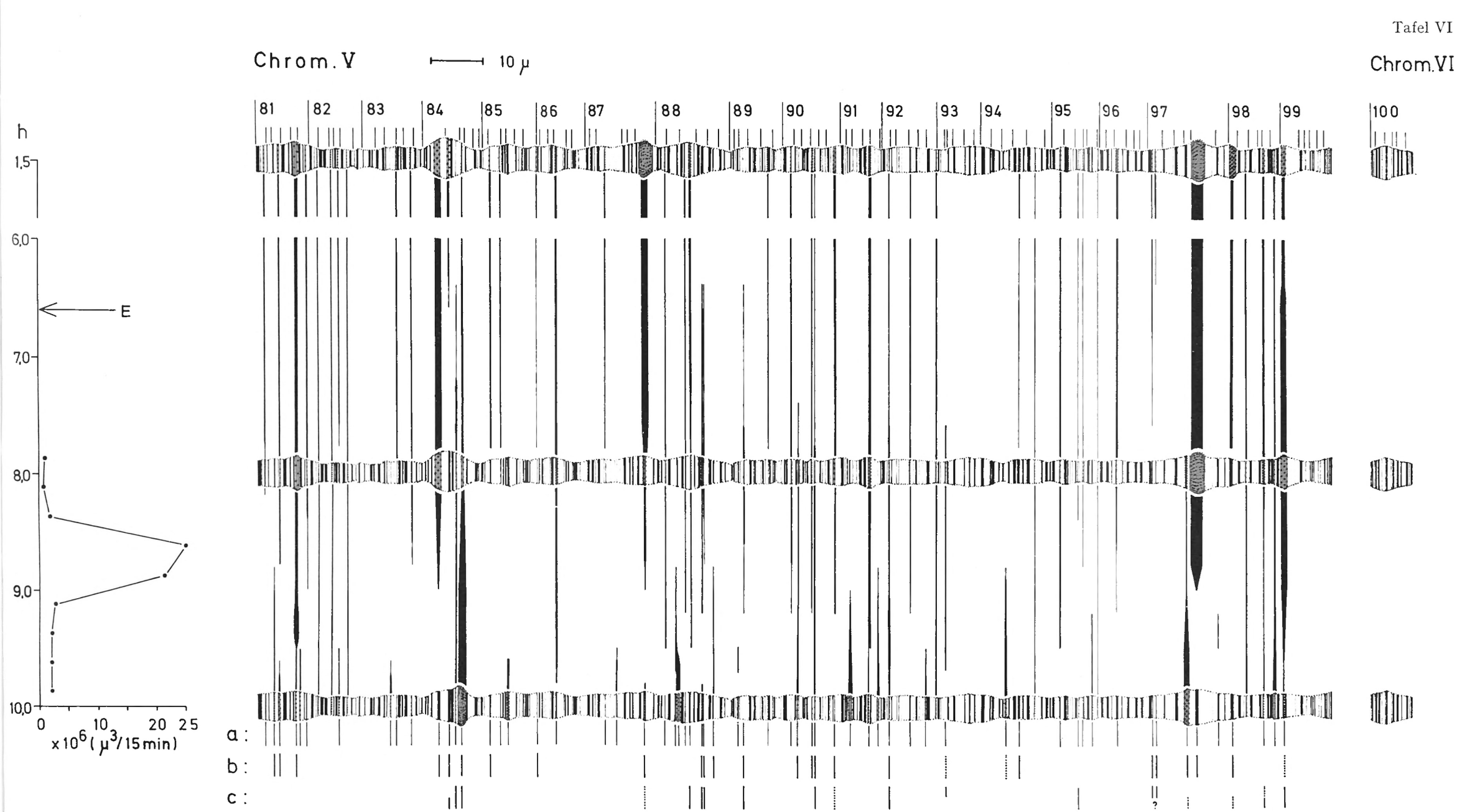
Tafel III


Chrom. II
10µ
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
h
1,5
6,0
E
7,0
8,0
9,0
10,0
0
10
20
25
x 10⁶ (µ³/15 min)
a :
b :
c :


Chrom. III
10 µ
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
h
1,5
6,0
7,0
8,0
9,0
10,0
E
0
10
20
25
x10⁶ (µ³/15min)
a:
b:
c:

Tafel V


Chrom. IV
10 µ
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
h
1,5
6,0
7,0
8,0
9,0
10,0
E
0
10
20
25
x 10⁶ (µ³/15 min)
a :
b :
c :


Chrom. V
10 µ
Chrom.VI
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
h
1,5
6,0
E
7,0
8,0
9,0
10,0
0
10
20
25
x10⁶ (µ³/15 min)
a :
b :
c :