Über die Lokalisierung der Thiaminpyrophosphatase in den Hyphen von *Achlya* sp.

I. PALCZEWSKA

Während der Vitalbeobachtung der Wasserpilze *Achlya* sp. können dieselben Strukturen bemerkt werden, die von Drawert und Mix (1962) bei *Micrasterias rotata* als Diktiosomen beschrieben wurden. Mit Hilfe der Grössenanalyse der Diktiosomen im elektronenmikroskopischen Bild gelangten diese Autoren zur Schlussbemerkung, dass diese Strukturen auch im Lichtmikroskop sichtbar sein müssen. Tatsächlich konnten sie Diktiosomen auch lichtmikroskopisch erkennen. Diese Gebilde besaßen einen Durchmesser von 2–8 μ und eine Höhe von 0,30–0,35 μ und unterschieden sich von den Lipoidtropfen durch eine schwächere Lichtbrechung.

In dieser Arbeit wird die Probe einer näheren Charakterisierung dieser Strukturen mit Hilfe von vitalen und enzymatischen Färbungen unternommen.

Das Innere der cenocetischen Mycel von *Achlya* nehmen die kanalförmigen Vakuolen ein. In dem recht breiten Zytoplasmawandbelag können zahlreiche stabförmige Mitochondrien und weniger zahlreiche, typisch aussehende Sphärosomen (Abb. 2) beobachtet werden; in den älteren Hyphen treten noch Lipoidtropfen auf. Die Diktiosomen, im Gegensatz zu anderen zytoplasmatischen Gebilden, hängen in den inneren Schichten der Zytoplasmastränge (Abb. 3). Sie treten einzeln oder in Gruppen auf (Abb. 1, 2), sind rund gestaltet, ihr Durchmesser liegt in Grenzen von 2–7 μ . Grössere Diktiosomen weisen oft Schichtungen auf; bei vielen kann man einen helleren Hof erkennen. Sie verursachen eine schwächere Lichtbrechung als die Lipoidtropfen und sehen im Phasenkontrast dunkelgrau aus (Abb. 1).

Die Diktiosomen verschieben sich zusammen mit der Zytoplasme, sie können sich ebenfalls an Platz und Stelle bewegen. Ihre Lebhaftigkeit erschwert das Fotografieren.

In den Zellen mit dickflüssiger Zytoplasma gelingt es die Diktiosomen in der Profilstellung zu beobachten. Sie besitzen dann eine stab- oder sichelförmige Gestalt.

Es wurde keine Regelmässigkeit im Auftreten der Diktiosomen in der Mycel beobachtet. Man kann sie sowohl bei jungen und älteren Hyphen als in den sich bildenden Sporangien anzutreffen.

Nach Anwendung von Neutralrot wurde eine Vitalfärbung dieser Gebilde erzielt (Abb. 3). Diese war intensiver als die Färbung der Vakuole. Grössere Diktiosomen färbten sich schwächer als die kleinen, in welchen sich grosse Mengen von Farbstoff ansammelten. Mit Hilfe anderer Farbstoffe, wie Chrysoidine und Bismarck

braun, die zur Vitalfärbung der Golgi-Strukturen beim Tiermaterial verwendet werden (Stockinger 1964), ist es bei *Achlya* nicht gelungen die Diktiosomen zu färben. Methylenblau drang sogar nicht in die Hyphen ein.

Durch Anwendung der klassischen Golgi-Methoden, die auf Bildung von Silber- oder Osmdepositen basiert, wurden nur vereinzelt positive Ergebnisse erreicht. Diese Methode versagt jedoch in vielen Fällen, wie es Untersuchungen des Golgi-Apparates in Tierzellen erwiesen (Baker 1963) und erfordert deswegen einen gleichzeitigen Nachweis mit enzymatischen Methoden.

Thiaminpyrophosphatase wird als spezifisches Enzym für Golgi-Strukturen betrachtet. Ihre Entdeckungsmethode wurde von Novikoff (Novikoff u. Goldfischer 1961) eingeführt. An Hand dieser Methode wurde die Anwesenheit von Thiaminpyrophosphatase in verschiedenen Tierzellen lichtmikroskopisch sowie auch elektronenmikroskopisch entdeckt (Allen 1963; Goldfischer, Essner, Novikoff 1964).

Die Anwendung des Novikoff-Testes für Mycel von *Achlya* ermöglichte die Feststellung, dass die Lokalisierung der Thiaminpyrophosphatase sich nur auf den Diktiosomen beschränkt (Abb. 4). Die Intensivität der Reaktion ist bei den einzelnen Diktiosomen verschieden. Man beobachtet auch ungefärbte Diktiosomen.

Es wurde ebenfalls eine Reaktion für saure und alkalische Phosphatase durchgeführt, die — wie die biochemischen und cytochemischen Forschungen (Kuff, Dalton 1959; Wachstein u. Mitarb. 1961; Dominas u. Mitarb. 1963) und im Falle der sauren Phosphatase auch elektronenmikroskopische Bilder (Allen 1963; Meek, Lane 1963; Poux 1963; Goldfischer, Essner, Novikoff 1964) erwiesen, den Golgi-Strukturen begleiten. Bei der Entdeckung der Aktivität dieser Phosphatasen wurden von mir folgende Methoden angewandt: Gomoris (Pearse 1961), Azofarbstoff-Methode bei Verwendung von Salz Fast Blue RR und die Burstone-Methode (1961) mit Fast Red Violet LB. Kontrolle für saure Phosphatase stellte inkubiertes Material mit Zugabe von $\text{NaF}(10^{-2})$ in Substrat dar, für, alkalische Phosphatase Preinkubation in $0,1 \text{ N HCl}$.

Im Falle der Gomori-Methode, sind die Ergebnisse identisch für beide Phosphatasen; die Diktiosomen färben sich schwarz-braun (Abb. 5, 6). In Anbetracht

Abbildungstexte für die Tafel

Abb. 1 — Lebende Zelle im Phasenkontrast: D-Diktiosom, S-Sphärosom Vergr. 1200 $\times$.

Abb. 2 — Ausschnitt aus einer Hyphe nach Fixierung mit OsO_4 — in der oberen Zytoplasmaschicht stabförmige Mitochondrien und Sphärosomen, in der inneren drei Diktiosomen. Vergr. 1000 $\times$.

Abb. 3 — Ausschnitt aus einer Hyphe nach Vitalfärbung mit Neutralrot. Vergr. 1000 $\times$.

Abb. 4 — Thiaminpyrophosphatase, die Lokalisation des Reaktionsproduktes in den Diktiosomen. Kleine, schwarze Granula sind auch in den Kontrollpräparaten, die in einem Medium ohne Substrat-Zusatz inkubiert werden, vorhanden. Vergr. 1000 $\times$.

Abb. 5 — Saure Phosphatase, Gomori-Methode. Vergr. 1000 $\times$.

Abb. 6 — Alkalische Phosphatase, Gomori-Methode. Vergr. 1000 $\times$. Auf den Abbildungen 5 u. 6 ist das Endprodukt der Phosphatasereaktion ausser Diktiosomen auch in Sphärosomen lokalisiert.

dessen, dass die Burstone-Methode gewisse Schwierigkeiten bei der Identifizierung der Diktiosomen bereitete, wurde diese ausschliesslich nur zusammen mit der Reaktion für Thiaminpyrophosphatase angewandt. Eine Doppelfärbung erwies saure und alkalische Phosphatase neben Thiaminpyrophosphatase nur in einzelnen kleinen (2—3 μ) Diktiosomen. Die Azofarbstoff-Methode ergab negative Resultate.

Alle angewandten Methoden erwiesen eine grosse, mit Sphärosomen verbundene Phosphatasenaktivität.

Aus den dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass die vital sich mit Neutralrot färbenden Zellstrukturen der *Achlya* die einzigen Träger der Thiaminpyrophosphatase sind. Sie enthalten auch saure und alkalische Phosphatase, wobei diese jedoch hauptsächlich in Sphärosomen auftreten.

Im Gegensatz zu den Angaben von Novikoff u. Essner (1962) wurde die Thiaminpyrophosphatase in den Pflanzenzellen gefunden (Gabara 1965; Kwiatkowska, Stęplewski 1965; Olszewska u. Mitarb.). Dieses Enzym tritt in Strukturen auf, die den Golgi-Strukturen ähnlich sind d.h. sich nach Anwendung der Da Fano-Methode schwärzen.

Die entgültige Identifizierung der Diktiosomen wird mit Hilfe des Elektronenmikroskops durchgeführt.

Laboratorium der Cytochemie
Universität Łódź

LITERATURVERZEICHNIS

- Allen J. M., 1963, The properties of Golgi-associated nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase. I. Cytochemical analysis, J. Histochem. Cytochem., 11: 529.
- Baker J. R., 1963, New developments in the Golgi controversy. J. Roy. Microscop. Soc., 82: 145.
- Becker N. H., Novikoff A. B., Göldfischer M. D., 1961, A cytochemical study of the neuronal Golgi apparatus, Archiv Neurol. 5: 497.
- Burstone M. S., 1961, Histochemical demonstration of phosphatases in frozen sections with Naphtol AS-phosphate, J. Histochem. Cytochem. 9: 146.
- Drawert H., Mix M., 1961/62, Zur Frage von Struktur und Funktion des „Golgi-Apparates“ in Pflanzenzellen, Sitz. ber. Ges. Beförd. ges. Naturwiss. Marburg, 83/84: 361.
- Dominas H., Przełęcka A., Sarzała M. G., Taracha M., 1963, Alkaline phosphatase in the Golgi region of the intestinal epithelium of the frog, mouse and monkey fed with different diets, Folia Histochem. Cytochem., 1: 313.
- Gabara B., 1965, Zagadnienie cytokinezy w oparciu o badania nad *Spirogyra* i *Cladophora*. Dissertation, Universität Łódź.
- Goldfischer S., Essner E., Novikoff A. B., 1964, The localization of phosphatase activities at the level of ultrastructure, J. Histochem. Cytochem. 12: 72.
- Kuff E. L., Dalton A. J., 1959, Biochemical studies of isolated Golgi membranes, Subcellular particles, New York, The Ronald Press Comp.
- Kwiatkowska M., Stęplewski Z., 1965, Cytochemical studies on the relation between Golgi region and elaioplasts in *Malva neglecta*, Folia Histochem. Cytochem. (im Druck).
- Meek G. A., Lane N. J., 1963, The ultrastructural localization of phosphatases in the nuerones of the Snail, *Helix aspersa*, J. Roy. Microscop. Soc. 82: 193.

- Novikoff A. B., Essner E., 1962, Pathological changes in cytoplasmic organelles, Federation Proc. 21: No 6.
- Novikoff A. B., Goldfischer S., 1961, Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies, Proc. Natl. Ac. Sci. 47: 802.
- Olszewska M. J., Gabara B., Stęplewski Z., 1966, Recherches cytochimiques sur la succession d'enzymes hydrolytiques, sur la présence de la thiamine pyrophosphatase et des polysaccharides au cours du développement de la plaque cellulaire, Protoplasma (im Druck).
- Pearse A. E. G., 1961, Histochemistry theoretical and applied, London J. A. Churchill Ltd..
- Poux N., 1963, Localisation de la phosphatase acide dans les cellules méristématiques de blé (*Triticum vulgare* Vill.), J. Micr. 2: 485.
- Stockinger L., 1964, Vitalfärbung und Vitalfluorochromierung tierischer Zellen, Wien, Springer Verlag, 54.
- Wachstein M., Meissel E., Falcon C., 1961, Histochemistry of thiolacetic acid esterase: a comparison with non-specific esterase and inhibitors on intracellular localization, J. Histochem. Cytochem. 9: 325.

Lokalizacja tiaminowej pirofosfatazy w strzępkach Achlya sp.

Streszczenie

W strzępkach grzybní *Achlya* sp. obserwowano w mikroskopie świetlnym utwory w kształcie krążków o średnicy 2—7 μ . Utwory te barwią się przyżyciowo czerwinią obojętną; nie wyczerniają się przy zastosowaniu metody da Fano. W komórce są jedynymi nośnikami tiaminowej pirofosfatazy. Zawierają również fosfatazę kwaśną i zasadową. Obecność TPPazy, wyznacznika struktur Golgiego w komórce zwierzęcej wskazuje, że utwory te są diktiosomami.