

und mehr gelbgrün leuchtet. In dem gering fluoreszierenden Zytoplasma liegen die gelbrot leuchtenden, stark basophilen Grana. Besonders interessant aber war deren

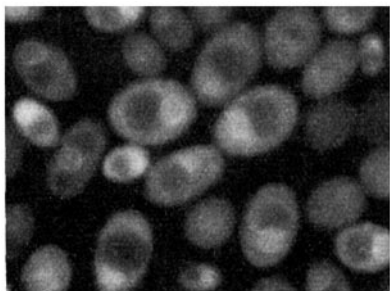


Abb. 2. *Saccharomyces cerevisiae*, Akridinorange 1:5000, Fluoreszenz 1600:1

Verhalten einem zweiten Fluorochrom gegenüber, dem Berberinsulfat (Abb. 3). Von ihm wurden die Grana *in vivo* selektiv tingiert und leuchteten allein in gelb-

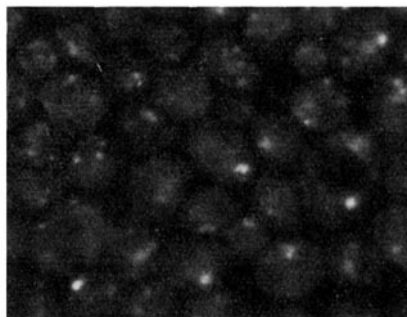


Abb. 3. *Saccharomyces cerevisiae*, Berberinsulfat 1:1000, Fluoreszenz 1600:1.

grünem Fluoreszenzlicht. Kern, Plasma und Vakuole zeigen im ungeschädigten lebenden Zustand keine Affinität zu diesem Farbstoff.

Diskussion

Zur Interpretation der Kernverhältnisse stehen zwei Ansichten zur Diskussion: Die erste, von ROCHLINA¹, bezeichnet das der grossen Vakuole aufsitzende Gebilde als chromatinarme Kernblase, während das euchromatische Kernmaterial sich an einer Wandseite angeordnet finden soll. Die zweite Ansicht ist die von LINDEGREN². Nach ihr ist die grosse, bisher als Zellsaftraum angesprochene Vakuole als Kern aufzufassen, während dem von ROCHLINA als «Kern» angesprochenen Gebilde lediglich die Bedeutung eines Zentrosoms zugeschrieben wird. Ohne sich auf eine der möglichen Deutungen festlegen zu wollen, möchte ich das Feulgen-positive Gebilde, das sich fluoreszenzmikroskopisch deutlich darstellen lässt, als euchromatisches Kernäquivalent betrachten. Auch bezüglich der Kernteilungsverhältnisse (Mitose oder Amitose?) besteht bisher noch keine allgemein anerkannte Meinung.

Was die Bedeutung der metachromatischen Körperchen (syn. Volutingranula) anbelangt, so bestehen auch hier die verschiedensten Ansichten. Da in der Hefezelle kein heterochromatisches Nukleolarsystem nachweisbar

war und CASPERSSON und BRANDT¹ auf UV.-mikroskopischem Wege Nukleinsäuren (vom Ribose-Typ) in den Granula nachweisen konnten, wurden sie von diesen Autoren zum Nukleolus-Heterochromatin-System gehörig angesehen. Im Anschluss an den topochemischen Nachweis von Metaphosphaten in den Körnchen durch WIAME² sahen verschiedene Autoren, wie HOFFMANN-OSTENHOF und WEIGERT³, in ihnen lediglich Phosphatspeicher, vergleichbar den tierischen Phosphagenen. Durch den Nachweis der selektiven Berberinspeicherung aber (siehe oben) wird die Chondriosomennatur dieser Grana unterstrichen. Nach den Ergebnissen von SCHMITZ⁴ an Grana von Ascites-Tumorzellen und PERNER⁵ an Granula (sogenannten Mikrosomen) höherer Pflanzenzellen ist die Befähigung zur Berberinspeicherung *in vivo* an die Redox-Orte der Zelle gebunden. Eigene vergleichende Untersuchungen mit dem Redox-Indikator Neo-tetrazoliumchlorid (NTC.) bestätigten die Reduktionseigenschaften der Grana. Demnach sind in den metachromatischen Granula Chondriosomen der Hefe zu erblicken, die sich in diesem Falle durch besondere Metaphosphatpeicherung auszeichnen. Nach den Untersuchungen von ZOLLINGER u.a.⁶ ist das Vorkommen von Ribonukleinsäure in Chondriosomen obligat.

A. KRIEG

Mikrolaboratorium Zeiss-Winkel, Göttingen, den 16. November 1953.

Summary

In confirmation of STRUGGER's statements it is possible to demonstrate in yeast-cells the structure which is considered by ROCHLINA to be nuclear, by means of acridin orange in the fluorescence microscope (Fig. 2). The large vacuole contains no basophilic material and therefore appears dark. The metachromatic granula appear as small red luminous particles. An interesting fact is that they store selectively the respiratory-poison "berberin". Since berberin fluoresces deep yellow, it is possible in this manner to isolate the metachromatic granula (Fig. 3). The function of chondriosomes is attributed to the particles.

¹ T. CASPERSSON und A. BRANDT, *Protoplasma* 35, 507 (1941).

² J. M. WIAME, *Biochim. Biophys. Acta* 1, 234 (1947).

³ O. HOFFMANN-OSTENHOF und W. WEIGERT, *Naturwissenschaften* 39, 303 (1952).

⁴ H. SCHMITZ, *Naturwissenschaften* 38, 405 (1951).

⁵ E. S. PERNER, *Ber. dtsh. bot. Ges.* 65, 52 (1952).

⁶ H. U. ZOLLINGER, *Exper.* 6, 14 (1950).

Partial Disintegration of Cytoplasmic Structures of *Amoeba proteus* after Fixation with Osmium tetroxide¹

It is generally assumed that cytological preparations for light microscopy fixed by osmium tetroxide are almost equivalent to the living state, because the structure of the hyaloplasm does not appear to be altered and the very instable mitochondria are well preserved. Many authors, working with preparations for the electron microscope, also seem to regard osmium tetroxide as the best suited fixing agent² because it does

¹ Carried out with the aid of the Federal Commission for Advancement of Scientific Research from the Fund for Promoting Employment.

² K. R. PORTER und F. L. KALLMAN, *Ann. New York Acad. Sci.* 54, 882 (1952).

¹ E. ROCHLINA, *Zbl. Bakt.* II 88, 304 (1933).

² C. C. LINDEGREEN, *Mycologia* 37, 767 (1945).

not produce coarse precipitations. This opinion could not be fully substantiated by the observations of WAHLI (1953)¹ on caseinates and cytoplasmic particles of *Tubifex* embryonic cells. The particles of *Tubifex* were sometimes only partially preserved by OsO_4 in contrast to the effect of other fixing actions². We have often observed similar phenomena in cytoplasmic structures of *Amoeba*³. We recently found some very significant cases illustrating clearly the incomplete fixing effects of OsO_4 .

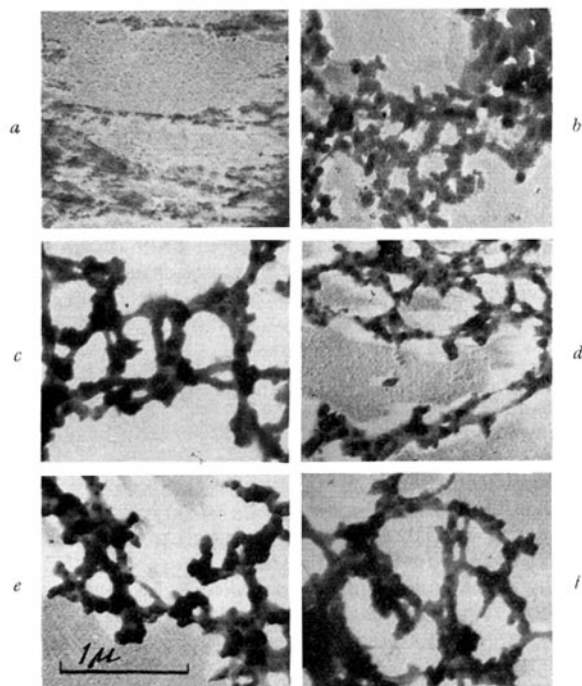


Fig. 1.—Structure of hyaloplasm fragments of *Amoeba* after action of different fixing fluids.—(a) Pretreated by Versene fixed with OsO_4 . Cotton-like appearance of fibrous material, no microsome-like bodies visible. (b) Fixed with formaline. Reticulum of globular formations, partly with very dense bodies, partly somewhat disintegrated. (c) Pretreated by Versene. Fixed with formaline and acetic acid. Reticulum of coagulated hyaloplasm with dense bodies. (d) Pretreated by Versene. Fixed with formaline, alcohol, and acetic acid (Serra). Reticulum with dense bodies of smaller size than in e and f. (e) Pretreated by Versene. Fixed with formaline, picric and acetic acid (Bouin). Similar structures and bodies as in f. (f) Pretreated by Versene. Fixed with bichromate, formaline and acetic acid (Regaud acidified). Very distinct dark bodies in hyaloplasmic reticulum.

Hyaloplasm and "microsomes" of *Amoeba*. Since the first experiments of CLAUDE, evidence has been accumulated to show that there is a population of small submicroscopic bodies in the cells, which can be separated by ultra-centrifuging⁴. These microsomes are generally not to be found in ultra-thin sections of material fixed with OsO_4 . Only very complex groupings of microsome chains (ergastoplasm) have been described in Osmium fixed and highly specialised liver and kidney

cells¹. But sections of cells which are not very highly specialised when fixed with OsO_4 , do not show distinct microsomes, which suggests the partial disappearance of these bodies after fixation. The very recent researches on successful isolation of sarcosomes² and microsomes of high density with the aid of a Ca-chelating substance "Versene" (Di-Na-salt of ethylene-diamine tetraacetic acid)³ indicate that in this case some autolyzing enzymes are blocked. Therefore, a good stabilization of the structure of these particles *in vivo* seems possible.

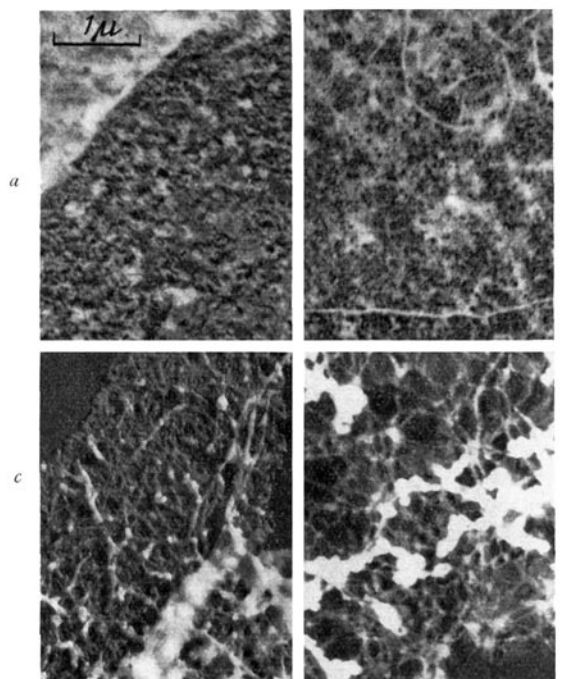


Fig. 2.—Wall of the contractile vacuole. Parts of inner and fibrous layer after action of different fixing fluids.—(a) Fixation by formaline, treated afterwards with OsO_4 . No fibrous and globular structures visible. (b) Fixation by OsO_4 . Some coarser fibres are visible but no globules. (c) Pretreated by Versene. Fixed with formaline, picric and acetic acid (Bouin). Network of distinct fibers and globules present. (d) Fixed with Bouin. Rest of hyaloplasmic fragments present.

We have applied these results to *Amoeba*. Before the fixation the amoebae were treated with a very diluted solution of Versene (0.0005 M), in order to stabilize the cytoplasmic particles. Furthermore, we have used fixing fluids containing acetic acid, since it is known that ribonucleoproteins are totally precipitated by this acid. In fact several fixing fluids containing acetic acid (Bouin, Serra, Carnoy, Regaud), gave very similar pictures of hyaloplasmic fragments (Fig. 1b–1f). The network of the coagulated hyaloplasm always contains numerous globular bodies with a diameter of between 30 and 100 m μ (see also footnote 3(b), Fig. 4, 6, 7) which are arranged either in chains or in strands. They absorb the electrons much more strongly than the hyaloplasmic ground-substance. The same microsome-like bodies are obtained without fixation after suspending hyaloplasm in distilled water⁴ and drying in air. Similar results were

¹ H. R. WAHLI, Diss. phil.-nat. Fakultät, Univ. Bern 1953.

² F. E. LEHMANN and H. R. WAHLI, Verh. Schweiz. Naturf. Ges. 1953 (in press) and Z. Zellf. 39, 618 (1954).

³ (a) A. BAIRATI and F. E. LEHMANN, Rev. suisse Zool. 58, 445 (1951); (b) Pubbl. Staz. Zool. Napoli 23, Suppl., 193 (1951).

⁴ W. C. SCHNEIDER and G. H. HOGBOOM, Cancer Res. 11, 1 (1951).

¹ W. BERNHARD, F. HAGUENAU, A. GAUTIER and CH. OBERLING, Z. Zellf. 37, 281 (1952).

² E. C. SLATER and K. W. CLELAND, Nature 170, 118 (1952).

³ H. HOLTER, M. OTTESEN and R. WEBER, Exper. 9, 346 (1953).

⁴ A. BAIRATI and F. E. LEHMANN, Rev. suisse Zool. 58, 445 (1951).

reached with the cytoplasm of *Tubifex*¹, which also contains microsome-like bodies.

In contrast to these different fixing methods, which uniformly preserve "microsomes", the fixation by osmium tetroxide even after pretreatment with Versene produces hyaloplasmic structure of quite different appearance (Fig. 1a). The fragments seem to consist of an irregular fibrous mass of cotton-like appearance, without any distinct bodies of microsome size. These "Osmium-structure" of hyaloplasm has been produced many times in our experiments (see also footnote 3(b), pag. 174, left column, Fig. 5).

Contractile vacuole. Our electron-microscopical observations have shown that there exists, between the internal limiting membrane and the external hyaloplasmic layer, an "intermediate layer" which contains a fibrous network and many globular bodies of the size of microsomes. The presence of this fibrous layer makes it possible to explain fully the data of polarized light microscopy.

We have applied a series of different fixing agents in order to obtain a great variety of pictures (Fig. 2). There is a clear contrast between the structures preserved by osmium tetroxide or formaline (Fig. 2a–b) and those obtained with all other fixing agents, especially after pretreatment by Versene (Fig. 2c and d). Whereas most fixing fluids preserve more or less clearly also the fine fibrous structures and numerous globular bodies of microsome size, osmium tetroxide leaves only the coarsest fibres more or less intact but no traces of globular bodies. We conclude from this that osmium tetroxide acts as a very incomplete fixing agent with disintegrating effects in the case of the fibrous layer of the contractile vacuole. This result is in accordance with the statement on the structure-"reducing" action of osmium tetroxide and formaline².

General remarks. We do not wish to draw general conclusions from our experiments on the hyaloplasm and the wall of the contractile vacuole of *Amoeba*. These results are substantiated, however, by our observations on the cytoplasm of *Tubifex*. At least for the cases here mentioned, it seems justifiable to state that osmium tetroxide by itself cannot adequately preserve all structures of cytoplasm. It might be assumed that especially structures rich in nucleoproteins and some enzymes are neither fast enough nor completely enough precipitated by osmium tetroxide to avoid secondary disintegrations. This has to be investigated further (see also³). To our opinion the almost exclusive use of osmium tetroxide for the preparation of ultra-fine sections has somewhat misled the study of cytoplasmic structures, especially of microsomes. We hope to have shown that it is necessary for each cytoplasmic material to check by careful comparison of several fixing agents how reliable the action of osmium tetroxide is, especially when structures are involved which are rich in nucleoproteins.

A. BAIRATI⁴ and F. E. LEHMANN

Theodor Kocher Institute and Department of Zoophysiology, Zoological Institute, University of Berne, November 3, 1953.

Zusammenfassung

Befunde an Kaseinaten sowie am Zytoplasma von *Amoeba* und *Tubifex* liessen vermuten, dass die Fixie-

rung mit OsO₄ nicht immer eine optimale Struktur-erhaltung gewährleistet. Es wird nun für die mikrosomenartigen Plasmapartikel der Amöbe nachgewiesen, dass diese nach Vorbehandlung mit «Versene» sehr gut durch essigsäurehaltige Fixierer konserviert werden können, während OsO₄-Fixierung diese Gebilde nicht erhält. In ähnlicher Weise kann die polarisationsoptisch nachweisbare Faserschicht der kontraktile Vakuole mit Fibrillen und Mikrosomen durch essigsäure Fixierer erhalten werden. Auch hier erfolgt nach OsO₄-Fixierung eine schlechte Erhaltung der Fasern und ein völliges Verschwinden der Mikrosomen. Diese Befunde sollen darauf hinweisen, dass die Qualität der OsO₄-Fixierung von Fall zu Fall vergleichend geprüft werden muss.

Differente Chromosomenstruktur in verschiedenen Geweben

Zwischen den Zellen eines vielzelligen Organismus ist Arbeitsteilung eine allgemeine Erscheinung. Die verschiedenen Funktionen ausübenden Zellen entstehen aus einer und derselben Eizelle. Mit fortschreitender Entwicklung werden bestimmte Keimteile, noch ehe sie sich differenzieren, determiniert. Mit der Differenzierung werden im Zytoplasma Strukturen gebildet, die mit bestimmten speziellen Funktionen der Zelle im Zusammenhang stehen. Nach der heute noch weitgehend herrschenden Auffassung sind Determination und Differenzierung rein zytoplasmatische Erscheinungen, wogegen der Kern an Bedeutung zurücktritt. Er ist zwar unerlässlich als das letzten Endes alle Prozesse kontrollierende Zentrum, wird aber keineswegs differenziert. Neuerdings mehren sich die Stimmen, dass auch Besonderheiten des Kerns, besonders des chromatischen Materials, einer differenzierten Zelle mit deren Funktion in enger Beziehung stehen, dass also, wie im Zytoplasma, von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich morphologisch-strukturelle Veränderungen bei der Differenzierung stattfinden, die für bestimmte Funktionen der differenzierten Zelle verantwortlich sind.

Die spezifischen und für eine Zellart typischen Prozesse sind entweder zyklischer Natur, wie bei der Tätigkeit der apokrinen Drüsenzellen, oder aber sie sind es nicht. Während in einer Reihe von Fällen nichtzyklische Differenzierungsprozesse in der einmal begonnenen Richtung bleiben, also irreversibel sind, kann man in anderen Fällen eine grössere Wandelbarkeit der beteiligten Strukturen beobachten. Es ist allgemein bekannt, dass zu bestimmten Funktionen bestimmte Strukturen des Plasmas gehören und dass auch im Fall rhythmisch verlaufender Funktionen sich die korrespondierenden plasmatischen Strukturen ändern. Mit neueren Methoden können diesen zytoplasmatischen Strukturveränderungen parallel verlaufende Vorgänge auch im Kern festgestellt werden. Andererseits, wenn man von Gewebe zu Gewebe vom Differenzierungsbeginn an unterschiedlich aussehendes chromatisches Material findet, so darf man zwischen dieser nukleären Strukturmodifikation und den oben erwähnten irreversiblen, gerichteten spezifischen Funktionen der Zelle das Vorhandensein von direkten Beziehungen annehmen. Dasselbe gilt auch, wenn im Falle zyklisch sich mit der Funktion verändernden Strukturen, zum Beispiel zyklische Ansammlungen und Verlagerungen des chromatischen Materials, stattfinden. Dass derartige Beziehungen tatsächlich bestehen, beweisen u. a. folgende Beobachtungen: Wenn man dasselbe Riesenchromosom im gleichen Gewebe alter und

¹ F. E. LEHMANN and H. R. WAHLI, Verh. schweiz. Naturf. Ges. 1953 (in press) and Z. Zellf. 39, 618 (1954).

² F. HAGUENAU and W. BERNHARD, Exp. cell res. 3, 629 (1951).

³ K. R. PORTER and F. L. KALLMAN, Exp. cell res. 4, 127 (1953).

⁴ Institute of Anatomy, Bari. At present guest of the Theodor Kocher Institute, Berne.