

Fig. 3. Live culture showing lumen (L) and separating cyst attached to the cellular process.  $\times 37$ .

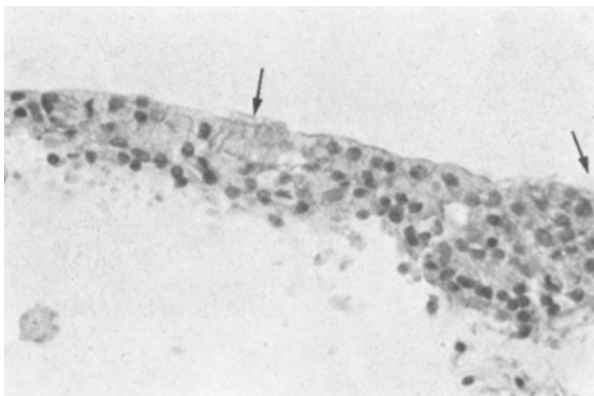


Fig. 4. Magnified view of the lining of the vesicle showing patches of ciliated epithelium ( $\rightarrow$ ).  $\times 340$ .

carbon particles and its binding into mucus droplets were of significance. If formed *in vivo*, these would go down the pharynx by gravitation. The isochronal ciliary movements as observed in culture could not possibly help the flow in particular direction, but would help the formation of bigger droplets, which would tend to trap the dust, bacteria, and other particles and which could finally be removed by the action of pharyngeal muscles. Thus the experimental studies seem to contradict the usual belief that the ciliary movement occurs in a particular direction. The study of the growth in culture suggests some interesting postulations. The migratory movements (observed from 3rd week onwards) of growing epithelial column which surround foreign materials and cell debris, and the formation of lumina lined with stratified ciliated columnar epithelium as well as its final separation as a cyst, suggest possibly a way of getting rid of more sticky material which cannot be dealt either by mucus adhesion and ciliary movement alone<sup>8</sup>.

**Résumé.** Des cultures d'épithélium naso-pharyngien ont donné naissance à des couches et des colonnes semblables à celles de l'épithélium *in vivo*. Cette distribution irrégulière de cellules ciliées, de mucosités, et de cellules polyédriques ont une action coordonnée qui crée un épithélium auto-détergent qui expulse les corps étrangers.

N. B. BHONSALE

Department of Anatomy, University of Singapore,  
Singapore 3, 17 February 1970.

<sup>8</sup> Acknowledgement. The author is grateful to Prof. R. KANAGASUNTERAM for his supervision of experimental work and advice in preparing the manuscript, and to Prof. LIM KOK ANN, Professor of Bacteriology, University of Singapore, for providing laboratory facilities. The technical assistance in microphotography of Mr. CHUA BENG CHENG and Mr. J. J. PAREIRA, and histological work of Mr. LEE CHUAN TEE is also acknowledged.

### Ultrastruktur der Symbionten in Oozyten von *Ornithodoros moubata*, Murray (Ixodoidea: Argasidae) nach simultaner Glutaraldehyd-Osmiumfixierung und Nachbehandlung mit Uranylacetat (Triple-Fixation)<sup>1,2</sup>

Mit einer Mischung von Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) konnten Nachteile gebräuchlicher Fixationen wie  $\text{OsO}_4$  allein (O) oder Glutaraldehyd gefolgt von  $\text{OsO}_4$  (G/O) bei Nierengewebe vermieden werden<sup>3</sup>. Durch zusätzliche Nachbehandlung mit wässriger Uranylacetatlösung wurden Strukturerhaltung und Membrandarstellung von Leukozyten verbessert<sup>4</sup>. Diese leicht modifizierte Triple-Fixation (TF) erzielte ebenfalls gute Resultate an freien Zellen, die mittels Membranfiltration aus kleinsten Volumina von Körperflüssigkeiten gewonnen wurden<sup>5</sup>.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss der TF auf die Ultrastruktur der rickettsienähnlichen Mikroorganismen gezeigt werden, welche intrazellulär in Zeckenorganen vorkommen<sup>6-13</sup>. Dabei gilt unser Interesse hauptsächlich der Darstellung membranöser Strukturen und der Wirkung des Uranylacetats auf die Verteilung der DNA-haltigen Fibrillen<sup>14,15</sup> und auf die ribosomenartigen Partikel dieser Symbionten.

**Material und Arbeitsmethoden.** Die hier verwendeten *Ornithodoros*-Zecken stammen aus der Ulanga-Region (Tansania) und werden seit mehreren Jahren am Tropeninstitut gezüchtet.

Die Sektion der Ovarien<sup>16</sup> erfolgte in physiologischer Kochsalzlösung oder direkt im Fixierungsgemisch bei 0–2 °C.

Für die Fixation hielt ich mich, mit geringen Abweichungen, an das Rezept von HIRSCH und FEDORKO<sup>4</sup>. Weil die Oozyten einen bedeutend größeren Durchmesser aufweisen als Leukozyten und vor allem in den späten Vitellogenesephasen schwer durchdringbar sind, wurde die Fixierungszeit auf 2 Stunden erhöht.

**Fixierungsgemisch** (nicht haltbar): 1 Teil A + 2 Teile B (vor Gebrauch bei 0 °C frisch ansetzen).

**Lösung A** (haltbar): 2,5% Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer (CP); pH 7,4.

**Lösung B** (haltbar): 1%  $\text{OsO}_4$  in 0,1M CP; pH 7,4.

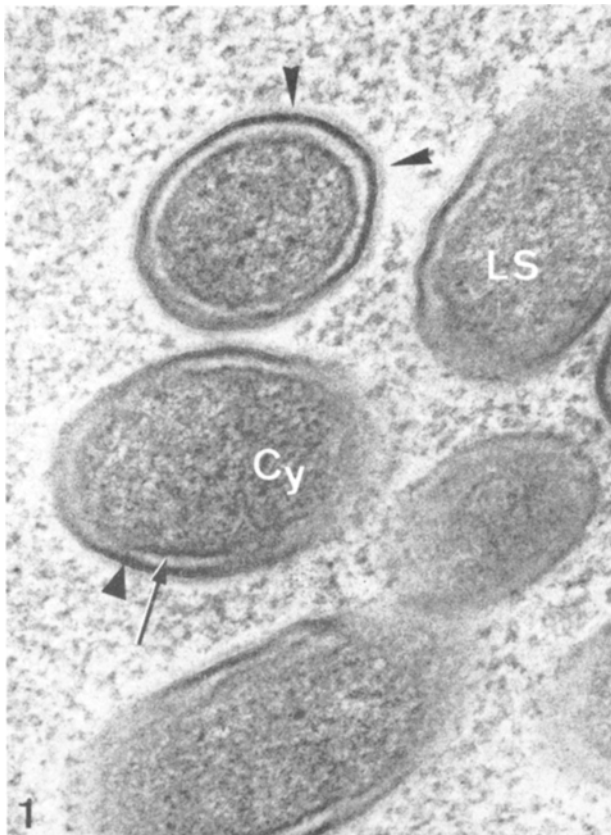


Fig. 1. Längliche Symbionten (LS) im Cytoplasma einer Ovozyte. Nach Uranylacetat-Behandlung umhüllt ein feiner, dunkler Hof (▶) die Bakterien, welche von 2 Membranen umgeben sind (äußere Membran dicker: ▶, innere Membran dünner: →). Im granulären Cytoplasma (Cy) sind die DNA-haltigen Fibrillen schlecht sichtbar.  $\times 81000$ .

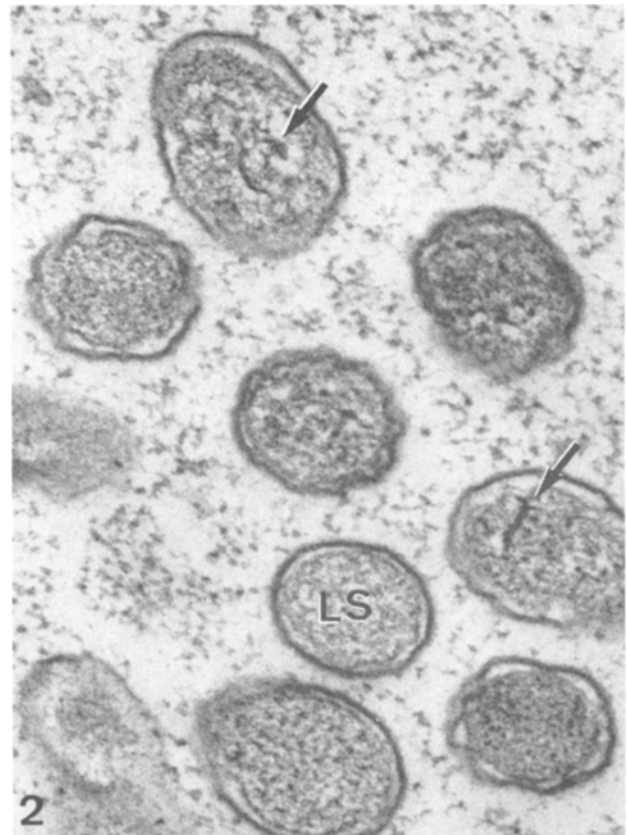


Fig. 2. Ohne Uranylacetat-Nachfixierung sind die länglichen Symbionten (LS) geschrumpft. Der umhüllende Hof tritt kaum in Erscheinung oder fehlt, die DNA-haltigen Fibrillen sind verklumpt (→) und deshalb gut sichtbar.  $\times 66000$ .

Man fixiert bei  $0-2^{\circ}\text{C}$ , da bei erhöhter Temperatur schwarzes, reduziertes Osmium ausfällt<sup>3</sup>. Verfärbt sich die Lösung im Laufe der Fixation (violett-schwarz), so wird sie gegen neu angesetztes Gemisch ausgetauscht. Fixierungstemperaturen unter  $0^{\circ}\text{C}$  haben sich nicht bewährt, weil ultrastrukturelle Schäden durch Eiskristallbildung auftreten. Die Präparate werden über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  in  $0,1\text{M}$  CP + 5% Saccharose gewaschen.

Nachfixiert wird mit 0,25% Uranylacetat, gelöst in  $0,1\text{M}$  Natriumacetat, pH 6,1, während 2 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Die Uranylacetat-Behandlung wurde bei einigen Präparaten weggelassen. Der Einfluss der Nachfixation auf gewisse Strukturen wird unten beschrieben.

Entwässern: Acetonreihe und Propylenoxid; Durchdringen: Propylenoxid/Epon; Einbetten: Epon; Schneiden: Glasmesser, Reichert OmU<sub>2</sub>, LKB Ultratome I; Kontrast: Uranylacetat, Bleizitrat; Aufnahmen: Philips EM 300, Zeiss EM 9.

**Resultate.** In den Ovozyten von *O. moubata* kommen längliche und runde rickettsienähnliche Symbionten vor<sup>12</sup>. Die langen Formen sind von 2 Membranen umgeben, wobei nach TF die äussere deutlich dicker und komplexer ist als die innere (Figur 1). Das Zytoplasma erscheint fein granuliert. Zwischen den Granula liegen feinste, nur undeutlich sichtbare Fäden, die wahrscheinlich DNA enthalten, wie dies bei anderen Bakterien gezeigt worden ist<sup>14,15</sup>. Ein abgrenzbares Nukleoid mit fibrillärem Nukleoplasma existiert nicht. Die Symbionten

werden gegen das Wirtspasma hin von einer dünnen Schicht mittlerer Elektronendichte umschlossen (Figur 1), welche ohne Uranylacetat-Behandlung kaum in Erscheinung tritt oder fehlt (Figur 2). Ohne diese Nachfixation

<sup>1</sup> Die Arbeit wurde vom Schweiz. Nationalfonds unterstützt.

<sup>2</sup> Frau S. LATSCHA-STOLLER möchte ich für ihre unentbehrliche technische Mitarbeit meinen besten Dank aussprechen.

<sup>3</sup> B. F. TRUMP und R. E. BULGER, Lab. Invest. 15, 368 (1966).

<sup>4</sup> J. G. HIRSCH und M. E. FEDORKO, J. Cell. Biol. 38, 615 (1968).

<sup>5</sup> G. KISTLER, W. SCHERLE und T. HAUSWIRTH, Experientia 26, 331 (1970).

<sup>6</sup> E. MUDROW, Z. Parasitenk. 5, 138 (1932).

<sup>7</sup> E. C. SUITOR und E. WEISS, J. Insect Path. 3, 148 (1961).

<sup>8</sup> M. A. ROSHDY, J. Insect Path. 3, 148 (1961).

<sup>9</sup> M. A. ROSHDY, Proc. Egypt. Acad. Sci. 17, 74 (1962/63).

<sup>10</sup> M. A. ROSHDY, J. Insect Path. 6, 170 (1964).

<sup>11</sup> P. BUCHNER, Endosymbiosis of animals with plant microorganisms (Interscience Publishers, New York, London 1965), p. 909.

<sup>12</sup> H. HECKER, A. AESCHLIMANN und M. J. BURCKHARDT, Acta trop. 25, 256 (1968).

<sup>13</sup> H. HECKER und A. AESCHLIMANN, Z. Tropenmed. Parasit., 27, 31 (1970).

<sup>14</sup> E. KELLENBERGER, A. RYTER und J. SÉCHAUD, J. biophys. biochem. Cytol. 4, 671 (1958).

<sup>15</sup> A. RYTER und E. KELLENBERGER, Z. Naturforsch. 13b, 597 (1958).

<sup>16</sup> R. GEIGY und A. HERBIG, Erreger und Überträger tropischer Krankheiten (Verlag für Recht und Gesellschaft, Basel 1955), Acta trop. Suppl. 6, p. 472.

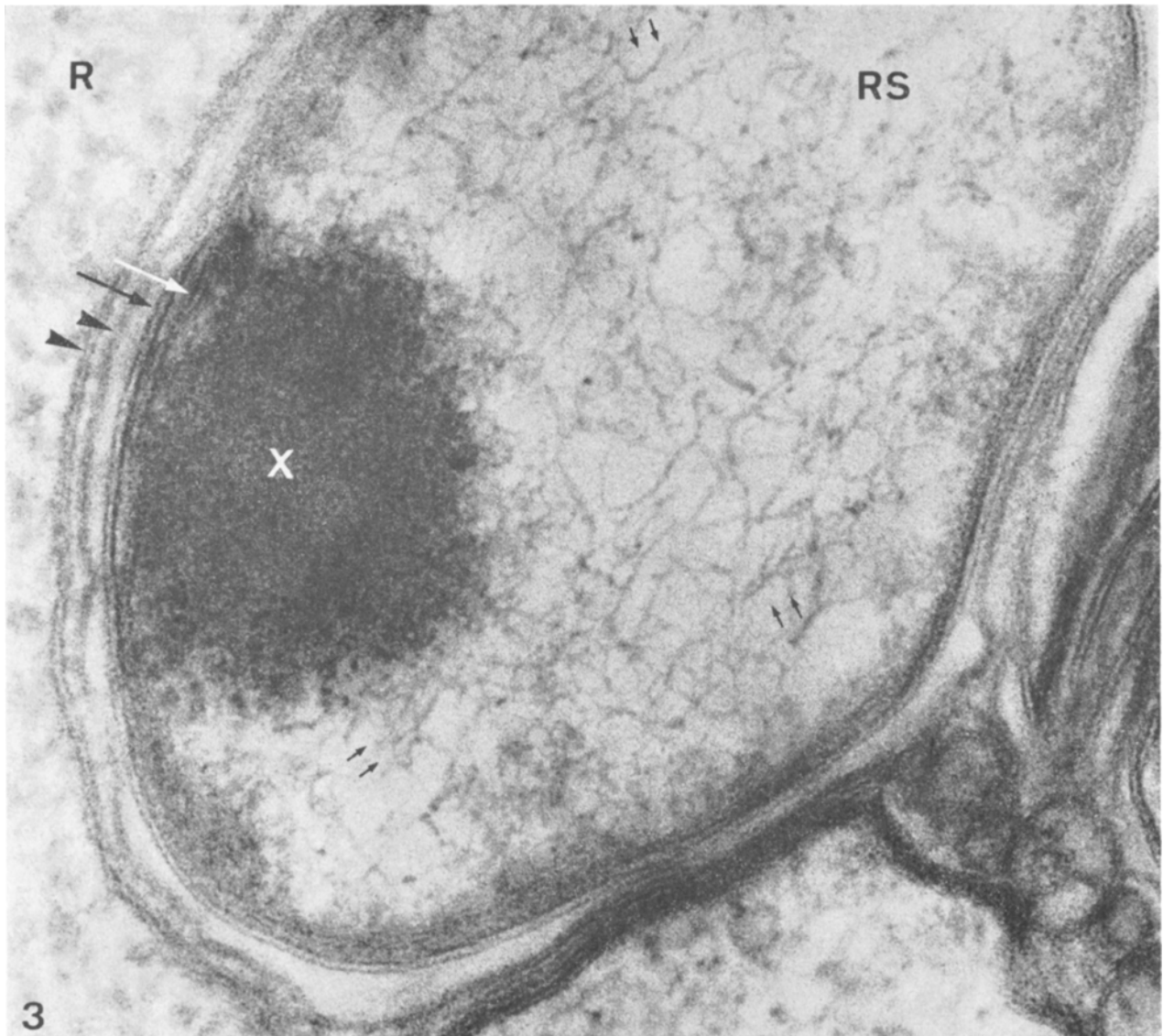


Fig. 3. Runder Symbiont (RS) nach TF. Membranen des Ovozytenplasmas (►) und 2 eigene Membranen (→) umgeben den Mikroorganismus. Das Nukleoplasma ist fein fibrillär (→), die vernetzten, ribosomenartigen Partikel sind hier an einer Stelle konzentriert (X). Als Vergleich dazu inhomogene Ribosomen (R) der Ovozyte.  $\times 196\,000$ .

schrumpfen die Bakterien merklich; die DNA-Fibrillen sind nicht mehr verteilt, sondern zusammengeballt und deshalb deutlich erkennbar (Figur 2).

Zwei gleich aussehende, eigene Membranen umgeben die runden Formen. Diese werden, im Gegensatz zu den länglichen Symbionten, durch zusätzliche Membranen der Ovozyte von der Wirtszelle getrennt (Figur 3). Das Plasma der Mikroorganismen ist nach TF locker und elektronendurchlässig. Nur an der Peripherie befinden sich Orte höherer Dichte. Die nach G/O verteilten, ribosomenartigen Partikel<sup>12</sup> erscheinen nach TF wie vernetzt und sind manchmal als dichte Masse an einer Stelle in der Zelle konzentriert. Man erkennt ein fibrilläres Nukleoplasma, das den grössten Teil des Symbionten einnimmt (Figur 3). Ohne Nachfixation in Uranylacetat geht diese Anordnung der DNA-haltigen Fibrillen verloren: die feinen Fäden sind verklumpt (Figur 4). Auch fehlen die

Ansammlungen der ribosomenähnlichen Partikel. Das Zytoplasma hat gröbere, flockige Struktur.

*Diskussion.* Mit der TF lässt sich das Nukleoplasma rickettsienähnlicher Mikroorganismen in seiner fibrillären Organisation für elektronenmikroskopische Untersuchungen erhalten. Die TF erzielt in dieser Hinsicht ähnliche Resultate wie die Standardmethode zur Fixation von DNA enthaltendem Plasma<sup>14,15</sup>. Die ribosomenartigen Partikel der Symbionten besitzen nach TF keine scharf begrenzten Umrisse. Sie scheinen gegenseitig vernetzt und bilden manchmal in den runden Formen ein nukleolusähnliches Gebilde. Wie weit dieser Struktur auch die Funktionen eines Kernkörperchens zukommen, lässt sich noch nicht beurteilen. Die beschriebene, dünne Schicht, welche die langen Formen vom Wirtsplasma trennt, besteht vielleicht aus Stoffwechselprodukten der Mikroorganismen. Eventuell handelt es sich dabei auch um

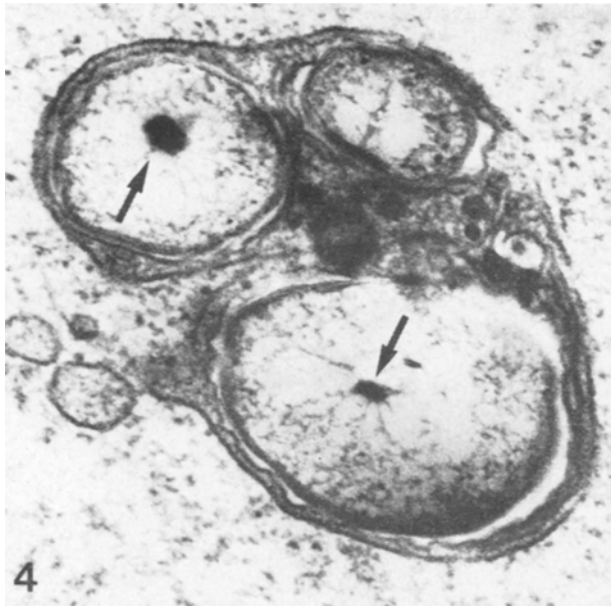


Fig. 4. Ohne Uranylacetat-Nachfixierung sind die DNA-haltigen Fibrillen grob verklumpt (→).  $\times 66000$ .

einen Schutz der Bakterien vor einer möglichen Verdauung durch die Ovozyte. Es ist auffallend, dass die runden Formen, ohne diese Hülle, viel mehr in Verbindung stehen mit lysosomalen Abbaustrukturen<sup>12</sup>.

Wenn O oder G/O fixiert wird oder wenn die Simultanfixierung ohne wässrige Uranylacetat-Behandlung vorgenommen wird, so ist die grobe Zusammenballung der DNA-haltigen Fibrillen neben anderen strukturellen Veränderungen am augenfälligsten. Diese Resultate zeigen, dass das Uranylacetat auch nach Simultanfixation auf bestimmte Systeme als Fixierungsmittel wirkt.

Weitere Versuche sollen zeigen, ob mittels Modifikationen der hier beschriebenen TF noch bessere Aussagen über die Verteilung der RNA und DNA rickettsienähnlicher Mikroorganismen gemacht werden können.

**Summary.** The nucleoplasm of rickettsia-like microorganisms living in the oocytes of the soft tick *Ornithodoros moubata* is preserved by TF (triple-fixation) in a fine fibrillary form, resembling the results obtained by the 'standard'-method<sup>14, 15</sup> for DNA-containing plasms.

H. HECKER

Schweizerisches Tropeninstitut,  
Socinstrasse 57, CH-4000 Basel (Schweiz),  
30. Januar 1970.

### Ultrastruktur der Ovozyten von *Ornithodoros moubata*, Murray (Ixodoidea: Argasidae) nach Triple-Fixation<sup>1, 2</sup>

Am Schweizerischen Tropeninstitut wurde im Zusammenhang mit der transovariellen Übertragung der Rückfallfieberspirochaete, *Borrelia duttoni* das Ovar von *Ornithodoros moubata* histologisch bearbeitet<sup>3, 4</sup>. In den letzten Jahren sind zur Untersuchung der Vorgänge während Dotter- und Eihüllenbildung bei Zecken elektronenmikroskopische<sup>5-7</sup> und histochemische<sup>8</sup> Arbeiten durchgeführt worden, beziehungsweise sind noch im Gange<sup>9, 10</sup>.

Nach der Einführung der Triple-Fixation<sup>11-14</sup> (TF: Simultanfixierung in einem Gemisch von Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid, Nachbehandlung in wässriger Uranylacetatlösung) stellte sich uns die Frage, ob diese Technik zur Abklärung ultrastruktureller Vitellogenesevorgänge geeignet ist. Eventuell treten Unterschiede in der Strukturhaltung auf gegenüber klassischen Fixierungsmethoden, wie zum Beispiel Osmiumtetroxid-Fixation allein (O) oder Glutaraldehyd, gefolgt von Osmiumtetroxid (G/O). Vielleicht bietet die TF auch die Möglichkeit, die während der Eireifung auftretenden kleinen Vesikel an der Peripherie der Ovozyten in verschiedenen Typen einzuteilen<sup>5-7</sup>. Die Arbeitsmethoden wurden in einer früheren Publikation beschrieben<sup>14</sup>.

**Resultate.** Es sei kurz daran erinnert, dass die Ovozyten von *O. moubata* mit dem Ovar nur durch einen zellulären Funiculus verbunden sind. Von keinem Follikularepithel umgeben, ragen sie in das Haemocoel hinein. Eine Basallamina umschliesst Ovar und Ovozyten und bildet die Begrenzung zur Haemolymph, welche die Zeckenorgane umspült<sup>5, 6</sup>. Sie hat nach TF ein leicht flockiges bis filamentöses Aussehen mittlerer Elektronendichte (Figur 1).

Das Oolemma, die Zellmembran der Ovozyte, mit ihren Einstülpungen und mit den, vor der Vitellogenese noch wenig prominenten Microvilli, ist deutlich dreischichtig (Figur 1).

Den grossen Ovozytenkern umgeben zwei, von zahlreichen Poren durchsetzte Membranen (Figuren 2 und 3). Die nach O oder G/O gut sichtbaren Diaphragmen der Kernporen<sup>5</sup> sind nach TF schlecht erkennbar. Das Nukleoplasma wird diffus dargestellt, wobei man stellenweise den Eindruck hat, es enthalte vernetzte, feine Fäden (Figur 2). Heterochromatin lässt sich, wie auch nach G/O, nicht zeigen. Der Nukleolus ist gross und locker gebaut. Er besteht aus Strängen fein granulärer bis filamentöser Substanz. Dazwischen befinden sich Inseln, welche aus größeren Granula zusammengesetzt sind (Figuren 2 und 4). Oft umfassen die beschriebenen Teile des Nukleolus eine mächtige, zentrale «Vakuole» und enthalten selber auch noch kleinere «Vakuolen». Der Inhalt dieser membranlosen Strukturen ist weniger elektronendurchlässig als das Nukleoplasma (Figur 5).

<sup>1</sup> Die Arbeit wurde vom Schweiz. Nationalfonds unterstützt.

<sup>2</sup> Frau S. LATSCHA-STOLLER danke ich für ihre unentbehrliche technische Mitarbeit.

<sup>3</sup> A. AESCHLIMANN, Acta trop. 15, 15 (1958).

<sup>4</sup> O. WAGNER-JEVSEENKO, Acta trop. 15, 118 (1958).

<sup>5</sup> A. AESCHLIMANN und H. HECKER, Acta trop. 24, 225 (1967).

<sup>6</sup> A. AESCHLIMANN und H. HECKER, Acarologia 11, 180 (1969).

<sup>7</sup> H. HECKER und A. AESCHLIMANN, Z. Tropenmed. Parasit. 27, 31, (1970).

<sup>8</sup> P. A. DIEHL, Bull. Soc. ent. Suisse 42, 117 (1969).

<sup>9</sup> P. A. DIEHL, in Vorbereitung.

<sup>10</sup> L. JENNI, in Vorbereitung.

<sup>11</sup> B. F. TRUMP und R. E. BULGER, Lab. Invest. 15, 368 (1966).

<sup>12</sup> J. G. HIRSCH und M. E. FEDORKO, J. Cell Biol. 38, 615 (1968).

<sup>13</sup> G. KISTLER, W. SCHERLE und T. HAUSWIRTH, Experientia 26, 331 (1970).

<sup>14</sup> H. HECKER, Experientia 26, im Druck (1970).