

to the increased secretion of testosterone by the abnormally large number of Leydig cells; while in the Klinefelter type a very low fructose average indicates that the Leydig cells are not normal. This latter agrees well with the findings of HELLER and NELSON<sup>11</sup> 1948, that some of the Klinefelter syndrome are accompanied by hypoleydigism.

### Summary and Conclusion

- 1 — 66 azoospermia subjects were investigated both biochemically and clinically.
- 2 — Some of them biopsied and histological examination of the biopsy studied.

<sup>11</sup> C. G. HELLER and W. O. NELSON, J. Clin. Endocrinol. **8**, 345 [1948].

3 — Fructose concentration was determined and compared with the fructose concentration of normal fertile subjects.

4 — Statistical analysis of the fructose concentration was performed resulting in that, the minimum fructose average was that of the Klinefelter azoospermia, while those who have normal testicular biopsy and suffer from an organic obstruction showed a fructose average which is remarkably near that of the fertile. This result is naturally expected for it indicates that the hormonal link between the primary and accessory sexual glands is unaffected by any organic obstruction. In other words the result lends a further proof that the balance between both sets of glands is purely hormonal.

## Bemerkungen zu Veränderungen bei elektronenmikroskopischen Schnitten durch den abbildenden Elektronenstrahl und zur Struktur der eingebetteten Gewebe

W. LIPPERT

Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M. (Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr. Dr. Dr. B. RAJEWSKY)

(Z. Naturforsch. **20 b**, 775—778 [1965]; eingegangen am 3. Februar 1965)

Es wird auf die Mannigfaltigkeit der Kontraste hingewiesen, die sich bei mit Aldehyden fixiertem, in Vestopal W oder Durcupan ACM eingebettetem Gewebe durch gesteuerte Elektronenbestrahlung erreichen läßt. Voraussetzung für einen einwandfreien Vergleich von Kontrasten bei z. B. verschiedenen gefärbten Schnitten ist daher eine Bestrahlung, die zu ausreichend definierten Objektveränderungen führt. Brauchbar in diesem Sinne ist eine Bestrahlung, die zum maximalen „reinen Strahlenverlust“ führt, bei der aber thermische Substanzverluste vermieden werden. Der Negativkontrast von Chromatin und Nucleolen und die offenbar physikalisch bedingte Färbbarkeit der nucleinsäurehaltigen Zellbestandteile mittels der „negative-staining“-Methode werden diskutiert.

Bei elektronenmikroskopischen Schnitten lassen sich genauere Aussagen gewinnen, wenn der Kontrast der Zellbestandteile zur Auswertung mit herangezogen werden kann. Die Kontrastverhältnisse sind aber auch von der Art der Elektronenbestrahlung des Objekts abhängig, und es ist daher in solchen Fällen erforderlich, die durch die Bestrahlung eintretenden Objektveränderungen zu kennen und entsprechend zu berücksichtigen. Die bisher bei eingebettetem Gewebe gewonnenen Erkenntnisse<sup>1</sup> beziehen sich im wesentlichen auf Osmiumtetroxyd-Fixierung und Methacrylat-Einbettung. Sie lassen sich aus leicht ersichtlichen Gründen wenigstens

quantitativ nicht ohne weiteres auf die heute übliche Aldehyd-Fixierung und die Einbettung in Vestopal W oder Araldit (Durcupan ACM) übertragen.

Bei Kontraständerungen an Schnitten ist zu unterscheiden zwischen den Veränderungen an den Einbettungsmitteln und den am eigentlichen biologischen Material. Etwas verallgemeinernd läßt sich sagen, daß diese Veränderungen sich in zwei verschiedenen Bereichen der Objektladungsdichte vollziehen und daher einigermaßen gut trennbar sind. Die neueren Einbettungsmittel zeigen Kontraständerungen im Objektladungsdichte-Bereich zwischen ungefähr  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  C/cm<sup>2</sup>. Der entsprechende Bereich für biologische Strukturen liegt, soweit bis jetzt bekannt, um ungefähr drei Zehnerpotenzen höher.

<sup>1</sup> Zum Beispiel C. MORGAN, D. H. MOORE u. H. M. ROSE, J. biophys. biochem. Cytol. Suppl. **2**, 21 [1956].

In Zusammenfassung einer früheren Arbeit<sup>2</sup> kann die Wirkung des Elektronenstrahls auf die Einbettungsmittel wie folgt genauer beschrieben werden: Bei niedrigen Objektstromdichten tritt der „reine Strahleneffekt“ in Erscheinung. Er führt zu Veränderungen atomarer Bindungen und dadurch zu Substanzverlusten. Ohne besondere Kunstgriffe ist er nicht steuerbar, er läßt sich deshalb relativ einfach beschreiben.

Methacrylat verliert maximal ungefähr 2/3, Vestopal W, und auch Durcupan ACM, maximal ungefähr 1/3 der Ausgangsmassendicke. Eine zweite Wirkung des Elektronenstrahls ist die Stabilisierung des Objekts gegen thermische Wirkungen. Dazu ist eine noch etwas höhere Objektladungsdichte nötig als zum Erreichen des maximalen „reinen Strahleneffekts“. Der dritte Mechanismus, der zu Objektveränderungen führt, ist thermischer Natur. Er ist daher ein Effekt der Objektstromdichte; er hängt aber z. B. auch von der Art des Objektträgers und der Vorbestrahlung des Objektes ab. Durch geeignete Anwendung der thermischen Wirkung kann das Einbettungsmittel praktisch vollkommen herausgestrahlt werden. Die Vorschrift zur Herstellung in bezug auf das Einbettungsmittel thermisch stabiler Schnitte, die nur den nicht vermeidbaren Substanzverlust durch den „reinen Strahleneffekt“ erlitten haben, lautet also: Man bestrahle mit so geringer Stromdichte, daß keine thermischen Wirkungen auftreten können, und zwar so lange, bis die dem Objekt zugeführte Ladungsdichte zur Stabilisierung ausreicht. Um dagegen größte thermische Wirkungen zu erhalten, muß man möglichst rasch möglichst intensiv bestrahlen, ohne allerdings die biologischen Strukturen zu gefährden.

Die Veränderungen an den Formelementen der Zelle sind schwieriger zu untersuchen, weil die Stromdichte nicht beliebig klein gemacht werden kann. Wegen der geringen Größe der Objekte sind z. T. sehr hohe Vergrößerungen und damit auch Stromdichten nötig. Eine Trennung in „strahlenbedingte“ und thermische Wirkungen ist daher bei diesen Objekten noch nicht streng durchgeführt.

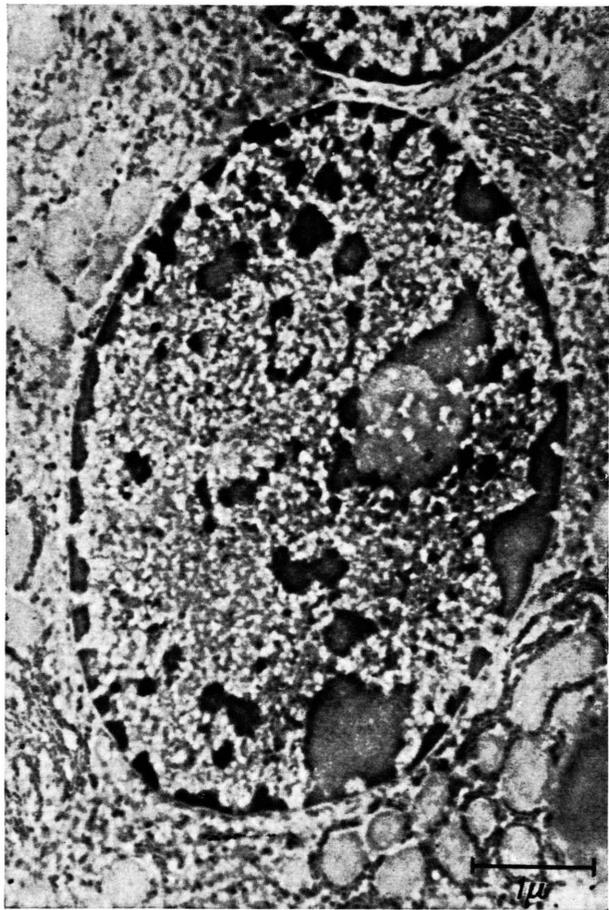
Bei unseren Untersuchungen haben wir in Glutaraldehyd fixiertes und in Vestopal W oder Durcupan ACM eingebettetes Leberparenchymgewebe benutzt, das nicht mit Osmiumtetroxyd nachfixiert und im allgemeinen nicht gefärbt wurde. Das für die Ein-

bettungsmittel Gesagte sei an Hand von Abb. 1 \* und Abb. 2 näher erläutert. Es handelt sich um Einbettung in Vestopal W, und zwar um aufeinanderfolgende Schnitte einer Serie, die verschieden bestrahlt wurden. Bei Abb. 1 ist nur der „reine Strahlenverlust“ eingetreten, bei Abb. 2 dagegen wurde angestrebt, das Einbettungsmittel vollständig herauszustrahlen, ohne die biologischen Strukturen zu verändern. Abb. 1 zeigt folgende charakteristische Erscheinungen: Kernchromatin und Nucleolus treten deutlich negativ gegenüber dem Interchromatin und allen übrigen Bestandteilen des Cytoplasmas hervor. Die Mitochondrien heben sich bei solchen Präparaten schwach, meist negativ, vom Cytoplasma ab; Einzelheiten sind meistens nicht zu erkennen. Das endoplasmatische Reticulum unterscheidet sich meistens nur sehr verschwommen, schwach positiv, von der Umgebung. Manchmal scheint es sich um Membranen, bei anderen Objekten dagegen um diskrete Punktreihen zu handeln. Abb. 2 erscheint bezüglich der Kernbestandteile in erster Näherung wie ein Negativ zu Abb. 1: Chromatin und Nucleolus sind deutlich positiv, bezogen auf Interchromatin und Cytoplasma. Die Ribosomen sind nun ebenfalls sehr deutlich positiv zu erkennen. Die Mitochondrien erscheinen bei einzelnen Präparationen etwas unterschiedlich schwach positiv gegenüber dem leeren Cytoplasma. Beide Abbildungen wurden, so weit wie möglich, mit der gleichen Gradation hergestellt. Über die Absolutwerte der Schwärzungen ist zu sagen, daß sich der Kontrast von Chromatin und Nucleolus durch die thermischen Wirkungen nur sehr wenig ändert. Diese Strukturen müßten in beiden Abbildungen, wenn auch auf gleiche Schwärzungen Wert gelegt worden wäre, daher annähernd gleich dunkel erscheinen. Man erkennt also, daß die Objektstellen, die offenbar wenig biologische Materie, dafür offenbar einen relativ hohen Anteil an Einbettungsmittel enthalten (Interchromatin, leere Stellen im Cytoplasma), sich durch die thermischen Wirkungen stark aufhellen. Die Nucleoproteine enthaltenden Strukturen des Kerns behalten im wesentlichen ihren ursprünglichen Kontrast.

Wie verschiedene Tests gezeigt haben, werden die meisten elektronenmikroskopischen Aufnahmen wohl unter Bestrahlungsbedingungen gemacht, die bezüglich des Kontrastes zwischen den beiden gezeigten Extremen liegen. Es ist daher bei der Dis-

<sup>2</sup> Zum Beispiel W. LIPPERT, *Optik* **19**, 145 [1962].

\* Abbn. 1–6 s. Tafel S. 776 a u. b.



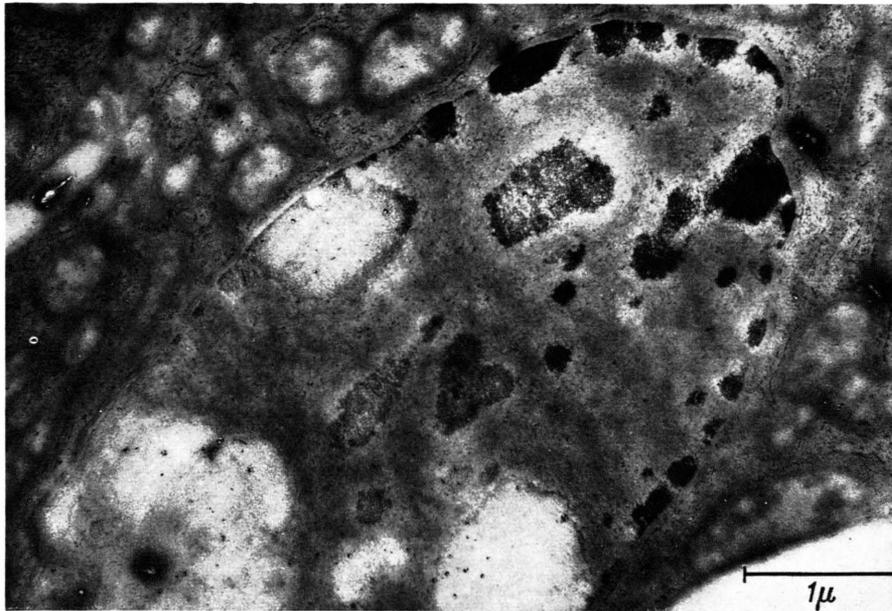


Abb. 5

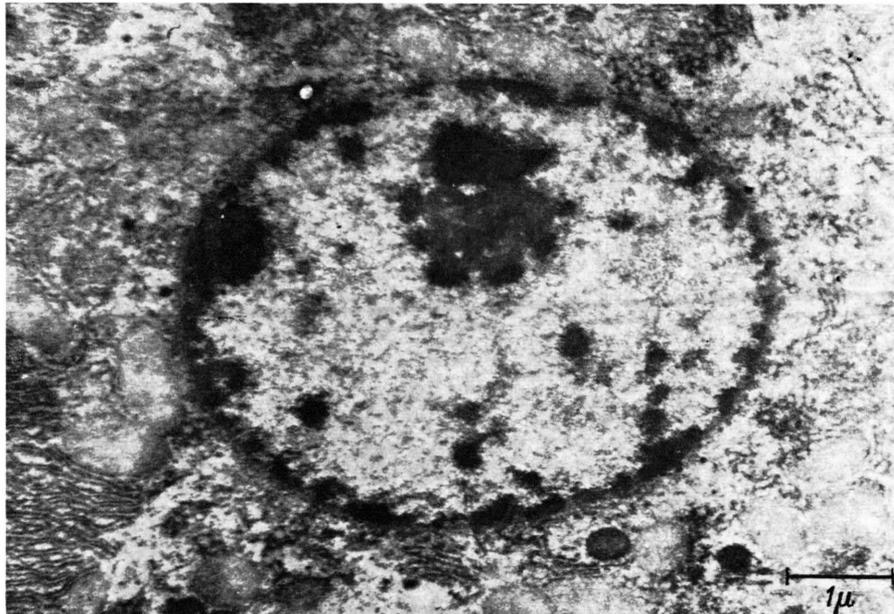


Abb. 6

Abb. 1. Leber-Parenchymzellkern. Glutaraldehyd-Fixierung, Einbettung in Vestopal W. Präparat wurde so bestrahlt, daß beim Einbettungsmittel nur der „reine Strahlenverlust“ eintrat. Chromatin und Nucleolus zeigen deutlich einen negativen Kontrast gegen alle übrigen Zellbestandteile. Eingezeichnete Entfernung entspricht  $1 \mu$ .

Abb. 3. Höher vergrößerter Ausschnitt aus einer Leberparenchymzelle. Helle Stellen gehören zu Mitochondrien. Dazwischen im Cytoplasma deutlich dunkle Punkte (Ribosomen) erkennbar. Bestrahlung so, daß beim Einbettungsmittel nur der „reine Strahlenverlust“ eintrat. Abb. gehört zu einer Serie, die angefertigt wurde, um die Veränderung der Ribosomen durch die Bestrahlung zu untersuchen. In der Abb. ist der Ausgangszustand dargestellt. Eingezeichnete Entfernung entspricht  $\frac{1}{10} \mu$ .

Abb. 2. Nachbarschnitt zu Abb. 1. Bestrahlung so, daß das Einbettungsmittel durch thermische Wirkungen weitgehend entfernt wurde. Chromatin und Nucleolus jetzt deutlich positiv, Retikulum jetzt deutlich erkennbar.

Abb. 4. Endzustand der Ribosomen von Abb. 3 nach längerer Bestrahlung. Aufhellung ist deutlich.

Abb. 5. Färbung nach dem „negative-staining“-Verfahren mit PWS. Schräg liegend von links unten nach rechts oben ein Leberzellkern. Chromatin in der rechten oberen Ecke in der Nähe eines außerhalb der Abbildung liegenden PWS-Tropfens deutlich angefärbt, ebenso die Ribosomen. Gleiche Bestrahlung wie bei Abb. 1. Eingezeichnete Entfernung entspricht  $1 \mu$ .

Abb. 6. Färbung nach dem „negative-staining“-Verfahren mit  $CdJ_2$ . Gleiche Bestrahlung wie bei Abb. 1. Chromatin, Nucleolus und Ribosomen deutlich positiv. Eingezeichnete Entfernung entspricht  $1 \mu$ .

kussion über den Kontrast bei Schnitten eine gewisse Vorsicht geboten.

Die Veränderungen an den nucleinsäurehaltigen Zellbestandteilen sollen durch die Abbn. 3 und 4 demonstriert werden. Das Einbettungsmittel Vestopal W hat nur den Substanzverlust durch die „reine Strahlenwirkung“ erlitten. Nach thermischer Stabilisierung des Einbettungsmittels wurde relativ schwach ungefähr zwei Stdn. lang bestrahlt. Die Abbildungen geben den Zustand der gleichen Objektstelle zu Beginn und am Ende der Bestrahlung wieder. In Abb. 3 sind zwischen größeren hellen Flecken, die von Mitochondrien herrühren, dunkle, z. T. in Doppelreihen angeordnete Punkte gerade zu erkennen. Die gleichen Punkte zeigt Abb. 4 dagegen deutlich hell im dunklen Einbettungsmittel, und zwar erscheinen mehr helle Punkte als ursprünglich dunkle zu erkennen waren. Ein Zwischenstadium, in dem die Punkte völlig im Cytoplasma verschwunden waren, ist in der Aufnahmeserie vorhanden. Parallel zu den Veränderungen an den Ribosomen vollziehen sich im Chromatin und im Nucleolus ähnliche, aber schwächere Aufhellungen. Stabilisiert man das Einbettungsmittel nicht gegen thermische Wirkungen, so zeigt sich bei ähnlichen Objektbelastungen einfach eine Aufhellung der durch das Herausstrahlen des Einbettungsmittels zunächst stark positiv erscheinenden Strukturen.

Der regelmäßig auftretende, bisher wohl noch nicht näher diskutierte Negativkontrast der nucleinsäurehaltigen Kernbestandteile (nKb) ist aus folgenden Gründen besonders interessant: Bei leichtatomigen Objekten gleicher Dicke, wie sie bei nicht gefärbten Schnitten vorliegen, ist der unterschiedliche Kontrast ein Ausdruck für verschiedene Dichten. Die Dichten der Einbettungsmittel weisen relativ verschiedene Werte auf: Methacrylat: 1,07, Durcupan ACM: 1,11, und Vestopal W: 1,27. In Einklang damit treten negativ erscheinende Substanzen schwächer, positiv erscheinende stärker bei Durcupan ACM hervor als bei Vestopal W. Von den nKb ist nun bekannt, daß sie bei Versuchen mit der Zentrifuge noch in Zuckerlösungen der Dichte 1,28 sedimentieren<sup>3</sup>. Aus dem Negativkontrast der nKb läßt sich dagegen ein Wert von ungefähr 0,8 abschätzen. Dieser Dichtewert ist außerordentlich niedrig, und man ist daher geneigt, eine poröse, inhomogene Struktur zu vermuten. Bei Färbung von Schnitten nach dem „negative-staining“-Verfahren

zeigt sich nun, im wesentlichen unabhängig von der verwendeten färbenden Substanz, eine selektive Färbung der nKb und auch der Ribosomen. Abb. 5 und Abb. 6 zeigen den Effekt bei Verwendung von Phosphorwolframsäure (PWS) bzw.  $CdJ_2$ . Das Einbettungsmittel (Vestopal W) hat nur den „reinen Strahlenverlust“ erlitten. Die Abbn. entsprechen in dieser Hinsicht also Abb. 1. Abb. 5 zeigt einen Kern am Rande eines nicht sichtbaren PWS-Tropfens (rechts oben). Man erkennt deutlich eine selektive Färbung des in der Nähe dieses Tropfens liegenden Chromatins und auch der Ribosomen. Ähnlich sind die Resultate bei der gleichmäßigeren Färbung mit  $CdJ_2$  in Abb. 6. Dieser Effekt des „negative-staining“-Verfahrens braucht an sich nicht auf einer Porosität zu beruhen, er könnte z. B. auch bei einer besseren Benetzbarkeit der Schnittoberfläche an den gefärbten Stellen in Erscheinung treten. Bei hochvergrößerten Stereoaufnahmen läßt sich jedoch bei so gefärbtem Chromatin in günstigen Fällen eine räumliche, wolkige Struktur erkennen. Das scheint uns eine weitere Stütze für die Annahme eines porösen Aufbaus.

Die Färbung mit Hilfe des „negative-staining“-Verfahrens unterscheidet sich wesentlich von den üblichen Färbeverfahren. Beim „negative-staining“ trocknet in relativ kurzer Zeit eine dabei in der Konzentration zunehmende Lösung ein, bei normalen Färbeverfahren wirkt eine Lösung gleichbleibender Konzentration längere Zeit auf das zu färbende Objekt ein. Bei der normalen Färbung findet eine relativ feste Anlagerung der Farbstoffbestandteile an die Zellkomponenten statt, die durch Waschen nicht ohne weiteres zu beseitigen ist. Die Färbungen nach der „negative-staining“-Methode lassen sich dagegen ohne weiteres auswaschen. Die beim „negative-staining“ vorhandene Selektivität ist also offenbar nicht auf den chemischen Aufbau, sondern auf die physikalische Struktur der gefärbten Zellbestandteile zurückzuführen. Diese Auffassung wird durch die Beobachtung gestützt, daß bei nicht einwandfreien Schnitten die Messerkratzer und andere schlecht geschnittene Stellen ebenfalls z. T. angefärbt werden. Man kann sich vorstellen, daß an diesen Stellen der Schnitt etwas aufgeraut ist oder die sonst glatte Oberfläche irgendwie beschädigt ist.

Einen weiteren Beitrag zu diesen Überlegungen bildeten Versuche, durch die Verwendung von Styrol als Zwischenmedium bei der Einbettung (nach

<sup>3</sup> Zum Beispiel R. MAGGIO, P. SIEKEVITZ u. G. E. PALADE, J. Cell Biol. 18, 267 u. 293 [1963].

KURTZ<sup>4</sup>) ein gutes Eindringen des Vestopals in das Gewebe zu sichern. Der Anteil guter Einbettungen stieg an, an der Tatsache des Negativkontrastes der nKb und an der Färbbarkeit durch das „negative-staining“-Verfahren änderte sich nichts.

Herrn Prof. RAJEWSKY sei für die stetige Förderung der Arbeit, den technischen Assistentinnen Frl. W. FRIESE und Frl. S. UNGER für interessierte Mitarbeit bestens gedankt.

<sup>4</sup> S. M. KURTZ, J. Ultrastr. Res. 5, 468 [1961].

Über photodynamische Wirkung von Farbstoffen\* III  
 Dunkelwirkung und photodynamischer Effekt von Farbstoffen  
 auf Saccharomyceszellen verschiedenen Ploidiegrades  
 und auf Nucleinsäuren

ERNST-RANDOLF LOCHMANN, WERNER STEIN und CHRISTA UMLAUF

Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin

(Z. Naturforschg. 20 b, 778—785 [1965]; eingegangen am 8. März 1965)

The inactivation of homozygous yeast strains of different ploidy by some dyes in the presence and in the absence of visible light was investigated and the results were compared with the reactions of thiopyronine. The influence of some of these dyes on nucleic acids was also examined.

Only those dyes which gave precipitates with nucleic acids in aqueous solution activate yeast cells in the absence and — even in smaller concentrations — in the presence of visible light.

I.

Die Untersuchungen über die Wirksamkeit von Thiopyronin (TP) auf Saccharomyceszellen und auf Nucleinsäure-Komponenten, über die in den beiden ersten Mitteilungen berichtet worden war<sup>1, 2</sup>, wurden fortgesetzt und durch Untersuchungen mit anderen Farbstoffen ergänzt. Es wurde die Wirkung von Methylenblau (MB), Thionin (Th), Acridingelb (AG), Acridinorange (AO), Trypaflavin (TF), Pyronin (Py), Lactoflavin (LF) und Methylgrün (MG)

geprüft und mit der Wirksamkeit von TP verglichen. Die Inaktivierung durch diese Farbstoffe bei Saccharomyceszellen verschiedenen Ploidiegrades in Gegenwart und in Abwesenheit von sichtbarem Licht und unter Variierung einiger anderer Parameter wurde vergleichend untersucht, um biochemische Gründe für die Wirksamkeit dieser Verbindungen zu finden.

Im folgenden wird ein vergleichender Überblick über die Konstitution der verwendeten Verbindungen gegeben:

\* I. und II. Mitteilung dieser Reihe siehe I c. 1, 2.

<sup>1</sup> E.-R. LOCHMANN u. W. STEIN, Naturwissenschaften 51, 59 [1964].

<sup>2</sup> E.-R. LOCHMANN u. W. STEIN, Z. Naturforschg. 19b, 838 [1964].