

Aus dem Ludwig-Asehoff-Haus, dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. F. BÜCHNER)

DIE HISTOCHEMISCHE LOKALISATION DER PHOSPHATASE
IN DER TUBULUSEPITHELZELLE DER MÄUSENIERE
IM ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN BILD*

Von

ELISABETH MÖLBERT, FRANZ DUSPIVA und OTTO v. DEIMLING

Mit 17 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. November 1959)

Durch die Methode des ultradünnen Schnittes konnte die Ultrastruktur der Zelle bis in Dimensionen von ungefähr 15 Å mit dem Elektronenmikroskop erschlossen werden. Erst kürzlich haben BARNETT und PALADE (1958/59) die Probleme aufgezeigt, die sich bei Einführung histochemischer Methoden in die Elektronenmikroskopie ergeben.

Andere Autoren wie GERSH (1958), UNAKAR und SIRSAT (1958) und WATSON (1958) versuchten mit unterschiedlichen Methoden, eine Lokalisation von Enzymen durchzuführen. Das elektronenmikroskopische Bild der Zelle, das mit diesen Versuchsanordnungen erzielt werden konnte, zeigte keine ganz befriedigenden Ergebnisse. Einmal war die Ausfällung der erhaltenen Reaktionsprodukte im Vergleich zur Ultrastruktur in ihren Partikeln zu grob, zum anderen konnte die Feinstruktur des Gewebes nicht immer deutlich zur Darstellung gebracht werden.

Uns interessierte die Frage, ob sich für die *elektronenmikroskopische Darstellung* das bekannte, gleichzeitig von GOMORI und TAKAMATSU entwickelte Verfahren zur Lokalisation der alkalischen Phosphatase im Original — natürlich unter Verzicht auf die Umwandlung des im Lichtmikroskop unsichtbaren Niederschlages von Kalziumphosphat bzw. Hydroxylapatit in Kobaltphosphat und schließlich in das dunkle Sulfid — oder in einer passenden Modifikation eignet.

Die ersten Versuche, die Nierenrinde der Maus lebendfrisch einzufrieren und mit dem Kryostaten-Mikrotom zu schneiden, in gepuffertem Formol zu fixieren und dem Gomori-Test zuzuführen, wobei als Substrat Phenylphosphat Verwendung fand, ergaben lichtmikroskopisch eine gute Darstellung der alkalischen Phosphatase. Eine Anzahl dieser Schnitte wurde in Methyl-Butylmethacrylat eingebettet und ultradünn geschnitten.

Das Resultat war aber im elektronenmikroskopischen Bild wenig zufriedenstellend. Die zytoplasmatische Feinstruktur war sehr schlecht erhalten, eine feinere Lokalisation des Kalziumphosphatniederschlages ließ sich nicht durchführen.

Eine ausgezeichnete methodische Anregung verdanken wir den Untersuchungen von ESSNER, NOVIKOFF und MASEK (1958) über die Adenosintriphosphatase und 5-Nukleotidase in Leberzellen. Diese Autoren fixierten in kalter 1%iger Osmium-

* Mit Unterstützung des Bundes und der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Über die Ergebnisse wurde auf der 9. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie vom 18.—21. 10. 59 in Freiburg i. Br. berichtet.

säurelösung bei p_H 7,2 kleine Organstückchen 7 min vor, inkubierten dann die Blöckchen im Reaktionsgemisch und fixierten mit Formaldehyd-Veronal-Acetat-Puffer bei p_H 7,2 nach.

Da Osmiumsäure in tierisches Gewebe nur sehr langsam eindringt (etwa 40μ in 5 min) wird nur die äußerste Zone der Blöckchen fixiert. Die Destruktion des Enzyms folgt einem Gradienten von der Peripherie zum Zentrum des Blöckchens. ESSNER, NOVIKOFF und MASEK fanden im Homogenat von 7 min vorfixierten Lebergewebesblöckchen noch eine Aktivität von 17% für die ATPase und von 40% für die 5-Nucleotidase.

Unter Verwendung des Prinzips der *Vorfixierung* kleiner Gewebeblöckchen, aber mit kürzerer Dauer — nur etwa 3 min — führten wir die *Gomori-Reaktion* bei p_H 9,6 an der Tubuluszelle der Mäuseniere durch. In Abänderung der Essnerschen Methode wurde eine *Nachfixierung* im Osmiumsäuregemisch nach PALADE in der Modifikation nach CAULFIELD während 2 Std vorgenommen. Bei dieser Versuchsanordnung erhielten wir Schnitte mit guter Darstellung der Zellstruktur.

Das Produkt der enzymatischen Reaktion, das Kalziumphosphat, fehlte in den oberflächlichen Gewebeschichten, da in diesen ein totaler Aktivitätsverlust der Enzyme durch die Fixation eingetreten war, sie nahm aber mit der Tiefe zu. Die Güte der Fixation des Gewebes verhielt sich umgekehrt. Nur jeweils in einer schmalen Zone, welche die Dicke von 20—30 Serienschnitten umfaßt, ist bei gut erhaltener Zellstruktur das Reaktionsprodukt zu erkennen (Abb. 1 und 2).

Kalziumphosphat ergibt infolge der verhältnismäßig schwachen Elektronenstreuung im elektronenmikroskopischen Bild nur einen geringen Kontrast.

Um einen besseren elektronenmikroskopischen Kontrast zu erzielen, ersetzten wir das Kalziumchlorid durch Bleinitrat. Allerdings ergab sich hierbei eine Schwierigkeit. Die meisten Substrate der Phosphatase ergeben mit dem Schwermetall bereits im neutralen Reaktionsgebiet eine Fällung. Eine Stabilisierung des Ansatzes war durch Zugabe von Seignettesalz zum Reaktionsgemisch und Verwendung von Phenylphosphat als Substrat bei Zimmertemperatur für etwa 30 min zu erreichen, wenn das Gemisch auf p_H 7,6 bis 7,7 gepuffert war.

Die bei $0^\circ C$ mit 1%iger Osmiumsäure vorfixierten Gewebeblöckchen wurden in folgendem frisch zubereitetem *Reaktionsgemisch* bei Zimmertemperatur 20 min inkubiert:

2 g Seignettesalz werden in 45 ml Trispuffer 0,05 m, p_H 7,6 gelöst, 5 ml Dinatriumphenylphosphatlösung 0,04 m und je 1 ml 2%ige Manganchlorid- und 2%ige Magnesiumchloridlösung werden zugefügt. Zum Schluß werden 2,5 ml Bleinitratlösung 0,1 m tropfenweise unter Schütteln zugefügt (p_H der Mischung 7,6 bis 7,7). Die Lösung muß kurz vor dem Versuch zubereitet werden, da nach etwa 30 min eine Trübung eintritt.

Nach der Inkubation wurden die Gewebeblöckchen in der Fixationslösung gewaschen und anschließend fixiert. Die Entwässerung und Einbettung erfolgte mit den für die Elektronenmikroskopie üblichen Methoden. Es wurde in einem Gemisch von Methylmethacrylat und Butylmethacrylat 3:100 eingebettet. Die Dünnschnitte wurden mit dem Elmiskop I der Fa. Siemens bei 60 kV untersucht.

Unter diesen Versuchsbedingungen hat die alkalische Phosphatase noch eine ausreichende Aktivität, jedoch ist zu erwarten, daß sich bei diesem p_H auch andere Phosphatasen an der Reaktion beteiligen.

Ergebnisse

Nach den Untersuchungen von SJÖSTRAND und RHODIN (1953) und RHODIN (bis 1958/59) zeichnet sich die Tubuluszelle der Niere durch tiefe Einfaltungen der Zellmembran an der Seite aus, die der Basalmembran anliegt. Im Schnitt erscheinen diese Falten als „Doppelmembranen“, die dadurch entstehen, daß das Lumen zwischen den Falten nicht erweitert, sondern kollabiert ist (RUSKA, MOORE und COPENHAVER 1957). ROBERTSON (1958) konnte allerdings an Zellen nach Kaliumpermanganatfixation nachweisen, daß die Zellmembran aus 2 „Unit“-Membranen besteht, die dunkel tingiert sind und einen helleren Zwischenraum begrenzen. Im Bereich dieser eingefalteten Zellmembranen, welche die Basalzzone der Tubuluszelle gleichsam in einzelne Kammern unterteilen, befinden sich die Mitochondrien. Apikal liegen die Stäbchen des Bürstensaumes.

In unseren Bildern ist ausnahmslos an allen *Grenzmembranen der Tubuluszellen* ein feiner, kontrastreicher Niederschlag zu beobachten (Abb. 3). Überall dort, wo eine Falte der Zellmembran im Schnitt exakt senkrecht getroffen wurde, ist mit aller Deutlichkeit zu sehen, daß die Bleiphosphatkriställchen immer in einer dem Zytoplasma zugewandten Reihe an der Zellmembran gelegen sind (Abb. 4, 5 und 13). Durch den Phosphatase-Test werden demnach die Zellmembranen tingiert, dadurch in auffälliger Weise hervorgehoben und als Sitz der Phosphatase markiert. In ähnlicher Weise ist auch die Innenseite der Stäbchen des *Bürstensaumes* mit den Mikrokristallen von Bleiphosphat (Hydroxylapatit) besetzt (Abb. 7, 8 und 9). In Kontrollpräparaten (Abb. 6 und 10) oder in den äußeren Randzonen der Testblöckchen (Abb. 12), die sich durch einen Aktivitätsverlust des Enzyms auszeichnen, fehlte ein Niederschlag völlig. Die Kontrollpräparate wurden mit allen Bestandteilen des Ansatzes einschließlich des Bleinitrats, aber ohne Substrat inkubiert.

Der Zellkern, die Mitochondrien und andere Zellstrukturen verhalten sich gegenüber dem Phosphatase-Test negativ. Ein diffuser Schatten im Zellkern (Abb. 13), besonders im Nukleolus (Abb. 14) findet sich auch in den Kontrollpräparaten (Abb. 15). Er geht auf eine unspezifische Einlagerung von Blei in Proteine und Nukleinsäuren zurück und läßt sich damit als Enzymort ausschließen. Bei längere Inkubationszeit treten gröbere Bleifällungen auch an anderen Zellorten auf, die unschwer als Kunstprodukte zu erkennen sind (Abb. 16). Das Inkubationsmedium wird dabei instabil und trübt sich.

Das weiter zentralwärts gelegene Gewebe des inkubierten Blöckchens läßt keine Differenzierung der Feinstrukturen der Zelle zu. Lediglich der Bürstensaum, die Zellgrenzen, die basalen Einfaltungen und die Zellmembran der Endothelien sind durch die Bleiniederschläge als solche zu erkennen. Aber auch hier findet man die Mikrokristalle nur in einer Reihe nebeneinander liegen (Abb. 17).

Die scharfe Lokalisation des Präzipitats im Phosphatase-Test in einer etwa 40 Å betragenden Zone innerhalb der Zellmembran spricht für den *Sitz des Enzyms innerhalb oder direkt unterhalb der Zellmembran*. Die Größe der Mikrokristalle schwankt zwar in gewissen Grenzen, sie sitzen aber der Membran unmittelbar auf. Wir konnten niemals beobachten, daß die Kriställchen bei genau senkrecht geschnittenen Membranen außerhalb des Zytoplasmas im extrazellulären Raum gelegen sind, was aber der Fall sein müßte, wenn bei dem Test stärkere Diffusionseffekte eine Rolle spielen würden.

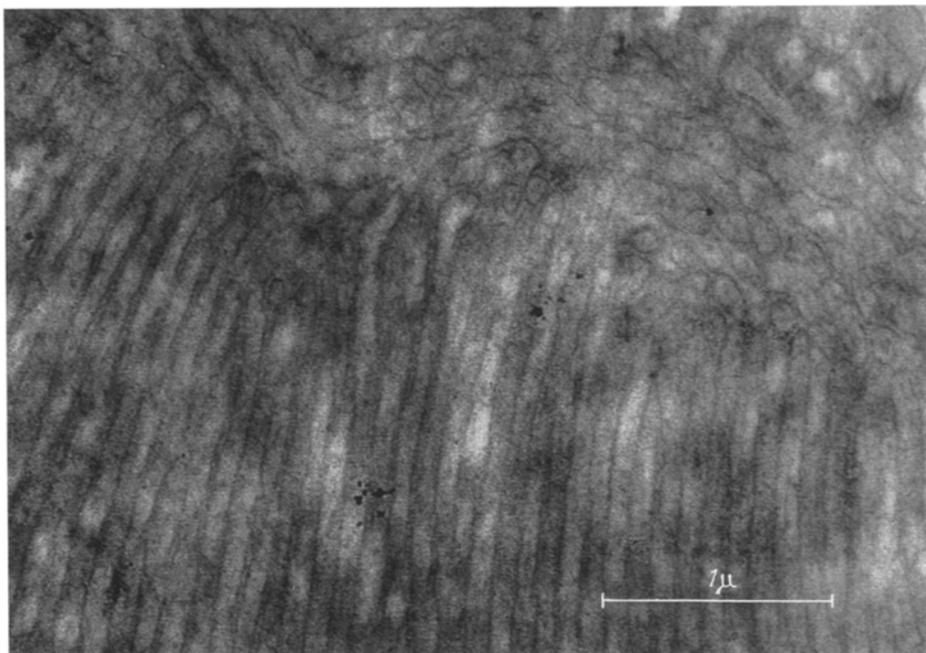


Abb. 1

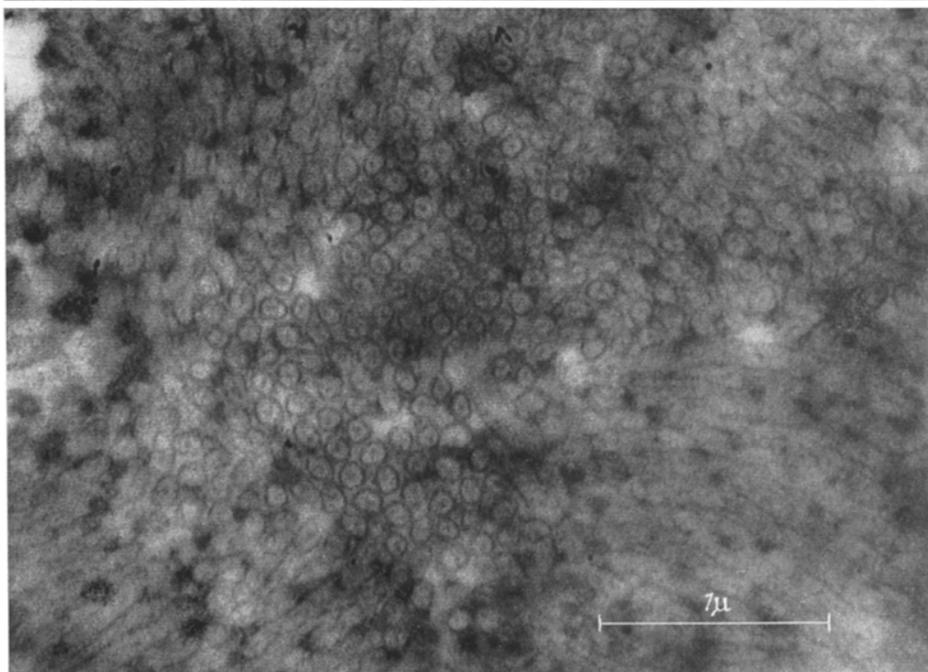


Abb. 2

Abb. 1. Bürstensaum einer Tubulusepithelzelle der Mäuseniere im Längsschnitt nach Gomori-Test. Kleine Kalziumphosphatkristalle mit schwachem Kontrast in einer Reihe an der Zellmembran liegend. Orig.-Vergr. 10000 \times , Gesamtvergr. 30000 \times , Arch.-Nr. 575/59

Abb. 2. Bürstensaum einer Tubulusepithelzelle im Querschnitt. Das Reaktionsprodukt besetzt die Zellmembran der Mikrovilli. Kalziumphosphat ergibt nur einen schwachen Kontrast im elektronenmikroskopischen Bild. Orig.-Vergr. 10000 \times , Gesamtvergr. 30000 \times , Arch.-Nr. 575/59

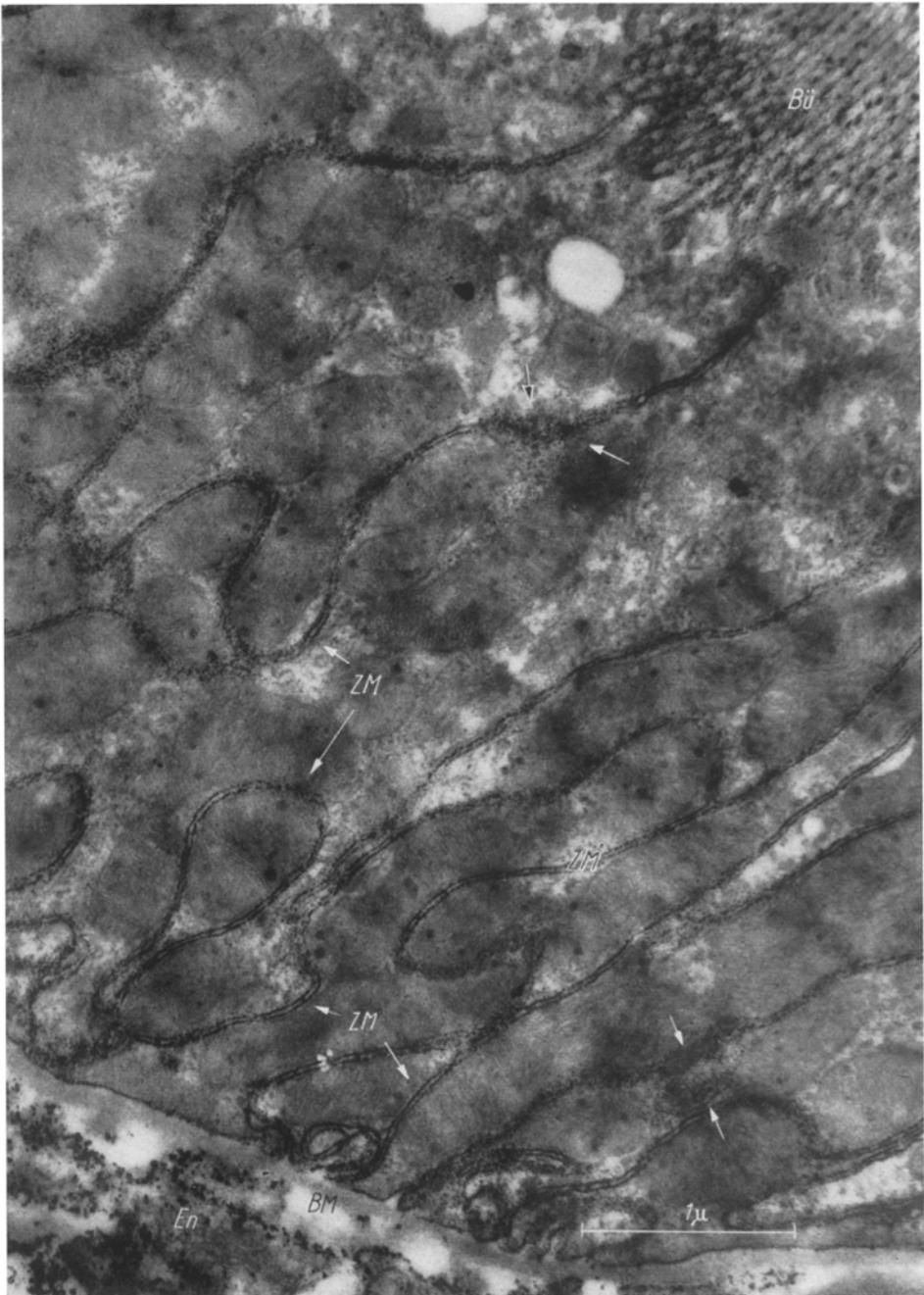


Abb. 3. Tubulusepithelzellen der Mäusenieren im Phosphatase-Test mit Bleisalz. Die Zellmembran der Endothelzelle (*En*) mit Bleiphosphatniederschlag. Der Basalmembran (*BM*) aufliegend die Tubuluszelle mit Einfaltung der Zellmembran (*ZM*), besonders deutlich durch den Phosphatase-Test hervorgehoben. Die Zellmembranen verlaufen bei senkrechter Schnittführung parallel zueinander. Im Flachschnitt lassen sich die Membranen durch den Bleiphosphatniederschlag nachweisen (—→). Mehrere Zellen im Bürstensaum (*Bü*) (obere rechte Ecke) vereinigt, ebenfalls positiv.

Orig.-Vergr. 8000 ×, Gesamtvergr. 28000 ×, Arch.-Nr. 1157/59

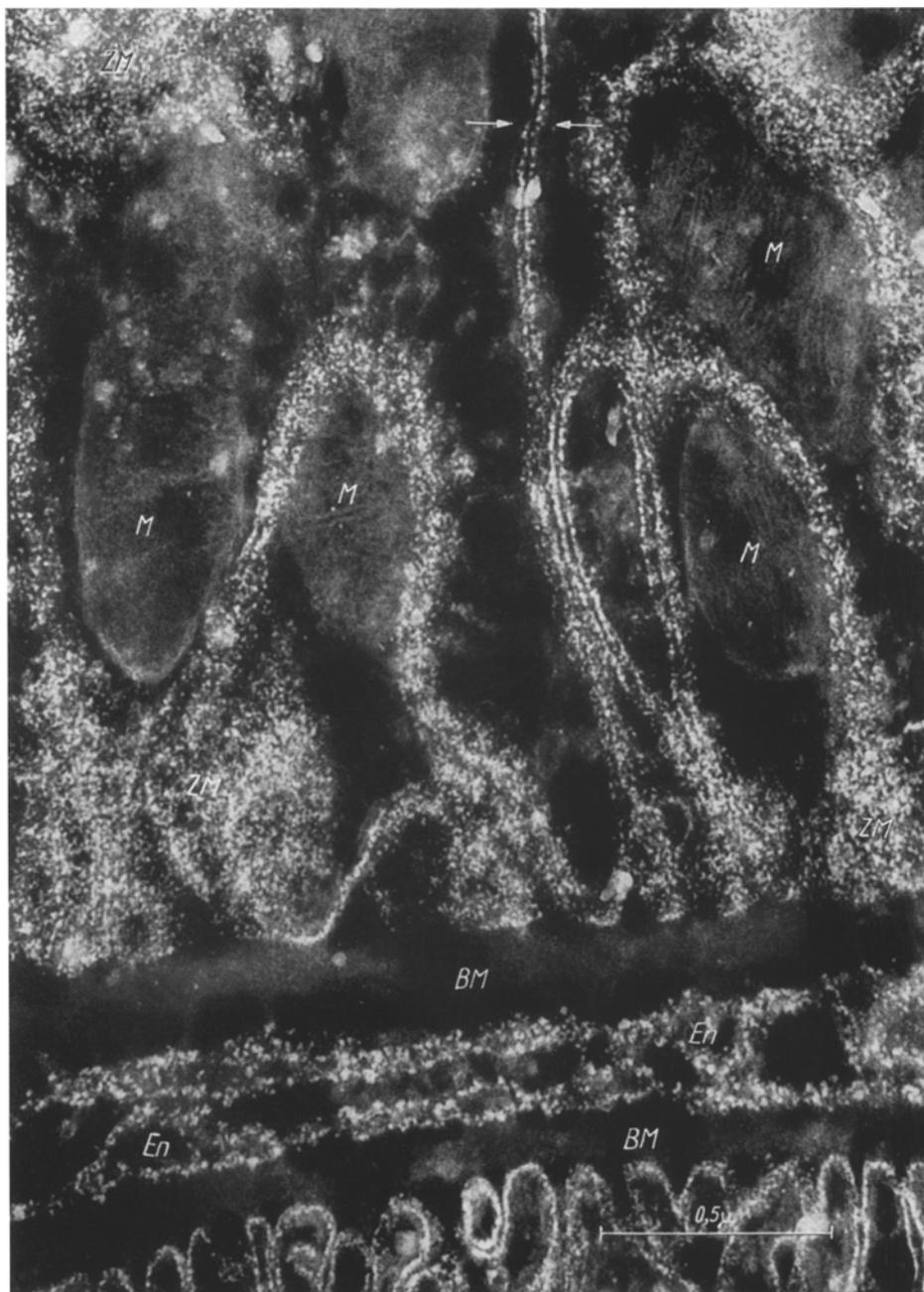


Abb. 4. Negativkopie der Basalzone von Tubulusepithelzellen im Phosphatase-Test mit Bleisalz. Der Basalmembran (*BM*) aufsitzend die Faltensysteme der Zelle. Die Zellmembranen sind mit Bleiphosphatkristallen besetzt, die deutlich in einer Reihe liegen, besonders gut an den senkrecht getroffenen Membranen zu beobachten (—→). Im Extrazellulärraum zwischen 2 Zellmembranen *keine* Bleiphosphatkristalle zu finden (—→). Die flachgeschnittenen Zellmembranen (*ZM*) heben sich deutlich vom Untergrund durch die Bleiniederschläge ab. Die Mitochondrien (*M*) lassen deutlich Cristae mitochondriales erkennen. Sie sind im Phosphatase-Test negativ. Die Zellmembran der Endothelzelle (*En*) ist positiv. Orig.-Vergr. 20 000 ×, Gesamtvergr. 60 000 ×, Arch.-Nr. 975/59

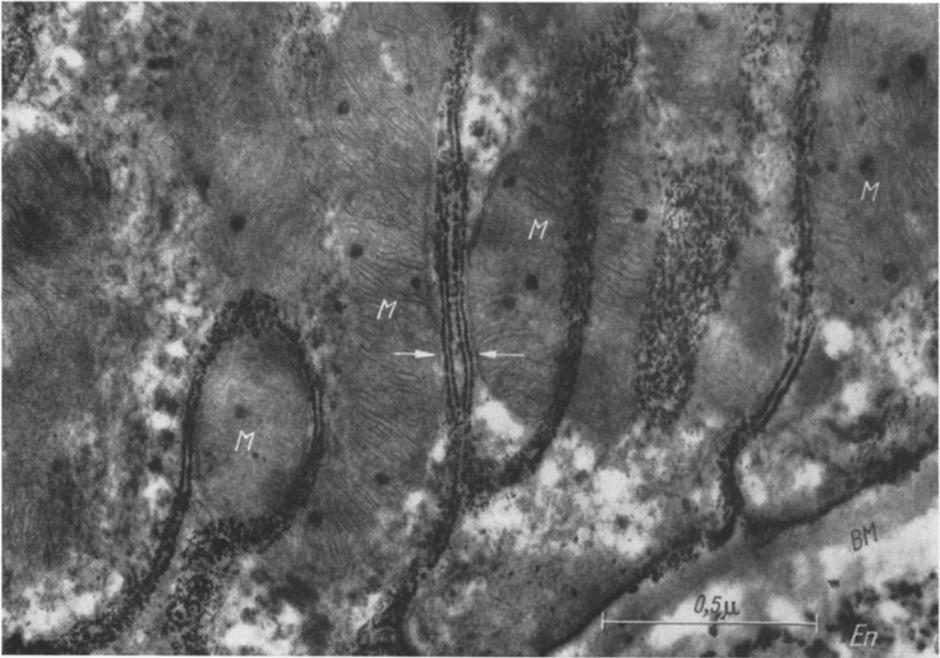


Abb. 5

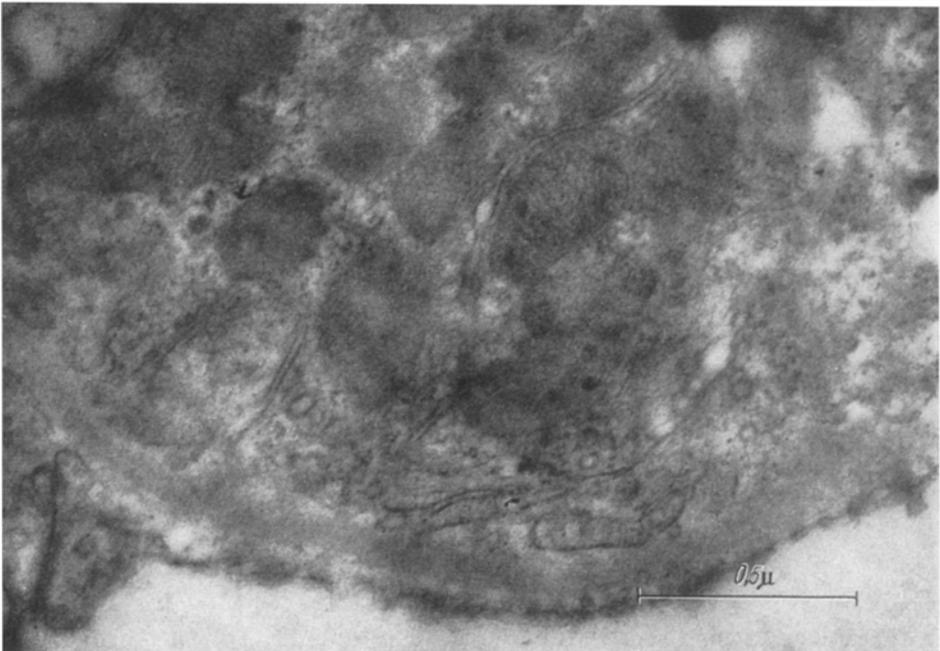


Abb. 6

Abb. 5. Basalzone einer Tubulusepithelzelle im Phosphatase-Test mit Bleisalz. Die Einfaltungen der Zellmembranen dicht besetzt mit Bleiphosphatkristallen. Die Mitochondrien (*M*) gut fixiert, mit deutlichen inneren Doppelmembranen. Orig.-Vergr. 20 000 ×, Gesamtvergr. 56 000 ×, Arch.-Nr. 962/59

Abb. 6. Basalzone einer Tubulusepithelzelle. Kontrollversuch (Reaktionsgemisch ohne Substrat). Keine Niederschläge von Bleiphosphat an den Zellmembranen. Orig.-Vergr. 8000 ×, Gesamtvergr. 56 000 ×, Arch.-Nr. 1141/59

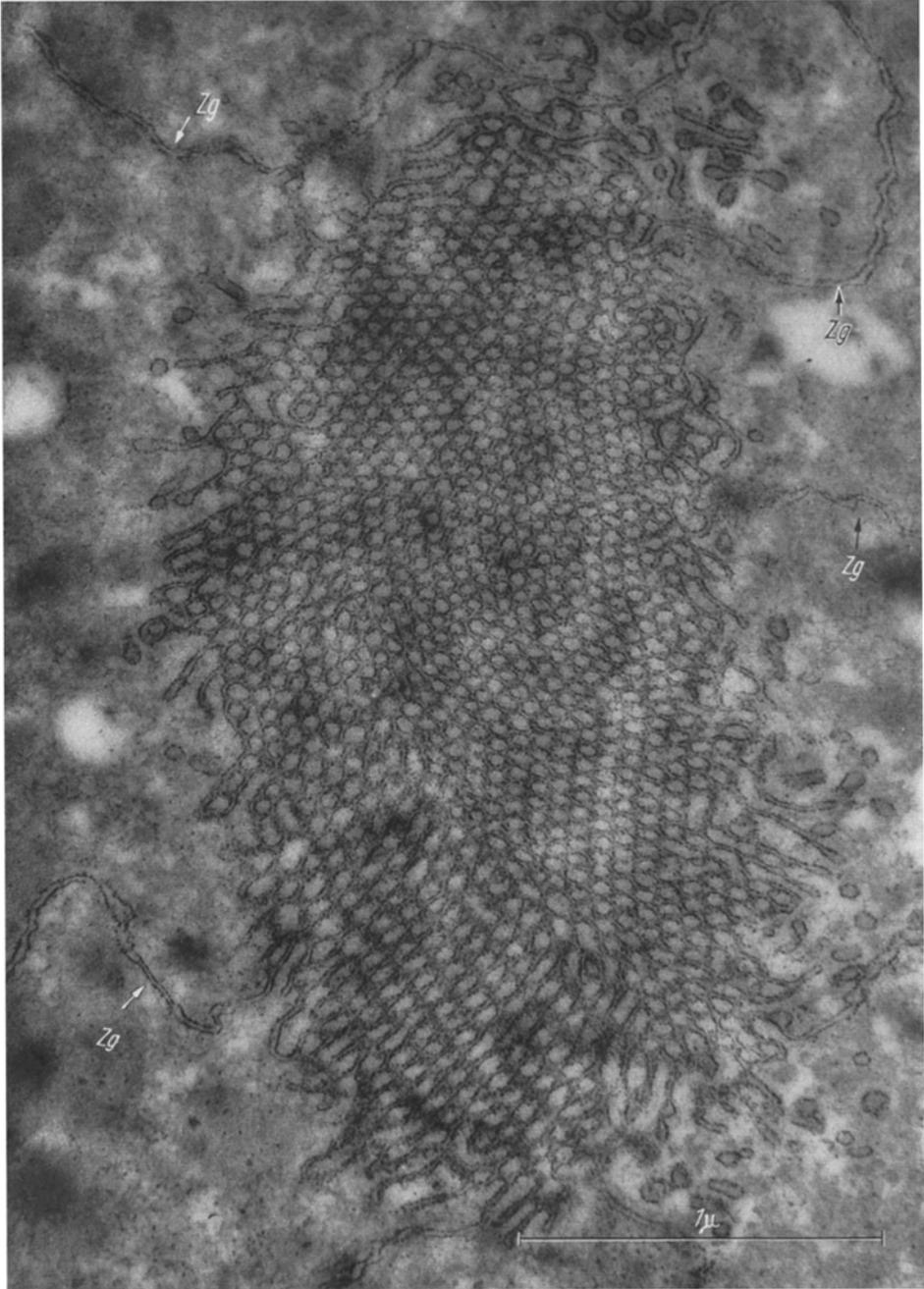


Abb. 7. Bürstensaum (Querschnitt) einer Tubulusepithelzelle im Phosphatase-Test mit Bleisalz. Die Membranen der Mikrovilli sind dicht mit Bleiphosphatkristallen in *einer* Reihe besetzt. Die Zellgrenzen (Zg) sind deutlich durch zwei annähernd parallel verlaufende, mit Bleiphosphat besetzte Membranen hervorgehoben. Orig.-Vergr. 8000 \times , Gesamtvergr. 48000 \times , Arch.-Nr. 1137/59

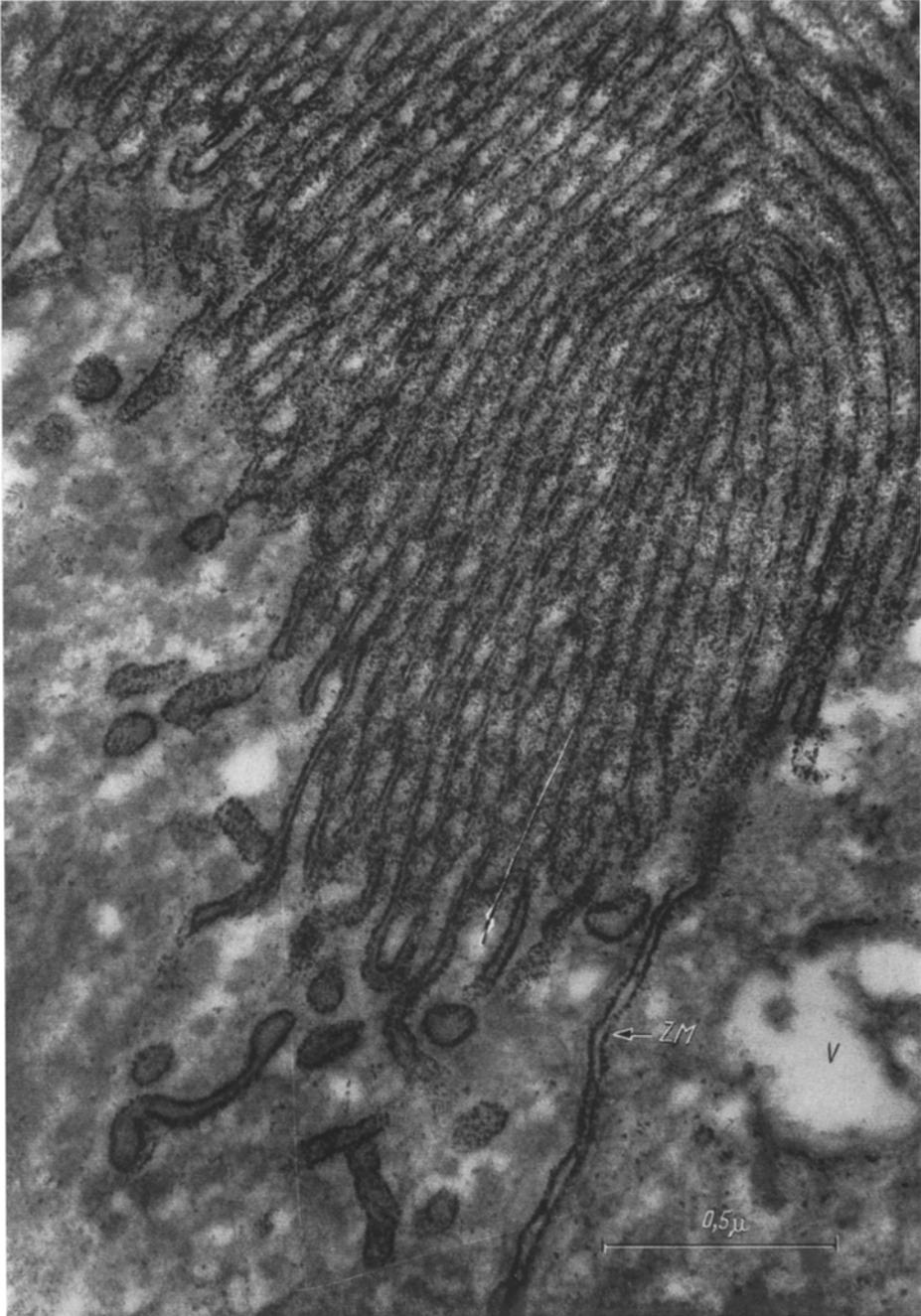


Abb. 8. Längsschnitt durch den Bürstensaum einer Tubulusepithelzelle im Phosphatase-Test mit Bleisalz. Die Membranen der Stäbchen des Bürstensaumes mit positiver Phosphatase-reaktion. Extrazellulär zwischen den Mikrovilli *keine* Niederschläge von Bleiphosphat nachweisbar. Die positiven Bläschen im Cytoplasma, sind Ausschnitte von einzelnen Stäbchen des Bürstensaumes. Bei ZM Zellgrenzmembranen zweier Zellen. Auch hier die Reaktionsprodukte des Phosphatase-Testes zyttoplasmawärts gelegen. V Vakuole im Zytoplasma. Orig.-Vergr. 20 000 ×, Gesamtvergr. 60 000 ×, Arch.-Nr. 1129/59

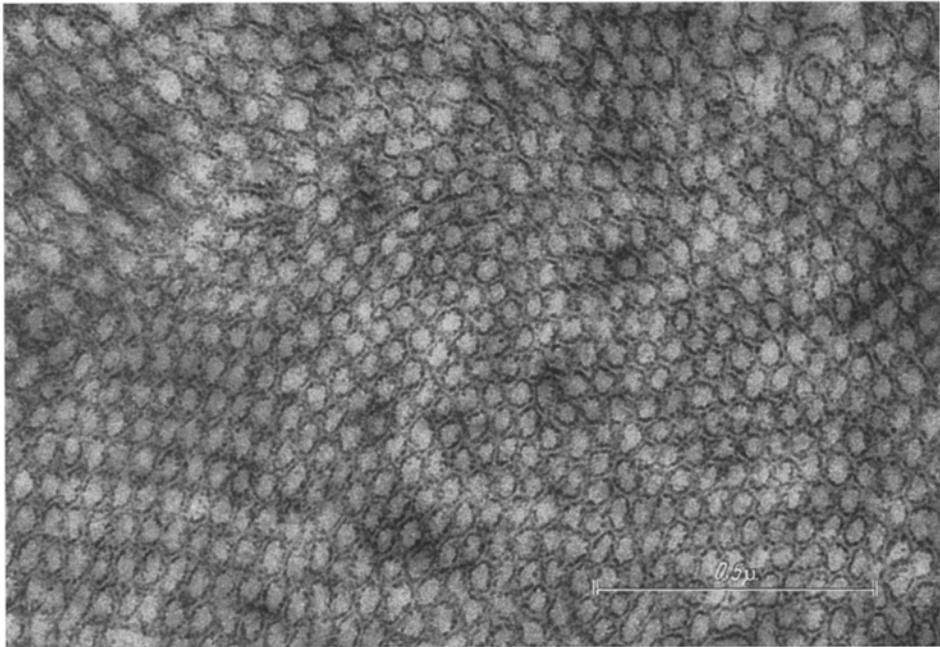


Abb. 9

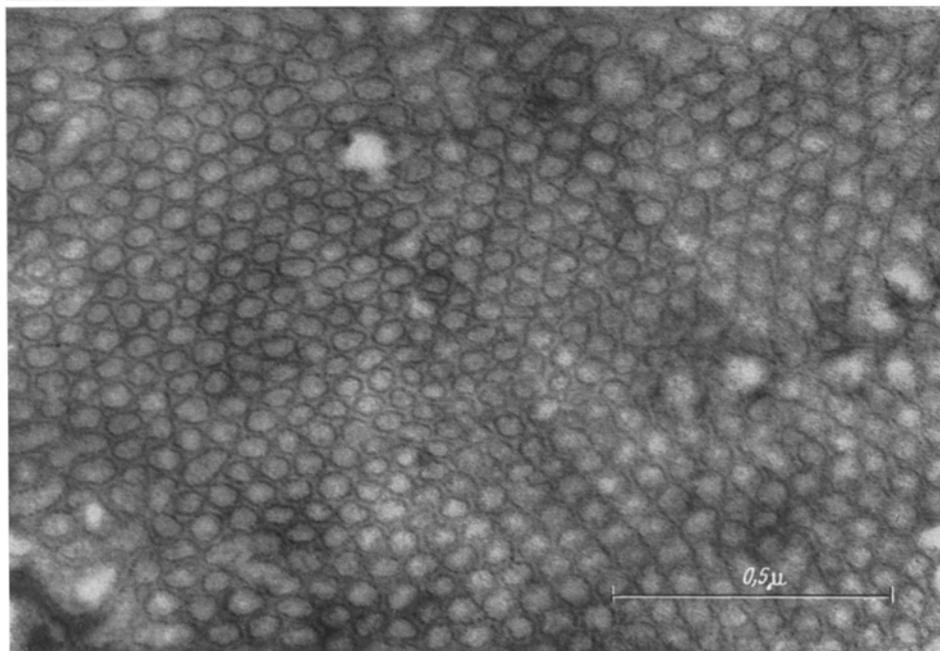


Abb. 10

Abb. 9. Quergeschnittener Bürstensaum im Phosphatase-Test. Entlang der Zellmembranen sitzen kontrastreiche Körnchen von Bleiphosphat streng in einer Reihe. Extrazellulär in den Spalten zwischen zwei Membranen keine Niederschläge nachweisbar. Orig.-Vergr. 78000 ×, Gesamtvergr. 72000 × Arch.-Nr. 1137/59

Abb. 10. Quergeschnittener Bürstensaum. Kontrollversuch. Im gleichen Gemisch, nur ohne Substrat, wie Gewebe der Abb. 9 inkubiert. Keine Niederschläge an der Zellmembran nachweisbar. Orig.-Vergr. 8000 ×, Gesamtvergr. 72000 ×, Arch.-Nr. 1159/59

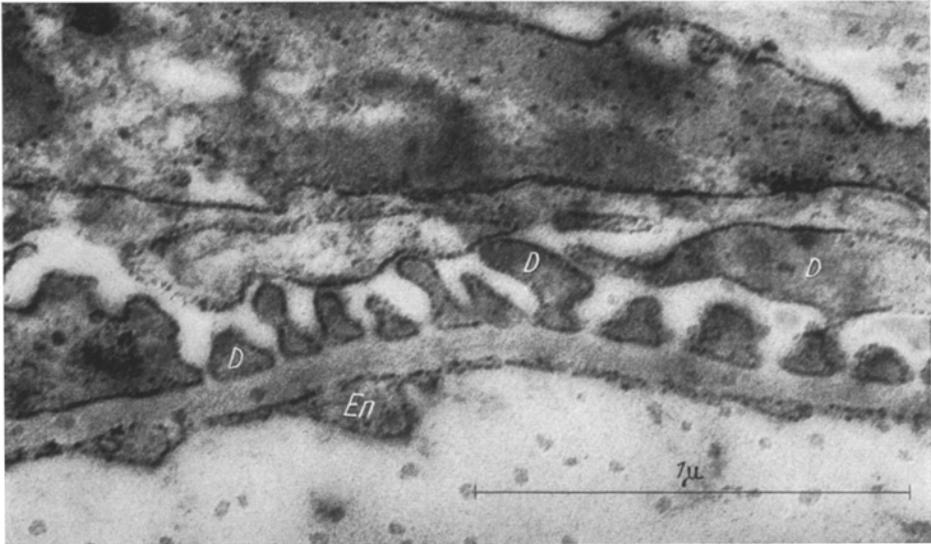


Abb. 11



Abb. 12

Abb. 11. Ausschnitt aus einer Glomerulusschlinge im Phosphatase-Test mit Bleisalze. Die Zellmembranen der Kapillarendothelien (*En*) und der Deckzellfortsätze (*D*) sind enzymatisch aktiv. Orig.-Vergr. 8000 \times , Gesamtvergr. 56000 \times , Arch.-Nr. 979/59

Abb. 12. Ausschnitt aus einer Glomerulusschlinge aus den gut fixierten Außenbezirken eines Testblöckchens. Durch die Inaktivierung keine enzymatische Reaktion. Endothelzelle (*En*), Deckzelle (*D*), Erythrozyt (*E*). Orig.-Vergr. 8000 \times , Gesamtvergr. 56000 \times , Arch. Nr. 1142/59

Mit dem Phosphatase-Test fand gleichzeitig ein anderes Phänomen seine Erklärung. In der Regel findet man im elektronenmikroskopischen Bild der Zelle mehr senkrecht geschnittene Membranen als nach statistischer Berechnung über die Anordnung der Membransysteme zu erwarten wäre. Für die Mitochondrien

konnte dieses Problem von ANDERSON-CEDERGREEN (1959) gelöst werden, indem die Autorin an Serienschritten Rekonstruktionen geschnittener Mitochondrien

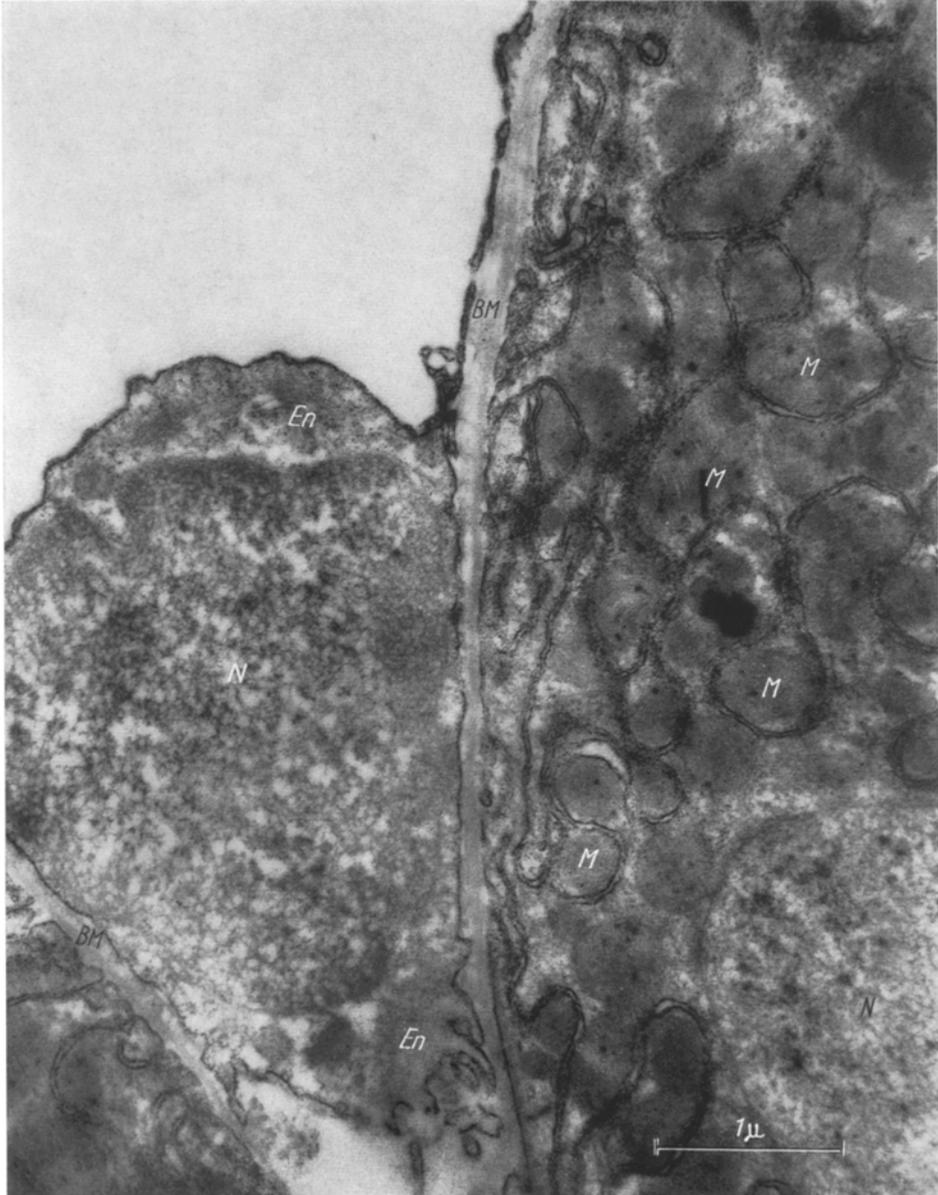


Abb. 13. Basale, kapillarwärts gelegene Zone von Tubulusepithelzellen im Phosphatase-Test mit Bleisalz. Die Endothelzelle (*En*) der Kapillare mit großem Zellkern (*N*) zeigt unspezifische Bleieinlagerung. Das Cytoplasma der Endothelzelle ohne Reaktion, aber deutlich positive Reaktion der Zellmembran. Die zytoplasmatischen Ausläufer der Endothelzellen lassen durch die Besetzung mit Bleiphosphatkristallen besonders schön die Endothelporen erkennen. Die Basalmembran (*BM*) ohne Reaktion. Die Einfaltungen der Zellmembran der Tubulusepithelzellen mit deutlicher Reaktion auf Phosphatasen. Die Mitochondrien (*M*) ohne Reaktion. Im Zellkern (*N*) unspezifische Bleieinlagerung. Orig.-Vergr. 8000 \times , Gesamtvergr. 24 000 \times , Arch.-Nr. 1134/59

durchführte. Aber der mögliche Aufbau anderer Membransysteme blieb zum Teil problematisch. Durch den Phosphatase-Test kann nun eindeutig gezeigt werden,

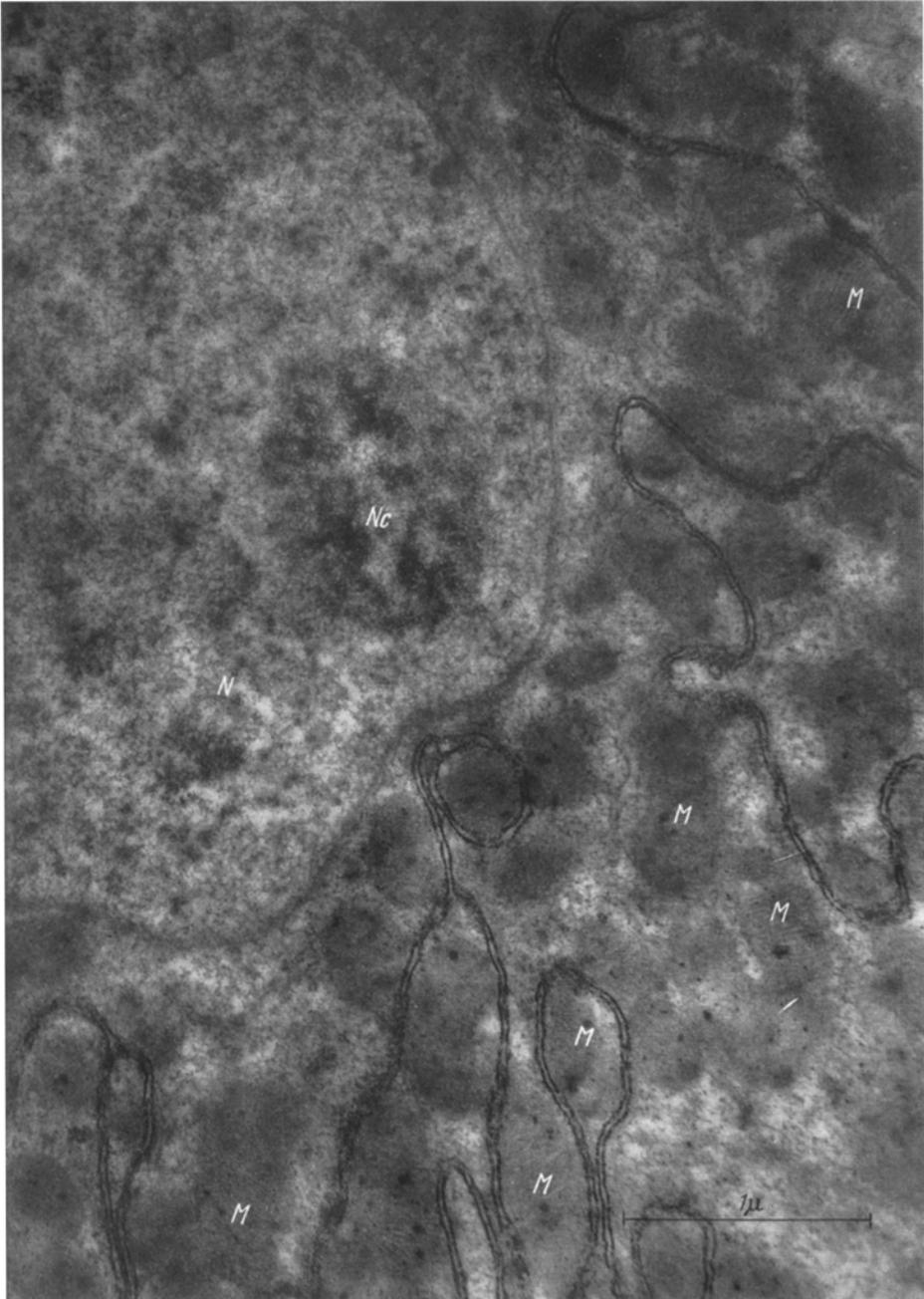


Abb. 14. Tubulusepithelzelle im Phosphatase-Test. Die Einfaltungen der Zellmembran deutlich enzymatisch positiv. Im Zellkern (N) besonders im Nukleolus (Nc) unspezifische Bleieinlagerung. Die Mitochondrien (M) ohne Reaktion, die Cristae mitochondriales durch die ausreichende Fixation gut erhalten. Orig.-Vergr. 8000 \times , Gesamtvergr. 32000 \times , Arch.-Nr. 1133/59

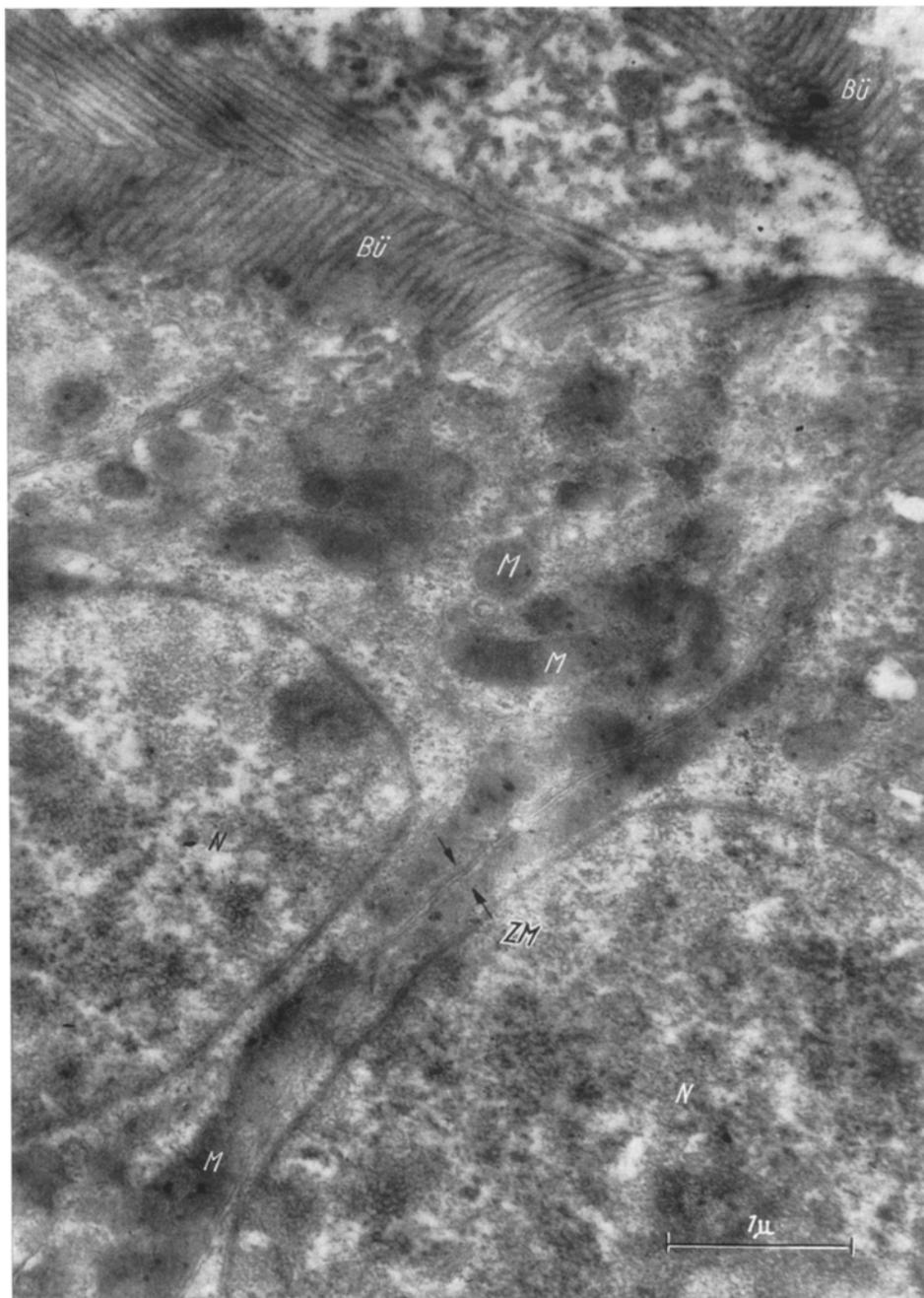


Abb. 15. Tubulusepithelzelle. Kontrollversuch. Kontrolllösung bestehend aus Reaktionsgemisch ohne Substrat. Keine unspezifischen Niederschläge von Bleisalz, weder an der Zellmembran, noch am Bürstensaum (*Bü*). In den Zellkernen schwache unspezifische Bleieinlagerung. Mitochondrien (*M*), Zellmembran (*ZM*). Orig.-Vergr. 8000 \times , Gesamtvergr. 24000 \times , Arch.-Nr. 1162/59

daß die Membranen im Flachschnitt infolge des geringen Kontrastes im Elektronenmikroskop nicht mehr zur Abbildung gelangen und sich damit der

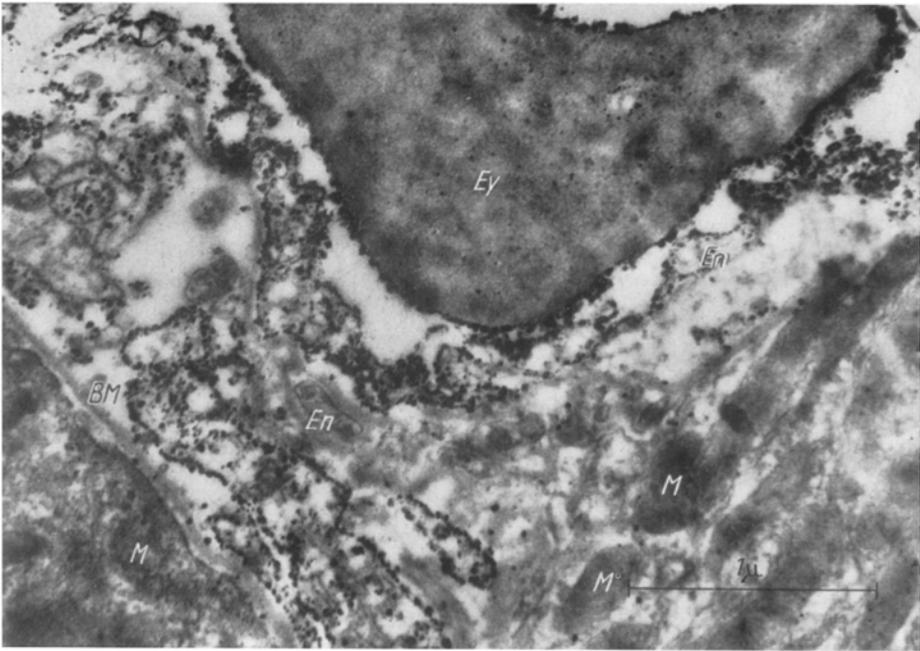


Abb. 16

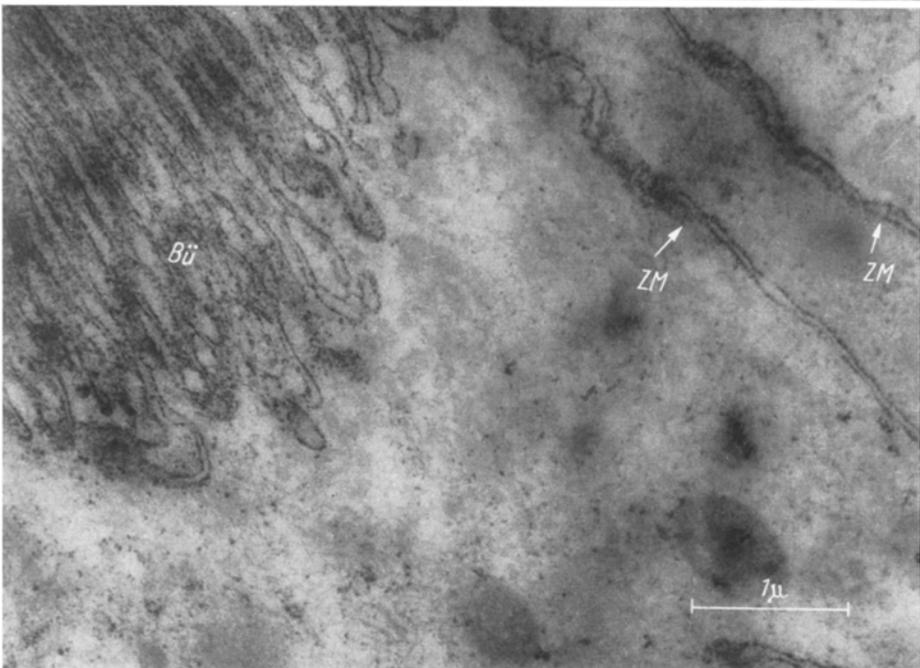


Abb. 17

Abb. 16. Kapillare mit Basalzone von Tubulusepithelzellen. Unspezifische ungeordnete Bleisalz-niederschläge nach 30 min Inkubation bei getrüübtem Reaktionsgemisch (Artefakt). Erythrozyt (*Ey*), Endothelzelle (*En*), Basalmembran (*BM*), Mitochondrien (*M*). Orig.-Vergr. 8000 \times , Gesamtvergr. 32000 \times , Arch.-Nr. 972/59

Abb. 17. Ausschnitt aus einer Tubulusepithelzelle aus dem schlecht fixierten Zentrum eines Geweblöckchens nach Phosphatase-Test. Die Zellmembranen (*ZM*) und der Bürstensaum (*Bü*) im Phosphatase-Test dargestellt. Im Zytoplasma sind Feinstrukturen nicht zu erkennen, da keine genügende Fixation. Orig.-Vergr. 8000 \times , Gesamtvergr. 20000 \times , Arch.-Nr. 1188/59

statistischen Erfassung entziehen. Der Test bringt aber diese Membranteile durch die Einlagerung von Blei auch im Flachschnitt deutlich zur Darstellung (Abb. 4 und 5).

Die Lokalisation der Phosphatasen im Bürstensaum der Tubuluszelle ist kein neuer Befund. Schon in den ersten Arbeiten, die sich der Gomori-Takamatsu-Methode bedienten, wurde der Bürstensaum als Sitz der Phosphatasen erkannt. Unser elektronenmikroskopischer Befund zeigt jedoch, daß nicht der Mikrovillus in seiner Gesamtmasse, sondern nur in seiner *Membranschicht Träger der enzymatischen Aktivität* ist. Nach lichtmikroskopischen Untersuchungen von SPOHR, NOVIKOFF, MASEK ist auch die Adenosintriphosphataseaktivität in der Zellmembran lokalisiert. Mit Glycerinphosphat als Substrat konnte von den Autoren jedoch weder bei neutraler, schwach saurer noch alkalischer Reaktion in den gefalteten Membranen der Tubuluszelle eine enzymatische Aktivität gefunden werden.

Die Zuverlässigkeit der Methode von GOMORI und TAKAMATSU wurde niemals ernstlich in Frage gestellt, wenn sie zur Untersuchung der Verteilung enzymatischer Aktivitäten in Organen herangezogen wurde, und der Auswertung die Zelle als strukturelle Einheit zugrunde gelegt wurde.

Die Anwendbarkeit der Methode zur intrazellulären Lokalisation stieß auf eine scharfe Kritik. Eine Fehllokalisation kann dadurch hervorgerufen werden, daß die *Präzipitationsorte* von Orthophosphat in dem Reaktionsgemisch aus Substrat und einem Kation (Ca, Pb) nicht identisch mit den *Enzymorten* sind. Dies kann auf zwei verschiedene Ursachen zurückgeführt werden:

a) Unter den Bedingungen des Testes diffundieren Enzymmoleküle vom ursprünglichen Zellort ab, bleiben in Lösung oder lagern sich an fremde Zellstrukturen an.

b) Die während der Testreaktion am Enzymort freigesetzte Orthophosphorsäure wird nicht momentan gefällt, sondern wandert vom Bildungsort ab. Phosphat, Ca- bzw. Pb-Ionen können mit Proteinen und Nukleinsäuren der Zelle in Wechselbeziehung treten; oder es bildet sich eine übersättigte Lösung, aus der eine Präzipitation nicht am Enzymort, sondern dort einsetzt, wo Kristallisationskeime liegen oder sonst günstige Bedingungen herrschen.

Eine kurze allgemeine Besprechung des Problems der Fehllokalisation bei der zytochemischen Anwendung des Gomori-Testes gibt PEARSE (1954). Die Prozesse der Freisetzung und Diffusion von Orthophosphationen haben an Hand eines Modelles JOHANSEN und LINDERSTRÖM-LANG behandelt. Einer Entgegnung von GOMORI und BENDITT (1953) haben JOHANSEN und LINDERSTRÖM-LANG (1953) geantwortet. Eine zufriedenstellende Abklärung der Frage nach der Zuverlässigkeit des Gomori-Testes in der Zytochemie konnte bis heute nicht erreicht werden.

Auf Grund unserer Erfahrungen möchten wir zu dieser Frage wie folgt Stellung nehmen:

Eine gute Lokalisation der enzymatischen Aktivität innerhalb der Zelle ist mit einer quantitativen Erfassung der enzymatischen Aktivität unvereinbar.

Alle Bemühungen, durch eine schonende Fixation oder den Verzicht auf eine Fixation die enzymatische Aktivität zur Hauptsache oder vollständig zu erhalten, haben eine Schädigung der Zellstruktur während der Inkubation zur Folge. Diese führt zu einer Ablösung von Enzymmolekülen und gibt damit notgedrungen Anlaß zu Unschärfe und Fehllokalisation.

Die Zusammensetzung der Reaktionsmedien zur optimalen Erfassung der enzymatischen Aktivität (Puffer, alkalisches p_H , Aktivatoren) sind in der Regel der Erhaltung der Zellstruktur abträglich.

Die *intrazellulären histochemischen Reaktionen* sind daher ihrem Wesen nach *qualitative Methoden*, die dazu dienen, die Lokalisation enzymatischer Aktivität in der Feinstruktur der Zelle darzustellen.

Man kann nicht vermeiden, Verfahren zur Erhaltung der Struktur (Fixierung) anzuwenden, die mit einer partiellen Inaktivierung der enzymatischen Aktivität verbunden sind. LISON hat stets die Bedeutung einer guten Fixierung in der Histochemie betont.

Zur quantitativen Erfassung der enzymatischen Aktivität stehen die klassischen Methoden der Biochemie (Homogenisationstechnik) und die Methoden der Mikrodissektion (LINDERSTRÖM-LANG und HOLTER) zur Verfügung. Sie sind naturgemäß ungeeignet, eine feinere Lokalisation der enzymatischen Aktivität durchzuführen.

Eine enzymatisch-histochemische Reaktion in den Dimensionen der Elektronenmikroskopie muß stets eine Kompromißlösung zwischen Fixierung und Erhaltung einer ausreichenden enzymatischen Aktivität bleiben. Der Test setzt freilich voraus, daß die enzymatische Aktivität in der Zelle nicht schwach und diffus verteilt, sondern an distinkte Formelemente in hoher Aktivität gebunden ist. Durch eine passende Vorfikation wird das Enzym in dieser hohen räumlichen Konzentration konserviert, wobei nicht vermieden werden kann, daß hierbei ein Teil der natürlichen Aktivität verlorengeht. Durch das Festlegen von Enzym an distinkte Formelemente der Zelle wird erreicht, daß auch das Produkt der enzymatischen Reaktion auf engstem Raum mit einer hinreichend hohen Geschwindigkeit anfällt, um in Gegenwart von Bleitionen und einer passenden Wasserstoffionenkonzentration so rasch Kristallkeime von Bleiphosphat zu bilden, daß die Niederschlagsbildung in unmittelbarer Nähe des Enzymortes eintritt.

Für diese speziellen Bedingungen gelten die seinerzeit von JOHANSEN und LINDERSTRÖM-LANG erhobenen Bedenken gegen die Lokalisationsschärfe des Gomori-Testes nicht.

Zusammenfassung

An der Niere der Albinomaus wurde nach Vorfikation mit Osmiumtetroxyd eine modifizierte Gomori-Reaktion auf Phosphatasen durchgeführt. Als Fällungsmittel der bei dem Test freigesetzten Orthophosphorsäure wurde ein Bleisalz verwendet. Damit konnte im elektronenmikroskopischen Bild am Enzymort ein feinkörniger Niederschlag mit hohem Kontrast erzielt werden. Als Sitz der bei p_H 7,6—7,7 wirksamen Phosphatasen konnten die Membran des Bürstensaums und die basalen Einstülpungen der Zellmembran der Tubulusepithelzellen erkannt werden. Enzymatisch aktiv wurden ferner die Zellmembranen der Kapillarendothelien des Tubulus und des Glomerulus sowie die Deckzellfortsätze (Microvilli) des Glomerulus befunden.

Das Problem der intrazellulären Lokalisation von Phosphatasen wird diskutiert.

Summary

A modified Gomori-reaction on phosphatases of the albino-mouse kidney was performed. The method of prefixation with osmiumtetroxyde was used. The orthophosphoric acid, liberated in the test and crystallized by lead salt, yielded

a fine granulated sediment with a high contrast at the location of enzyme in the electronmicroscopic picture. The phosphatases, active at a p_H of 7,6—7,7, could be located in the membranes of the brushborder and in the basal invaginations of the membranes of the tubuli cells. Furthermore an enzymatic activity was observed in the membranes of the capillary endothelium cells in the tubulus as well as in the glomerulus and in the microvilli of the glomerulus.

Problems resulting from the test for the phosphatase were discussed.

Literatur

ANDERSSON-CEDERGREEN, E.: Ultrastructure of motor end plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber. *J. ultrastruct. Res. Suppl.* **1** (1959). — BARNETT, R. J.: Histochemical demonstration of dehydrogenase systems requiring pyridine nucleotide co-enzymes, with the electron microscop. *Anat. Rec.* **127**, 395 (1957). — Histochemistry and electron microscopy. 4. Internat. Kongr. Elektr.mikrosk., Berlin, 1958. — The demonstration with the electron microscope of the endproducts of histochemical reactions in relation to the fine structure of cells. *Exp. Cell Res., Suppl.* **7**, 65—89 (1959). — BARNETT, R. J., and G. E. PALADE: Histochemical demonstration of the sites of activity of dehydrogenase systems with the electron microscope. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 577—588 (1957). — Application of histochemistry to electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 1—12 (1958). — Enzymatic activity in the M-band. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 163—169 (1959). — ESSNER, E., A. B. NOVIKOFF and B. MASEK: Adenosinetriphosphatase and 5-nucleotidase activities in the plasma membrane of liver cells as revealed by electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 711—716 (1958). — GERSH, J.: Selective and cytochemical staining of frozen-dried preparations for study with the electron microscope. 4. Internat. Kongr. Elektr.mikrosk., Berlin, 1958. — GOMORI, G., and E. P. BENDITT: Precipitation of calcium phosphate in the histochemical method for phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 114—122 (1953). — JOHANSEN, G., and K. LINDERSTRÖM-LANG: Precipitation of phosphate in the Gomori-test. *Acta chem. scand.* **5**, 965—967 (1951). — Liberation, diffusion and precipitation of phosphate in the Gomori-test. *Acta med. scand.* **142**, 601—613 (1952). — Liberation, diffusion and precipitation of phosphate in the Gomori-test. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 442—446 (1953). — KAPLAN, S. E., and A. B. NOVIKOFF: The localization of adenosine triphosphatase activity in rat kidney. *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 295 (1959). — LISON, L.: La recherche histochimique des phosphates. *Etude critique. Bull. Histol. Techn. micr.* **25**, 23—41 (1948). — MÖLBERT, E., F. DUSPIVA u. O. v. DEIMLING: Die Darstellung der Phosphatasen im elektronenmikroskopischen Bild. *J. biophys. biochem. Cytol.* (im Druck). — NOVIKOFF, A. B.: The validity of histochemical phosphatase methods on the intracellular level. *Science* **113**, 320—325 (1951). — PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry*. London: Churchill 1954. — RHODIN, J.: Electron microscopy of the kidney. *Amer. J. Med.* **24**, 661—675 (1958). — ROBERTSON, J. S.: Ordering in lamellar systems. 4. Internat. Kongr. Elektr.mikrosk., Berlin, 1958. — RUSKA, H., D. H. MOORE and J. WEINSTOCK: The base of the proximal convoluted tubule cells of rat kidney. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 249—254 (1957). — SJÖSTRAND, F. S., and J. RHODIN: The ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as revealed by high resolution electron microscopy. *Exp. Cell Res.* **4**, 426—456 (1953). — SPATER, H. W., A. B. NOVIKOFF and B. MUSEK: Adenosine triphosphatase activity in the cell membranes of kidney tubule cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 765 (1958). — UNAKAR, N. J., and S. M. SIRSAT: Distribution of succinic dehydrogenase in the human spermatozoa as revealed in the electron microscope. 4. Internat. Kongr. Elektr.mikrosk., Berlin, 1958. — WATSON, M. L.: Staining of tissue section for electron microscopy with heavy metals. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 475—478 (1958). — Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 727—730 (1958).

Dr. ELISABETH MÖLBERT, Dr. OTTO v. DEIMLING,
Pathologisches Institut der Universität Freiburg

Prof. Dr. F. DUSPIVA,

Zoologisches Institut der Universität Heidelberg, Sofienstr. 6