Ber. Nat.-Med. Ver. Salzburg	Band 8	S. 101 – 114	Salzburg 1986
©Naturwissenschaftlich-Medizinischen Vereinigung in Salzburg; download unter www.biologiezentrum.at

DAS „ANUCLEAR TYPE OF DEVELOPMENT" (ATD)-PHÄNOMEN, HERVORGERUFEN DURCH HEMMUNG DER PROTEINSYNTHESE, BEI VERSCHIEDENEN DESMIDIACEEN

THE „ANUCLEAR TYPE OF DEVELOPMENT" (ATD)-PHENOMENON INDUCED BY AN INHIBITION OF PROTEIN SYNTHESIS IN VARIOUS DESMIDS

Von Oswald KIERMAYER und Ursula MEINDL

Aus dem Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Salzburg
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Oswald Kiermayer)

Summary

In the introduction a survey is given on our present knowledge and the corresponding literature concerning the problem of the „anuclear type of development" (ATD-syndrom) in the desmid *Micrasterias.*

In experiments with the inhibitor of protein-synthesis cycloheximide, administered to divison stages of *Xanthidium armatum* and *Closterium lunula* it is shown that also these desmids exhibit characteristic ATD-forms with a reduction of their cell pattern and a swelling of the young half cells.

With the aid of the „cellulase onozuka test" it could be shown that in both algal species an inhibition of protein synthesis during the growth of the young half cell leads to a total inhibition of secondary wall formation which represents – together with the early bursting of the treated cells – a characteristic symptom of the ATD-syndrom.

Zusammenfassung

In der Einleitung wird ein Überblick über das heutige Wissen und die Literatur zum Problem des „anuclear type of development" (ATD-Syndrom) bei der Desmidiacee *Micrasterias* gegeben.

Es werden Versuche mit dem Proteinsynthese-Blocker Cycloheximid bei Teilungsstadien von *Xanthidium armatum* und *Closterium lunula* beschrieben und

©Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesellschaft in Salzburg; download unter www.biologiezentrum.at

gezeigt, daß auch bei diesen Desmidiaceen charakteristische ATD-Formen entstehen, die eine Reduktion des Zellmusters und eine Anschwellung der jungen Halbzelle aufweisen. Mit Hilfe des „Cellulase Onozuka Tests" wird nachgewiesen, daß bei beiden Algenarten eine Blockade der Proteinsynthese während des Wachstums der jungen Halbzelle zu einer völligen Hemmung der Sekundärwandbildung führt, die ebenso wie das festgestellte frühe Zerplatzen der ATD-Zellen ein charakteristisches Merkmal des ATD-Syndroms darstellt.

Einleitung

Bei umfangreichen cytophysiologischen Untersuchungen gelang es den beiden finnischen Pflanzenphysiologen H. WARIS und P. KALLIO um 1950 durch verschiedene experimentelle Eingriffe, insbesonders durch Zentrifugierung während der Mitose, mehrkernige und kernlose Zellen bei der Grünalge *Micrasterias* herzustellen. Bei „entkernten" Zellen zeigte es sich, daß solche Zellen nicht mehr imstande waren, beim postmitotischen Wachstum eine normal gestaltete Halbzelle auszubilden, sondern vielmehr eine in ihrer Lappenzahl stark reduzierte Form entwikkelten (KALLIO 1949, 1951, WARIS 1951, WARIS und KALLIO 1964). So bildeten sich z. B. bei *Micrasterias thomasiana* meist 5 oder 3, bei *M. rotata* nur 3 Lappen aus, wobei jede weitere Differenzierung unterblieb (WARIS 1951). Während die lateralen Lappen an Größe immer mehr zunahmen und „blasenförmige" Gebilde entwickelten, blieb der Polarlappen meist in seinem Wachstum gehemmt. Unter normalen Kulturbedingungen platzten solche Zellen nach 24 Stunden und starben ab. WARIS (1951) wies auf eine starke Vakuolisierung und Kontraktion des Chloroplasten in solchen Zellen hin. Besonders auffällig war, daß das Wachstum der Lappen „entkernter" Zellen ohne weitere Differenzierung noch stundenlang fortgesetzt wurde, während normale oder binucleare Zellen ihr Wachstum in wesentlich kürzerer Zeit beendeten (vergl. dazu die kinematographischen Zeitrafferaufnahmen bei MEINDL 1982).

Da offenbar der Mangel an einem funktionierenden Zellkern die Ursache für starke Wachstumsaberrationen war, versuchten WADDINGTON (1962), KALLIO (1963) und SELMAN (1966) solche Effekte durch eine „Entkernung" bzw. Inaktivierung des Zellkernes bei *Micrasterias*-Zellen mit Hilfe von UV-Bestrahlung durchzuführen. Während KALLIO (1963) entweder ganze Zellen oder Halbzellen mit UV-Licht bestrahlte, verwendete SELMAN (1966) ein Mikrostrahlen-Gerät, das die lokale Bestrahlung z. B. nur des Zellkernes erlaubte. Es gelang tatsächlich, durch UV-bedingte Inaktivierung des Zellkernes zu sehr ähnlichen Zellmorphosen zu gelangen, wie sie bei mechanisch entkernten (zentrifugierten) Zellen auftraten. Da diese Formanomalie eindeutig auf den Verlust der Kernaktivität zurückzuführen war, nannte SELMAN (1966) diesen aberranten Wachstumstyp der „kernlosen" *Micrasterias*-Zelle den „anuclear type of development", im folgenden als ATD-Phänomen bezeichnet, das morphologisch in erster Linie durch eine Reduktion des Zellmusters und der Ausbildung großer blasiger Lappen gekennzeichnet ist (vergl. Abb. 1–4).

©Naturwissenschaftlich-Medizinischer Verein in Salzburg; download unter www.biologiezentrum.at

SELMAN (1966) führte erstmalig UV-Bestrahlungen bei Zellkernen verschiedener Entwicklungsstadien durch und konnte dabei wahrscheinlich machen, daß die Kerndetermination für den Ablauf der Lappenbildung bei *M. thomasiana* zwischen 35 und 155 Minuten vor dem eigentlichen morphogenetischen Ereignis (Lappenteilung) eintritt.

Die Ergebnisse an UV-bestrahlten Zellkernen konnten in der Folge durch gezielte UV-Kerninaktivierung mit UV-Strahlenstichgeräten noch verfeinert und eindeutig bestätigt werden (SELMAN 1972, KALLIO und HEIKKILÄ 1972, TOURTE 1972 b, LETHONEN 1977, PIHAKASKI und KALLIO 1978). KALLIO und HEIKKILÄ (1972) führten UV-Bestrahlungen bei verschiedenen Entwicklungsstadien von *M. torreyi* und *M. thomasiana* durch und konnten eine eindeutige Beziehung zwischen Entwicklungsstadium der Zelle zum Zeitpunkt der Bestrahlung und der morphogenetischen Reaktion feststellen. Während eine UV-Bestrahlung der ganzen Zelle in der Mitosephase zu 3-lappigen, blasigen Halbzellen führte, bewirkte die Bestrahlung im Zustand der Halbzellenbildung (Bulbusstadium) etwas höher differenzierte, meist 5-lappige, blasenartige Gebilde. Auf Grund dieser und ähnlicher Versuche kamen die beiden Autoren zu dem Schluß: „The damage caused by ultraviolet irradiation is due to the effect on nucleic acids" und es lag die Vermutung nahe, daß für die Entstehung des ATD-Phänomens die Zerstörung oder Inaktivierung vor allem von RNS von entscheidender Bedeutung sein könnte. Diese Annahme erfuhr eine eindeutige Bestätigung durch Versuche, in denen wachsende *Micrasterias*-Zellen mit RNAse behandelt wurden, was ebenfalls zur Bildung des ATD-Phänomens führte (KALLIO 1963, KALLIO und HEIKKILÄ 1972, TIPPIT und PICKETT-HEAPS 1974).

Da RNAse das ATD-Phänomen induzierte, lag es nahe, andere in den Stoffwechsel der Nucleinsäuren eingreifende Substanzen in Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Induktion dieses Phänomens zu testen. Nachdem bekannt war, daß Actinomycin D (AMD) die Synthese von RNS durch Bindung an DNS verhindert, führte bereits SELMAN (1966) neben seinen UV-Bestrahlungsversuchen erste Experimente mit diesem Stoff bei *Micrasterias* durch (vergl. auch TOURTE 1976). Auch durch AMD gelang es, das ATD-Phänomen zu induzieren, sodaß an dem Zusammenhang von RNS-Zerstörung bzw. Hemmung ihrer Synthese und dem Zustandekommen von ATD-Zellen nicht mehr zu zweifeln war. Umfangreiche Untersuchungen mit AMD vor allem über die Stadienspezifität der AMD-bedingten RNS-Blockade und dem Auftreten des ATD-Phänomens wurden vor allem auch von KALLIO und HEIKKILÄ (1972) durchgeführt (vergl. auch SELMAN 1972, TOURTE 1972 b, TIPPIT und PICKETT-HEAPS 1974, BURGSTALLER-GETZINGER 1979, HAMPL 1984). Die Autoren konnten einen starken Einfluß des Entwicklungsalters zu Behandlungsbeginn und der verwendeten Wirkstoffkonzentration nachweisen, wobei es interessant ist, daß bereits eine Behandlung in der Mitosephase zum ATD-Phänomen führt. Genauere z. T. quantitative Untersuchungen über den Einfluß von AMD auf das Zellwachstum, insbesonders dessen Stadienabhängigkeit wurden von HACKSTEIN-ANDERS (1974, 1975) durchgeführt. Die Autorin weist darauf hin, daß unter dem Einfluß dieser Substanz in vielen Fällen keine

©Naturwissenschaftlich-Medizinischer Verein in Salzburg; download unter www.biologiezentrum.at

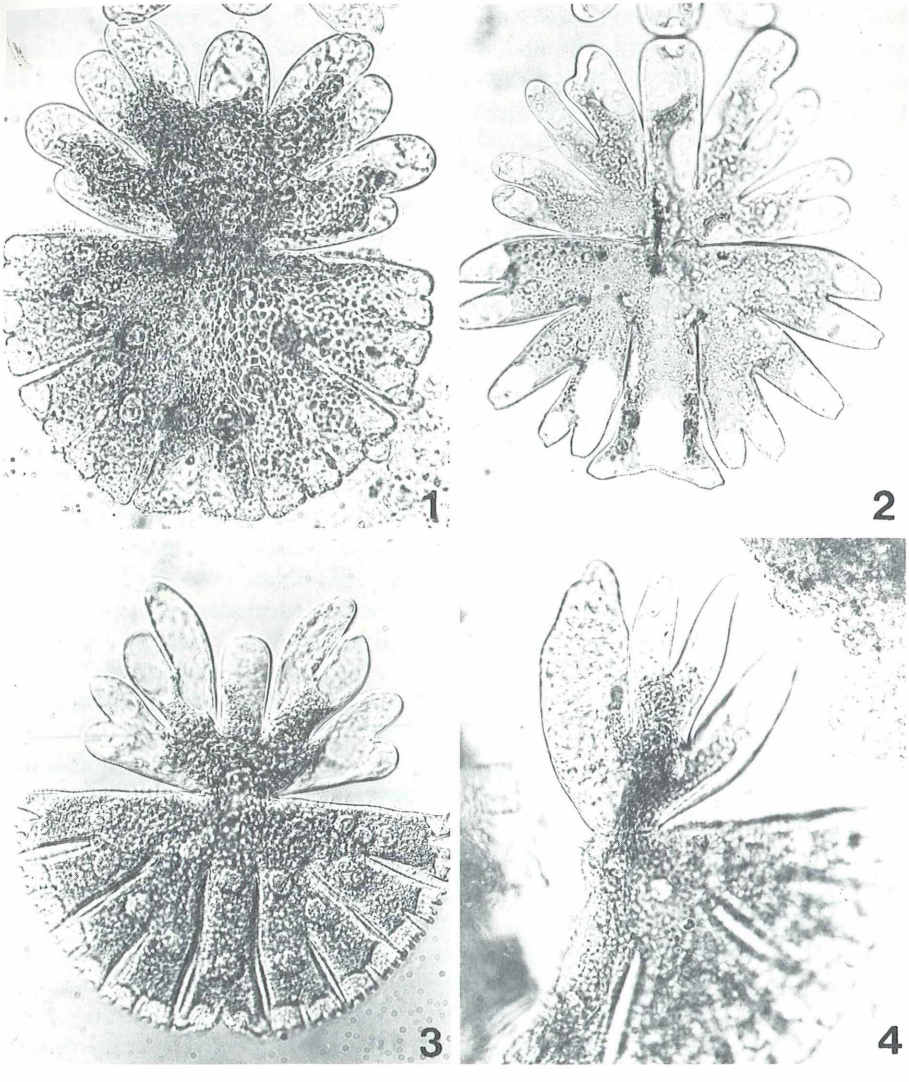


Abb. 1–4. **Micrasterias**-Zellen, welche im Zustand der Halbzellenbildung, nach der Mitose mit 10^{-3}% Cycloheximid behandelt wurden. Aufnahmen 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Die ATD-Form der jungen Halbzellen ist deutlich erkennbar. Abb. 1: *M. denticulata* Bréb. Abb. 2: *M. torreyi.* Abb. 3: *M. thomasiana.* Abb. 4: *M. thomasiana f. uniradiata* (WARIS 1950 b; Algenkulturen erhalten von Culture Collection of Algae, Austin, University of Texas).

©Naturwissenschaftlich-Botanische Gesellschaft Salzburg; download unter www.biologiezentrum.at

Sekundärwand gebildet wird und der osmotische Wert der AMD-behandelten Zellen höher liegt als bei unbehandelten Zellen vergleichbarer Stadien. Ferner fand sie, daß neben AMD auch Ethidiumbromid bei Einwirkung während der Zellentwicklung des ATD-Phänomen hervorruft.

Neben Actinomycin D und Ethidiumbromid, bei denen es sich um Blocker der RNS-Synthese handelt, behandelte TOURTE (1972 a) als erste *Micrasterias* mit dem Proteinsyntheseblocker Cycloheximid, wobei sich zeigte, daß auch dieser Stoff imstande ist, das ATD-Phänomen hervorzurufen, während Puromycin eine qualitativ andere, schwache morphogenetische Wirkung hervorruft (TIPPIT und PICKETT-HEAPS 1974). Die zuletzt genannten Autoren stellten fest, daß unter dem Einfluß von Cycloheximid das Anlagerungsmuster von Zellwandmaterial, das bei Turgorreduktion erkennbar wird (KIERMAYER 1964, 1967, 1981) z. T. verändert wird, was auf eine direkte Wirkung dieses Stoffes auf das artspezifische Entwicklungsmuster hindeutet.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von RNS- und Proteinsyntheseblocker in Hinblick auf ihre Wirkung zur Induktion des ATD-Phänomens untersucht, wobei die in Tabelle 1 genannten Stoffe als wirksam gefunden wurden.

Wichtige weitere Aufschlüsse brachten elektronenmikroskopische Untersuchungen an ATD-Zellen. So hob bereits TOURTE (1972 b) hervor, daß bei durch Zentrifugieren „entkernten" oder mit AMD behandelten Zellen vor allem das Golgi-System und die Zellwand starke ultrastrukturelle Veränderungen erfahren, während Chloroplast und Mitochondrien kaum verändert werden. Auch HACKSTEIN-ANDERS (1974) wies auf Veränderungen (Reduktion) der Dictyosomen und der Primärwand hin.

Elektronenoptisch waren weder eine Sekundärwand noch Sekundärwand-bildende F-Vesikel (KIERMAYER 1981) bei ATD-Zellen nachweisbar (vergl. auch BURGSTALLER-GETZINGER und KIERMAYER 1980 nach Behandlung mit Streptomycin, und HAMPL 1984 nach Einwirkung von Bleomycin-sulfat). Schon TOURTE (1972 b) wies auf „dünne Zellwände" bei ATD-Zellen hin, ohne allerdings die nötige Unterscheidung zwischen Primärwand und Sekundärwand zu treffen (vergl. auch WARIS und KALLIO 1964). Die Autorin zeigte ferner die allmähliche Zerstörung der Dictyosomen in ATD-Zellen. Neben einer Abnahme der Zisternenzahl der Dictyosomen wurde die Anzahl dieser Organellen immer geringer, wobei auch die ihnen zugeordneten ER-Zisternen verschwanden.

Eine ausführliche Untersuchung über die subzelluläre Morphologie von *Micrasterias torreyi* bei durch Zentrifugierung „entkernten" und bei UV-bestrahlten Zellen führten PIHAKASKI und KALLIO (1978) durch. Obwohl bei beiden Behandlungsarten leicht unterschiedliche Wirkungen festzustellen waren (vergl. auch TOURTE 1972 b), waren auch in diesen Untersuchungen deutliche Wirkungen auf die Dictyosomen und die Zellwand festzustellen. Sekundärwandbildende F-Vesikel fehlten auch hier völlig. Beide Behandlungsarten führten zu einer Zerstörung der ER-Membranen und der Polysomen.

NOGUCHI und UEDA (1979) untersuchten elektronenmikroskopisch den Einfluß einer Cycloheximidbehandlung auf *Micrasterias crux melitensis* und stellten

©Naturwissenschaftlich-Medizinischer Verein in Salzburg; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 1: Überblick mit Literaturangabe über die bisher gefundenen physikalischen und chemischen Möglichkeiten zur Induktion des ATD-Syndroms bei verschiedenen *Micrasterias* Arten.
* Auch elektronenmikroskopische Untersuchung der ATD-Zellen
** Kinematographische Zeitrafferdarstellung der Entwicklung von ATD-Zellen.

ATD-Induktion durch	Literatur
1. Denukleation (Zentrifugierung)	KALLIO 1949, 1951, WARIS 1951, TOURTE 1972 b*
2. Denukleation (UV-Bestrahlung)	WADDINGTON 1962, KALLIO 1963, SELMAN 1966, 1972, KALLIO u. HEIKKILÄ 1972, TOURTE 1972 b, LETHONEN 1977, PIHAKASKI u. KALLIO 1978*
3. RNAse	KALLIO 1963, KALLIO u. HEIKKILÄ 1972, TIPPIT u. PICKETT-HEAPS 1974
4. RNA und Proteinsynthese-Blocker	
a) Actinomycin D	SELMAN 1966, 1972, KALLIO u. HEIKKILÄ 1972, TOURTE 1967, 1972 b*, TIPPIT u. PICKETT-HEAPS 1974, HACKSTEIN-ANDERS 1974*, 1975, BURGSTALLER-GETZINGER 1980*, HAMPL 1984
b) Cycloheximid	TOURTE 1972 a, TIPPIT u. PICKETT-HEAPS 1974, NOGUCHI u. UEDA 1979*, KIERMAYER u. MEINDL 1980 b*, MEINDL 1982**, 1985, HAMPL 1984
c) Ethidiumbromid	HACKSTEIN-ANDERS 1974*, 1975, HAMPL 1984
d) Nystatin	KUNZMANN u. KIERMAYER 1978

©Naturwissenschaftlich-Medizinischer Verein in Salzburg; download unter www.biologiezentrum.at

e) Streptomycin	KUNZMANN u. KIERMAYER 1978, BURGSTALLER-GETZINGER 1979*, BURGSTALLER-GETZINGER u. KIERMAYER 1980*, HAMPL 1984
f) Gougerotin	KIERMAYER u. MEINDL 1980a, MEINDL 1982**, HAMPL 1984
g) Acrilflavin	HAMPL 1984
h) Bleomycin-sulfat	HAMPL 1984*
i) Chromomycin M_3	HAMPL 1984
j) Mitramycin	HAMPL 1984
k) Cordycepin (3'deoxyadenin)	HAMPL 1984
l) 4-Phorbol	HAMPL 1984
5. Glutaraldehyd	MEINDL u. KIERMAYER 1986 a*, b*

auch mit diesem Stoff eine Beeinflussung vor allem der Dictyosomen in Form einer Hemmung der Vesikelproduktion sowie einer „Krümmung" der Dictyosomen fest, wie sie auch von HACKSTEIN-ANDERS (1974) nach Behandlung mit Actinomycin D beschrieben wurde. Auch bei *Micrasterias denticulata* stellten KIERMAYER und MEINDL (1980 b) eine charakteristische Veränderung der Primärwand durch Cycloheximid fest. In dieser fanden sich diskrete Partikel, welche sehr wahrscheinlich den Inhalt von D-Vesikeln (KIERMAYER 1970) darstellten, und eine innere, an die vorhandene Primärwand angelagerte Schicht bildeten. Die Autoren nahmen an, daß durch Hemmung der Proteinsynthese der Inhalt von D-Vesikeln die Fähigkeit verliert, in die wachsende Primärwand eingelagert zu werden und zu einer homogenen Schicht zu fusionieren (vergl. auch HACKSTEIN-ANDERS 1974 bei AMD- und Ethidiumbromid-Behandlung, und PIHAKASKI und KALLIO 1978 bei „entkernten" und UV-bestrahlten Zellen). Eine Störung im Chemismus der D-Vesikeln könnte somit einen Faktor für die Entstehung der Formaberration von ATD-Zellen darstellen. Für die Aufrechterhaltung der normalen Fusionsfähigkeit von Primärwandmaterial-Portionen aus D-Vesikeln in der wachsenden Primärwand scheint eine ungestörte Proteinsynthese während der Zellentwicklung unbedingte Voraussetzung (KIERMAYER und MEINDL 1980 b). Die spätere Größenzunahme und die „blasige" Ausbildung der Lappen ist möglicher-

©Naturwissenschaftlich-M www.biologiezentrum.at

weise auf eine Dehnung der Primärwand durch erhöhte Turgeszenz ohne Vesikelmaterial-Einbau zurückzuführen (MEINDL 1982).

Auch durch Cycloheximid wurde die Bildung der Sekundärwand bei *Micrasterias denticulata* unterbunden. Dementsprechend waren elektronenoptisch keine dictyosomalen F-Vesikel bei diesen ATD-Zellen nachweisbar. Hier muß besonders hervorgehoben werden, daß es durch Hemmung der Proteinsynthese bei *Micrasterias* möglich ist, einen streng stadienspezifischen Prozeß, nämlich die Bildung von Sekundärwand-bildenden F-Vesikeln zu unterbinden und somit in den Membranfluß am Dicyosom (KIERMAYER 1981) experimentell einzugreifen (KIERMAYER und MEINDL 1980 b).

Jüngst wurde in licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen festgestellt, daß auch subletale Konzentrationen des Fixativums Glutaraldehyd das ATD-Phänomen mit allen Symptomen die oben dargelegt wurden, hervorruft (MEINDL und KIERMAYER 1986 a, b).

Tabelle 2: Übersicht über die bisher bekannten Merkmale des ATD-Syndroms bei *Micrasterias* aufgrund licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen (Literatur vergl. Tab. 1).
* aufgrund der bisherigen Untersuchungen auch bei *Xanthidium armatum* und *Closterium lunula*

1. Blasenförmige Ausbildung der Lappen bei gleichzeitiger Reduktion des Zellmusters*
2. Reduktion des Polarlappens
3. Zeitlich stark verlängertes Wachstum (Dehnung) der Primärwand*
4. Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit*
5. Erhöhung des osmotischen Wertes
6. Zerplatzen der Zellen nach 24stündiger Behandlungsdauer*
7. Fehlen der Ausbildung einer Sekundärwand*
8. Fehlen von dictyosomalen Sekundärwand-bildenden F-Vesikeln
9. Reduktion der Dictyosomen (Verringerung der Zisternenzahl)
10. Bildung einer erhöhten Anzahl von „coated-vesicles" aus Golgi-Zisternen und Krümmung der Dictyosomen
11. Markante Änderung der Ultrastruktur der Primärwand. Diese weist im Mikrofibrillengeflecht vesikelartige, membranlose Einschlüsse (wahrscheinlich membranlose D-Vesikel) auf. Offenbar geht die Fusion von D-Vesikeln zu einer homogenen Primärwandschicht verloren.
12. Vakuolisierung des Protoplasmas
13. Chloroplastenkontraktion

Es kann somit festgestellt werden, daß durch verschiedenartige experimentelle Maßnahmen, die letztlich zur Blockade der Proteinsynthese führen, ein charakteristisches Syndrom (ATD-Syndrom) induziert wird, dessen bisher bekannte Merkmale in Tabelle 2 zusammengestellt sind.

©Naturwissenschaftlich-Medizinischer Verein in Salzburg; download unter www.biologiezentrum.at

Da das ATD-Syndrom bisher ausschließlich bei *Micrasterias* untersucht wurde, schien es interessant vergleichend lichtmikroskopisch zwei andere Desmidiaceen-Arten und zwar *Xanthidium armatum* und *Closterium lunula* zu untersuchen. Über diese Untersuchungen wird nachfolgend berichtet.

Material und Methodik

Algenkultur: Für nachfolgend dargelegte Versuche wurden Zellen von *Xanthidium armatum* und *Closterium lunula* (WEST und WEST 1912) verwendet. Die Algen wurden in Hochmooren bei Tamsweg/Salzburg (Überling-Moore und Hochmoor am Seethaler See) gesammelt und im Labor unter semisterilen Bedingungen weiterkultiviert. Für die Kultur wurden einzelne Zellen der natürlichen Algenprobe entnommen und über sieben sterile Passagen mit Nährlösung letztlich in Erlenmeyerkolben in 30 ml Nährlösung überführt (vergl. MEINDL et al. 1986). Die so beschickten Kolben wurden bei 20 ± 1°C und einem Licht-Dunkelrhythmus von 14:10 Stunden aufgestellt (genaue Kulturbedingungen siehe KIERMAYER 1980).

Als Nährlösung kam eine Lösung nach WARIS (1950a) mit Zusatz von Erdextrakt (SCHLÖSSER 1982) im Verhältnis 1:8 zur Verwendung. Die Kulturen verblieben ca. 3–4 Wochen in der Klimakammer, bevor sie für die Versuche verwendet wurden. In dieser Zeit entwickelten sich sowohl *Xanthidium armatum* als auch *Closterium lunula* zu einer dichten Algenkultur, die für die Versuche zur Verfügung stand.

Versuchsdurchführung: Für die Versuche zur Induktion des ATD-Phänomens wurden junge Teilungsstadien der beiden Algenarten in wässrige Lösungen von Cycloheximid (Serva) in einem Konzentrationsbereich von $10^{-3}\% - 7 \times 10^{-4}\%$ übertragen. Die Versuche wurden in Napfschälchen mit jeweils 1 ml Lösung bei 20°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Pro Versuch kamen jeweils 20–30 Zellpaare zur Verwendung. Kontrollversuche wurden unter gleichen Versuchsbedingungen mit Aqua bidest durchgeführt. Die Auswertung der Versuche erfolgte 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Dazu wurden Zellen auf Objektträger überführt und lichtmikroskopische Aufnahmen mit einem Reichert-Univar hergestellt (zur Methodik vergl. KIERMAYER 1980, MEINDL et al. 1986).

Cellulase-Onozuka-Test: Zur eindeutigen Unterscheidung der Primärwand und Sekundärwand hat sich bei Versuchen mit *Micrasterias* und *Cosmarium* die Anwendung der Cellulase „Onozuka" bewährt (BERLINER und WENC 1976, MEINDL und KIERMAYER 1986 b). Die Cellulase löst die Primärwand völlig auf, während die Sekundärwand enzymatisch nicht angegriffen wird. Dieser Wirkungsunterschied erlaubt eine eindeutige Unterscheidung der beiden Wandschichten und auch die genaue Bestimmung des Zeitpunktes der Entstehung der Sekundärwand bzw. ihres Fehlens (MEINDL und KIERMAYER 1986 b). Bei den nachfolgend beschriebenen Versuchen mit *Xanthidium armatum* und *Closterium lunula* wurde die Cellulase „Onozuka" (Serva) in einer Konzentration von 2% verwendet. Um ein Platzen der Zellen zu verhindern, wurde die 2%ige Cellulase-Lösung in 0.3 M Glucose angewandt. Die Enzymbehandlung dauerte jeweils 30 min. bei Raumtemperatur.

©Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesellschaft in Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Versuchsergebnisse und Diskussion

Wurden Zellen von *Xanthidium armatum* und *Closterium lunula* im Zustand der Neubildung einer Halbzelle nach erfolgter Mitose in wässrige Lösungen von Cycloheximid mit einer Konzentration von $10^{-3}\% - 7 \times 10^{-4}\%$ eingelegt und die Zellen für 24 Stunden in der Versuchslösung belassen, zeigten sich typische Wachstumsänderungen. Wie auf Abb. 5 und 6 dargestellt, bildete *Xanthidium armatum* an Stelle der zahlreichen regelmäßig angeordneten Stacheln (vergl. normales Zellmuster auf Abb. 9) eine stark vereinfachte Zellform aus. Die unter dem Einfluß von Cycloheximid gebildeten neuen Halbzellen waren wesentlich größer als die normalen alten Halbzellen und wiesen eine helmartige Gestalt auf. Es ist anzunehmen, daß das gesamte, normalerweise für die Bildung der Stacheln zur Verfügung stehende Zellwandmaterial für die Ausbildung einer großen stachellosen Halbzelle verwendet wurde. In allen untersuchten *Xanthidium armatum* Zellen kann die helmartige Form der jungen Halbzelle als die typische ATD-Form dieser Art angesehen werden.

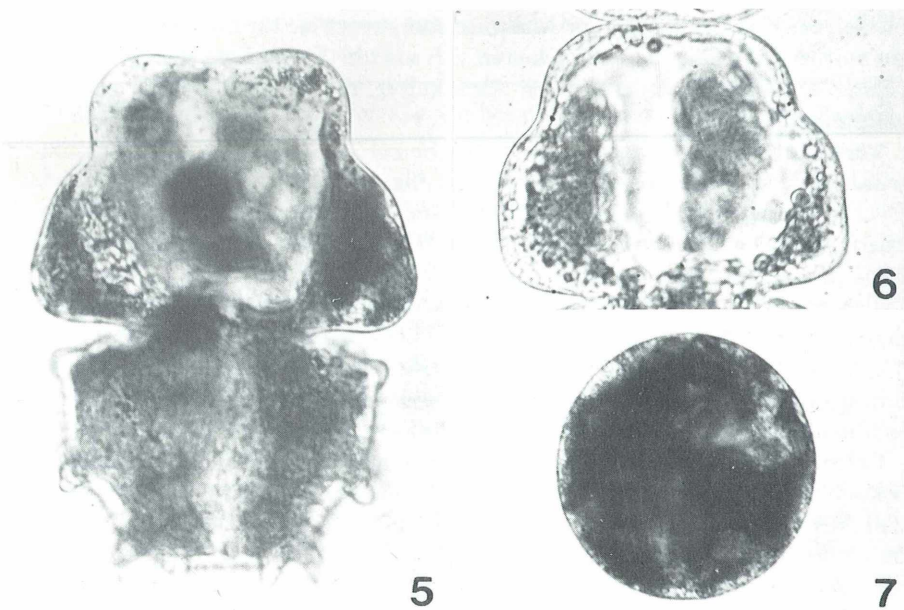
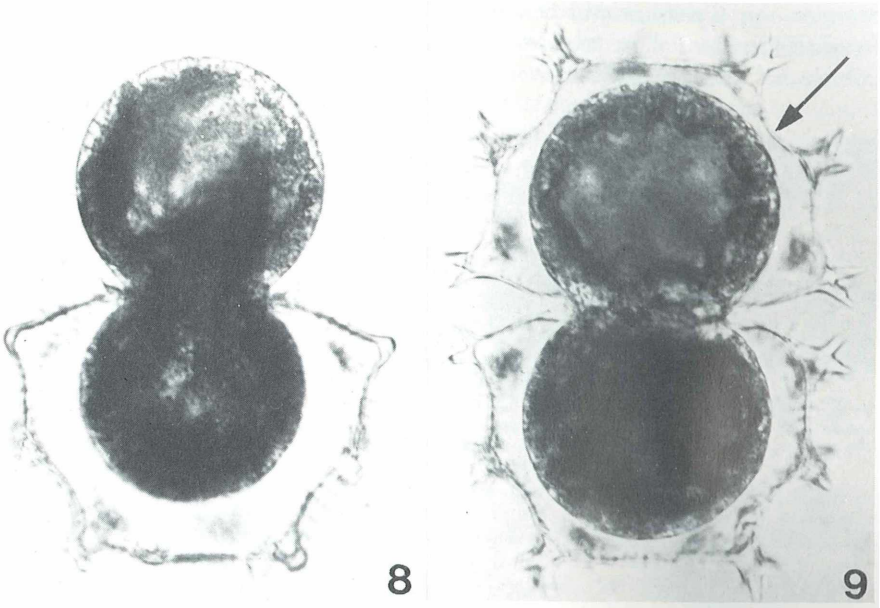


Abb. 5–9. *Xanthidium armatum.* Abb. 5 und 6: Zellen, die in jungen postmitotischen Stadien mit $10^{-3}\%$ Cycloheximid behandelt wurden. Aufnahmen 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Das ATD-Phänomen in Form helmartiger, vergrößerter und stachelloser junger Halbzellen ist deutlich erkennbar. Abb. 7–9: Zellen, die zur Unterscheidung von Primärwand und Sekundärwand mit der Cullulase „Onozuka" behandelt wurden. Abb. 7: Isolierter Protoplast, der durch die Enzymbe-

©Naturwissenschaftlich-Medizinischer Verein in Salzburg; download unter www.biologiezentrum.at



handlung entstand (Behandlung wie bei Abb. 8). Abb. 8: Die Zelle wurde während des postmitotischen Halbzellenwachstums für 24 Stunden mit 10^{-3}% Cycloheximid behandelt und danach mit Cellulase „Onozuka" (2% in 0.3 M Glucose, 30 Min.) versetzt. Die vorhanden gewesene Primärwand wurde durch das Enzym völlig aufgelöst. Sekundärwand wurde keine gebildet. Der Protoplast ist plasmolysiert. Abb. 9: Normale Zelle (Kontrolle), die sich 24 Stunden in Aqua bidest entwickelte und danach mit Cellulase („Onozuka" 2% in 0.3M Glucose) für 30 Minuten behandelt wurde. Die Sekundärwand, vom Enzym nicht angegriffen, ist auch in der jungen Halbzelle (Pfeil) voll entwickelt.

Wurden Teilungsstadien von *Closterium lunula* nach gleicher Behandlung mit Cycloheximid und nach gleicher Versuchsdauer untersucht, ergaben sich die in Abb. 10 und 11 dargestellten, stark in ihrer morphologischen Ausprägung veränderten Zellen. Auch hier kam es zu einem frühzeitigen Stillstand der Differenzierung bei gleichzeitigem starken blasenförmigen Anschwellen der neuen Halbzellen. Da diese Formen bei allen in sehr jungen Entwicklungsstadien mit Cycloheximid behandelten Zellen auftraten, können auch hier die in Abb. 10 und 11 dargestellten Zellen als typische „ATD-Zellen" charakterisiert werden. Dazu kommt, daß viele dieser Zellen nach einer 24stündigen Versuchsdauer zerplatzten, was ebenfalls auf ihren ATD-Charakter hindeutet.

Wie schon in der Einleitung hervorgehoben wurde, tritt bei ATD-Zellen von *Micrasterias* eine völlige Hemmung der Sekundärwandbildung ein (z. B. HACKSTEIN-ANDERS 1974, KIERMAYER und MEINDL 1980 b, MEINDL und KIERMAYER 1986 a, b). Zur Untersuchung der Frage, ob dies auch bei den 24

©Naturwissenschaftlich-Naturhistorische Gesellschaft; download unter www.biologiezentrum.at

Stunden mit Cycloheximid behandelten *Xanthidium armatum*- und *Closterium lunula*-Zellen der Fall ist, wurden solche Zellen einer Behandlung mit der Cellulase „Onozuka" (2%ig in 0.3M Glucose) unterzogen.

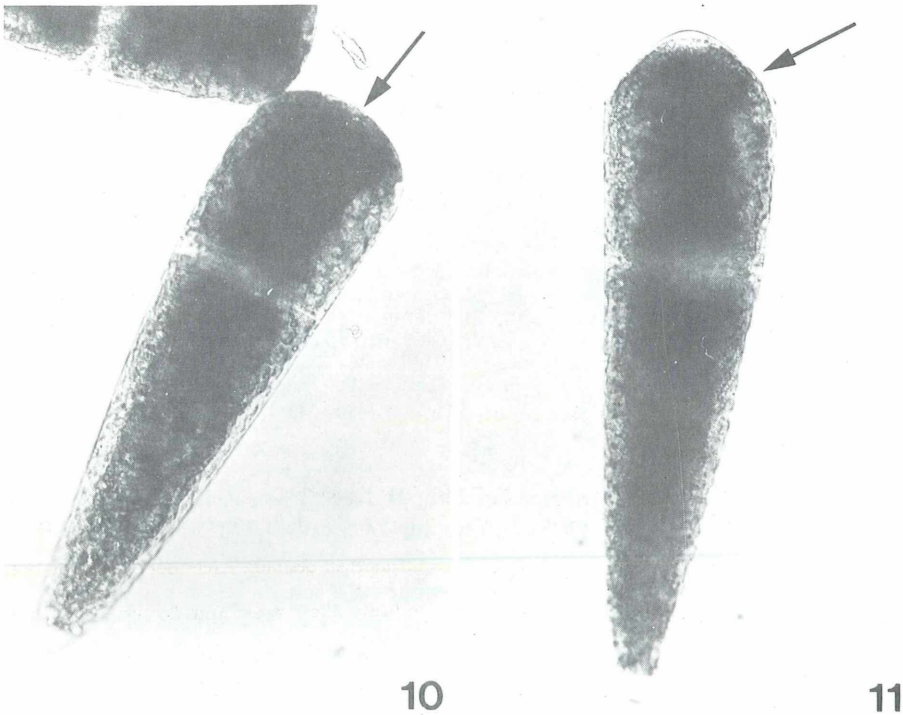


Abb. 10 und 11. *Closterium lunula.* Die Zellen wurden während des postmitotischen Halbzellenwachstums mit 10⁻³% Cycloheximid für 24 Stunden behandelt. Die neuen Halbzellen zeigen deutlich das ATD-Phänomen in Form abnormal differenzierter, stark angeschwollener Halbzellen (Pfeil).

Wie auf Abb. 9 ersichtlich, trat bei den nicht mit Cycloheximid behandelten Kontrollzellen von *Xanthidium armatum* nach Cellulase-Glucose Behandlung starke Plasmolyse ein, ohne daß jedoch die hier vorhandene Zellwand (Sekundärwand, Pfeil) aufgelöst worden wäre. Im Gegensatz dazu war bei einer mit Cycloheximid vorbehandelten und nach 24stündiger Versuchsdauer anschließend mit der Cellulase-Glucose-Lösung behandelten Zelle keine neue Halbzelle zu sehen, und statt dieser nur der plasmolysierte gelegentlich nekrotische Protoplast zu erkennen (Abb. 8). Durch die Enzymbehandlung entstanden daneben häufig auch isolierte Protoplasten (Abb. 7). Der Enzymtest zeigte eindeutig das Fehlen einer Sekundärwand und die völlige Auflösung der Primärwand. Gleiche Versuchsergebnisse ergaben sich auch bei *Closterium lunula.*

©Naturwissenschaftlich-Medizinische Vereinigung in Salzburg; download unter www.biologiezentrum.at

Die oben dargelegten lichtmikroskopischen und enzymatischen Unteruchungen zeigten eindeutig, daß durch Proteinsynthese-Blockierung – in unserem Fall durch Cycloheximid – auch bei *Xanthidium armatum* und *Closterium lunula* der „anuclear type of development" (ATD) zu induzieren ist. Als charakteristische Merkmale des ATD-Syndroms wurden 1. typische Anschwellungen der Halbzellen bei Reduktion des Zellmusters, 2. Zerplatzen der jungen Halbzellen und 3. Fehlen einer Sekundärwand bei den neugebildeten Halbzellen gefunden (vergl. Tab. 2).

Literatur

BERLINER, M. D. und K. A. WENC: Protoplast induction in *Micrasterias* and *Cosmarium.* Protoplasma **89,** 389–393, **1976.**

BURGSTALLER-GETZINGER, CH.: Der Einfluß der Zentrifugierung und chemischer Stoffe auf sich differenzierende Zellen von *Micrasterias denticulata* Bréb. unter besonderer Berücksichtigung der Dictyosomen. Dissertation, Salzburg, **1979.**

BURGSTALLER-GETZINGER, CH. und O. KIERMAYER: Einfluß der Zentrifugierung und chemischer Stoffe auf sich differenzierende Zellen von *Micrasterias denticulata* Bréb. mit besonderer Berücksichtigung des Golgi-Systems. Sitz. Ber. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl. Abt. I, **189;** 233–247, **1980.**

HACKSTEIN-ANDERS, CH.: Untersuchungen zur Wirkung von Actinomycin D und Ethidiumbromid auf die Cytomorphogenese und Ultrastruktur von *Micrasterias thomasiana* und *Micrasterias denticulata* Bréb. unter besonderer Berücksichtigung des Golgi-Apparates. Dissertation, Köln, **1974.**

HACKSTEIN-ANDERS, CH.: Untersuchungen zur Cytomorphogenese von *Micrasterias thomasiana* und *Micrasterias denticulata* Bréb. unter Einfluß von Actinomycin D und Ethidiumbromid. I. Lichtmikroskopische Untersuchungen. Protoplasma **86,** 83–105, **1975.**

HAMPL, S.: Beeinflussung der Cytomorphogenese von *Micrasterias denticulata* Bréb. durch Proteinsyntheseblocker. Dissertation, Salzburg, **1984.**

KALLIO, P.: Artificially produced binuclear, diploid and anuclear desmids. Arch. Bot. Soc. Zool. Bot. Fenn. „Vanamo" **2,** 42, **1949.**

KALLIO, P.: The significance of nuclear quantity in the genus *Micrasterias.* Ann. Bot. Soc. Zool. Bot. Fenn. „Vanamo" **24,** 1–122, **1951.**

KALLIO, P.: The relationship between nuclear quantity and cytoplasmic units in *Micrasterias.* Ann. Acad. Sci. Fenn. A IV, **44,** 1–44, **1959.**

KALLIO, P.: The effects of ultraviolet radiation and some chemicals on morphogenesis in *Micrasterias.* Ann. Acad. Sci. Fenn. A IV, **70,** 1–39, **1963.**

KALLIO, P. und H. HEIKKILÄ: On the effect of elimination of nuclear control in *Micrasterias.* In: Biology and Radiobiology of Anucleate Systems. II. Plant Cells. 167–192 (eds. BONOTTO, S., GAUTIER, R., KIRCHMANN, R. and MAISIN, J.-R.), Academic Press, New York and London.

KIERMAYER, O.: Untersuchungen über die Morphogenese und Zellwandbildung bei *Micrasterias denticulata* Bréb. Protoplasma **59,** 76–132. **1964.**

KIERMAYER, O.: Das Septuminitialmuster von *Micrasterias denticulata* und seine Bildung. Protoplasma **64,** 481–484, **1967.**

KIERMAYER, O.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Cytomorphogenese von *Micrasterias denticulata* Bréb. I. Allgemeiner Überblick. Protoplasma **69,** 97–132, **1970.**

KIERMAYER, O.: Control of morphogenesis in *Micrasterias.* In: Handbook of Phycological Methods (ed. GANTT, E.) 6–12, Cambridge University Press, **1980.**

KIERMAYER, O.: Cytoplasmic basis of morphogenesis in *Micrasterias.* In: Cytomorphogenesis in Plants (ed. KIERMAYER O.) Cell Biology Monographs Vol. **8,** 147–189, Springer Verlag, Wien–New York, **1981.**

KIERMAYER, O. und U. MEINDL: Cytomorphogenetic and anti-microtubule action of the antibiotic gougerotin in *Micrasterias denticulata* Bréb. Protoplasma **104,** 175–179, **1980 a.**

KIERMAYER, O. und U. MEINDL: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Cytomorphogenese von *Micrasterias denticulata* Bréb. III. Einfluß von Cycloheximid auf die Bildung und die Ultrastruktur der Primärwand. Protoplasma **103,** 169–177, **1980 b.**

KUNZMANN, R. und O. KIERMAYER: Über die Wirkung verschiedener Antibiotika auf sich differenzierende Zellen von *Micrasterias denticulata* Bréb. Sitz.-Ber. Österr. Akad. Wiss, math.-nat. Kl., Abt. I, **187,** 233–255, **1978.**

©Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesellschaft in Salzburg; download unter www.biologiezentrum.at

LETHONEN, J.: Morphogenesis in *Micrasterias torreyi* Bail. and M. thomasiana Arch. studied with UV microbeam irradiation and chemicals. Ann. Bot. Fenn. **14,** 165–190, **1977.**

MEINDL, U.: *Micrasterias denticulata* (Desmidiaceae) – Störung der Cytomorphogenese durch Hemmung der Proteinsynthese (Cycloheximid, Gougerotin). Publ. Wiss. Film. 1572, 1–8 (Film D 1425), Göttingen, **1982.**

MEINDL, U.: Experimental and ultrastructural studies on cell shape formation in the defect mutant cell *Micrasterias thomasiana f. uniradiata.* Protoplasma **129,** 74–87, **1985.**

MEINDL, U. und O. KIERMAYER: Cytomorphogenetic and ultrastructural effects of sublethal concentrations of glutaraldehyde in *Micrasterias denticulata.* Europ. J. Cell Biol. Suppl. 12 (Vol. **39**) 23, **1986 a.**

MEINDL, U. und O. KIERMAYER: Wirkung subletaler Konzentrationen des Fixativums Glutaraldehyd auf die Cytomorphogenese und Ultrastruktur von *Micrasterias denticulata* Bréb. Phyton, in Druck, **1986 b.**

MEINDL, U., W. G. URL und O. KIERMAYER: Elektronenmikroskopische Methodik – Präparation der Grünalge *Micrasterias.* Publ. Wiss. Film, Göttingen, Sekt. Biol. Biol. Ser. 18, Nr. 22, Film D 1588, 1–14, **1986.**

NOGUCHI, T. und K. UEDA: Effect of cycloheximide on ultrastructure of cytoplasm in cells of a green alga, *Micrasterias crux* melitensis. Biol. Cell. **35,** 103–110, **1979.**

PIHAKASKI, K. und P. KALLIO: Effect of denucleation and UV-irradiation on the subcellular morphology in *Micrasterias.* Protoplasma **95,** 37–55, **1978.**

SELMAN, G. G.: Experimental evidence for the nuclear control of differentiation in *Micrasterias.* J. Embryol. exp. Morphology **16,** 469–485, **1966.**

SELMAN, G. G.: Anucleate development in *Micrasterias* induced using an ultraviolet microbeam. In: Biology and Radiobiology of anucleate systems. II. Plant Cells (eds. BONOTTO, S., GOUTIER, R., KIRCHMANN, R. and MAISIN, J.-R.) 145–164, Academic Press, New York and London, **1972.**

SCHLÖSSER, U. G.: List of strains. Ber. Deutsch. Bot. Ges. **95,** 181–276, **1982.**

TIPPIT, D. H. und J. D. PICKETT-HEAPS: Experimental investigations into morphogenesis in *Micrasterias.* Protoplasma **81,** 271–296, **1974.**

TOURTE, M.: Etude de la restitution des characterès morphogénétiques après action de l'actinomycine D chez *Micrasterias fimbriata* (Ralfs). C. R. Soc. Biol. **161,** 2111–2115, **1967.**

TOURTE, M.: Modifications morphogénétiques induites par la puromycine et la cycloheximide sur le *Micrasterias fimbriata* (Ralfs) au cours du bourgeonnement. C. R. Acad. Sci. (Paris) **274,** 2295–2298, **1972 a.**

TOURTE, M.: Ultrastructural investigations on anucleate cells in *Micrasterias fimbriata.* Comparison to three-lobed actinomycin D treated cells. In: Biology and Radiobiology of Anucleate Systems. II. Plant cells. (eds. BONOTTO, S., GAUTIER, R., KIRCHMANN, R., and MAISIN, J.-R.) 193–223, Academic Press, New York and London, **1972 b.**

WADDINGTON, C. H.: New patterns in genetics and development. Columbia University Press, New York–London, **1962.**

WARIS, H.: Cytophysiological studies on *Micrasterias.* I. Nuclear and cell division. Physiol. Plant. **3,** 1–16, **1950 a.**

WARIS, H.: Cytophysiological studies on *Micrasterias.* II. The cytoplasmic framework and its mutation. Physiol. Plant. **3,** 236–246, **1950 b.**

WARIS, H.: Cytophysiological studies on *Micrasterias.* III. factors influencing the development of enucleated cells. Physiol. Plant. **4,** 387–409, **1951.**

WARIS, H. und P. KALLIO: Morphogenesis in *Micrasterias. Adv. Morphogenesis* **4,** 45–80, **1964.**

WEST, W. und G. S. WEST: A monograph of the British *Desmidaceae.* Johnson Reprint Corporation, New York, London, **1912.**

Anschrift der Verfasser: Univ.-Prof. Dr. Oswald KIERMAYER und Mag. Dr. Ursula MEINDL
Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Salzburg
Hellbrunnerstr. 34, A-5020 Salzburg, Austria.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Berichte der Naturwissenschaftlich-Medizinischen Vereinigung in Salzburg

Jahr/Year: 1986

Band/Volume: 8

Autor(en)/Author(s): Kiermayer Oswald, Meindl Ursula

Artikel/Article: DAS "ANUCLEAR TYPE OF DEVELOPMENT" (ATD)-PHÄNOMEN, HERVORGERUFEN DURCH HEMMUNG DER PROTEINSYNTHESE, BEI VERSCHIEDENEN DESMIDIACEEN. 101-114