Protoplasma 72, 191–201 (1971) © by Springer-Verlag 1971

Ein argyrophiles Fibrillensystem bei Amoeba villosa (Wallich)

WILHELM FOISSNER

Naturkundliche Station der Stadt Linz, Österreich

Mit 10 Abbildungen Eingegangen am 25. Januar 1971

Summary

An Argyrophilic Fibrillar System in Amoeba villosa (Wallich)

An extensive fibrillar network in *Amoeba villosa* is described. The width of its meshes variates in large limits, indicating a high plasticity. Likewise the size of the observed network variates in the special cases. During the drying-process the fibrils sometimes dissociate into a globular substance which frequently becomes a membranous state. Fibrils ending freely in the protoplasm show typical tension-figures, indicating torsions and rotations of these fibrils.

The observed structures probably correspond with the fibrils demonstrated in *Trichamoeba villosa* by the electron microscope. The significance of this fibrillar network and some other problems are discussed.

Zusammenfassung

Es wird ein ausgedehntes Fibrillennetz bei Amoeba villosa beschrieben. Seine Maschenweite ist in weiten Grenzen variabel, was auf eine hohe Plastizität hindeutet. Ebenfalls sehr variabel ist die Größe des jeweils dargestellten Fibrillennetzes. Bei der Entquellung lösen sich die Fibrillen manchmal in eine globuläre Substanz auf, die oft in eine membranartige Zustandsform übergeht. Frei im Protoplasma endende Fibrillen zeigen typische Spannungsformen, die auf Torsionen und Rotationen dieser Fibrillen hinweisen.

Die dargestellten Strukturen entsprechen wahrscheinlich den im Elektronenmikroskop bei *Trichamoeba villosa* gefundenen Fibrillen. Die Bedeutung dieses Fibrillennetzes sowie verschiedene andere Probleme werden diskutiert.

1. Einleitung

Die neueren elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen häufig Fibrillen bei Amöben und Myxomyceten, die vorwiegend in der Grenzschicht von Ekto- und Endoplasma lokalisiert sind [2, 3, 16, 17, 18, 24–29, 31, 32] und die vielfach als Bewegungsgrundlage angesehen werden [11, 13, 15, 16, 17, 31, 32]. Die klarsten elektronenmikroskopischen Bilder veröffentlichte BHOWMICK [3]. Dieser Autor konnte bei *Trichamoeba villosa* hauptsächlich im Uroid lokalisierte Fibrillen, die beinahe lichtmikroskopische Größenordnung erreichen, nachweisen.

Lichtmikroskopisch ist bisher die Existenz von Fibrillen bei Amöben nur ungenügend nachgewiesen worden. GOLDACRE [10] beobachtete nach einer teilweisen Dehydration von *A. proteus* fibrilläre Bildungen im Ektoplasma. KÄPPNER [19] konnte Ähnliches bei *Chaos chaos* nach Cysteineinwirkung feststellen. JAROSCH [13] fand eine außergewöhnlich große Dynamik bei feinen Amöbenfilopodien und führt diese auf die Aktivität submikroskopischer, schnell rotierender schraubenförmiger Fibrillen bzw. Fibrillensysteme [15] zurück.

Beim Plasmodium von *Physarum polycephalum* wies WOHLFARTH-BOTTER-MANN [29, 30] sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch gut sichtbare, weitreichende, fibrilläre Protoplasmadifferenzierungen nach, von denen er annimmt, daß sie so wie bei *Chaos chaos* [2] vernetzt sind. Nach ATP-Einwirkung konnte am selben Organismus auch mehrfach der Zusammenschluß kleinerer Fibrillen zu größeren vernetzten Komplexen beobachtet werden [17, 25, 26].

Die von der Fixierung und Vorbehandlung des Objekts oft unabhängigen Strukturaspekte der elektronenmikroskopisch darstellbaren Fibrillen lassen darauf schließen, daß sie von einem globulären Zustand leicht in einen gut differenzierten fibrillären überwechseln können [2, 28]. Manchmal weisen die Fibrillen auch eine gewisse Vorzugsrichtung auf [26] oder sie zeigen sich an mechanisch [27, 32] oder chemisch [24] behandelten Gebieten der Corticalschicht.

In der vorliegenden Arbeit soll über ein neues argyrophiles Fibrillensystem bei *Amoeba villosa* berichtet werden. Aus verschiedenen Erwägungen heraus wurden schon früher von einigen Autoren [1, 3, 15, 16, 31] sowohl bei den Amöben als auch bei den Myxomyceten Fibrillen bzw. Fibrillennetze als Bewegungsgrundlage gefordert.

2. Material und Methode

Für das Untersuchungsmaterial und die Bestimmung von Amoeba villosa danke ich Herrn Dr. R. JAROSCH [vgl. 15]. Vergleichenderweise wurden noch verschiedene Amöben der Limaxund Proteus-Gruppe sowie das Plasmodium von Fulgio septica (Centraalbureau voor Schimmelcultures-Baarn, Nederland) untersucht.

Da die Menge des Materials von Amoeba villosa sehr beschränkt war, wurde nur eine "trockene" Versilberungsmethode angewendet, die auch zur Darstellung des Silberliniensystems der Ciliaten dient [5]. Andere Silbermethoden, die auf der Basis einer chemischen Fixierung arbeiten, wurden bisher nicht versucht.

3. Ergebnisse

Nach der Imprägnation zeigte sich an etwa 20% der versilberten Amöben eine mehr oder weniger klar angefärbte netzartige Struktur, die sich nur in wenigen Fällen über mehr als 2-5% der Amöbenoberfläche ausbreitete (Abb. 2–10). Da sich die Amöben bei der zur Präparation notwendigen Dehydration leider fast vollständig abkugeln, war es unmöglich, die Fibrillennetze genauer zu lokalisieren. Sie fanden sich sowohl an der Peripherie als auch in der Mitte der dehydrierten, versilberten Individuen.

Interessant ist vor allem die Tatsache, daß die Maschenweite der Fibrillennetze in sehr weiten Grenzen variabel ist, und sie überhaupt eine deutliche



Abb. 1. Fibrillenformen von A. villosa. a-d Formen, die durch "Umschnappen" tordierter helixförmiger Fibrillen entstanden sein könnten (vgl. Modellversuch 7 bei JAROSCH 1965). e-f Formen, die als "Verzweigung durch Abwindung" gedeutet werden können. Dabei zweigen sich von den vielen die Fibrille zusammensetzenden Einzelfibrillen einige Fibrillen ab (vgl. Modellversuch 8 bei JAROSCH 1965). g-k Diese Serie demonstriert einen vorstellbaren Entwicklungsweg einer einzelnen, unverzweigten, aus vielen Einzelfibrillen zusammengesetzten Fibrille (g). Durch Kombination von "Umschnappen" und "Verzweigung durch Abwindung" (vgl. Modellversuch 9 c bei JAROSCH 1965) kann zwanglos eine netzförmige Struktur erzeugt werden, die sehr an das Fibrillennetz von A. villosa erinnert

Tendenz zu Formveränderungen erkennen lassen (vgl. z. B. Abb. 2 mit Abb. 6). Dabei können am gleichen Individuum weit- und engmaschige Systemteile abwechseln bzw. fließend ineinander übergehen (Abb. 4, 9). Schließlich werden die Maschen so klein, daß sie eine mehr oder weniger ausgeprägte argyrophile Membran bilden (Abb. 6, 9), in der dann keine fibrillären Bestandteile mehr zu erkennen sind. Dieser Zustand scheint einmal mehr fibrillär, ein andermal mehr globulär zu sein. Sehr selten fand sich auch eine Längsorientierung des Fibrillennetzes (Abb. 8).

Eine weitere interessante Beobachtung, die vor allem eine Dynamik der Fibrillen bzw. des Fibrillennetzes wahrscheinlich macht, ergab sich aus dem Aus-

sehen von frei im Protoplasma endenden Fibrillen. Es zeigen sich hier nämlich typische Spannungs- und Verzweigungsfiguren (Abb. 2, Pfeile), wie sie oft bei schnell rotierenden Fibrillen auftreten und die im Modellversuch leicht nachgeahmt werden können [12—15]. Man findet dabei Formen, die durch "Umschnappen" oder "Verzweigung durch Abwindung" von schnell rotierenden helixförmigen einfach oder mehrfach umwundenen Proteinschrauben gedeutet werden können (Abb. 1 a-f, 2, 4, 5, 7). Diese Beobachtung legt nahe, die Netzbildung als eine direkte Folge fortgesetzter "Umschnappungen" und "Verzweigungen" dieser Fibrillen anzusehen (Abb. 1 g-k).

Auffällig waren auch die verschiedenen Strukturaspekte der Fibrillennetze, die sehr an die entsprechenden elektronenmikroskopischen Befunde [28] erinnern. Besonders am Rand der Fibrillennetze zeigte sich fast immer ein Übergang zur globulären Zustandsform (z. B. Abb. 5, rechte Bildseite). Dieser Übergang scheint manchmal über eine fein-fädige Zwischenstufe zu erfolgen. Dies ist aber keine obligatorische Verhaltensweise, da die Fibrillennetze oft auch ohne diese "Zwischenstufe" in den globulären Zustand übergehen. Oft hat es auch den Anschein, als zeigten sich im Übergangsbereich zur globulären Zustandsform besonders ausgeprägte Verzweigungstendenzen des Fibrillennetzes (Abb. 7, Pfeil).

Über die räumliche Anordnung des Fibrillennetzes kann aus methodischen Gründen nur wenig ausgesagt werden. Manche Beobachtung deutet aber auf eine dreidimensionale Konfiguration hin (Abb. 4). Vielleicht ließen sich hier die "nassen" Silbermethoden (s. Diskussion), die die Form des Objektes besser als die "trockenen" erhalten, nutzbringend anwenden. Allerdings ist ein Erfolg der cytologischen Methoden recht zweifelhaft, weil GELEI, ein Meister der "nassen" Präparation, bei Amöben kein argyrophiles Fibrillensystem darstellen konnte [8].

4. Diskussion

4.1. Kritik an der angewandten Versilberungsmethode

Die hier verwendete Versilberungsmethode basiert auf dem von KLEIN [20, 23] für Ciliaten eingeführten "trockenen" Imprägnationsverfahren. Dabei wird nach einer Modifikation des Autors [5] das Untersuchungsmaterial auf

Abb. 2. *A. villosa*: Ausschnitt aus einem an der Peripherie gelegenen Fibrillennetz, das besonders gut die typischen durch "Umschnappen" oder "Verzweigung durch Abwindung" entstandenen Fibrillenformen zeigt (Pfeile). Die verschiedenen dunklen Flecken sind, so wie auf den anderen Bildern, Nahrungseinschlüsse oder Detritus (ca. 2900 \times)

Abb. 3. A. villosa: Teil eines Fibrillennetzes, das sich in der Mitte des versilberten Individuums ausbreitet. Man bemerkt, daß das Netz teilweise mehr oder weniger stark dissoziiert ist, besonders dort, wo gehäuft Detritus liegt. Dadurch entstehen wahrscheinlich ungünstige Entquellungsbedingungen und die Fibrillen dissoziieren (ca. 2900 \times)



Abb. 2 und 3

einen mit Hühnereiweiß bestrichenen Objektträger gebracht, eingetrocknet und versilbert. Eine zweite Möglichkeit zur Darstellung des Silberliniensystems der Ciliaten basiert auf der Verwendung von besonders zusammengesetzten Fixiergemischen, den "nassen" Methoden [4]. Über die Vor- und Nachteile dieser prinzipiell verschiedenen Methoden ist bereits mehrmals referiert worden [6, 7, 21, 22].

Da die Abtötung des Protoplasmas bei der Entquellung ("trockene" Methode) naturgemäß nicht so rasch erfolgt wie bei einer chemischen Fixierung ("nasse" Methoden), haben dynamische, biologische Strukturen noch genügend Zeit, verschiedene formative Reaktionen auszubilden [6, 7, 22]. Unter diesem Gesichtspunkt müssen auch die vorliegenden Untersuchungen gewertet werden! Es ist demnach nicht auszuschließen, daß die oft sehr ausgeprägte Vernetzung der dargestellten Strukturen teilweise eine Reaktion auf die Entquellung ist. Durch mechanische Einwirkungen, und eine solche stellt die Entquellung teilweise dar, wird nämlich eine Verzweigung einfacher Fibrillen begünstigt [6, 7]. Daß aber die Vernetzung nicht nur eine Reaktion auf die Entquellung darstellt, also ein "vitaler Artefakt" ist, darauf weisen elektronenmikroskopische Untersuchungen hin, die eine Vernetzung der bei Amöben nachweisbaren Fibrillen wahrscheinlich machen [3] bzw. zeigen konnten [24, 31].

Auch der Einwand, daß die dargestellten Strukturen vielleicht nur mit Silber gefüllte Spalten oder Falten des Ektoplasmas seien, ist leicht zu widerlegen. Ein Spalten- oder Faltensystem könnte sich wohl kaum zu einer membranartigen Zustandsform (Abb. 6, 9) bzw. zu einem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Netzwerk verändern. Wenn, dann müßte es seine Silberfreundlichkeit verlieren. Auch die vielen verschiedenen Strukturaspekte und die dynamischen Erscheinungsformen (vgl. S. 193 f.) sprechen eindeutig für die Fibrillennatur der dargestellten Strukturen.

Abb. 4. *A. villosa*: Hier fällt besonders die unterschiedliche Maschenweite des Fibrillennetzes in einem eng begrenzten Gebiet auf. In der rechten Bildseite findet sich ein kleiner, sehr engmaschiger Teil; gegen den Rand des Bildes wird dann die Maschenweite immer größer (ca. $4500 \times$)

Abb. 5. *A. villosa*: Teil eines Fibrillennetzes. Man beachte die rechte Bildseite, wo sich das Fibrillennetz über eine fädige Zwischenstufe in eine globuläre Zustandsform auflöst. Der schräg durch die Mitte des Bildes laufende dunkle Streifen ist wahrscheinlich ein Präparationsartefakt (ca. $3600 \times$)

Abb. 6. *A. villosa*: Ein Fibrillennetz mit auffallend geringer Maschenweite (ca. 1–3 m μ). Teilweise ist schon ein Übergang des Netzes in eine membranöse Zustandsform zu bemerken (ca. 2900×)

Abb. 7. *A. villosa*: Wieder ist hier eine außerordentliche Variabilität in der Maschenweite des Fibrillennetzes feststellbar. Ein Teil des Netzes scheint kurz vor dem Zerfall zu stehen. Der Strukturzustand wird dabei schlechter, und es treten viele kleine, verzweigte Fibrillen auf (Pfeil) (ca. $3100\times$)





4.2. Die Ausdehnung des Fibrillennetzes

Daß dieses Fibrillennetz nicht bei allen Amöben zu sehen war, läßt sich auf verschiedene Ursachen zurückführen. Entweder es wird nur temporär oder lokal (Schwanzregion?) ausgebildet oder, was wahrscheinlicher ist, es zerfällt bei der Präparation. Aus Untersuchungen an Ciliaten weiß man nämlich, daß die silberfärbbaren Fibrillen in eine undifferenzierte argyrophile Masse dissoziieren können [6, 7, 22]. Ähnliche Dissoziationserscheinungen zeigten sich auch häufig am Fibrillennetz von *A. villosa* (z. B. Abb. 5). Dies könnte bedeuten, daß die dargestellten Fibrillennetze nur Teile eines größeren, vielleicht sogar die ganze Amöbe umspannenden Fibrillennetzes sind.

4.3. Fibrillennetze bei anderen Amöben, Heliozoen und Plasmodien

Bei Amöben aus der *Limax*-Gruppe konnten ebenfalls feine, an der Grenze der Sichtbarkeit liegende Fibrillennetze konstatiert werden. An *Pelomyxa verrucosa* war bisher kein Fibrillennetz nachzuweisen. Vielleicht verhindert hier die Zusammensetzung des Protoplasmas (Kristalle!) eine gute Entquellung und somit Erhaltung der Fibrillen.

KLEIN [21] beschreibt bei einem Heliozoon ein weitmaschiges Fibrillennetzwerk. Eigene Untersuchungen an Actinospaehrium sp. verliefen ergebnislos. Ebenfalls ergebnislos verliefen Versilberungen am Plasmodium von Fulgio septica. Hier dürfte wahrscheinlich die angewandte Methode versagt haben.

4.4. Vergleich des Fibrillennetzes von A. villosa mit den Silberliniensystemen gewisser Ciliaten

Viele Ciliaten besitzen ebenfalls ein mehr oder weniger eng- bzw. weitmaschiges Fibrillennetz: das Silberliniensystem (z. B. Urostyla, Chilodonella, Euplotes [22]). Der wesentliche Unterschied zum Fibrillennetz von A. villosa besteht darin, daß dieses Netz bei den Ciliaten immer eine sehr konstante Form und Größe besitzt, wogegen es bei A. villosa in weiten Grenzen variabel ist (s. S. 193 f.). Dies ließe sich vielleicht auf leistungsmäßige Unterschiede zurückführen. Das Silberliniensystem der Ciliaten dürfte eine reizleitende und morphogenetische Funktion ausüben [6, 7, 22], während das Fibrillennetz von A. villosa wahrscheinlich die Bewegungsgrundlage der Amöbe ist.

Abb. 8. *A. villosa*: Hier fällt die Längsorientierung der Fibrillen auf. Sie erstrecken sich von der Peripherie zur Mitte der Amöbe hin (ca. $4000 \times$)

Abb. 9. *A. villosa*: Dieses Bild zeigt eindrucksvoll das Nebeneinander von weitmaschigem und engmaschigem Fibrillennetz. Der engmaschige Teil geht teilweise schon in eine membranöse Zustandsform über (ca. $2200 \times$)

Abb. 10. A. villosa: Ein Fibrillennetz an der Peripherie der Amöbe (ca. 2900×)



Abb. 8—10

Literatur

- ALLEN, R. D., D. W. FRANCIS, and HIROMICHI NAKAJIMA, 1965: Cyclic birefringence changes in pseudopods of *Chaos carolinensis* revealing the localization of the motive force in pseudopod extension. Proc. nat. Acad. Sci. 54, 1153–1161.
- [2] BHOWMICK, D. K., and K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN, 1965: An improved method for fixing *Amoebae* for electron-microscope. Exp. Cell Res. 40, 252–263.
- [3] 1967: Electron microscopy of *Trichamoeba villosa* and amoeboid movement. Exp. Cell Res. **45**, 570–584.
- [4] CHATTON, E., et A. LWOFF, 1930: Impregnation, par diffusion argentique, de l'Infraciliature des Cilies marins et d'eau douce, après fixation cytologique et sans dessication. Compt. rend. 104, 834-836.
- [5] FOISSNER, W., 1967: Wimpertiere im Silberpräparat. Ein verbessertes "trockenes" Verfahren zur Darstellung des Silberliniensystems. Mikrokosmos 4, 122–126.
- [6] 1969: Reaktionen des Silberliniensystems der Ciliaten auf mechanische Insulte. I. Teil. Protoplasma 68, 23–45.
- [7] 1969: Reaktionen des Silberliniensystems der Ciliaten auf mechanische Insulte. II. Teil. Protoplasma 68, 433—456.
- [8] GELEI, J. v., 1934: Amöbenforschung und Silbermethoden. Zool. Anz. 108, 92-95.
- [9] 1934: Eine mikrotechnische Studie über die Färbung der subpelliculären Elemente der Ciliaten. Z. wiss. Mikrosk. und mikrosk. Tech. 51, 103–178.
- [10] GOLDACRE, R. J., 1961: The role of the cell membrane in the locomotion of amoebae, and the source of the motive force and its control by feedback. Exp. Cell Res. (suppl.) 8, 1-16.
- [11] JAHN, T. L., 1964: Protoplasmic flow in the mycetozoan, *Physarum*-II. The mechanism of flow; a re-evaluation of the contraction-hydraulic theory and of the diffusion drag hypothesis. Biorheology 2, 133—152.
- [12] JAROSCH, R., 1965: Über Kontakt und Verzweigung der Protein-Schrauben. Österr. Bot. Z. 112, 500-542.
- [13] 1968: Zur Dynamik feiner Pseudopodien von Hochmoor-Amöben. Protoplasma 65, 363—377.
- [14] 1968: Konfiguration und Hydrodynamik protoplasmatischer Schrauben. Z. Naturforsch. 23 b, 17—24.
- [15] 1971: Vergleichende Studien zur amöboiden Beweglichkeit. Protoplasma (im Druck).
- [16] KAMIYA, N., 1966: Motilität des Plasmas der lebenden Zelle. Naturwiss. Rundschau 19, 270–282.
- [17] 1968: The mechanism of cytoplasmic movement in a myxomycete plasmodium. Aspects Cell Mot. 200—214.
- [18] and K. KURODA, 1965: Movement of the myxomycete plasmodium. I. A study of glycerinated models. Proc. Japan Acad. 41, 837—841.
- [19] KÄPPNER, W., 1961: Bewegungsphysiologische Untersuchungen an der Amöbe Chaos chaos. I. und II. Teil. Protoplasma 53, 81–105, 504–529.
- [20] KLEIN, B. M., 1926: Über eine neue Eigentümlichkeit der Pellikula von Chilodon uncinatus Ehrbg. Zool. Anz. 67, 1-2.
- [21] 1932: Das Ciliensystem in seiner Bedeutung f
 ür Lokomotion, Koordination und Formbildung mit besonderer Ber
 ücksichtigung der Ciliaten. Erg. Biol. 75, 75—171.
- [22] 1942: Das Silberlinien- oder neuroformative System der Ciliaten. Ann. Naturhist. Mus. Wien 53, 156—336.
- [23] 1958: The "dry" silver method and its proper use. J. Protozool. 5, 99-103.
- [24] KOMNICK, H., und K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN, 1965: Das Grundplasma und die Plasmafilamente der Amöbe *Chaos chaos* nach enzymatischer Behandlung der Zellmembran. Z. Zellforschung 66, 434–456.

- [25] NAGAI, R., and N. KAMIYA, 1968: Movement of the myxomycete plasmodium. II. Electron microscopic studies on fibrillar structures in the plasmodium. Proc. Japan Acad. 42, 934-939.
- [26] 1968: Movement of the myxomycete plasmodium. VI. Fibrillar structures in the glycerinated plasmodium. Proc. Japan Acad. 44, 1044—1047.
- [27] TAKATA, T., R. NAGAI, and N. KAMIYA, 1967: Movement of the myxomycete plasmodium. III. Artificial polarization in endoplasm distribution in a plasmodium and its bearing on protoplasmic streaming. Proc. Japan Acad. 43, 45-50.
- [28] WOHLFARTH-BOTTERMANN, K. E., 1961: Cytologische Studien. VII. Strukturaspekte der Grundsubstanz des Cytoplasmas nach Einwirkung verschiedener Fixierungsmittel. Untersuchungen am Hyaloplasma von Amöben der *Limax-* und *Proteus-*Gruppe. Protoplasma 53, 259–290.
- [29] 1962: Weitreichende, fibrilläre Protoplasmadifferenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung. I. Teil. Protoplasma 54, 514—539.
- [30] 1963: Weitreichende, fibrilläre Protoplasmadifferenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung. II. Teil. Protoplasma 57, 747—761.
- [31] 1964: Cell structures and their significance for ameboid movement. Int. Rev. Cytol. 16, 61–131.
- [32] 1968: Dynamik der Zelle. Mikroskopie 23, 71-96.

Anschrift des Verfassers: W. FOISSNER, Naturkundliche Station der Stadt Linz, Roseggerstraße 22, A-4020 Linz, Österreich.

Printed in Austria