

Zur Funktion hydrolytischer Enzyme bei der Autolyse von Coprinus

Autor(en): **Iten, Werner**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **79 (1969)**

PDF erstellt am: **08.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-55536>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Zur Funktion hydrolytischer Enzyme bei der Autolyse von Coprinus

Von *Werner Iten*

(Institut für Allgemeine Botanik der ETH Zürich)

Manuskript eingegangen am 25. Juli 1968

Inhalt

1. Einleitung und Problemstellung	175
2. Objekt und Methoden	176
3. Resultate	179
3.1 Morphologie der Fruchtkörperentwicklung	179
3.2 Physiologie der Autolyse	182
3.3 Intrazelluläre Lokalisation von Hydrolasen	184
3.4 Zur Funktion der lysosomalen Enzyme	189
4. Diskussion	191
Zusammenfassung	195
Summary	195
Literatur	196

1. Einleitung und Problemstellung

Die potentielle Fähigkeit von intrazellulären hydrolytischen Enzymen, alle Bestandteile der lebenden Zelle abzubauen, nötigt zur Annahme, dass das Zytoplasma irgendwie vor diesen Enzymen geschützt sei. De Duve (1959) beobachtete als erster, dass in Extrakten aus Rattenleber latente Aktivitäten hydrolytischer Enzyme durch Zerstören von Membranstrukturen befreit werden können. Diese zunächst biochemisch definierten Einheiten wurden Lysosomen genannt. Ihnen entsprechen morphologisch feststellbare, membranumschlossene Zellräume. Dieses Konzept hat sich als geeignet erwiesen, die Funktion der hydrolytischen Enzyme zu klären: Neben synthetischen Prozessen, den anabolischen, laufen in derselben Zelle ebenfalls abbauende oder katabolische Prozesse ab. Einige katabolische Prozesse, namentlich die Auflösung von Protein, Nukleinsäuren und Zellstrukturen, spielen sich in den Lysosomen ab (De Duve und Wattiaux, 1966).

Wenn mit dem Tod einer Zelle die dauernd Energie verbrauchende Aufrechterhaltung der Ordnung verloren geht, zerfallen die Membranen. In der Folge greifen die Hydrolasen Substrate an, welche ihnen in der lebenden Zelle nicht zugänglich waren. Es beginnt der postmortale Abbau des Zytoplasmas, der Autolyse genannt wird. Im technologischen Anwendungsbereich spielen autolytische Vorgänge bei der Heugärung

oder der Tabak- und Teefermentation eine wichtige Rolle (Frey-Wyssling, 1943). Als natürlich vorkommender Prozess wurde im Pflanzenreich die Autolyse in einzigartiger Weise bei einigen Hutpilzen, wie zum Beispiel den Tintlingen (Fam. Coprinaceen), in den Dienst der Sporenverbreitung gestellt. In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, inwiefern die Autolyse mit latenten lysosomalen Enzymen in Zusammenhang steht.

2. Objekt und Methoden

2.1 Objekt

Für alle Untersuchungen wurde als Versuchsobjekt *Coprinus lagopus* Fr. verwendet (Fam. Coprinaceen, Basidiomycetes), dessen Mycel aus Pferdemit isoliert worden war.

2.2 Kulturmethoden

Mycelkultur: Das Mycel wurde submers in Schüttelkulturen (200 ml Medium in 500-ml-Erlenmeyerkolben) bei 28 °C gezogen. Als Impfmateriale diente eine Sporensuspension. Das Medium hatte folgende Zusammensetzung: 1% Glucose; 0,25% Casein (Hammerstein); 0,2% K_2HPO_4 ; 0,02% $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,0005% Thiamin, Spurenelemente. Für die Untersuchung der Proteaseausscheidung wurde neben diesem Medium ein solches verwendet, bei dem Casein durch 0,1% $(NH_4)_2NO_3$ als Stickstoffquelle ersetzt wurde.

Fruchtkörperkultur: Ein zirka 1 cm² grosses Stück vegetativen Mycels einer 1wöchigen Vorkultur wurde auf ein festes Nährmedium geimpft. Als Kulturgefässe dienten zylindrische Glasschalen (Durchmesser 10 cm), welche mit folgendem Medium gefüllt waren: 1% Malzextrakt; 0,4% Hefeextrakt; 0,4% Glucose; 1,2% Agar. Die Kulturen wurden mit einer 75-Watt-Glühbirne in 80 cm Abstand täglich während 8 Stunden belichtet. Bei 28 °C waren in der Regel am siebenten Tag nach dem Beimpfen die ersten Fruchtkörper reif.

2.3 Zellfraktionierung

Zellaufschluss: Die Homogenisation wurde immer bei 0 °C im Mörser ausgeführt. Für Mycel wurde feiner Quarzsand zugegeben, nicht jedoch für Hutgewebe, weil so eine grössere Ausbeute an leicht zerstörbaren Zellorganellen erzielt werden konnte. Das Homogenisationsmedium bestand aus 0,3-m Sorbit, 0,02-m Trispuffer (pH 7,4) und 0,001-m EDTA (Äthylendiamino-tetraessigsäure). Bei Bestimmungen, die keiner weiteren Fraktionierung des Homogenates bedurften, wurde der Puffer weggelassen. Homogenaten, die mittels der Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt werden sollten, wurde 0,01% Triton x-100 zugefügt. Gemäss eigenen Beobachtungen reduziert dieses Detergentium die Tendenz der Zellorganelle zu agglomerieren. Unzerstörte Zellen und Zellwände wurden durch eine Vorzentrifugation (10 Min. 500 g) beseitigt. Der Überstand, der zellfreie Extrakt, war das Ausgangsmaterial für alle weiteren Untersuchungen.

Differentialzentrifugation: Zur Bestimmung der sedimentierbaren Enzymaktivitäten wurde ein zellfreier Extrakt bei 150000 g (30 Min.) zentrifugiert. Bei der differentiellen Zentrifugation wurden bei 10000 g (10 Min.) die Mitochondrien, bei 40000 g (10 Min.) eine schwere und bei 150000 g (30 Min.) eine leichte Mikrosomenfraktion sedimentiert. Der Überstand stellte die lösliche Fraktion dar. Die Sedimente wurden einmal resuspendiert und erneut zentrifugiert.

Dichtegradientenzentrifugation: Für die Übersichtung eines Gradienten wurde ein durch Differentialzentrifugation gewonnenes, resuspendiertes Sediment verwendet (Vol. 1 ml). Die linearen Dichtegradienten wurden in Nitrocellulose tuben hergestellt, teils aus Saccharose und Urografin (Methylglukaminsalz der 3,5-Diacetyl-diamino-2,4,6-trijodbenzoesäure, Fa. Schering AG, Berlin), teils aus Sorbit und Ficoll. (Genauere Angaben finden sich unter Ergebnisse.) Das Volumen der Gradienten betrug 4 bis 4,5 ml. Die Zentrifugation wurde in einem Ausschwingrotor Modell SW 39 (Spinco) bei 39000 U/Min. (2 Std.) ausgeführt. Anschliessend wurden die Gradiententuben am unteren Ende am Rande des Sedimentes angestochen und deren Inhalt mittels eines Tropfenzählers in 15 bis 18 Fraktionen aufgetrennt.

2.4 Enzymbestimmungen, Stoffanalysen

In Vorversuchen wurden die Aktivitäten der hydrolytischen Enzyme Protease, Chitinase, β -Glucosidase, saure Phosphatase und RNase in Abhängigkeit vom pH untersucht (Abb. 1). Die Temperatur während der Inkubation betrug durchwegs 37 °C.

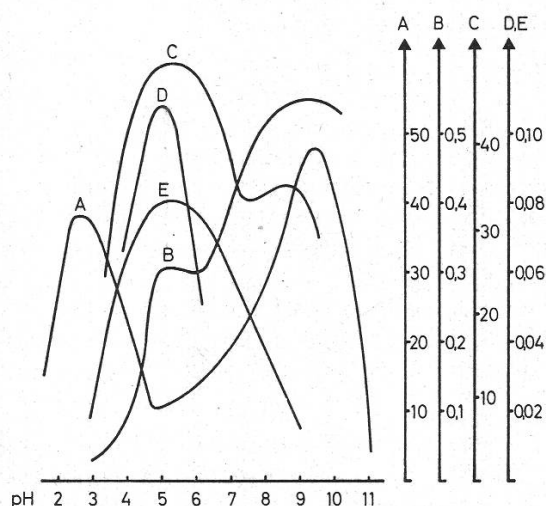


Abbildung 1

pH-Abhängigkeit der Aktivitäten einiger Hydrolasen im zellfreien Extrakt von vegetativem Mycel

- | | |
|-------------------------|---|
| A: Protease | Substrat: Rinderserumalbumin
Puffer: Phosphat-, Borat-, Zitratuniversalpuffer nach Theorell (1938)
Aktivitätseinheit: μg Tyrosin/60 Min. |
| B: RNase | Substrat: gereinigte Hefe-RNS
Puffer: pH 3-5,5: 0,05-m Acetat
pH 5-9: 0,05-m Phosphat
Aktivitätseinheit: ΔE_{280} /60 Min. |
| C: Chitinase | Substrat: Zellwände der Lamellen von <i>Coprinus</i> -Fruchtkörpern
Puffer: wie bei B
Aktivitätseinheit: μg N-Acetylglucosamin/60 Min. |
| D: Phosphatase | Substrat: p-Nitrophenylphosphat
Puffer: wie bei B
Aktivitätseinheit: μMol PO_4 /20 Min. |
| E: β -Glucosidase | Substrat: p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid
Puffer: wie bei B
Aktivitätseinheit: μMol Glucose/20 Min. |

Protease: Die Bestimmung wurde nach der Phenolmethode von Greenberg (1961), modifiziert nach Matile (1965), ausgeführt. Für die Ermittlung der pH-Abhängigkeit diente eine 1prozentige Serumalbuminlösung im Universalpuffer nach Theorell und Stenhagen (1938). In Abbildung 1 sind die beiden ausgeprägten Aktivitätsoptima bei pH 2,5 und 9,5 wiedergegeben. In allen folgenden Bestimmungen wurde entweder die saure Proteaseaktivität bei pH 2,5 (0,1-m Acetat) mit 1prozentigem Hämoglobin oder die alkalische Proteaseaktivität bei pH 9,5 (0,1-m Carbonat) mit 1prozentigem Casein gemessen. Aktivitätseinheit: μg Tyrosinäquivalente/60 Min.

Chitinase:

a) *Methode, beruhend auf der Bestimmung von N-Acetylglucosamin* nach Jeuniaux (1966): In Vorversuchen wurde zunächst ein geeignetes Substrat gesucht. Mit Chitinsuspensionen, welche aus Krebspanzern nach Tracey (1955 a) oder aus dem Rückenskelett von *Sepia* nach Hackman (1964) gewonnen wurden, konnten selbst nach 20stündiger Inkubation keine Aktivitäten gemessen

werden. Mit Chitosan, hergestellt nach Tracey (1955 b), als Substrat konnte das Spaltprodukt Glucosamin in geringen Mengen festgestellt werden.

Die grössten Aktivitäten waren jedoch nachweisbar bei der Verwendung von *Coprinus*-Zellwänden: Es wurden Lamellen von Fruchtkörpern, die kurz vor der Sporenbildung standen, gesammelt. Das Gewebe wurde bei 0 °C in 0,1-m Trispuffer (pH 7,4) und 1 % Triton x-100 im Mörser zerkleinert und anschliessend 3mal 1 Stunde in einem Vibromischer zusammen mit Glaskugeln (Durchmesser 0,5 mm) aufgeschlossen. Kontrollen im Lichtmikroskop zeigten, dass hierbei praktisch alle Zellen aufgebrochen waren. Plasmareste wurden durch Stehenlassen in 1n NaOH bei 20 °C (4 Std.) und durch mehrmaliges Waschen von den Zellwänden entfernt. Vorversuche hatten gezeigt, dass diese Behandlung die Angreifbarkeit der Zellwände durch die Chitinase nicht beeinträchtigt.

Für alle weiteren Messungen wurde eine Zellwandsuspension von 25 mg Trockensubstanz pro ml in 0,1-m Acetatpuffer (pH 5,0; vgl. Aktivitätsoptimum in Abb. 1) als Substrat verwendet. Das Abstoppen der Inkubation erfolgte durch Erhitzen auf 100 °C (2 Min.). Nach dem Abzentrifugieren der Zellwände erfolgte im Überstand die Bestimmung von N-Acetylglucosamin nach Reissig et al. (1955): 0,5 ml Probe wurde mit 0,1 ml 0,8-m Kaliumtetraborat 3 Minuten auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 3 ml einer 1prozentigen Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in Eisessig (enthaltend 1,25 % [V/V] 10n HCl) zugefügt. Nach 20 Minuten erfolgte die Messung der Extinktion bei 585 nm. Die Aktivität der Chitinase ergab sich aus der Differenz des Gehaltes an N-Acetylglucosamin in einer Enzymlösung, welche mit Zellwänden, und parallel dazu einer solchen, die nur mit Pufferlösung inkubiert worden war. Aktivitätseinheit: μg N-Acetylglucosamin/60 Minuten.

b) Methode, beruhend auf der Bestimmung reduzierender Spaltprodukte: Enzympräparate wurden mit Zellwänden (wie oben) inkubiert. Um die Aktivitäten von Amylasen auszuschliessen, wurden parallel dazu Proben ohne Zellwände inkubiert. In den Überständen liessen sich die reduzierenden Gruppen nach Nelson (1944) bestimmen. Die Differenz galt als Mass für die Chitinaseaktivität. Aktivitätseinheit: μg N-Acetylglucosamin-Äquivalente/60 Minuten.

β -Glucosidase: Als Substrat diente p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (1 mg/ml) in 0,1-m Acetatpuffer von pH 5,0 (Aktivitätsoptimum siehe Abb. 1). Das freigesetzte Nitrophenol wurde in alkalischem Milieu bei 400 nm photometrisch bestimmt. Aktivitätseinheit: μMol Glucose/20 Minuten.

Saure Phosphatase: Analog zur β -Glucosidase wurde das von p-Nitrophenylphosphat abgespaltene Nitrophenol bei 400 nm gemessen. Aktivitätseinheit: μMol Phosphat/20 Minuten.

RNase: Als Substrat diente eine 0,2prozentige Lösung von gereinigter Hefe-RNS in 0,1-m Acetatpuffer bei pH 5,2 (dies entspricht dem Aktivitätsoptimum einer sauren RNase; vgl. Abb. 1). Die Inkubation wurde abgestoppt mit 2,5prozentiger Trichloressigsäure in 10^{-3} -m Uranylacetat. Nach der Zentrifugation der ausgefällten RNS wurde im Überstand die Ribose der löslichen Nukleotide mit Orcinol nach Schneider (1957) gemessen. Bei der RNase-Bestimmung in zellfreien Extrakten und bei der Ermittlung der pH-Abhängigkeit wurden die Nukleotide direkt bei 260 nm gemessen. Um dabei die Aktivitäten einer Protease auszuschliessen, wurden die Extinktionen von ohne RNS inkubierten Parallelansätzen abgezogen. Aktivitätseinheiten: μg RNS/60 Minuten beziehungsweise $\Delta E_{260}/60$ Minuten.

Zytochromoxydase: Die Enzymaktivität wurde nach Nielsen und Lehninger (1955) bestimmt. Aktivitätseinheit: Extinktionsabnahme $\Delta E_{550}/\text{Minuten}$.

Succinatdehydrogenase: Die kolorimetrische Bestimmung der Aktivität erfolgte nach Ells (1959). Aktivitätseinheit: $\Delta E_{600}/8$ Minuten.

Aldolase: Die kolorimetrische Bestimmung der Aktivität wurde nach Biochimica Böhringer (1963) ausgeführt. Aktivitätseinheit: $\Delta E_{340}/\text{Minuten}$.

Zellwandanalysen: Zellwände aus Mycel und Fruchtkörpern wurden gewonnen nach einer Angabe von Crook und Johnston (1962): 1 Volumen Gewebe wurde mit 1 Volumen 0,1-m NaCl im Turmix homogenisiert und anschliessend mit 2 Volumen Glaskugeln (Durchmesser 0,5 mm) im Vibromischer 120 Minuten lang aufgeschlossen. Die von den Glaskugeln entfernten Zellwände wurden in 0,1-m NaCl mehrmals gewaschen und erneut im Vibromischer so lange behandelt, bis im Lichtmikroskop keine Plasmarückstände mehr feststellbar waren. Die Zellwandfragmente wurden schliesslich wiederholt gewaschen mit destilliertem Wasser, Alkohol und Äther und unmittelbar getrocknet. Zur Hydrolyse wurden 20 mg Zellwandpräparat mit 0,5 ml 5n HCl in einem zugeschmolzenen Röhrchen 15 Stunden bei 100 °C aufgeschlossen, die Säure anschliessend im Exsiccator über KOH entfernt und der Rückstand in Pyridin aufgenommen. Zur chromatographischen Auf-

trennung des Hydrolysates verwendete man Kieselgur-G-Dünnschichtplatten, die mit 0,02-m Natriumacetat imprägniert worden waren (nach Stahl, 1962). Als Lösungsmittel diente ein Gemisch von 60 Teilen Äthylacetat und 40 Teilen Isopropanol-Wasser (2:1). Zucker und Glucosamin wurden sichtbar gemacht mit einer Lösung von 1 ml Anisaldehyd in 97 ml Eisessig und 2 ml konzentrierter Schwefelsäure. Glucosamin ergab blaue Flecken.

Protein: Die Bestimmung der in 10prozentiger Trichloressigsäure fällbaren Proteine erfolgte nach Lowry et al. (1951).

RNS: Die mit 10prozentiger Trichloressigsäure gefällte RNS wurde während 20 Minuten mit 5prozentiger Perchlorsäure bei 90 °C hydrolisiert. Im Überstand liess sich die Ribose der Nukleotide mit Orcinol bestimmen (nach Schneider, 1957).

N-Acetylglucosamin: Eine bestimmte Menge eines zellfreien Extraktes wurde mit 80prozentigem Alkohol versetzt und der nach dem Zentrifugieren gewonnene Überstand eingetrocknet. Der in Pyridin aufgenommene Rückstand wurde quantitativ auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (Kieselgel G, Merck) gebracht und mit einem Gemisch von 60 Teilen Isopropanol, 20 Teilen Äthanol und 20 Teilen 0,02-m Natriumacetat aufgetrennt. Die Stellen mit dem N-Acetylglucosamin entsprechenden R_f -Werten wurden abgeschabt, in destilliertem Wasser ausgewaschen und das N-Acetylglucosamin nach Reissig et al. (1955) bestimmt.

2.5 Morphologische Untersuchungen

Lichtmikroskopie: Zur Beobachtung einzelner Hyphen wurde vegetatives Mycel auf Objektträgern, welche mit einem dünnen Agarfilm überzogen waren, in einer feuchten Kammer kultiviert.

Zur Beobachtung des intakten Hymeniums wurden die Lamellen von Fruchtkörpern in einer feuchten Kammer längs des Tramas in zwei Teile zerlegt. Wenn nur einzelne Zellen des Hymeniums beobachtet werden sollten, wurden von Lamellenstückchen Quetschpräparate hergestellt.

Elektronenmikroskopie: Für alle elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde die Gefrierätztechnik von Moor (1964) verwendet. Gewaschenes vegetatives Mycel beziehungsweise kleine Stückchen von Lamellen aus Fruchtkörpern wurden zur Vorbehandlung 2mal 1 Stunde in 25prozentigem Glycerin suspendiert. Aus Dichtegradienten isolierte Partikel wurden in 25prozentigem Glycerin und 0,01-m Tris (pH 7,4) sedimentiert (30 Min. 150000 g).

3. Resultate

3.1 Morphologie der Fruchtkörperentwicklung

Zum besseren Verständnis der zu beschreibenden physiologischen Resultate sollen vorerst die morphologischen Aspekte der Fruchtkörperentwicklung dargestellt werden. Die Arbeiten von Buller (1924) und Borriss (1934) waren Ausgangspunkt eigener morphologischer Beobachtungen.

Das Mycel, welches auf ein festes Nährmedium geimpft worden ist, wächst unter den erwähnten Kulturbedingungen innerhalb 5 Tagen zu einer im Durchmesser 5 cm messenden Scheibe heran. Zu diesem Zeitpunkt erscheinen die ersten Fruchtkörperanlagen als kleine Knötchen. Diese differenzieren sich mit zunehmender Grösse in Stiel und Hut. Einen Überblick über die komplexen Vorgänge der makroskopischen sowie der mikroskopischen Morphogenese der Fruchtkörper vermittelt die Abbildung 2. Der Nullpunkt der Zeitskala wurde willkürlich auf den Zeitpunkt, in dem die ersten Sporen befreit werden, festgesetzt. Dieser Zeitpunkt kann besonders eindeutig festgelegt werden an Hand einer Schwärzung des unter dem Hut befindlichen vegetativen Mycels, welche von den heruntergefallenen Sporen herrührt. Unter natürlichen Bedingungen beginnt die Sporenaussaat um die zweite Stunde nach Einbruch der Dunkelheit. Bei Kulturen, die von 24.00 bis 08.00 Uhr belichtet wurden, fällt der Nullpunkt mit der Tageszeit 14.00 Uhr zusammen.

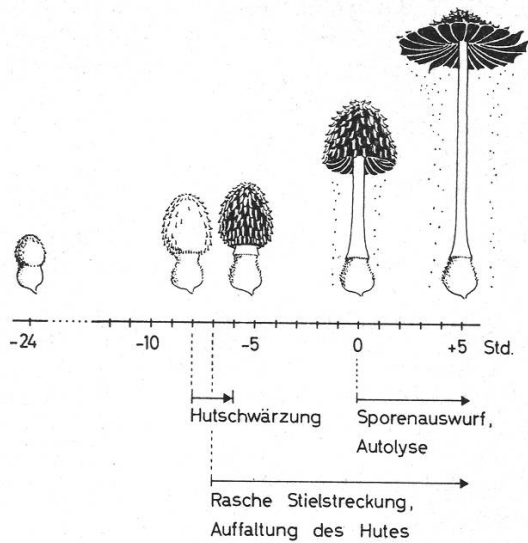


Abbildung 2a

Morphologie der Fruchtkörperentwicklung bei *Coprinus lagopus*

I. Morphogenese des Fruchtkörpers

Alle Stadien sind im Massstab 1:3 wiedergegeben. Der Nullpunkt der Zeitskala entspricht dem Zeitpunkt des beginnenden Sporenfalls

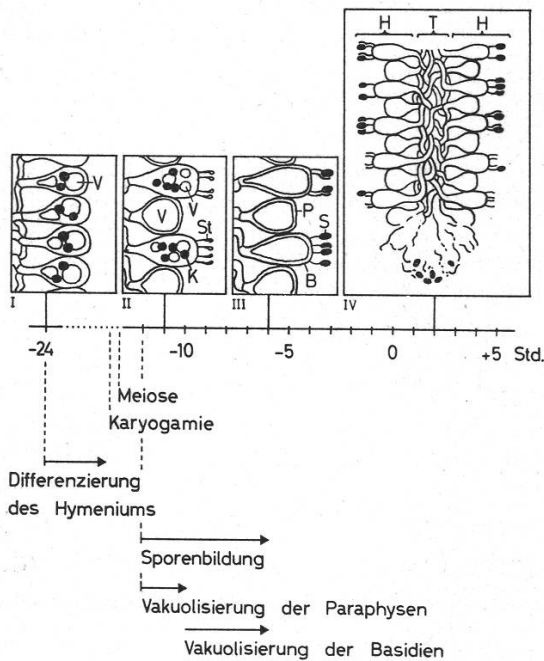


Abbildung 2b

Morphologie der Fruchtkörperentwicklung bei *Coprinus lagopus*

II. Differenzierung der Lamellen

Gleiche Zeitskala wie in Abbildung 2a.

I: Hymenium undifferenziert (Vergr. 250 ×)

II: Beginn der Sporenbildung (Vergr. 250 ×)

III: Sporenbildung abgeschlossen (Vergr. 250 ×)

IV: Lamelle im Querschnitt bei fortgeschrittener Autolyse (Vergr. 160 ×, nach Buller, 1924)

B: Basidie, P: Paraphyse, St: Sterigma, S: Spore, V: Vakuole, K: Kern, H: Hymenium, T: Trama. Weitere Angaben siehe Text

Aus lichtmikroskopischen Beobachtungen geht hervor, dass am sechsten Tag beziehungsweise 24 Stunden vor dem Sporenauswurf die Differenzierung des Hymeniums in Basidien und Paraphysen beginnt. Jede Basidie bildet zur Zeit -12, nach erfolgter Karyogamie und Meiose, 4 Sterigmata, an deren Enden die Sporen entstehen (Abb. 2b, II). Während die Basidien mit Plasma prall gefüllt sind, sind die Paraphysen schon weitgehend vakuolisiert. Die Vakuolisierung einzelner Zellen in diesen frühen Entwicklungsstadien kann besonders deutlich an Hand elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt werden (Tafel Ia). 4 Stunden später haben die am unteren Ende des Hutes befindlichen Basidien ihren Inhalt vollständig an die Sporen abgegeben und werden nun ebenfalls von einer grossen Zentralvakuole ausgefüllt (Abb. 2b, III). Die Sporen haben ihre endgültige Grösse von 10μ erreicht und beginnen sich braun zu

färben. Makroskopisch ist dies erkennbar an der Schwärzung des Hutes, welche in weiteren 2 Stunden abgeschlossen ist. Durch Zellstreckung setzt nun ein rasches Wachstum des oberen, im Hut bis anhin verborgenen Teils des Stieles ein (ca. 1 cm pro Std.). Gleichzeitig beginnt der Hut sich aufzufalten. Sobald der Stiel sich ungefähr um die Hälfte seiner maximalen Längenzunahme gestreckt hat, beginnt der Hut die Sporen auszuwerfen. Die zuerst ausgeschleuderten Sporen stammen von den ursprünglich den Stiel berührenden Rändern der Lamellen. An diesen Stellen setzt kurz darauf die Autolyse ein. Die Zonen, in welchen Sporenauswurf stattfindet, wandern innerhalb 5 Stunden gegen den äusseren Hutrand, gefolgt von den Zonen, welche sich auflösen (Abb. 2b, IV). Die durch die Autolyse der Zellen entstehende Flüssigkeit wird zum Teil von der Tramaschicht der noch unverdauten Lamellenreste aufgesogen. Am Ende der Autolyse ist der Hut flach ausgebreitet, und nur ein dünnes, mehrschichtiges Hyphengewebe, welches den äusseren Abschluss des Hutes bildet, wird von der Auflösung nicht ergriffen.

Die makroskopische Beobachtung des Autolysevorganges liess vermuten, dass die vollständige Auflösung der Lamellen neben dem Zytoplasma auch die Zellwände betreffe. Zur genaueren Abklärung dieser wichtigen Einzelheit wurden Lamellen von in Sporenaussaat begriffenen Fruchtkörpern in folgender Weise behandelt: Die Lamellen wurden in einer feuchten Kammer längs des Tramas in zwei Hälften zerlegt. Zu diesem die Basidien und Paraphysen tragenden, nur mehr wenige Zellagen messenden Hymenium wurde auf einem Objektträger ein Tropfen des Saftes eines vollständig autolysierten Fruchtkörpers gegeben in solcher Weise, dass das Hymenium mit unbenetzter Oberseite auf dem Tropfen schwamm. Solche Präparate wurden 30 Minuten bis 3 Stunden bei Wasserdampfsättigung und 25 °C inkubiert, anschliessend mit einem Deckglas bedeckt und im Phasenkontrastmikroskop beobachtet. In der Tafel Ia ist ein Ausschnitt aus einer 30 Minuten inkubierten Lamelle wiedergegeben. Während in deren oberem Teil die Zellwände noch gut erkenntlich sind, sind sie im unteren Teil bereits vollständig aufgelöst. Das Phänomen der Zellwandauflösung breitet sich innerhalb 3 Stunden über die ganze Lamelle aus. Aus diesem morphologischen Befund konnte auf eine möglicherweise enzymatisch bedingte Auflösung der Zellwandsubstanzen geschlossen werden.

Eine Bestätigung dafür, dass das Autolysat zellwandabbauende Enzyme enthält, war seine Fähigkeit, aus jungem Lamellengewebe nackte Protoplasten herzustellen: Lamellen aus einem Stadium mit undifferenziertem Hymenium (20 Std. vor der Autolyse) wurden mit Autolysat bei 25 °C 2 Stunden inkubiert. Nach leichtem mechanischem Druck wurden zahlreiche sphärische Protoplasten konstanter Grösse befreit. Diese enthielten immer zwei Kerne und zwei relativ grosse Vakuolen und stammten von denjenigen Zellen des Hymeniums, aus welchen sich später die Basidien und die Paraphysen herausdifferenzieren (Tafel Ic, d). Im Gegensatz dazu gelang es nie, aus Mycel oder Stielen auf diese Weise nackte Protoplasten zu gewinnen.

Es wurde zunächst ein Unterschied in der Zusammensetzung der Zellwände aus Mycel und Lamellen vermutet. Für eine Untersuchung zellwandabbauender Enzyme war es notwendig, die chemische Natur ihrer Substrate genauer zu kennen. In der Literatur existiert nur eine qualitative Angabe für *Coprinus atramentarius* (Frey, 1950), dessen Zellwände Chitin enthalten sollen. Die qualitative Beurteilung von Dünnschichtchromatogrammen von Zellwandhydrolysaten aus Mycel, Stielen und Hüten zeigte keinen Unterschied der verschiedenen geprüften Zellwände. Es konnte aus-

schliesslich Glucosamin nachgewiesen werden. Es muss gefolgert werden, dass die Zellwände zum grössten Teil (über 90%) Chitin enthalten. Bei ihrer Auflösung während der Autolyse dürften Chitinasen eine entscheidende Rolle spielen.

3.2 Physiologie der Autolyse

Zur Charakterisierung der physiologischen Vorgänge während der Autolyse wurden einige Stoffe und Enzyme vor und während der Auflösung des Hutes quantitativ erfasst. Besondere Beachtung wurde der Chitinase geschenkt, nachdem sich gezeigt hatte, dass bei der Autolyse die chitinhaltigen Zellwände weitgehend aufgelöst werden.

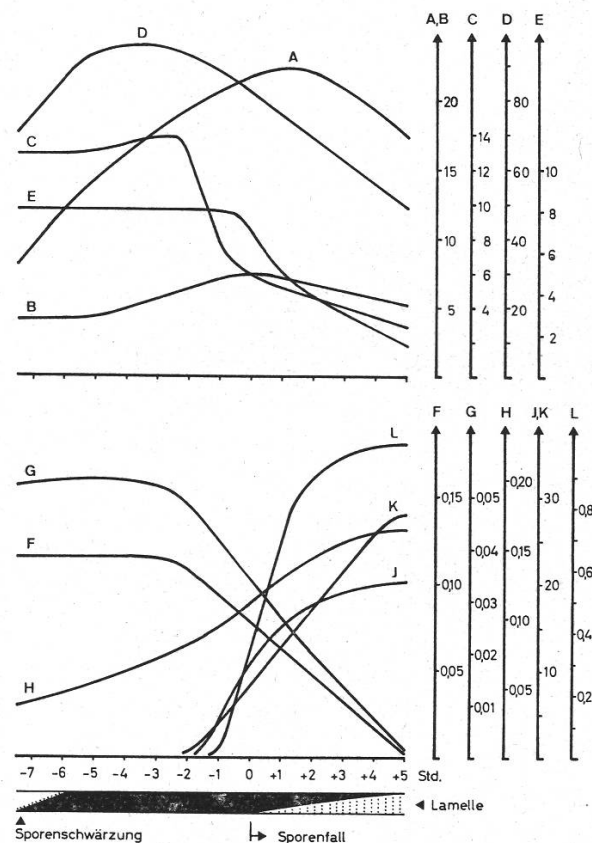


Abbildung 3

Zu- und Abnahme von einigen Stoffen und Enzymaktivitäten in zellfreien Extrakten von Fruchtkörperlamellen. Es wurden sechs verschiedene Stadien (zu den Zeiten $-7,5$; -5 ; $-2,2$; $-0,5$; $+1,5$; $+5$) vor und während der Autolyse aus einer synchronen Kultur gesammelt (Zeitskala wie in Abb. 2).

Alle Bestimmungen sind auf 1mg Trockengewicht des zellfreien Extraktes bezogen

Gemessene Stoffe und Enzymaktivitäten:

- | | | | |
|-------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---|
| A: Alkalische Protease | in μg Tyrosin/30 Min. | J: N-Acetylglucosamin | in μg |
| B: Saure Protease | in μg Tyrosin/30 Min. | K: Chitinase | (Bestimmung von N-Acetylglucosamin) |
| C: Saure RNase | in μg RNS/60 Min. | | in μg N-Acetylglucosamin/20 Min. |
| D: Protein | in μg | L: Chitinase (Bestimmung der freien | reduzierenden Gruppen) |
| E: RNS | in μg | | in mg N-Acetylglucosamin-Äquivalenten/20 Min. |
| F: Aldolase | in ΔE_{340} /Min. | | |
| G: Zytochromoxydase | in ΔE_{550} /Min. | | |
| H: β -Glucosidase | in μg Glucose/10 Min. | | |

Es wurden sechs verschiedene Entwicklungsstadien von Fruchtkörpern (zwischen beginnender Sporenschwärzung und während 5 Stunden fortgeschrittener Autolyse) aus einer synchronen Kultur, die von 24.00 bis 8.00 Uhr belichtet worden war, gesammelt. Pro Stadium wurden fünf bis sechs Fruchtkörper verwendet und von diesen nur die Lamellen verarbeitet. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3 zusammengefasst. Alle Bestimmungen wurden auf 1 mg Trockengewicht des zellfreien Extraktes bezogen.

Um den Beginn der zweiten Stunde vor dem Sporenfall machen sich einige entscheidende Veränderungen bemerkbar: Die durch die Aldolase und die Zytochromoxydase repräsentierte Zellatmung beginnt abzunehmen. Dies weist darauf hin, dass energieverbrauchende Aufbauprozesse stark eingeschränkt werden. Andererseits macht es die bis zur Zeit 0 konstant bleibende RNS-Menge wahrscheinlich, dass noch Proteine synthetisiert werden. Dies geht auch aus der Zunahme der Protease- und der Chitinaseaktivität hervor. Die anfänglich sehr aktive RNase nimmt ebenfalls um die erwähnte, kritische zweite Stunde rasch ab.

Der Verlauf der RNase-Aktivität entspricht möglicherweise einem anfänglich grossen RNS-Umsatz. Dieser scheint eingeschränkt werden zu können, sobald nur noch einige wenige, spezialisierte Enzyme hergestellt werden. Eine solche Vorstellung würde dem plötzlichen Abfall der RNase-Aktivität gerecht.

Der Proteinstoffwechsel zeigt ein etwas anderes Bild: Schon relativ früh (+5 Std.) beginnt die Gesamtproteinmenge abzunehmen. Die Proteasen (die alkalische und die saure verhalten sich gleich) nehmen in ihren Aktivitäten bis zur Zeit -1 zu, um dann bis an das Ende der Autolyse wieder abzunehmen. Ihre Funktion scheint sich im Zeitpunkt ihres Aktivitätsmaximums weitgehend erfüllt zu haben.

Es soll nun etwas eingehender die Chitinase diskutiert werden: Nach bisherigen Befunden besteht das enzymatische System, welches fähig ist, Chitin bis zum monomeren Spaltprodukt, N-Acetylglucosamin, abzubauen, aus zwei Enzymen, nämlich der Chitinase und der Chitobiase (Jeuniaux, 1966). Die Chitinase hydrolysiert alle Polymere von N-Acetylglucosamin einschliesslich des Tetramers und etwas weniger des Trimers. Als Spaltprodukte erscheinen Mono-, Tri-, Tetra- und wahrscheinlich höhere Polymere. Die Chitobiase hydrolysiert hauptsächlich die Chitobiose (Dimer von N-Acetylglucosamin) und etwas weniger aktiv das Trimer.

Tracey (1955b) fand in *Coprinus comatus* mittels der viskosimetrischen Methode eine starke Chitinaseaktivität. Um genauere quantitative Aussagen machen zu können, wurden in dieser Arbeit über *Coprinus lagopus* kolorimetrische Methoden verwendet. Einerseits wurde das monomere Spaltprodukt, N-Acetylglucosamin, bestimmt, welches jedoch nur zu einem geringen Anteil neben verschiedenen Polymeren entsteht, falls in einem chitinolytischen System die Chitobiase fehlt. (Dieser Anteil kann als proportional zur Aktivität der Chitinase angesehen werden.) Um diese Möglichkeit bei *Coprinus* abzuklären, wurde als zweite Methode die Bestimmung der Spaltprodukte mit reduzierenden Eigenschaften nach Nelson (1944) verwendet. Ein Vergleich der beiden Methoden ergibt, dass bei der maximalen Chitinaseaktivität (5 Std. nach Beginn des Sporenfalls) die Menge der befreiten reduzierenden Gruppen (in N-Acetylglucosamin-Äquivalenten ausgedrückt) rund 30mal grösser ist als die Menge des abgespaltenen Monomers, des N-Acetylglucosamins selber. Daraus folgt, dass die Chitinzellwände nur zu einem kleinen Teil bis zum N-Acetylglucosamin abgebaut werden. Dies stimmt überein mit der kleinen Menge freien N-Acetylglucosamins, das während der Autolyse in situ entsteht. Zu einem weitaus grösseren Teil entstehen bei

der Zellwandhydrolyse die nicht weiter untersuchten Di-, Tri-, Tetra- und höheren löslichen Polymere, deren reduzierende Gruppen sich messen lassen. Es darf also geschlossen werden, dass im chitinolytischen System von *Coprinus lagopus* die Chitobiaseaktivität minim ist. Für den Zweck einer Auflösung der Zellwand genügt offenbar die Chitinase allein bereits.

Bemerkenswert ist, dass die Chitinase erst 2 Stunden vor dem Autolysebeginn gebildet wird und vorher weder im Fruchtkörper noch im Mycel zu finden ist.

Eine β -Glucosidase, welche das künstliche Substrat p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid spaltet, ist schon lange vor der Autolyse anwesend und ist sehr wirksam. Zudem nimmt ihre Aktivität vor und während der Autolyse stetig zu. Diese Aktivität kann nicht einer Chitobiase zugeschrieben werden, da eine solche wahrscheinlich fehlt oder aber eine sehr schwache Aktivität aufweist. Ob es sich dabei um ein Enzym handelt, welches ein nicht chitinartiges Polysaccharid hydrolysiert, ist nicht untersucht worden.

Es muss betont werden, dass die in der Abbildung 3 dargestellten Messungen sich auf ein heterogenes Gewebe beziehen. Es sind zwar alle Zellen der Lamellen stark vakuolisiert; jedoch befinden sich die untersten Zonen der Lamellen in einem physiologischen Zustand, welcher von den weiter oben liegenden erst einige Stunden später erreicht wird. Die erhaltenen Ergebnisse stellen also eine Überlagerung von verschiedenen Vorgängen dar. (Eine Subfraktionierung der Lamellen, die zu autolysieren beginnen, bietet wegen ihrer Kleinheit grosse experimentelle Schwierigkeiten und wäre am ehesten bei *Coprinus comatus*, der sehr lange Lamellen besitzt, durchführbar.) Gewisse Schlüsse können trotzdem gezogen werden, denn plötzliche Änderungen von Werten, die vor der Autolyse einige Zeit konstant blieben, können mit grosser Wahrscheinlichkeit den Zellen zugeordnet werden, die zuerst der Autolyse anheimfallen.

Demnach ist der Autolysevorgang namentlich durch das Auftreten eines chitinolytischen Systems charakterisiert. Daneben scheint der Abbau von Protein und RNS ebenfalls eine gewisse Rolle zu spielen.

3.3 Intrazelluläre Lokalisation von Hydrolasen

3.3.1 Sedimentierbarkeit hydrolytischer Enzyme

Voruntersuchungen und die im vorhergehenden Abschnitt geschilderten Ergebnisse hatten gezeigt, dass alle untersuchten hydrolytischen Enzyme ausser der Chitinase bereits im vegetativen Mycel sowie in sämtlichen Stadien des Fruchtkörpers vor dessen Autolyse anwesend sind. Ebenso ist die Chitinase bereits 2 Stunden vor der Autolyse nachweisbar. Damit ein geordneter Stoffwechsel gewährleistet ist, müssen daher diese Enzyme strukturgebunden sein.

Auf der Suche nach entsprechenden Zellstrukturen wurde zunächst die Sedimentierbarkeit hydrolytischer Enzyme untersucht. Die alkalische Protease (pH-Optimum: 9,5), welche in sämtlichen Geweben und Stadien des untersuchten Pilzes reichlich vorhanden ist, wurde als Testenzym verwendet.

Die totale sedimentierbare Proteaseaktivität aus 10 Tage altem Mycel betrug 11,4% der gesamten, im zellfreien Extrakt vorhandenen Aktivität. In Mycel, welches nur 45 Stunden kultiviert worden war (exponentielle Wachstumsphase, vgl. Tafel II), war sie doppelt so gross, nämlich 23%. Der relativ grosse Anteil an nicht sedimentierbarer Aktivität scheint aus Zellstrukturen zu stammen, die bei der Homogenisation zerstört werden.

Tabelle 1

Fraktionen	Totales Sediment	Durch differentielle Zentrifugation gewonnene Sedimente		
		10000 g	40000 g	150000 g
Protease in mg Tyrosin/60 Min.	1,78	1,38	0,34	0,35
in %	100	77,5	19	19,5
Zytochromoxydase in ΔE_{550} /Min.	16,0	14,0	0	0
in %	100	87	0	0

Differentielle Zentrifugation eines zellfreien Extraktes aus vegetativem Mycel (Kulturzeit: 45 Std.). Aktivitäten der alkalischen Protease und der Zytochromoxydase in Sedimenten, die bei 10000 g, 40000 g und 150000 g gewonnen wurden

Die differentielle Zentrifugation ergab, dass ein grosser Teil der gesamten sedimentierbaren Proteaseaktivität in der bei 10000 g sedimentierenden Fraktion enthalten ist. Aus Tabelle 1 geht hervor, dass sich in derselben Fraktion auch die gesamte Aktivität der Zytochromoxydase befindet. In der Mitochondrienfraktion ist offenbar eine lysosomenartige Struktur enthalten.

Die geringen Proteaseaktivitäten, welche in den beiden Mikrosomenfraktionen festgestellt wurden, sind möglicherweise an die Ribosomen und an das endoplasmatische Retikulum gebunden, wo dieses Enzym synthetisiert wird. Zum Teil könnte diese breite Verteilung des Enzyms auch auf eine unspezifische Adsorption an Membranen zurückgeführt werden.

Aus Hutgewebe konnten relativ grosse Mengen hydrolytischer Aktivitäten sedimentiert werden, und zwar im Stadium vor der Sporenreife 35% der alkalischen Protease und im Stadium der beginnenden Autolyse 28% der Chitinase.

3.3.2 Dichtegradientenzentrifugation

Aus den Ergebnissen der differentiellen Zentrifugation kann geschlossen werden, dass ein Teil der alkalischen Proteaseaktivität strukturgebunden ist. Um diese fraglichen Strukturen zu isolieren und insbesondere von den Mitochondrien zu trennen, wurden Mitochondriensedimente (15 Min. 20000 g) mittels der Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Als Ausgangsmaterial diente Mycel, das 57 Stunden kultiviert worden war. Auf der Suche nach einem geeigneten Gradientensystem erwies sich die Saccharose als ungünstig, hingegen gelang es, mit Urografin eine leichtere, hydrolasehaltige Bande von den schwereren Mitochondrien zu trennen (Abb. 4). Da Urografin bei vielen Enzymbestimmungen stört, musste dieses entfernt werden, indem die Enzyme zusammen mit 0,5prozentigem Serumalbumin in 80prozentigem Aceton gefällt und 1mal gewaschen wurden. Als Leitenzym der Mitochondrien diente die Succinatdehydrogenase. Alle gemessenen hydrolytischen Enzyme, wie saure und alkalische Protease, saure Phosphatase und saure RNase, hatten ihr Maximum in einer Bande dicht unter der Interphase zwischen dem Gradienten und der überladenen Partikelsuspension. Ein zweites, kleineres Maximum oder eine Schulter im Bereich der

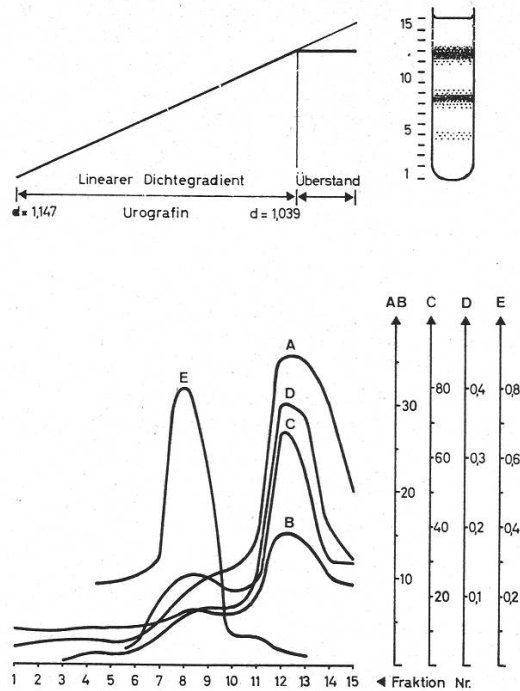


Abbildung 4

Auftrennung einer Mitochondrienfraktion aus Mycel mittels Dichtegradientenzentrifugation. Kulturzeit des Mycels: 57 Stunden. Zur Vermeidung eines osmotischen Schockes beim Übertritt von überschichteten Partikeln in den Gradienten wurde die leichtere Urografinlösung in 0,5-m Sorbit hergestellt

Gemessene Enzymaktivitäten:

A: Alkalische Protease	in μg Tyrosin/60 Min.
B: Saure Protease	in μg Tyrosin/60 Min.
C: Saure RNase	in μg RNS/60 Min.
D: Saure Phosphatase	in μMol PO_4 /20 Min.
E: Succinatdehydrogenase	in ΔE_{600} /8 Min.

Oben rechts: Ansicht eines Dichtegradienten mit den von Auge sichtbaren Banden

Mitochondrien kann wieder mit einer unspezifischen Verklebung der betreffenden Enzyme mit Mitochondrienmembranen erklärt werden.

In analoger Weise sollten nun die hydrolytischen Enzyme in Lamellen von Fruchtkörpern lokalisiert werden, um dann den Ort der Entstehung der Chitinase studieren zu können. Zunächst wurden wiederum Mitochondriensedimente aus Fruchtkörpern bei beginnender Sporenschwärzung untersucht. Um die Enzymbestimmungen zu vereinfachen, wurde bei den Dichtegradienten das vielfach störende Urografin durch Ficoll ersetzt. Aus der Verteilung der Aktivitäten der Protease und der Phosphatase im Gradienten (Abb. 5a) geht hervor, dass diese Hydrolasen wiederum zum grössten Teil in der leichten Bande unterhalb der Interphase enthalten sind; zudem treten sie in einem kleineren Maximum in einer Bande oberhalb der Mitochondrien auf.

Zur Lokalisierung der Chitinase wurde Lamellengewebe verwendet, das kurz vor dem Autolysebeginn gesammelt worden war. Nach Abbildung 3 hat in diesem Zeitpunkt die Chitinase erst etwa ein Drittel ihrer endgültigen Aktivität erreicht. Wie aus der Abbildung 5b ersichtlich ist, konnte diese Hydrolase (Methode der N-Acetylglucosamin-Bestimmung) im Dichtegradienten ebenfalls in der spezifisch leichtesten

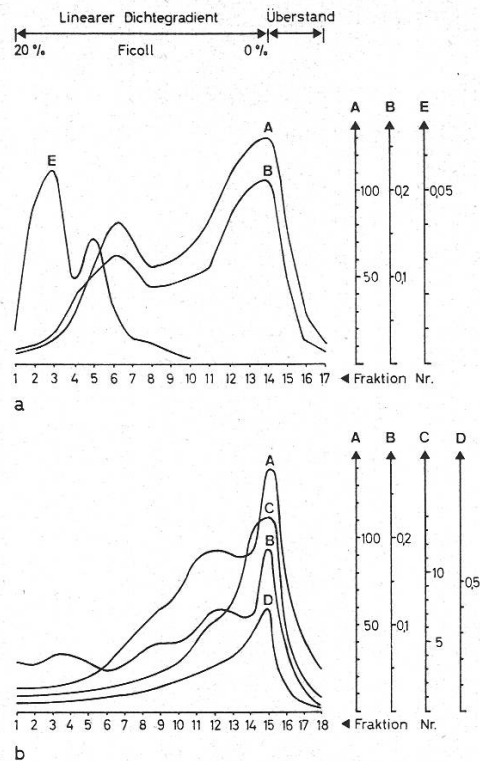


Abbildung 5

Auftrennung einer Mitochondrienfraktion aus Lamellen mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die Lamellen wurden in a vor der Sporenreife, in b kurz vor dem Sporenauswurf gesammelt. Zum osmotischen Schutz der Zellpartikeln wurde die leichte Ficoll-Lösung in 0,5-m Sorbit, die schwere Ficoll-Lösung in 0,2-m Sorbit hergestellt

Gemessene Enzymaktivitäten:

A: Alkalische Protease	in μg Tyrosin/60 Min.
B: Saure Phosphatase	in $\mu\text{Mol PO}_4$ /10 Min.
C: Chitinase	in μg N-Acetylglucosamin/20 Min.
D: β -Glucosidase	in μMol Glucose/20 Min.
E: Zytochromoxydase	in ΔE_{550} /Min.

Bande lokalisiert werden. Die schwerere Bande mit dem zweiten Hydrolasemaximum ist nicht mehr so deutlich und hat sich gegen die erste Bande verschoben.

3.3.3 Morphologische Identifikation der hydrolasehaltigen Fraktionen

Die phasenkontrastmikroskopische Untersuchung ergab, dass die leichteren hydrolaseführenden Banden aller oben beschriebenen Gradienten hauptsächlich aus Bläschen bestanden, deren Grösse stark variierte ($0,5\text{--}4\ \mu$; vgl. Tafel IIc). Die $4\ \mu$ grossen Bläschen entsprechen ihrer Grösse nach den in situ vorhandenen Vakuolen, und zwar sowohl denjenigen der Hymenialzellen (Tafel Ic) wie denen in vegetativen Hyphen (Tafel IIb).

Zur genaueren Identifizierung wurden Gefrierätzungen isolierter Vakuolen hergestellt. Um grössere Mengen von Vakuolen zu erhalten, wurde ein zellfreier Extrakt mittels eines Stufengradienten aufgetrennt. Dieser bestand aus einer schweren Lösung von 4prozentigem Ficoll und aus einer leichten Lösung von 0,5-m Sorbit. Die Mitochondrien wanderten in diesem System in das Sediment. Die Vakuolen, die sich auf der Ficollschicht auffangen liessen, wurden beim Durchwandern der Sorbitschicht

einmal gereinigt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen, dass die Vakuolenmembranen in situ (Tafel II d) und diejenige isolierter Vesikel (Tafel II e) eine ähnliche Struktur aufweisen, insbesondere von gleich grossen Partikeln besetzt sind. Die vielen kleinen Vesikel, die immer in solchen Isolaten anwesend sind, stellen vermutlich kleinere Vakuolen dar.

In der schwereren hydrolasehaltigen Bande, die in ausgeprägter Form nur in den mit Lamellenextrakt befrachteten Gradienten auftraten, konnten mittels der Phasenkontrastmikroskopie unter anderem kleine, weniger als 1μ messende Bläschen beobachtet werden. Diese entsprechen möglicherweise einer jüngeren Entwicklungsstufe der Vakuolen.

Aus den morphologischen Untersuchungen geht hervor, dass die hydrolaseführenden Zellstrukturen mit den Vakuolen identisch sind. Letztere entsprechen somit der Definition des Lysosoms.

3.3.4 Latenz von Phosphatase und Protease in den hydrolaseführenden Zellstrukturen

Zum eindeutigen Beweis, dass die Hydrolasen sich im Inneren der Vakuolen aufhalten, wurden die latenten Aktivitäten der sauren Phosphatase und der alkalischen Protease bestimmt (Tab. 2). Unter der latenten Aktivität eines Enzyms versteht man die in Vesikeln eingeschlossene und daher nicht direkt messbare Aktivität. Bei ihrer Bestimmung musste berücksichtigt werden, dass in allen Vakuolensuspensionen ein gewisser Betrag an hydrolytischer Aktivität in freier Form vorliegt. Diese freie Aktivität stammt ebenfalls aus Vakuolen, die bei der Homogenisation und durch andere Behandlungen, wie zum Beispiel Zentrifugation, zerstört worden waren. Zur Bestimmung der freien Aktivitäten wurden die Vakuolenfraktionen in einem isotonischen Medium (0,5-m Sorbit) inkubiert. Vorversuche hatten gezeigt, dass die unversehrten Vakuolen mindestens innerhalb 90 Minuten intakt und die latenten Aktivitäten somit eingeschlossen bleiben. In einem zweiten Ansatz wurden die Membranen identischer Vakuolensuspensionen mittels Ultraschalls zerstört, so dass die latente Aktivität freigesetzt wurde. Dies erlaubte die Bestimmung der totalen Aktivität. Die Differenz zwischen totaler und freier Aktivität stellt die latente Aktivität dar.

Tabelle 2

	Phosphatase			Protease			
	freie Aktivität	totale Aktivität	latente Aktivität %	freie Aktivität	totale Aktivität	latente Aktivität	%
Zellfreier Extrakt	0,254	0,266	0,012 4,5	111,3	114,0	2,7	2,4
Vakuolen aus Stufengradient	0,037	0,084	0,047 56	18,3	35,1	16,8	48
Gereinigte Vakuolen	0,0074	0,023	0,015 68				

Latenz von saurer Phosphatase und alkalischer Protease. Die freien Aktivitäten wurden in einem isotonischen Medium (0,5-m Sorbit) gemessen. Für die Bestimmung der totalen Aktivitäten wurden die Vakuolen mittels Ultraschalls zerstört. Die Differenz zwischen totaler und freier Aktivität ergibt die latente Aktivität. Die Isolation der Vakuolen erfolgte mit Hilfe eines Stufengradienten. Eine gereinigte Vakuolenfraktion wurde erhalten durch Flotation in Gegenwart einer 8prozentigen in eine darübergeschichtete 6prozentige Ficoll-Lösung. Aktivitätseinheiten: für die Phosphatase: $\mu\text{Mol PO}_4/20 \text{ Min.}$; für die Protease: $\mu\text{g Tyrosin}/60 \text{ Min.}$

Auf diese Weise wurden die latenten Aktivitäten der Phosphatase und der Protease im zellfreien Extrakt von Mycel und in zwei verschiedenen Vakuolenfraktionen bestimmt. Die Vakuolen wurden auf dieselbe Weise wie bei der Isolierung für die Gefrierätzung aus zellfreiem Extrakt von Mycel gewonnen. Durch Flotation in Gegenwart von 8prozentigem Ficoll in eine darübergeschichtete 6prozentige Ficoll-Lösung wurden sie einmal gereinigt. Aus der Tabelle 2 geht hervor, dass bereits im zellfreien Extrakt kleine Aktivitäten der untersuchten Enzyme in latenter Form feststellbar sind. Die Latenz ist wesentlich grösser in angereicherten Vakuolen und kann noch mehr erhöht werden durch einen weiteren Reinigungsschritt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die beiden getesteten Enzyme in den Vakuolen eingeschlossen sind. Es darf als sehr wahrscheinlich angesehen werden, dass die anderen hydrolytischen Enzyme sich analog verhalten.

Aus den Ergebnissen der Dichtgradientenzentrifugation geht hervor, dass der sedimentierbare Anteil der geprüften Hydrolasen sich zum Teil in den Vakuolen lokalisieren lässt. Der grosse, je nach Art und Alter des Gewebes 70–90% betragende Anteil an löslicher Aktivität muss einer Zellstruktur zugeordnet werden, die bei der Homogenisation zerstört wird. Dies trifft mit grösster Wahrscheinlichkeit für die Vakuole zu, die in älteren Hyphen das ganze Lumen der Zelle ausfüllt. In Übereinstimmung mit dieser Auffassung steht die Feststellung, dass die Sedimentierbarkeit der Proteaseaktivität mit zunehmendem Alter des Mycels, also mit dessen zunehmender Vakuolisierung, abnimmt. Bei der Homogenisation bleiben offenbar nur die relativ kleinen Vakuolen junger Hyphen (Tafel II b) und der Basidien und Paraphysen intakt. Es kann daher der indirekte Schluss gezogen werden, dass der hohe Anteil an löslicher Aktivität ebenfalls aus Vakuolen stammt.

3.4 Zur Funktion der lysosomalen Enzyme

3.4.1 *Intrazelluläre Verdauung*

Nachdem festgestellt worden war, dass die untersuchten Hydrolasen mit Ausnahme der Chitinase in allen Geweben und Stadien des Fruchtkörpers sowie im vegetativen Mycel enthalten sind, stellte sich die Frage nach deren Funktion. Hinweise dafür wurden bei der Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Protease erhalten: Vakuolenfraktionen, die durch Flotation gereinigt worden waren, enthielten immer relativ grosse Mengen Protein, so dass die auf das Protein bezogene spezifische Aktivität der Protease nie mehr als das Zweifache von derjenigen im zellfreien Extrakt erreichte. Da zu erwarten wäre, dass die Protease und alle anderen Hydrolasen in einer Vakuolenfraktion gegenüber einem zellfreien Extrakt stark angereichert sind, muss dieser Befund dahin interpretiert werden, dass die Vakuolen ebenfalls grössere Mengen Protein enthalten. Dieses intravakuoläre Protein steht sehr wahrscheinlich in Zusammenhang mit den Einschlüssen, welche sowohl im Lichtmikroskop (Tafel II c) wie im Elektronenmikroskop (Tafel III a–c) oft feststellbar sind. Ähnliche Vakuoleneinschlüsse sind andernorts bereits beschrieben worden (Thomas und Isaac, 1967; Matile und Moor, 1968; Thornton, 1968). Sie sind membranumgrenzt und enthalten wahrscheinlich zytoplasmatisches Material, welches durch eine Einstülpung der Vakuolenmembran in das Innere der Vakuole gelangt ist (Tafel III a–c). Die Membran der intravakuolären Vesikel entspricht daher einer umgestülpten Vakuolen-

membran, wie dies für analoge Gebilde in den Vakuolen meristematischer Wurzelzellen von Mais nachgewiesen worden ist (Matile und Moor, 1968). Die Funktion der hydrolytischen Enzyme besteht nun offenbar darin, das in die Vakuolen eingeschleuste Material abzubauen. Soche Vakuolen nennt man autophagisch.

3.4.2 Autolyse

Eine spezielle Funktion der hydrolytischen Enzyme ergibt sich bei der Autolyse des Fruchtkörpers. Dabei spielt die Chitinase, die offenbar eigens zu diesem Zwecke synthetisiert wird, eine dominierende Rolle. Sie erfüllt ihre Funktion allerdings erst, wenn das Lysosom zerfallen ist.

3.4.3 Extrazelluläre Verdauung

Auf der Suche nach der Bedeutung der Protease von *Coprinus lagopus* wurde auch die extrazelluläre Verdauung von Protein in Betracht gezogen, wie sie von anderen Pilzen, wie zum Beispiel *Neurospora crassa* (Matile, 1965) oder *Penicillium cyanofulvum* (Ankel und Martin, 1964), bekannt ist.

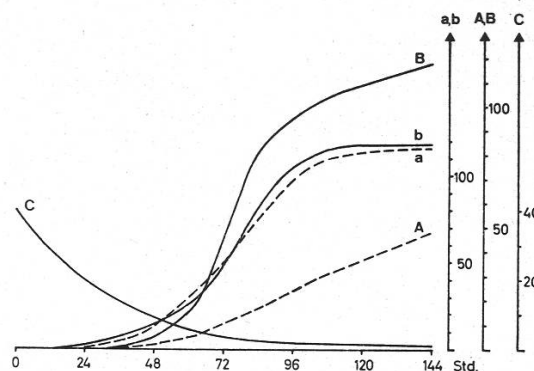


Abbildung 6

Wachstum von submers kultiviertem Mycel. Ausscheidung von Protease in Gegenwart von Protein (Casein) oder Ammoniumnitrat im Kulturmedium

- a: Trockensubstanz des Mycels im Ammoniumnitratmedium (in mg)
- b: Trockensubstanz des Mycels im Caseinmedium (in mg)
- A: Extrazelluläre alkalische Protease im Ammoniumnitratmedium
- B: Extrazelluläre alkalische Protease im Caseinmedium
- Aktivitätseinheit: μg Tyrosin/60 Min. pro 0,1 ml Medium
- C: Casein (in 10prozentiger Trichloressigsäure fällbar) in μg pro 0,1 ml Medium

Vegetatives Mycel wurde in Schüttelkulturen gezogen, wobei einerseits Casein und andererseits zum Vergleich Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle diente. In der Abbildung 6 ist das Ergebnis zusammengefasst. Es wird in beiden Medien in gleichen Zeitabschnitten annähernd gleich viel Trockensubstanz produziert. Hingegen steigt die Aktivität der extrazellulären alkalischen Protease im Caseinmedium viel rascher an, was auf eine aktive Ausscheidung der Protease schließen lässt. Die allmähliche

Zunahme der Proteaseaktivität im Ammoniumnitratmedium kann auf den Tod älterer Zellen zurückgeführt werden. Hierbei gelangen intrazelluläre Proteasen mit dem Zellsaft passiv in das Medium. Die rasche Proteinabnahme im Medium zu Beginn des Versuches zeigt, dass schon geringe, noch kaum messbare Proteaseaktivitäten hinreichen, um Casein in grösseren Mengen abzubauen.

Ein Kulturmedium, das als Stickstoffquelle ausschliesslich Protein enthält, ist also fähig, eine vermehrte Ausscheidung von Protease aus Mycel zu induzieren. Ob diese Enzymaktivität aus den Vakuolen oder aus besonderen Zellstrukturen stammt, ist nicht abgeklärt worden.

4. Diskussion

Das 1959 von de Duve aufgrund von Untersuchungen an Rattenleber aufgestellte Lysosomenkonzept ist inzwischen vielfach auch in pflanzlichen Objekten bestätigt gefunden worden und scheint somit für das Leben universelle Bedeutung zu haben. Eine Reihe hydrolytischer Enzyme, wie saure Protease, RNase, Phosphatase und Esterase und andere, sind in den Vakuolen von Mais (Matile, 1966) und Hefe (Matile und Wiemken, 1967) und ferner in vakuolenartigen Strukturen im Milchsaft von *Hevea brasiliensis* (Pujarnisclé, 1968) nachgewiesen worden. Diese Organellen erfüllen also die Definition des Lysosoms. Die bei *Coprinus lagopus* ebenfalls in den Vakuolen lokalisierten Hydrolasen, wie Protease, RNase, Chitinase, Phosphatase und β -Glucosidase, beweisen das Vorhandensein von lysosomalen Organellen nun auch für einen Vertreter aus einer der höchsten Entwicklungsstufen im Pilzreich.

Es soll nun zunächst der Zusammenhang des Lysosoms mit der Autolyse von *Coprinus* und anschliessend die Funktion des Lysosoms vor der Autolyse diskutiert werden.

4.1 Funktion der Vakuolen und deren Hydrolasen bei der Autolyse

Das Erscheinen der Chitinase in der Vakuole kurz vor der Autolyse macht es offensichtlich, dass dieses Organell unmittelbar beteiligt sein muss an dem Prozess der Hutauflösung. Von besonderer Bedeutung ist dabei die vollständige Vakuolisierung aller von der Autolyse betroffenen Zellen.

In den Zellen des Fruchtkörperstieles und des vegetativen Mycels findet ebenfalls eine Vakuolisierung statt. Diese Zellen werden offenbar nicht aufgelöst, weil sie keine zellwandabbauenden Enzyme enthalten. Die Vakuolisierung älterer Zellen scheint bei den Pilzen allgemein verbreitet zu sein. Als Beispiel sei *Schizophyllum commune*, ein nicht autolysierender Basidiomycet, erwähnt, in dessen Basidien nach abgeschlossener Sporenbildung die Vakuolisierung so weit fortgeschritten ist, dass im Elektronenmikroskop die Tonoplastenmembran nur schwerlich vom Plasmalemma getrennt sichtbar gemacht werden kann (Wells, 1965). Vermutlich fehlen auch hier entsprechende zellwandauflösende Enzyme. Die Vakuolisierung ist notwendig, aber nicht hinreichend für das Phänomen der Autolyse.

Die Zellauflösung bei *Coprinus* scheint ihren Anfang folgendermassen zu nehmen: In den praktisch plasmafreien Zellen der Lamellen ist die metabolische Aktivität, namentlich die Atmung, eingestellt worden, was als Bedrohung der Integrität noch verbliebener Membranen angesehen werden kann. Die Aufrechterhaltung einer geordneten Struktur bedarf ja eines dauernden Energieaufwandes. Die Vakuolen enthalten

bereits die Chitinase, und die Protease hat soeben ihre höchste Aktivität erreicht. Die energetisch ungünstigen Verhältnisse lassen es als wahrscheinlich erscheinen, dass die doppelte Membran, bestehend aus Tonoplast und Plasmalemma, zerfällt. Als Folge hiervon hat die Chitinase freien Zutritt zur Zellwand und beginnt diese von innen her abzubauen. Der Zellsaft der zuerst autolysierten Zellen wird durch Adhäsion in die Interzellularräume des Tramas gesogen, wo die Chitinase von aussen her die Zellen angreift. In der Tat wird das Trama schon relativ früh aufgelöst, was das schirmartige Auffalten des Hutes ermöglicht, wobei jede Lamelle von oben her in der Mitte des Tramas gespalten wird. Die Zellen des weiter oben liegenden Hymeniums werden jedoch noch nicht aufgelöst, obwohl sie von Zellsaft umgeben sind.

Möglicherweise wird die oberflächliche Zellwandstruktur der Hymenialzellen vor der Autolyse derart verändert, dass sie für die Chitinase unangreifbar wird. Die Zellwandauflösung würde infolgedessen hauptsächlich vom Zellinnern her beginnen und somit die zeitlich und örtlich so exakte Steuerung des Autolyseprozesses (evtl. auf hormonaler Basis) ermöglichen. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Feststellung, dass sich aus Lamellen vom Zeitpunkt der beginnenden Sporenbildung an immer weniger gut nackte Protoplasten gewinnen lassen.

Wenn man für die Definition der Autolyse die Notwendigkeit des Zelltodes postuliert, so hat der Begriff Autolyse für die geschilderten Verhältnisse bei *Coprinus* keine Berechtigung. Da die Zellen der Lamellen nach der Sporenreife plasmafrei und die Basidien sogar kernlos geworden sind, kann man eigentlich nicht mehr von lebenden Zellen sprechen. Das lebende Plasma hat sich in die Sporen zurückgezogen (richtiger: ist von der Vakuole in die Spore gestossen worden) und hinterlässt nur das Zellwandgehäuse mit der die ganze Zelle ausfüllenden Vakuole. Es gibt keinen Zelltod, und der Begriff Autolyse passt daher nicht für die geschilderte Zellwandauflösung. Diese muss eher unter dem Gesichtspunkt einer extrazellulären Verdauung verstanden werden.

Die funktionelle Bedeutung der Selbstverdauung für die Sporenverbreitung wurde bereits von Buller (1924) ausführlich beschrieben: Sie erleichtert den freien Fall der Sporen und deren Verbreitung durch Tiere. Die enge Fallstrecke zwischen zwei benachbarten Lamellen wird durch das dauernde Auflösen der Lamellen von unten her auf ein Minimum beschränkt und infolgedessen die Gefahr des Haftenbleibens der Sporen verkleinert.

4.2 Funktion der Vakuolen und deren Hydrolasen vor der Autolyse

Die primäre Funktion der Lysosomen und insbesondere auch der pflanzlichen Vakuolen ist die intrazelluläre Verdauung. Als morphologischer Anhaltspunkt hierfür gelten Bilder von Vakuolen mit eingeschleusten, zum Teil verdauten Plasmabestandteilen, wie zum Beispiel Mitochondrien (Poux, 1963; Brandes, 1965), die ihrer Funktion gemäss als autophagische Vakuolen bezeichnet werden. Solche intravakuolären Vesikel sind neulich in Sporangienträgern von *Phycomyces* (Thornton, 1968) und anderen Pilzen (Bracker, 1966; Thomas und Isaac, 1967) sowie in Maiswurzeln (Matile und Moor, 1968) beobachtet worden.

Die physiologische Seite des Beweises wurde neben der morphologischen Seite für pflanzliches Material von Matile et al. (1965) erstmals geführt: Diese Autoren konnten zeigen, dass die autophagischen Vakuolen mit gewissen hydrolaseführenden

Partikeln identisch sind. Diese Befunde reihen solche Organellen unter die Definition eines sekundären Lysosoms von de Duve und Wattiaux (1966).

Die Ergebnisse der Untersuchungen an *Coprinus* lassen die Vermutung aufkommen, dass die als Lysosomen charakterisierten Vakuolen hauptsächlich *sekundäre* Lysosomen sind. Die weite Verbreitung hydrolasehaltiger Vakuolen in verschiedenen Geweben, wie vegetativem Mycel und Fruchtkörperlamellen, die häufig auftretenden intravakuolären Vesikel, welche wahrscheinlich aus Invaginationen des Tonoplasten entstehen, und schliesslich der relativ hohe Proteinanteil in gereinigten Vakuolenfraktionen sind Anhaltspunkte dafür.

Offenbar sind die intravakuolären Vesikel und deren zytoplasmatischer Inhalt im Begriff, durch die reichlich vorhandenen Hydrolasen verdaut zu werden. Dieser Abbau zytoplasmatischen Materials stellt als Katabolismus die eine Seite des im Pflanzenreich weit verbreiteten Umtriebes dar, wie er zum Beispiel für Proteine in Karottenzellen gezeigt werden konnte (Bidwell et al., 1964).

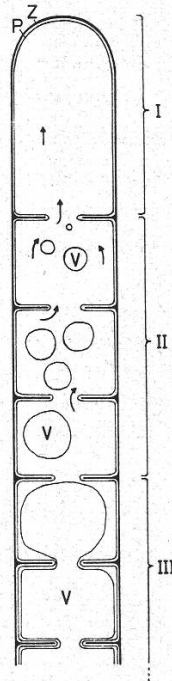


Abbildung 7

Zusammenhang von Anabolismus, Katabolismus und Plasmatransport in einer (schematisch stark verkürzten) Hyphe (vgl. Text)

I: Zone des aktiven Wachstums, der Zellwandbildung. Anabolismus herrscht vor

II: Zone mit $0,2-5\mu$ ($\sim 10\mu$) grossen Vakuolen. Ort der intrazellulären Verdauung: Einschleusen von Plasmamaterial in Verdauungsvakuolen, Entlassen der niedermolekularen Abbauprodukte. Katabolismus überwiegt

III: Zone mit abgeschlossener Vakuolisierung. Die sich vergrößernde Vakuole drängt das apikale Plasma nach vorn. Stoffwechsel stillgelegt

Pfeile deuten die Plasmaströmung an, welche die Produkte des Katabolismus aus der Zone II in die Zone I transportiert

Z: Zellwand, P: Plasmalemma, V: Vakuole

Die räumliche Trennung von Anabolismus und Katabolismus scheint bei Pilzmycelien ausgeprägt zu sein. In der Abbildung 7 ist versucht worden, die teils hypothetischen Zusammenhänge zwischen Katabolismus, Anabolismus und Stoff- und Plasmatransport in einer Hyphe darzustellen: Aufbauende Prozesse (z. B. Zellwandbildung) spielen sich vor allem in der keine Vakuolen enthaltenden Hyphenspitze ab (Zone I). In der Zone II (über 100 μ von der Hyphenspitze entfernt) befinden sich Vakuolen von sehr unterschiedlicher Grösse. Die Heterogenität der Vakuolen bezüglich ihrer Dichte und Grösse, wie sie insbesondere bei der Dichtegradientenzentrifugation zum Ausdruck kommt, gibt eine Möglichkeit, die Entwicklung des Vakuoms zu verstehen: Die kleinen Vakuolen (Durchmesser kleiner als 0,5 μ) im apikalen Teil der Zone II verschmelzen zu immer grösseren Vakuolen, bis schliesslich eine Zentralvakuole die ganze Zelle ausfüllt. Die Anwesenheit kleinerer bis mittelgrosser Vakuolen in der Zone II deutet auf den hier stattfindenden Katabolismus. Wahrscheinlich wird in dieser Zone altes Zytoplasma dauernd abgebaut. Die niedermolekularen Endprodukte werden aus der Vakuole in das Zytoplasma entlassen und durch die Plasmaströmung wieder den in aktivem Wachstum befindlichen Hyphenspitzen zugeleitet. Diesem räumlichen Nebeneinander überlagert sich ein zeitliches Nacheinander: Jede Hyphe durchläuft die verschiedenen Zustände vom plasmareichen bis zum vollständig vakuolisierten Stadium (Zone III). Der «Plasmapfropfen» in der Hyphenspitze wandert durch den von ihm dauernd neu gebildeten Zellwandschlauch immer weiter und hinterlässt schliesslich eine nur mehr von einer Vakuole vollständig ausgefüllte Zellwandhülle. Die «Massenwanderung» des Zytoplasmas kommt durch den Druck der sich vergrössernden rückwärtigen Vakuole zustande (Buller, 1933; Madelin, 1960). Diese Funktion der Vakuole wird besonders deutlich bei der Sporenbildung, wo die Vergrösserung der Basidienvakuole Hand in Hand mit dem Sporenwachstum geht.

Die Massenwanderung des Plasmas ist verantwortlich für den Stofftransport über grössere Strecken in Mycelkomplexen. Nach Untersuchungen von Schantz und Piemeisel (1917) und von Schuette (1956) findet der Stofftransport nur in der Richtung des Hyphenwachstums statt. Die Plasmaströmung, die in einer Hyphe vor- und rückwärts gerichtet ist, ist für diese Art Stofftransport von untergeordneter Bedeutung, da sie auf eine relativ kurze Zone der Hyphe beschränkt ist.

Die Vakuole durchläuft also einen Funktionswandel: Anfänglich steht sie im Dienste des Umtriebes; am Ende ihrer Entwicklung bewirkt sie durch ihren Turgor den Plasmatransport. Der notwendige Turgor der Vakuole kommt möglicherweise durch eine Anreicherung der bei der intravakuolären Verdauung anfallenden Mikromoleküle zustande. Jedenfalls enthalten die grossen Zentralvakuolen, die bei der Homogenisation grösstenteils zerstört werden, ebenfalls Vesikel mit zytoplasmatischem Inhalt (Tafel IIIa). Die hydrolytischen Enzymaktivitäten dieser Vakuolen sind nach der Homogenisation in der löslichen Fraktion zu finden. Dies erklärt, weshalb bei stark vakuolisierten Geweben der Betrag an löslicher hydrolytischer Aktivität relativ hoch ist.

Eine weitere Funktion der hydrolytischen Enzyme kommt in der extrazellulären Verdauung zum Ausdruck, wie es für die Protease gezeigt werden konnte. Ob diese durch bestimmte Partikel analog denen bei *Neurospora crassa* (Matile et al., 1965) aktiv ausgeschieden wird, kann nicht gesagt werden, mindestens sind aus den Ergebnissen der Dichtegradientenzentrifugation keine Anhaltspunkte dafür gegeben. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die induzierte Protease auf dem Weg über die Vakuole

beim Alterungsprozess einer Hyphe passiv in das Medium gelangte. Diese Art der Ausscheidung würde völlig derjenigen der Chitinase entsprechen.

Die Funktion der Hydrolasen bei *Coprinus* ist somit eine dreifache: Die wichtigste dürfte diejenige der intrazellulären Verdauung sein. Die extrazelluläre Verdauung ermöglicht eine bessere Anpassungsfähigkeit an Nährsubstrate. Schliesslich kommt in der Autolyse eine spezialisierte Funktion zum Ausdruck, indem zu diesem Zweck eigens ein zellwandabbauendes Enzym, die Chitinase, synthetisiert wird.

Zusammenfassung

Das Phänomen der Hutauflösung bei *Coprinus lagopus* Fr. konnte aufgrund lichtmikroskopischer Beobachtungen auf eine Auflösung der Zellwände der Lamellen zurückgeführt werden.

Die Dünnschichtchromatographie von Zellwandhydrolysaten ergab, dass die Zellwände aller Zellen des vegetativen Mycels und des Fruchtkörpers fast ausschliesslich Chitin enthalten.

An der Auflösung der Lamellenzellwände scheint hauptsächlich eine Chitinase beteiligt zu sein. Ihre Aktivität wird erst 2 Stunden vor der Hutauflösung messbar und steigt dann rasch an, während die Zellatmung bereits abnimmt. Die Chitinase konnte in der Vakuole lokalisiert werden. Sie fehlt in vegetativem Mycel und in Fruchtkörpern vor der Sporenreife. Die Auflösung der Lamellen nimmt wahrscheinlich durch ein Auflösen der Vakuolenmembran ihren Anfang.

In den Vakuolen von vegetativem Mycel und von Lamellen konnten durch Dichtegradientenzentrifugation die folgenden Hydrolasen nachgewiesen werden: saure und alkalische Protease, saure RNase, saure Phosphatase und β -Glucosidase. Ihre Funktion bei der intrazellulären Verdauung wird diskutiert.

In Submerskulturen von vegetativem Mycel wird Casein extrazellulär durch eine ausgeschiedene Protease verdaut.

Summary

In the basidiomycete *Coprinus lagopus* Fr. the phenomenon of hat dissolution can be attributed to the breakdown of the gill cell walls.

As shown by thin layer chromatography of hydrolysates the cell walls of vegetative mycelium and fruiting bodies contain practically only chitin.

Chitinase activity, responsible for breaking down gill cell walls, appears in homogenates of gills two hours before, and increases rapidly towards the beginning of autolysis. At the same time the activities of respiratory enzymes decrease.

Chitinase is localized in vacuoles isolated from gills of the mature fruiting body. The mechanism of release of chitinase from vacuoles into the cell walls is discussed. Chitinase is absent from the vegetative mycelium and the premature fruiting body.

Vacuoles isolated from vegetative mycelium and from gills contain the following hydrolases: acid and alkaline protease, acid RNase, phosphatase and β -glucosidase. The metabolic function of these organelles and enzymes in the process of intracellular digestion is discussed.

Vegetative mycelium is able to utilise extracellular protein (casein) by means of secreted proteases.

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Allgemeine Botanik der ETH unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ph. Matile. Ihm danke ich herzlich für seine wertvollen Anregungen und Ratschläge. Ferner bin ich Herrn Prof. Dr. H. Moor für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu Dank verpflichtet.

Literatur

- Ankel H. und S.M. Martin. 1964. Hydrolysis of polyaminoacids by an extracellular protease from *Penicillium cyano-fulvum*. *Biochem. J.* **91**, 341–436.
- Bidwell R.G.S., R.A. Barr und F.C. Steward. 1964. Protein synthesis and turnover in cultured plant tissue: Sources of carbon for synthesis and the fate of the protein breakdown products. *Nature (Lond.)* **203**, 367–373.
- Biochimica Boehringer. 1963. Bestimmung der Aktivitäten der Aldolase. *Biochim. Boehringer*, Mannheim.
- Borriss, H. 1934. Beiträge zur Wachstums- und Entwicklungsphysiologie der Fruchtkörper von *Coprinus lagopus*. *Planta* **22**, 28–69.
- Bracker C.E. und C.M. Williams. 1966. Comparative ultrastructure of developing sporangia and asci in fungi. *Proc. 6th Intern. Congr. Electron Microscopy*, Kyoto. S. 307.
- Brandes D., D. E. Buetow, F.J. Bertini und B. Malkoff. 1965. Role of lysosomes in cellular lytic processes. I. Effect of carbon starvation in *Euglena gracilis*. *Exp. Mol. Pathol.* **3**, 583–592.
- Buller A.H.R. 1924. The production and liberation of spores in hymenomycetes. In: *Researches on Fungi*, Vol. III, S. 119 ff. Longmans, London (Neuaufgabe 1958).
- 1933. The translocation of protoplasm through the septate mycelium of certain pyrenomycetes, discomycetes and hymenomycetes. In: *Researches on Fungi*, Vol. V. S. 75–167. Longmans, London.
- Crook E.M. und L.R. Johnston. 1962. The qualitative analysis of the cell walls of selected species of fungi. *Biochem. J.* **83**, 325–331.
- Duve Ch. de 1960. Lysosomes, a new group of subcellular particles. In: *Subcellular particles*. Ronald Press, New York.
- und R. Wattiaux. 1966. Functions of Lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.* **28**, 435–492.
- Ells H.A. 1959. A colorimetric method for the assay of soluble succinicdehydrogenase and pyridine-nucleotide-linked dehydrogenases. *Arch. Biochem.* **85**, 561.
- Frey R. 1950. Chitin und Zellulose in Pilzzellwänden. *Diss. ETH. Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **60**, 199–230.
- Frey-Wyssling A. 1943. Die Blattfermentation als Autolyse. *Vjschr. Naturforsch. Ges. Zürich* **88**, 176.
- Greenberg D.M. 1961. Plant proteolytic enzymes. In: *Methods in enzymology*, Vol. II, S. 54–64. Acad. Press, New York.
- Hackman R.H. 1964. New substrates for use with chitinases. *Analytical Biochem.* **8**, 325.
- Jeuniaux Ch. 1966. Chitinases. In: *Methods in enzymology*, Vol. VIII, S. 644. Acad. Press, New York.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Madelin M.F. 1960. Visible changes in the vegetative mycelium of *Coprinus lagopus* Fr. at the time of fruiting. *Transact. Brit. Mycol. Soc.* **43**, I, 105–110.
- Matile Ph. 1965. Intrazelluläre Lokalisation proteolytischer Enzyme von *Neurospora crassa*. I. Mitteilung: Funktion und subzelluläre Verteilung proteolytischer Enzyme. *Z. Zellforsch.* **65**, 884–896.
- 1966. Enzyme der Vakuolen aus Wurzelzellen von Maiskeimlingen. Ein Beitrag zur funktionellen Bedeutung der Vakuole bei der intrazellulären Verdauung. *Z. Naturforsch.* **21b**, 871–878.
- M. Jost und H. Moor. 1965. Intrazelluläre Lokalisation proteolytischer Enzyme von *Neurospora crassa*. II. Mitteilung: Identifikation von proteasehaltigen Zellstrukturen. *Z. Zellforsch.* **68**, 205–216.

- J.P. Balz, E. Semadeni und M. Jost. 1965. Isolation of spherosomes with lysosome characteristics from seedlings. *Z. Naturforsch.* **20b**, 693–698.
- und A. Wiemken. 1967. The vacuole as the lysosome of the yeast cell. *Arch. f. Mikrobiol.* **56**, 148–155.
- und H. Moor. 1968. Vacuolation: Origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells. *Planta* **80**, 159–175.
- Moor, H. 1964. Die Gefrier-Fixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie. *Z. Zellforsch.* **62**, 546–580.
- Nelson N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem.* **153**, 375–380.
- Nielsen S.O. und A. Lehninger. 1955. Phosphorylation coupled to the oxidation of ferrocytochrome c. *J. biol. Chem.* **215**, 555.
- Poux N. 1963. Sur la présence d'enclaves cytoplasmiques en voie de dégénérescence dans les vacuoles des cellules végétales. *CR Acad. Sci. (Paris)* **257**, 736–738.
- Pujarniscle S. 1968. Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Mul-Arg. *Physiol. Veg.* **6**, 27–46.
- Reissig J.L., J.L. Strominger und L.F. Leloir. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. biol. Chem.* **217**, 959.
- Schantz H.L. und R.L. Piemeisel. 1917. Fungus fairy rings in eastern Colorado and their effect on vegetation. *J. Agr. Res.* **11**, 191.
- Schneider W. C. 1957. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In: *Methods in enzymology*, Vol. III, S. 680–684. Acad. Press, New York.
- Schuette K.H. 1956. Translocation in the fungi. *New Phytologist* **55**, 164–182.
- Stahl E. 1962. *Dünnschichtchromatographie*. S. 474. Springer, Berlin.
- Theorell T. und E. Stenhagen. 1938. Ein Universalpuffer für den pH-Bereich 2,0 bis 12,0. *Biochem. Z.* **299**, 416.
- Thomas R.L. und P.K. Isaac. 1967. An electronmicroscope study of intravacuolar bodies in the uredia of wheat stem rust and in hyphae of other fungi. *Canad. J. Bot.* **45**, 1473.
- Thornton R.M. 1968. The fine structure of *Phycomyces*. *J. Ultrastr. Res.* **21**, 269.
- Tracey M.V. 1955a. Chitin. In: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. II, S. 273. Springer, Berlin.
- 1955b. Chitinases in some Basidiomycetes. *Biochem. J.* **61**, 579.
- Wells K. 1965. Ultrastructural features of developing basidia and mature basidiospores of *Schizophyllum commune*. *Mycologia* **57**. 236–261.

Tafel I

a: Hymenium einer Lamelle aus dem Hut von *Coprinus lagopus*, während 30 Minuten mit Autolysensaft behandelt. Im oberen Teil des Hymeniums (gegen den Hutrand gerichtet) sind die Zellwände noch gut erkennbar, im unteren Teil (nahe dem Lamellenrand) sind sie aufgelöst (Phasenkontrastmikroskop, 335 x)

b: Unbehandelte Kontrolle (Phasenkontrastmikroskop, 335 x) B: Basidie, P: Paraphyse, Z: Zellwand, S: Spore

c: Quetschpräparat einer Lamelle (20 Std. vor Autolysebeginn): Undifferenzierte Hymenialzellen mit meistens zwei Vakuolen (Phasenkontrastmikroskop, 635 x)

d: Nackte Protoplasten aus Lamellengewebe von Abbildung c, hergestellt durch Inkubation mit Autolysensaft (Phasenkontrastmikroskop, 635 x)

Tafel II

a, b: Hyphen aus vegetativem Mycel, gewachsen auf einem mit Nähragar beschichteten Objektträger (Phasenkontrastmikroskop, 460 x)

a: Hyphenspitze, enthält noch keine Vakuolen

b: Stelle zirka 1 mm hinter der Hyphenspitze im Stadium fortgeschrittener Vakuolisierung. Die kleinen Vakuolen, V_k (Grösse des Hyphendurchmessers), bleiben bei der Homogenisation intakt, sie entsprechen in ihrer Grösse den isolierten Vakuolen (vgl. Abb. c). Die grösseren Vakuolen, V_g , werden bei der Homogenisation zum Teil zerstört

c: Vakuolen aus vegetativem Mycel, isoliert mittels Dichtegradientenzentrifugation (Phasenkontrastmikroskop, mit Urografin kontrastiert, 440 x). Oben: Grosse Vakuole mit Einschlüssen (Vergr. 1400 x)

d: Gefrierätzung einer Hyphe aus einer Schüttelkultur, mit Vakuole, V (Vergr. 36000 x)

e: Gefrierätzung einer Vakuolenfraktion entsprechend der Abbildung c. V: Vakuole (Vergr. 39000 x)

Tafel III

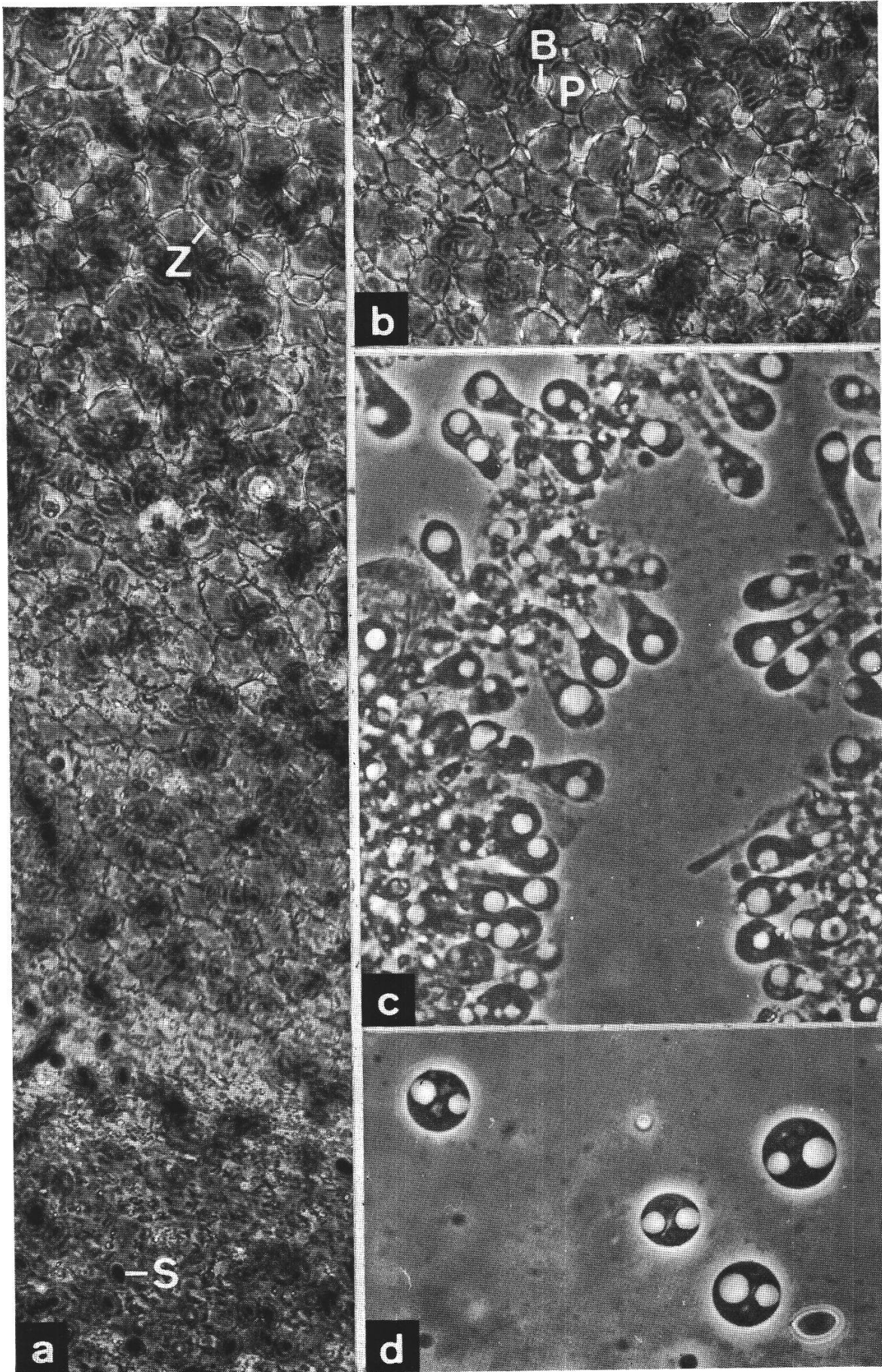
Gefrierätzungen von Lamellen eines Hutes im Stadium vor der Sporenbildung (12 Std. vor der Autolyse)

a: Sehr stark vakuolisierte Zellen. Die zentrale Vakuole (V) beansprucht beinahe das ganze Zellvolumen. Eine dünne Schicht von Zytoplasma (schwarzer Pfeil) ist zwischen Plasmalemma (PI) und Tonoplast (T) erkennbar. Die Vakuole enthält mehrere intravakuoläre Vesikel (IV), von denen eines sich gerade vom Tonoplasten abschnürt (weisser Pfeil) (Vergr. 4600 x)

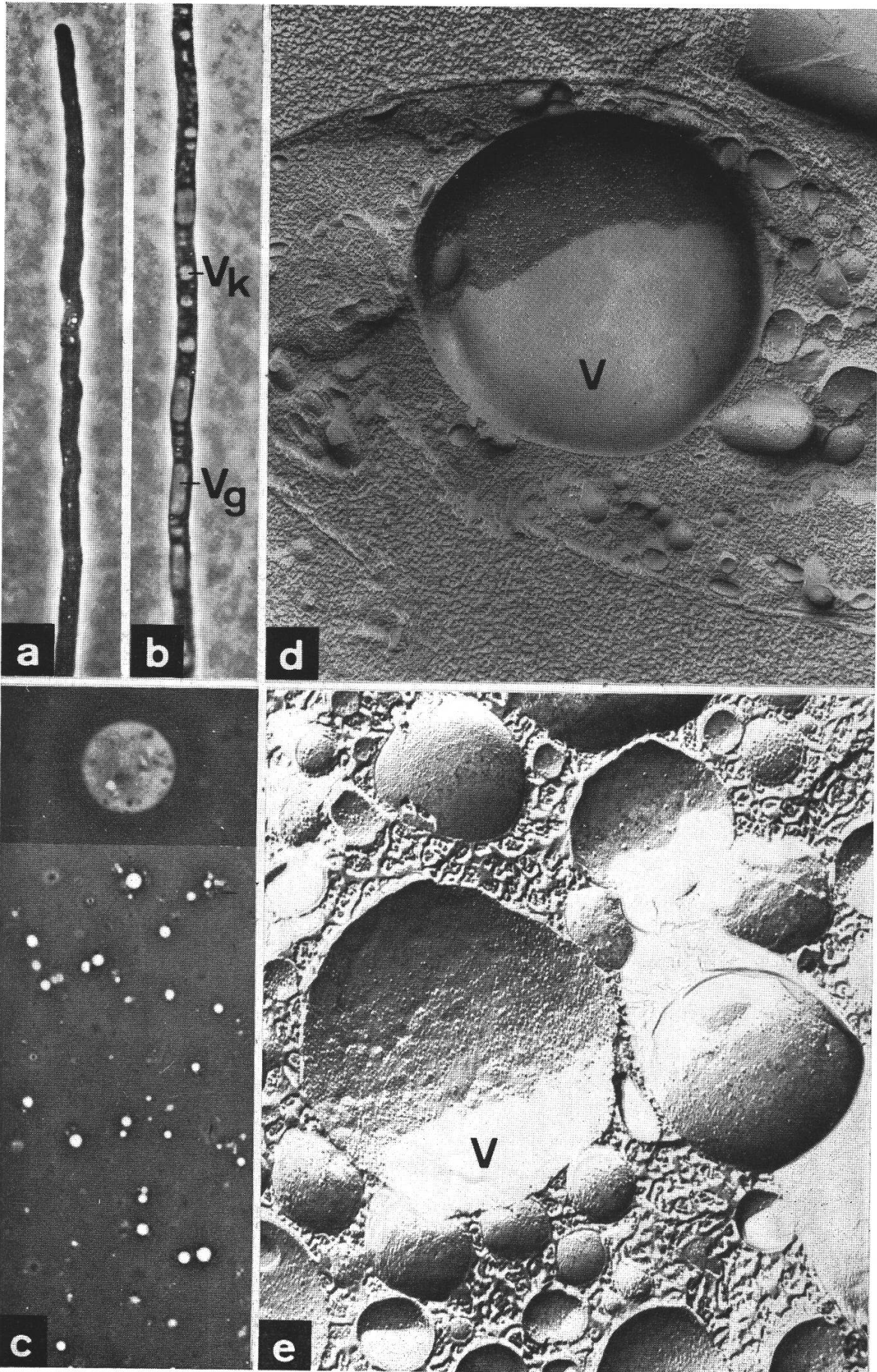
b: Vakuole mit vielen intravakuolären Vesikeln (IV) (Vergr. 20600 x)

c: Relativ häufig auftretende Invaginationen des Tonoplasten (Pfeile), aus welchen die intravakuolären Vesikel entstehen (Vergr. 27600 x)

Tafel I



Tafel II



Tafel III

