

# Neue Methoden der lichtmikroskopischen Zytochemie

Autor(en): **Leemann, Ursula**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Jahrbuch der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft. Wissenschaftlicher und administrativer Teil = Annuaire de la Société Helvétique des Sciences Naturelles. Partie scientifique et administrative**

Band (Jahr): **159 (1979)**

PDF erstellt am: **17.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-90766>

## **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.

# Neue Methoden der lichtmikroskopischen Zytochemie

Ursula Leemann

## Einleitung

Die Fluoreszenz spielt heute in der Zytochemie eine bedeutende Rolle; in den letzten Jahren hat eine ganze Reihe neuer Fluoreszenzreagenzien Verbreitung gefunden. Im folgenden seien deshalb einige Probleme und Anwendungsmöglichkeiten von Fluoreszenzreaktionen dargestellt.

Für quantitative Untersuchungen bietet die Fluoreszenz wesentliche Vorteile: Die Intensitätsmessung erlaubt Stoffmengenbestimmungen an Zellen oder Zellpartikeln ohne das bei Absorptionsmessungen notwendige Scanning. Seit Einführung der Durchflusszytofluorometrie besteht ein ausgeprägtes Bedürfnis nach methodisch einfachen Farbreaktionen, die weder Vor- noch Nachbehandlung des Zellmaterials erfordern. Abgesehen von der Zeitersparnis, haben solche Reaktionen auch in der Mikroskopie ganz allgemeine Vorteile: Sie vermindern die Gefahr, dass Zellen verloren, Stoffe extrahiert oder Strukturen verändert werden. Die Fluoreszenz bietet auch in dieser Beziehung, dank der hohen Empfindlichkeit, sehr günstige Voraussetzungen. Erwähnt seien hier beispielsweise neuere Reaktionen für Amine, speziell Peptidhormone, mit Fluorescamine (Håkanson et al. 1975) und für Sulfhydryle mit Dansylaziridin (Arndt-Jovin et al. 1976).

Die Fluoreszenz hängt natürlich wie die Absorption von der molekularen Struktur des Farbstoffes ab. Bekannt sind seit langem zum Beispiel metachromatische Farbstoffe wie etwa das Akridinorange. Die Fluoreszenz reagiert aber viel empfindlicher auf geringfügige innermolekulare Verschiebungen, wie sie zum Beispiel durch Polaritätsänderungen in Substrat oder Medium hervorgerufen werden. Verschiedene Substrate können, trotz mengenmässig gleicher Farbstoffbindung, unterschiedliche Quanteneffizienzen des Farbstoffes zur Folge haben.

Diese Erscheinung ist zunächst für zytofluorometrische Mengenbestimmungen eher eine unerwünschte Komplikation. Andererseits sind solche Effekte aber unter Umständen nutzbar für die Untersuchung von biologischen Prozessen und Strukturen. Mehrere Anwendungen dieser Art sind beschrieben worden, zum Beispiel Potentialmessungen an Nervenfasern (Ross et al. 1977) und Muskelzellen (Oetliker et al. 1975) oder Membranuntersuchungen (Arndt-Jovin et al. 1976). Für Routineuntersuchungen sind freilich solche Messungen noch in keiner Weise verfügbar.

Näher bei der klassischen Zytochemie liegen Untersuchungen mit DNA-Reagenzien, die in den letzten Jahren als Bandingfarbstoffe bekannt geworden sind. Mindestens teilweise dürften auch hier Quanteneffizienzprobleme eine Rolle spielen. Eine genaue Erklärung der den Banden zugrunde liegenden Chromosomenstrukturen ist ja noch immer nicht möglich, trotz einer Vielzahl von Untersuchungen. Im folgenden seien nur einige Probleme und Resultate für das DNA-Farbstoffpaar DAPI und Chromomycin respektive Mithramycin dargestellt.

## DNA-Farbstoffe, am Beispiel von DAPI und Chromomycin, respektive Mithramycin

DAPI, ähnlich wie DIPI und Hoechst 33 258, produziert ein Quinacrin-ähnliches Bandenmuster, während Mithramycin wie das nahe verwandte Chromomycin ein R-Muster ergibt (Schnedl et al. 1977a; Schweizer 1976). Die beiden Farbstoffe können in einer Doppelfärbung verwendet und durch selektive Anregung gesondert beobachtet werden (Leemann & Ruch 1978). Im Modell, das heisst an isolierter DNA und Polynukleotiden, ist die Fluoreszenz dieser Farbstoffe

quantitativ vom Basengehalt der DNA abhängig (AT bei DAPI, GC bei Mithramycin). Die Frage ist nun, ob dies auch bei den Chromosomen der Fall ist. Weitere Faktoren wie Proteine oder Basensequenzen dürften die Sache komplizieren, und es gibt Anhaltspunkte dafür, dass mehrere Bindungsmechanismen vorliegen (Leemann und Ruch 1978). Ob es sich bei den Banden um Farbstoffbindungs- oder um Quanteneffizienzerscheinungen handelt (wie zum Beispiel beim Proflavin, Rigler 1973), ist bis heute nicht bekannt.

### **DNA-Bestimmungen mit DAPI und Mithramycin**

Beide Farbstoffe können für DNA-Mengenbestimmungen an Zellkernen verwendet werden (Schnedl et al. 1977b; Johannisson & Thorell 1977); eigene Messungen an Leukozyten und Rattenleberkernen haben dies bestätigt. Allerdings beziehen sich diese Resultate auf Objekte mit gleichem oder ähnlichem Basengehalt, wie zum Beispiel die verschiedenen Säugerzellen. Sie zeigen, dass die Färbungen grundsätzlich reproduzierbar und quantitativ sind, geben aber keine weiteren Auskünfte über die Frage nach der Basenabhängigkeit.

Die DNA von verschiedenen niedrigeren Pflanzen und Tieren weist eine von den Säugern stark abweichende Basenzusammensetzung auf; ihre Untersuchung kann deshalb zur Klärung der offenen Fragen beitragen. B. Müller (Diss., ETH, noch nicht publ.) erhielt an Rattenleberkernen, Seeigelspermien und Charaspermien tatsächlich mit DAPI und Mithramycin Fluoreszenzwerte, die den verschiedenen Basengehalten recht gut entsprechen. Messungen bestimmter menschlicher Chromosomen (I. Hauser, Diss. ETH, noch nicht publ.) ergaben Resultate, die ebenfalls auf eine Basenabhängigkeit der Fluoreszenz schliessen lassen: die Fluoreszenzwerte verhalten sich bei den beiden Farbstoffen reziprok abweichend vom durchschnittlichen DNA-Gehalt der Chromosomen. (Dies im Gegensatz zu Quinacrinmustard, das bedeutend stärkere Abweichungen ergibt.) Generell dürften diese Ergebnisse zeigen, dass die Farbstoffe Mithramycin und DAPI nicht nur im Modell, son-

dern auch im Zellkern und an Chromosomen eine vom Basengehalt abhängige Fluoreszenz zeigen.

Ob sich freilich die Chromosomenbanden ausschliesslich durch den Basengehalt der DNA erklären lassen oder nicht, kann damit nicht beantwortet werden. Die Abweichungen vom durchschnittlichen DNA-Gehalt sind teilweise zu gering, um in dieser Beziehung eine völlig schlüssige Interpretation zu erlauben. Die Chromosomen setzen sich ja aus Banden und Interbanden zusammen; eine Kompensation von Stellen mit zu hoher und solchen mit zu niedriger Fluoreszenz (gerechnet auf den Basengehalt) ist nicht auszuschliessen. Leider ist es technisch kaum möglich, einzelne Banden zu messen. Auch Scanning-Methoden sind zu wenig genau, da sich die Banden zu nahe am Auflösungsvermögen des Mikroskopes bewegen und die Abgrenzung zu viele Unsicherheiten mit sich bringt. Immerhin wurde mit den genannten Arbeiten eine Grundlage geschaffen, auf der aufzubauen ist: Die Untersuchung von weiterem Material, speziell besonderen menschlichen Karyotypen, dürfte sich lohnen.

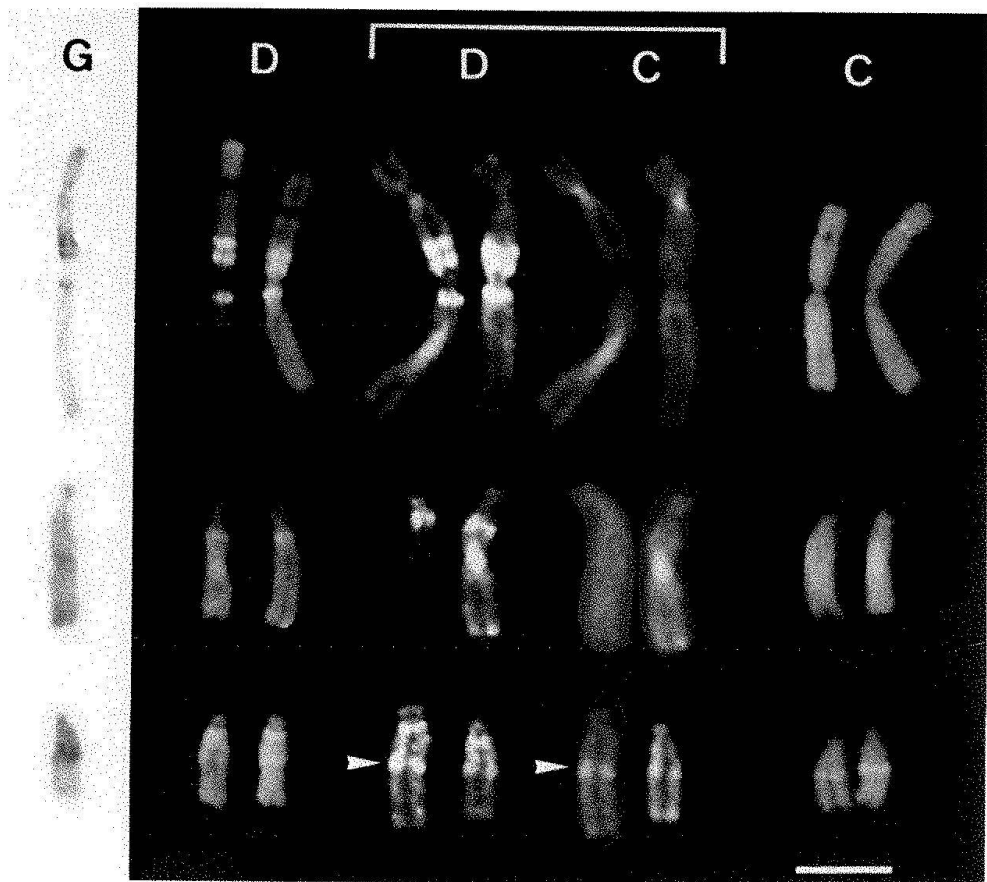
### **Qualitative Untersuchungen an Pflanzenchromosomen**

Weitergehende Feststellungen lassen sich nun zumindest qualitativ an pflanzlichen Chromosomen machen. Bekanntlich weisen diese wesentlich andere Bandenmuster auf als die Säugerchromosomen, was mit dem höheren Konzentrationsgrad erklärt worden ist (Greilhuber 1977). Bei *Anemone blanda* zum Beispiel ergibt DAPI eine Vielzahl, Mithramycin dagegen nur zwei oder drei starke Banden (Leemann & Ruch 1978).

Im folgenden seien nun einige Resultate an Chromosomen von *Vicia faba* dargestellt. Untersucht wurden Essigsäure-Quetschpräparate von Alkohol-Eisessig (3:1) fixierten Wurzelspitzen. Gefärbt wurde mit DAPI (30 Minuten,  $2 \cdot 10^{-6}$  in Sörensenpuffer pH 7.0), oder mit Chromomycin (30 Minuten,  $10^{-4}$  in Sörensenpuffer pH 7.0, 0.01 M  $MgCl_2$  enthaltend), oder, als Doppelfärbung, zuerst mit Chromomycin (30 Minuten), dann mit DAPI (30 Minuten). Als Einschlussmittel diente ein Puffer pH 7-Glyzerin-Gemisch 1:1.

Beim grossen Chromosom von *Vicia faba*

Abb. 1. *Vicia faba*, Wurzelspitzen-Quetschpräparat. Chromosomen Nr. 1 (obere), 2 (mittlere) und 6 (untere Reihe). Strich: 10  $\mu$ m. G: Giemsa, nach Bariumhydroxyd-Behandlung; D: DAPI, Anregung 365 nm; C: Chromomycin, Anregung 435 nm; DC: Doppelfärbung.



(Abb. 1) ist ähnliches zu beobachten, wie bei *Anemone blanda*: drei starke DAPI-Banden in der Nähe des Centromers, die den Giemsa-Banden entsprechen, mit korrespondierenden Dunkelstellen an Chromomycin-gefärbten Chromosomen. Bei der DAPI-negativen sekundären Einschnürung lässt sich eine Chromomycin-Bande erkennen. Der Rest des Chromosoms fluoresziert mit beiden Farbstoffen mit mittlerer Intensität.

Man kann dies nun durchaus auch mit der Basenabhängigkeit der Fluoreszenz erklären, sofern man mehrere Niveaus von Basengehalten annimmt. Bei genauerem Hinsehen erweist sich das Bild aber als komplexer. Mit Chromomycin ist an der sekundären Einschnürung immer, auch bei schwächer kontrahierten (d.h. zum Beispiel nicht colchicinierten) Chromosomen eine durchgehende Struktur zu beobachten (Abb. 2a). Um diese Chromomycin-positive DNA dürfte es sich bei der Fluoreszenz der isolierten Nukleolen handeln, wobei offenbar die Banden-bildende DNA entweder am Nukleolus hängen bleiben (grosser Pfeil, Abb. 2b oben) oder weggerissen werden kann (Abb. 2b unten).

An allen beobachteten Nukleolen waren zumindest die feineren DNA-Strukturen erkennbar (kleiner Pfeil). Mit DAPI dagegen konnte nie eine Nukleolus-Fluoreszenz festgestellt werden, obwohl DAPI absolut gesehen sehr viel stärker (mindestens 10 $\times$ ) fluoresziert. Entweder enthält also die NOR-DNA bei *Vicia* praktisch ausschliesslich GC-Basenpaare, oder aber die Fluoreszenz ist nicht einfach proportional zum Basengehalt. Ein eindeutiger Schluss lässt sich beim kleinsten *Vicia*-Chromosom ziehen (Abb. 1): die gleichzeitig mit DAPI wie mit Chromomycin erkennbare Bande kann offensichtlich nicht mit basenspezifischer Fluoreszenz der Farbstoffe erklärt werden.

Um abzuklären, ob die Banden ein Farbstoffbindungs- oder ein Quanteneffizienzphänomen sind, wurden Fotografien im Absorptionsbereich der Farbstoffe gemacht. Die Absorptionen sind äusserst gering, was für die Fluoreszenz sehr günstig ist, aber natürlich das Fotografieren wie die Interpretation der Fotos erschwert. Für DAPI wurde 340 und 365 nm, für Chromomycin 435 nm gewählt. In keinem Fall konnten Banden beob-



achtet werden, die auch nur annäherungsweise mit den Fluoreszenzbanden verglichen werden könnten. Dies heisst, dass die Banden durch erhöhte Quanteneffizienz und nicht erhöhte Farbstoffbindung zu erklären sind. Dies schliesst eine Basenabhängigkeit der Fluoreszenz natürlich nicht aus, lässt aber bei quantitativen Untersuchungen doch Vorsicht geboten erscheinen.

Zusammenfassend kann also folgendes gesagt werden: Das Farbstoffpaar DAPI und Chromomycin (resp. Mithramycin) lässt sich annäherungsweise für die zytofluorometrische Bestimmung von DNA-Basengehalten verwenden. Es ergibt im allgemeinen reziproke Chromosomen-Bandenmuster, was auf eine Korrelation von Banden und DNA unterschiedlichen Basengehaltes hinweist. Ausnahmen von dieser Regel sowie Absorptions- und Fluoreszenzmessungen deuten in-

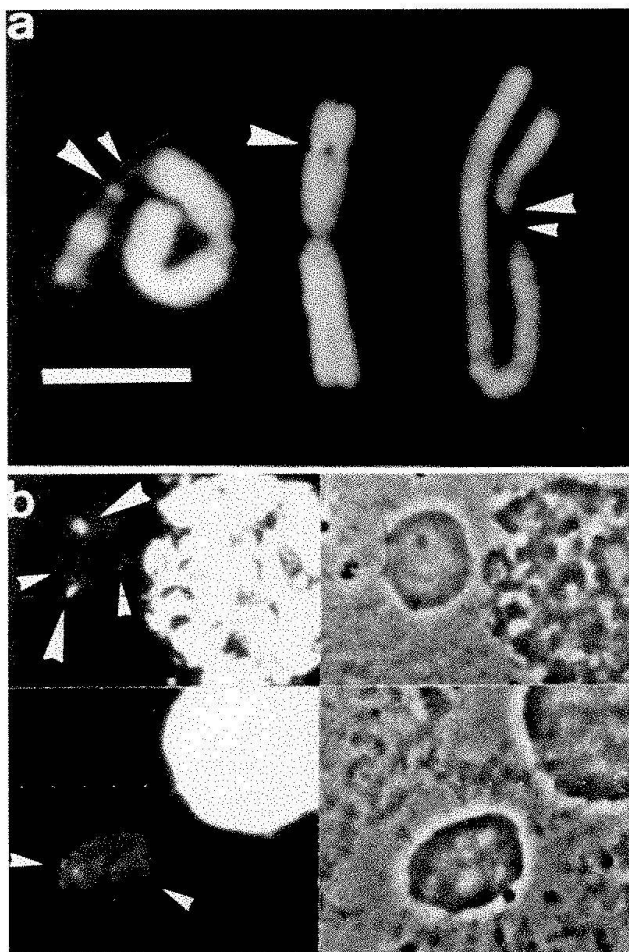


Abb. 2. *Vicia faba*. Wurzelspitzen-Quetschpräparat, Chromomycin. a: Chromosomen Nr. 1, Strich: 10  $\mu\text{m}$ ; b: Nukleolen.

dessen darauf hin, dass mehrere Mechanismen existieren; die Banden sind zumindest bei pflanzlichen Chromosomen eher Folge erhöhter Quanteneffizienz als stärkerer Farbstoffbindung. Eine quantitative Beziehung zwischen Fluoreszenz und Basengehalt in den einzelnen Chromosomenbanden darf deshalb nicht generell angenommen werden. Eindeutig nicht reziprok färbende Chromosomenbanden dürften allerdings DNA-mengenmässig wenig ins Gewicht fallen, weshalb sie auch die oben genannte Verwendbarkeit nicht wesentlich zu beeinträchtigen brauchen.

### Literatur

- Arndt-Jovin D.J. et al. 1976: Studies of cellular differentiation by automated cell separation. *J. histochem. cytochem.* 24. 332.
- Greilhuber J. 1977: Why plant chromosomes do not show G-bands. *Theor. App. Genet.* 50. 121.
- Håkanson R., L.I. Larsson & Sundler F. 1974: Fluorescamine: a novel reagent for the histochemical detection of amino groups. *Histochem.* 39. 15.
- Johannisson E. & Thorell B. 1977: Mithramycin fluorescence for quantitative determination of DNA in single cells. *J. histochem. cytochem.* 25. 122.
- Leemann U. & Ruch F. 1978: Selective Excitation of Mithramycin or DAPI fluorescence on double-stained cell nuclei and chromosomes. *Histochem.* 58. 329.
- Oetliker H. et al. 1975: Simultaneous changes in fluorescence and optical retardation in single muscle fibres during activity. *Nature* 257. 693.
- Rigler R. 1973: Interactions between Acridines and DNA. *Nobel sympos.* 23. 335.
- Ross W.N. et al. 1977: Changes in absorption, fluorescence, dichroism and birefringence in stained giant axons: optical measurement of membrane potential. *J. Membr. Biol.* 33. 141.
- Schnedl W. et al. 1977a: Mithramycin and DIPI: a pair of fluorochromes specific for GC- and AT-rich DNA respectively. *Hum. Genet.* 36. 299.
- Schnedl W. et al. 1977b: Cytofluorometric analysis of nuclei and chromosomes by DIPI staining. *Cytobiologie* 15. 357.
- Schweizer D. 1976: Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58. 307.

### Anschrift der Verfasserin:

Dr. Ursula Leemann  
 Institut für Allgemeine Botanik  
 ETH-Zentrum  
 CH-8092 Zürich