

BEOBACHTUNGEN AN CHROMOSOMEN IM DUNKELFELD UND IM ULTRAVIOLETTEN LICHT.

Von

HARRY HELLSTRÖM und HANS V. EULER.

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Stockholm.

(Eingelangt am 9. Oktober 1936.)

Zur Erforschung des chemischen Geschehens in Zellen und Geweben sind Mikromethoden unentbehrliche Hilfsmittel geworden. Davon legen die ausgezeichneten Arbeiten des Jubilars HANS MOLISCH ein beredtes Zeugnis ab. Oft ist es nicht möglich, rein chemische Mikromethoden mit so kleinen Substanzmengen auszuführen, wie sie die Pflanzen- oder Tierzelle darbietet, und es ist dann notwendig, optische Methoden zur Erkenntnis chemischer Stoffe heranzuziehen.

Färbeverfahren an mikroskopischen Schnittpräparaten sind bis jetzt mehr zur Hervorhebung der Struktur als zur Identifizierung von Substanzen verwendet worden. Die Beobachtungen an gefärbten Schnitten, in welchen meist eine gewisse Denaturierung eingetreten ist, werden ergänzt durch solche an ungefärbten Präparaten im ultravioletten Licht, und zwar dann, wenn die zu studierenden Zellen und Gewebe Substanzen von charakteristischer UV-Absorption enthalten. Zum Vergleich kann noch mit Erfolg eine beim Studium der Chromosomen früher nicht verwendete Methode zur Anwendung kommen, nämlich die Beobachtung im Dunkelfeld mit Kardioidekondensator.

Beim Studium der Riesenchromosome von Dipteren, das wir im Anschluß an die chemisch-genetischen Arbeiten dieses Institutes in Angriff genommen haben¹, wollten wir über den stofflichen Bau

¹ Vergl. unsere ersten Mitteilungen, H. HELLSTRÖM, D. BURSTRÖM u. H. v. EULER in Sv. Kem. Tidskr. 47, 207 u. 248 (1935), sowie H. v. EULER, H. HELLSTRÖM u. K. BRANDT, Sv. Vet. Akad. Archiv f. Kemi 12 A Nr. 6 (1936). Dasselbst Hinweis auf die einschlägige Literatur.

dieser Chromosome Anhaltspunkte gewinnen und wir haben deswegen vergleichende Versuche angestellt:

1. am lebenden Material,
2. an fixierten, gefärbten Präparaten,
3. im Dunkelfeld im auffallenden Licht und
4. im UV-Licht.

BAUER² konnte bekanntlich an geeignet gelegenen Körnern von *Chironomus Thummi* eine Struktur in den Riesenchromosomen erkennen. Wir konnten das Ergebnis von BAUER an unserem Material bestätigen: indem wir Drosophiladrüsen mit einem Tropfen Paraffin oder Rizinusöl bedeckten, konnten wir in sichtbarem Licht die Querstruktur dieser Chromosomen beobachten.

Bei Anwendung einer Dunkelfeldbeleuchtung mit Kardiod-Kondensor erscheinen die Chromosomen heller als das umgebende Medium. Die Voraussetzung für das Hervortreten einer deutlichen Struktur scheint in der Freimachung der Chromosomenschlingen vom Kerninhalt und vom umgebenden Plasma zu bestehen; wir haben diese Trennung erreicht durch Quetschen mit z. B. 50% iger Essigsäure, wodurch eine Fixierung eintrat. Die Chromosomenschlingen erscheinen alsdann als leuchtende Bänder auf schwarzem Hintergrund. In Ringerlösung oder bei Fixierung in Pyridin werden keine freiliegenden Chromosomenschlingen erhalten, und demgemäß tritt keine Struktur hervor. Dagegen bietet es keine Schwierigkeit, die Zerstörung bzw. die Deformation des Kerns mit Inhalt sehr gut im Dunkelfeld zu beobachten, z. B. nach Hervorrufen der Osmose in Wasser.

Um beurteilen zu können, ob die im Dunkelfeld stark „licht-reflektierende“ Substanz der Querstruktur identisch ist mit der im Ultraviolett absorbierenden, haben wir den gleichen Kern sowohl im Dunkelfeld als auch im UV-Licht photographiert. Man ersieht aus den Photographien, daß die im UV-Licht stark absorbierenden (schwarzen) Teile im Dunkelfeld hell leuchtende Streifen bilden (Abb. 1 a und b).

Sehr auffallend ist, daß die zwischenliegende Linin-Substanz sich im Dunkelfeld als „optisch leer“ erweist, umsomehr als das

² Ztschr. Zellforsch. 23, 280 (1935).

Präparat ja mit Essigsäure fixiert worden ist. Daß die Linien-substanz nicht aufgelöst ist, geht aus der Elastizität der Chromosomenschlingen etwa in der Essigsäure hervor. Wir wollen auch besonders auf die erstaunliche Schärfe der Struktur hinweisen, welche im Dunkelfeld erhalten wird und welche wir besonders bei stärkerer Vergrößerung erhalten haben.

Die färbbaren Teile der Chromosomen (die Chromomeren, bzw. die Chromatinsubstanz) — nach E. HEITZ³ das α -Hetero-Chromatin — absorbieren bei geeigneter Fixierung ultraviolettes Licht (vgl. Abb. 5 a u. b in der Mitteilung von H. HELLSTRÖM, K. BRANDT u. H. v. EULER⁴).

Variation der Wellenlänge bei UV-Aufnahmen als Mittel zur Analyse der Chromosomen.

Methodik. Für die Mikro-Aufnahmen im UV-Licht wurde ein Mikroskop mit Quarzoptik von Zeiß verwendet. Immersionsobjektiv 2,5 mm, $\lambda = 275 \text{ m}\mu$, $n_A = 0,85$, Quarzokular $10\times$ oder $5\times$. Als Immersionsflüssigkeit wurde Glycerin-Immersion $n = 1,450$ benutzt. Die Beleuchtung wurde mit monochromatischem Licht eines kondensierten Funkens erzeugt. Durch zwei wassergefüllte Prismen mit Quarzfenstern wurde das Licht der Funkenstrecke in ein Linienspektrum zerlegt. Bei Benutzung von Magnesiumelektroden eignen sich die hellen Linien 280 und 292 $\text{m}\mu$. Cadmiumelektroden geben die leicht isolierbaren, lichtstarken Linien 257 und 275 $\text{m}\mu$. Eine dieser Linien wird auf die vor dem Mikroskop verschiebbare Uranglasplatte eingestellt. Durch ein totalreflektierendes Quarzprisma wird das Licht in das Mikroskop geworfen. Ein 1 Kw Transformator 110/20.000 Volt besorgt die nötige elektrische Energie. Parallel der Funkenstrecke ist ein Kondensator von der Kapazität 40.000 cm geschaltet. Als photographisches Material haben wir Wellington-Platten benutzt. Die Scharfeinstellung des Mikroskops wird mit einem von Zeiß gelieferten Fluoreszenzokular besorgt. Die lineare Vergrößerung war in den meisten Fällen 1000, für einige Platten wurde die Vergrößerung 1550 benutzt.

³ Biol. Zentralbl. 54, 588 (1934). — Vergl. auch die methodisch sehr bemerkenswerte Mitt. von E. HEITZ in Ber. d. deutschen Bot. Ges. 53, 870 (1936).

⁴ Sv. Kem. Tidskr. 47, 248 (1935).

Eine ähnliche Methodik zum Studium der UV-Absorption hat etwa gleichzeitig T. CASPERSSON⁵ verwendet.

Die Absorption des UV-Lichtes wird nicht durch einen optischen Effekt, etwa durch Linsenwirkung der Chromomeren, vorgetäuscht, was aus dem Ausbleichen des Präparates bei längerer Belichtung hervorgeht. Um ein Bild über die Art der Absorption durch einen bekannten Stoff zu erhalten, haben wir Hefenukleinsäure (ein Präparat von BÖHRINGER) spektral studiert. Dabei trat die Absorp-

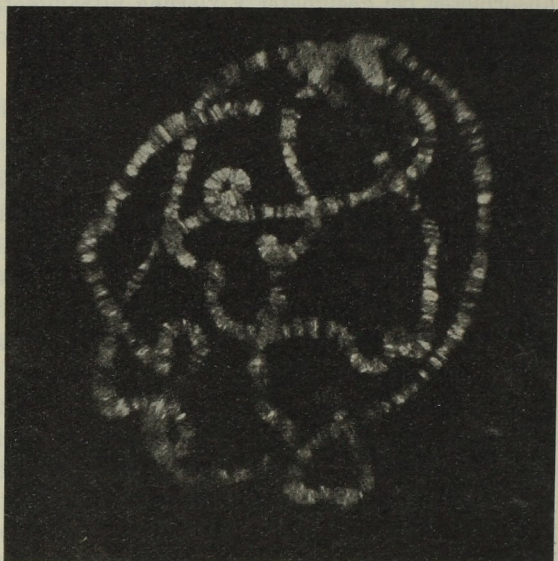


Abb. 1 a. Fixierung in 50% HAc. Dunkelfeld, 500 \times .

tion mit dem Maximum bei 260 $m\mu$ in saurer Lösung etwas stärker hervor als in alkalischer. Die Absorption von verschiedenen gefällten Proteinen (Casein, Eieralbumin), welche wir im Mikroskop beobachtet haben, erwies sich im UV-Licht nicht so stark, daß sie mit der außerordentlich starken Absorption vergleichbar wäre, welche die Querstreifen der Chromosomensubstanz (der Chromomeren) zeigen. Immerhin ist zu bedenken, daß die Dichte der untersuchten Proteine geringer gewesen sein kann als die der

⁵ Naturwiss. 23, 500 u. 527 (1935).

Chromomeren. Aller Wahrscheinlichkeit nach bestehen die Chromomeren übrigens nicht aus reinem Eiweiß oder reinen Nucleinsäuren, sondern sie dürften auch andere adsorbierende Stoffe (Sterine usw.) enthalten⁶.

Nach Einwirkung von Säuren und gewisser eiweißfällender Reagenzien absorbieren die Chromosomen im UV-Licht stark und man beobachtet im UV deutliche Struktur. Die Azidität der verschie-



Abb. 1 b. Dasselbe Präparat wie in 1 a im UV-Licht. 275 mu 500 X.

denen „Absorption hervorrufenden“ Reagenzien ist recht verschieden.

Zu erwähnen sind hier z. B. verd. HCl, 25%ige Phosphorsäure, 50%ige Essigsäure, welche ja sämtliche niedrige p_H -Werte zeigen. Bei Verwendung von 0,1 mol. Zitronensäure ($p_H = 2,3$) tritt die obenerwähnte Absorption erst nach Behandlung des Präparates in der Wärme hervor (Abb. 2 a und 2 b).

⁶ Siehe auch WRINCH, Nature 135, 788 und 136, 68 (1935). — Protoplasma 25, 550 (1936).

Wir führten diese Behandlung so durch, daß das gequetschte und mit Vaseline umschlossene Präparat von der Unterseite her zwei Minuten lang mit einem feinen Strahl von Wasserdampf erhitzt wurde. Erfolgt diese Erhitzung in isotonischen und neutralen Lösungen, so tritt im UV kein erheblicher Absorptionseffekt auf. Verwendeten wir Zitronensäurepuffer mit höherem p_H (2,9 und 3,3), so wurde nur eine schwache Steigerung der Absorptionsefähigkeit der Chromomeren erzielt. Die gleiche Beobachtung



Abb. 2a. Fixierung in 0,1 mol
Zitronensäure p_H 2,3, UV,
500 \times .



Abb. 2b. Dasselbe Präpa-
rat nach Erhitzen, UV,
500 \times .

machten wir auch mit Boratpuffer, durch welchen nach Wärmebehandlung des Präparates nicht einmal bei $p_H = 2,2$ eine erhebliche Absorption erreicht wurde. Dagegen gab eine 0,1 molare wässrige Lösung von Alaun bei $p_H = 3,2$ ohne Wärmebehandlung eine gute Absorption.

Die verschiedenen Reagenzien haben wir in ihrer Einwirkung auf die Chromomeren nicht nur durch obige Methoden, sondern auch im sichtbaren Licht untersucht; indem wir die Drüsen in verschiedenen Flüssigkeiten quetschten und nach einer gewissen Zeit die Präparate färbten — wir ließen Farbstoffe wie Acetocarmin unter das Deckglas eindiffundieren — konnten wir die Einwirkung der verschiedenen Lösungen verfolgen. Je stärker die Destruktion ist, um so schlechter wird die Färbbarkeit und um so undeutlicher tritt die Struktur hervor. Wie bei den Unter-

suchungen im UV zeigte sich auch hier, daß Wasser und Ringerlösung auf die färbare Chromatinsubstanz auflösend wirkt, denn bei der darauffolgenden Einwirkung des Farbstoffs wurde nur der Kern als ganzes gefärbt, ohne daß sich dabei eine Chromosomenstruktur zeigte. Durch Verwendung eines Acetatpuffers (0,5 n, $p_H = 5,0$) wird dagegen offenbar die Chromatinsubstanz vor Auflösung geschützt, denn sogar nach einer Stunde konnten Präparate, welche in Acetatpuffer gequetscht waren, nach Färbung gute Struktur im Kern erkennen lassen.



Abb. 3. Acetocarmine, 40% HAc, blaues Licht, 1500 \times .

Die Fixierung scheint auf die Chromosomenschlingen einen recht ungleichartigen Einfluß zu haben. Fixiert man z. B. mit Essigsäure, so können die Schlingen bis zu sehr starker Verlängerung deformiert werden, ohne zu zerfallen, was ja darauf hindeutet, daß sie in hohem Grade dehnbar und elastisch sind. (Abb. 3 zeigt ein Präparat in Acetocarmine 40% HAc.). In Pyridin dagegen scheint die Deformation von ganz anderer Art zu sein. Die Schlingen fallen an verschiedenen Stellen auseinander, was durch eine eventuelle Veränderung bzw. Auflösung der zwischenliegenden Linin-substanz veranlaßt ist. In diesen Fällen beobachtet man kanten-gestellte Gruppen von im UV absorbierenden Chromomeren (siehe Abb. 4).

Unsere Beobachtungen können wir in den folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Die färbbare Substanz der Chromosomen kann mit der Substanz, welche bei geeigneter Fixierung im UV-Lichte absorbiert, identisch sein. In beiden Fällen tritt nämlich bei der Quetschung



Abb. 4. Fixierung in Pyridin.

in Wasser und entsprechenden Lösungen Zerstörung ein, wobei man eine innerhalb des Kernes diffuse Verteilung der Substanz durch Beobachten im UV-Licht und im sichtbaren Licht feststellen kann.

2. Absorption im UV-Licht tritt ein bei Fixierung mit mittelstarken Säurelösungen, Alaun und Pyridin.

3. Im fixierten Material sind die Chromosomen im Dunkelfeld gut sichtbar. Die Struktur tritt mit sehr großer Schärfe hervor.

Die Teile, die im Dunkelfeld hell leuchten, entsprechen jenen (die Chromomeren), die im UV stark absorbieren. Die Zwischensubstanz ist im Dunkelfeld optisch leer.

Die eben erwähnten Methoden geben gewissermaßen Aufschluß über die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Bestandteile der Chromosomen und damit auch einen Hinweis über die Natur der die Chromosomen aufbauenden Stoffe. Die starke UV-Absorption der Chromomeren dürfte wohl hauptsächlich von Nukleinsäuren herrühren. Ihre Anwesenheit im Zellkern war bereits bekannt⁷.

⁷ Eine verdienstvolle experimentelle und theoretische Behandlung der Absorptionsverhältnisse in mikroskopischen Objekten (Chromosomen) findet man in einer kürzlich erschienenen Dissertation von CASPERSSON (Skandin. Archiv Physiol. 73, Suppl. 1936).