

Zeitschrift: Verhandlungen der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft.
Wissenschaftlicher und administrativer Teil = Actes de la Société
Helvétique des Sciences Naturelles. Partie scientifique et administrative
= Atti della Società Elvetica di Scienze Naturali

Herausgeber: Schweizerische Naturforschende Gesellschaft

Band: 155 (1975)

Vereinsnachrichten: Schweizerische Gesellschaft für Vererbungsforschung

Autor: [s.n.]

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 29.11.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

3. Schweizerische Gesellschaft für Vererbungsforschung
Société Suisse de Génétique
Società Svizzera di Genetica

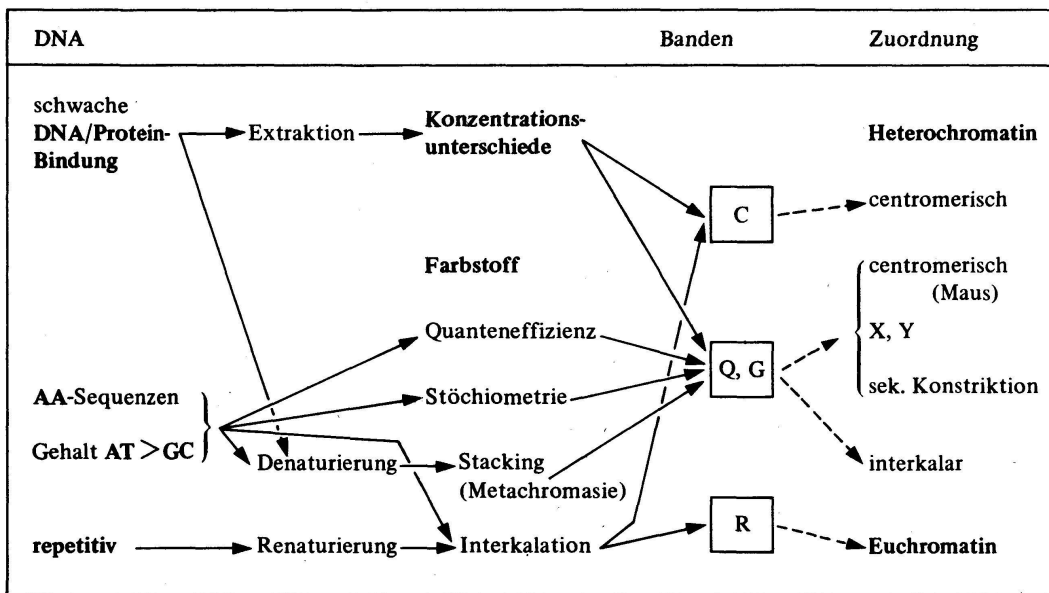
Moderne Chromosomenanalyse

1. Ursula Leemann (Institut für Allgemeine Botanik ETH Zürich):
Quantitative Aspekte der Chromosomenanalyse

1. Einleitung

Die von Caspersson und Mitarbeitern 1968⁵ zum erstenmal beschriebenen Chromosomenbanden sind in kurzer Zeit zum wichtigsten Hilfsmittel für die Chromosomenidentifizierung geworden und haben eine grossartige Entwicklung auf zytogenetischem Gebiet eingeleitet. Quantitative zytochemische Untersuchungen sind wesentlich für die Analyse der chemischen Grundlagen des Bandings und damit des Baues und des Chemismus der Chromosomen überhaupt. Casperssons ursprüngliche Zielsetzung war übrigens auch durchaus zytochemischer Natur gewesen, nämlich die Suche nach DNA-basenspezifischen Reagenzien; bereits seine ersten Banding-Arbeiten^{5,6} enthalten zytofotometrische Analysen der Quinacrin-Fluoreszenz im Vergleich zu UV- oder Feulgen-Absorption der DNA. Quantitative oder doch semiquantitative Auswertungen wurden sehr bald noch aus einem weiteren Grunde interessant: die Identifizierung der menschlichen Chromosomen anhand der Banden erlaubt im Prinzip die Automatisierung der Chromosomenanalysen⁷. Weder das eine noch das andere Ziel, d.h. weder die restlose Erklärung der Bandingphänomene noch die Automatisierung, ist bis heute erreicht worden.

Vom apparativen Standpunkt her ist eine Automatisierung durchaus realisierbar, und verschiedene Systeme sind beschrieben worden^{15, 16, 18, 21, 23}. Die in diesen Arbeiten angegebenen Fehlerquoten bei der Chromosomenklassifizierung liegen in der Grössenordnung von 4 bis 7 %, während die Brauchbarkeit der automatisch ausgelesenen Metaphasen zwischen 10 und 90 % schwankt. Der Grund für diese bis heute unbefriedigenden Ergebnisse liegt offensichtlich bei der Präparation (stark gekrümmte oder sich berührende Chromosomen, unvollständige Metaphasen usw.) und bei der mangelhaften Reproduzierbarkeit der Banding-Färbungen. Dass die Färbungen speziell mit Giemsa, wo eine Vorbehandlung der Chromosomen notwendig ist, meist recht unregelmässig ausfallen, dürfte jedem Praktiker bekannt sein. Auf dem selben Objektträger können sehr verschiedene Färbeintensitäten und sogar verschiedene Bandenmuster (G bis C) auftreten. Was sich bei visueller Untersuchung vielleicht etwas unangenehm, weil zeitraubend, auswirkt, wird bei der automatischen Klassifizierung zu einem kaum zu überwindenden Hindernis; quantitative Analysen sind unter solchen Umständen natürlich vollends unmöglich. Die riesige Zahl der bis heute publizierten Banding-Rezepte zeugt davon, dass immer wieder und mit nur sehr gerin-



Tab. 1: Schema zur Entstehung und zytologischen Zuordnung der Chromosomenbanden

gem Erfolg versucht wurde, die Methodik zu verbessern. Dass die Untersuchung der Bandenerscheinungen trotzdem ihre Faszination nicht verloren hat, ist wohl damit zu erklären, dass die systematisch auftretenden (und deshalb praktisch so eminent wichtigen) Banden ohne eine chemische oder strukturelle Grundlage einfach nicht zu denken sind. Die Interpretationen sind widersprüchlich geblieben: einerseits kann gezeigt werden, dass die Banden in einem Zusammenhang mit dem Basengehalt und der Basensequenz der DNA stehen (basenspezifische Farbstoffe, Antikörper, De- und Renaturierung der DNA); andererseits lassen sich die Banden auf Grund von Massenunterschieden darstellen (elektronenmikroskopisch, Feulgen, Phasenkontrast). In Tab. 1 sind diese Zusammenhänge vereinfacht dargestellt.

Anhand von Kriterien und Resultaten aus der quantitativen Zytchemie soll hier versucht werden, einige dieser Widersprüchlichkeiten zu erklären. Die Schwierigkeiten, die bei den Bandingmethoden auftreten, dürften sich dabei von grundsätzlicherer Natur erweisen, als zumeist angenommen wird. Ob wesentliche Fortschritte – wirklich reproduzierbare und auch quantitativ verwertbare Banding-Prozeduren – auf der heutigen methodischen Basis überhaupt möglich sind, muss bezweifelt werden. Für die praktische Anwendung, d.h. die Chromosomenidentifizierung im Mikroskop oder auf der Fotografie, spielt das eine geringe Rolle; für die Untersuchungen über Chemismus und Struktur der Chromosomen aber sowie für die Automation dürfte diese Frage von entscheidender Bedeutung sein.

2. DNA- und Trockengewichtsbestimmungen

DNA-Mengenbestimmungen können zytofotometrisch mit recht grosser Zuverlässigkeit ausgeführt werden, sowohl mit Hilfe der UV- oder Feulgen-Absorption wie mit Fluoreszenz-Schiffreaktionen²⁸. Menschliche Chromo-

somen sind verschiedentlich untersucht worden^{11, 22, 25, 29}. Innerhalb der Chromosomengruppen sind nur bei den Chromosomen 1–3 signifikante Unterschiede gefunden worden; die verwendeten Methoden erlaubten allerdings auch keine Identifizierung der einzelnen Chromosomen. Unterschiede im DNA-Gehalt entlang der Chromosomenachse wurden von keinem Autor beobachtet (abgesehen vom Centromer). Caspersson wies an pflanzlichen Chromosomen, die dank ihrer Grösse mit recht hoher Genauigkeit untersucht werden können, eine DNA-Verteilung von erstaunlicher Konstanz nach^{5,6}, während er mit Quinacrin an denselben Chromosomen eine auffallende Bänderung erhielt. Die für Chromosomenpräparate zumeist verwendeten Fixiermittel Carnoy oder Alkohol-Eisessig-Gemische werden in der Literatur im allgemeinen als gut bezeichnet für DNA-Bestimmungen; DNA-Verluste bei Alkohol-Eisessig-fixierten, getrockneten Chromosomenpräparaten wurden aber von Gaillard et al.¹¹ nachgewiesen und in eigenen Versuchen speziell an menschlichen Leukozyten wiederholt festgestellt (Abb. 1). Dies legt den Schluss nahe, dass Chromosomenbanden, die nach einer Feulgenreaktion beobachtet werden können²⁷, auf DNA-Extraktion zurückzuführen sind, um so mehr, als die entsprechenden Bilder morphologisch nur sehr schlecht erhaltene Chromosomen zeigen. Es ist ja auch bekannt, dass verschiedene DNA-Fractionen (Eu- resp. Heterochromatin) unterschiedliche Löslichkeit zeigen.

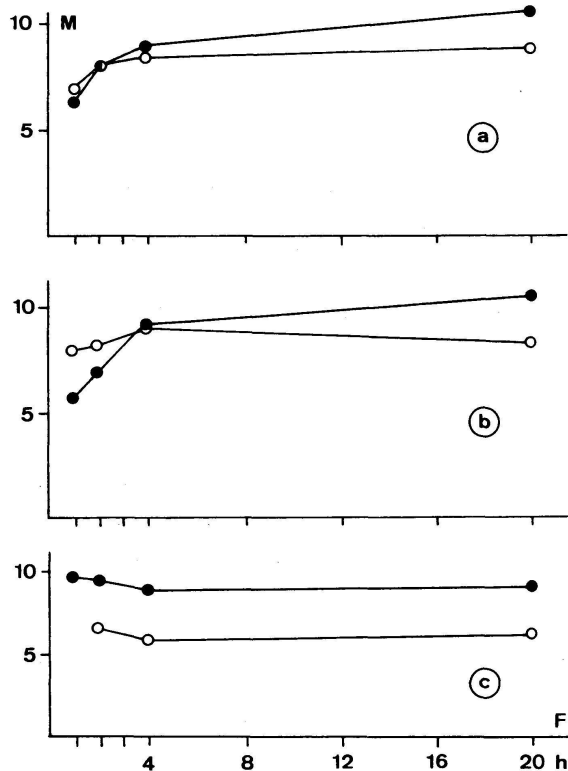


Abb. 1 Trockenmasse (a), Totalprotein (b) nach Sulfaflavinreaktion²⁸ und DNA (c) nach Bao-Reaktion²⁸ in relativen Einheiten M, in Abhängigkeit von der Fixierdauer F. Menschliche Leukozyten, in Suspension fixiert mit gepuffertem Formol 4 % (●) und Aethanol-Eisessig 99:1 (○).

Ähnliches lässt sich von der Trockenmasse resp. den Proteinen sagen, obwohl hier lichtmikroskopisch wenig quantitative Angaben über Chromosomen vorliegen. Chromosomenbanden sind im Phasenkontrast weder an lebenden Zellen noch nach zytologisch einwandfreier Fixierung zu beobachten, ebensowenig nach Proteinfärbungen, wie sie in der quantitativen Zytochemie Anwendung finden²⁸. An suspensionsfixierten Leukozyten können, vor allem bei kurzen Fixierzeiten, Proteinverluste nachgewiesen werden (Abb. 1); Histonverluste an Chromosomenpräparaten – bis zu 80 % nach Essigsäurebehandlung – sind von mehreren Autoren beschrieben worden^{3, 9, 10}. Golomb und Bahr¹³ bestimmten elektronenmikroskopisch die Trockengewichte von menschlichen Chromosomen und wiesen chromomerartige Strukturen nach, die recht genau der Quinacrinbänderung entsprechen¹⁴. Dasselbe wurde für G- und C-Banden gefunden⁴. Aus anderen elektronenmikroskopischen Arbeiten sind aber auch Chromosomen mit Spiralstruktur bekanntgeworden, wie wir sie aus vielen lichtmikroskopischen Untersuchungen kennen.

Man darf aus diesen Beobachtungen also wohl den Schluss ziehen, dass die bandenartigen DNA- und Proteinmassenunterschiede entlang der Chromosomenachse durch die Präparation und die Behandlung hervorgerufen werden. Dass solchermassen systematisch auftretende differenzielle Extraktionen (und vielleicht auch Stoff-Umlagerungen) letzten Endes auf Eigenschaften der DNA selbst beruhen müssen, dürfte allerdings auch klar sein. Für die praktischen Aspekte des Bandings sind diese Extraktionen sicher nur von Vorteil, weil sie die offenbar vorhandenen feinen Strukturunterschiede verstärken. Bei weitergehenden Interpretationen ist aber grösste Vorsicht geboten.

3. Präparation

Nicht nur die Fixierung, sondern die Präparation überhaupt ist in der Zytochemie von entscheidender Bedeutung. Besonders die Luft-Trocknung beeinflusst Struktur wie Färbbarkeit der Zellen sehr wesentlich. Dieser Trocknungseffekt hängt ab von verschiedenen äusseren Bedingungen, von der Fixierung, vom Objekt und interessanterweise offenbar auch vom Grad der Chromatinkondensation, was etwa am unterschiedlichen färberischen Verhalten von Mitosen und Interphasen festgestellt werden kann. Für gute Giemsa-Färbung ist eine Trocknung wahrscheinlich wesentlich; bei Histonreaktionen konnte zytofluorometrisch nachgewiesen werden²⁰, dass nur ungetrocknete Präparate homogene Färberesultate liefern. Einen Ausweg bieten für zytochemische Zwecke suspensionsfixierte Zellen, die auf Objektträger aufzentrifugiert werden. Im Elektronenmikroskop wurde festgestellt, dass Luft-Trocknung von unfixiert gespreizten Chromosomen eine vollständige Zerstörung der Struktur zur Folge hat; deshalb wird für solche Untersuchungen meist die Critical-Point-Trocknung angewendet¹.

4. Basenzusammensetzung der DNA

Banding ohne jede Vorbehandlung kann mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen erreicht werden, z.B. mit Quinacrinmustard, Quinacrin, Pro-

flavin oder der Hoechstverbindung 33 258. Im Modellversuch kann eindeutig ein Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und dem AT-Gehalt der gefärbten Polynukleotide gezeigt werden^{24, 26, 30}. Quinacrinmustard färbt direkt basenspezifisch (alkylierend), bei Quinacrin und Proflavin dagegen ist nur die Quanteneffizienz des Farbstoffes basenabhängig²⁴. Diese Farbstoffe – es handelt sich um Acridinderivate – interkalieren, d.h. sie lagern sich zwischen die Basen in den DNA-Doppelstrang ein. Andere Bindungsarten spielen aber auch eine Rolle, vor allem die elektrostatische Bindung an die Phosphatgruppen von DNA und RNA. Hier ist wohl die Erklärung dafür zu suchen, dass die Bänderung nicht bei allen Präparaten gleich deutlich ausfällt. Der Bindungsmechanismus des Hoechstfarbstoffes, eines Benzimidazolderivates, ist nicht bekannt. Quinacrin und Hoechstverbindung ergeben teilweise ähnliche, teilweise aber auch verschiedene Bilder¹⁷. Die Interpretation dieser Chromosomenbanden ist deshalb auch nicht einfach. Einmal dürften nicht lediglich der Gesamt-AT-Gehalt eines bestimmten DNA-Abschnittes, sondern auch die Basensequenzen eine Rolle spielen. Überdies ist, im Gegensatz etwa zum Acridinorange, nicht bekannt, wie weit die Präparation (Fixierung, Trocknung usw.), die Kernproteine oder die Chromatinkondensation die Färbung beeinflussen, da die zytochemische Erfahrung mit diesen neuen Farbstoffen noch recht gering ist.

Der AT-Gehalt wirkt sich aus auf die Denaturierungseigenschaften der DNA, die bei den Bandingphänomenen ebenfalls eine Rolle spielen dürften. Der Denaturierungsgrad der DNA lässt sich im Prinzip zytochemisch mit Hilfe der UV-Hyperchromizität nachweisen. Messungen sind freilich aus verschiedenen Gründen praktisch recht schwierig durchzuführen; an einzelnen Chromosomen sind sie deshalb kaum realisierbar. Die Prozeduren, die für die De- resp. Renaturierung der DNA in Chromosomenpräparaten angewendet werden, führen mit Sicherheit zu schwerwiegenden DNA-Verlusten^{10, 12} und zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur. (Dasselbe gilt übrigens auch für die in situ-Hybridisierung.)

Acridinorange wird wegen seiner ausgesprochen metachromatischen Eigenschaften ebenfalls zur Unterscheidung von ein- resp. zweisträngiger DNA verwendet²⁶. Die Färbung wird stark durch die Präparation (Trocknung, Fixierung, aber auch Glasoberfläche, Zellkonzentration usw.) beeinflusst und hängt vom Kondensationsgrad des Chromatins ab^{2, 19}. Quantitative Untersuchungen zeigen, dass Resultate an ganz oder teilweise denaturierten Zellen nur dann einigermaßen reproduzierbar sind, wenn in Suspension gearbeitet wird⁸. Diese Beobachtungen, zusammen mit den in Chromosomenpräparaten zu erwartenden DNA-Verlusten beim Denaturieren, machen deutlich, dass die Rot- resp. Grünfluoreszenz beim Acridinorange-Banding nicht ohne weiteres mit dem Vorhandensein von nicht- resp. leichtrenaturierbarer DNA gleichgesetzt werden darf.

Die Hauptkomponenten des Giemsa, Methylenblau und Azure, zeigen ähnlich wie Acridinorange metachromatische Eigenschaften. Der hohe Kontrast beim Giemsa-Banding dürfte auf ein Zusammenwirken aller besprochenen Faktoren zurückzuführen sein: Konzentrationsunterschieden, Trocknungseffekten und Färbbarkeit infolge von Sequenz und Denaturierung.

5. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend ist die Situation in Tab. 2 dargestellt. Die reproduzierbaren, quantitativen zytochemischen Reaktionen erfordern gute Fixierung und in vielen Fällen die Vermeidung von Luft-Trocknung, damit Extraktionen und Strukturveränderungen vermieden und homogene Färberesultate erzielt werden. Eine optimale Spreizung der Chromosomen ist aber

| | Chromosomenidentifikation | Quantitative Zytochemie |
|---------------------------|--|---|
| Fixierung | <p>schwach (z.B. Methanol-Eisessig):</p> <p>Zellen platzen → Chromosomen gespreizt</p> <p>differentielle Stoffverluste bei Behandlung mit H^+, OH^- usw. → Banden</p> | <p>gut (z.B. Formol, Formol-Aethanol-Eisessig):</p> <p>Zellen erhalten</p> <p>keine Stoffverluste</p> |
| Herstellung der Präparate | <p>getrocknet auf Objektträger:</p> <p>einfach, rasch, Haftung gut</p> <p>Änderung der Struktur und der Reaktionsfähigkeit, abhängig von: Fixierung, Schnelligkeit des Trocknungsvorganges → inhomogen Chromatinkondensation → Kontrasterhöhung der Banden</p> | <p>getrocknet, je nach Objekt und Reaktion, oder nass (z. B. aufzentrifugiert):</p> <p>aufwendiger, Haftung schlechter</p> <p>Struktur und chemische Reaktionsfähigkeit erhalten: → homogen, reproduzierbar → quantitativ</p> |

Tab. 2: Gegenüberstellung der Präparationsarten für Chromosomenidentifikation und für quantitative zytochemische Reaktionen

andererseits nur bei relativ schwacher Fixierung möglich. Der stärkste Bandenkontrast und wohl auch das feinste Bandenmuster wird mit dem Farbstoffgemisch Giemsa erreicht, dessen Reaktion vom chemischen Standpunkt aus am wenigsten durchschaubar ist und bei dem die notwendige Vorbehandlung Chromosomenstruktur- und chemismus weitgehend verändert. Die verschiedenen Forderungen sind kaum unter einen Hut zu bringen: für die Chromosomenidentifikation, wo kontrastreiche und gut reproduzierbare Färbungen erforderlich sind, wird man vor allem an der Präparation arbeiten müssen. Eine vollständige Vermeidung der Trocknung ist allerdings für Routineuntersuchungen aus praktischen Gründen kaum denkbar. Zur Untersuchung der Chromosomenstruktur und des Chemismus aber kommen in erster Linie die Fluorochrome wie Quinacrinmustard und die Hoechstverbin-

derung in Frage, die keine Vorbehandlung der Chromosomenpräparate erfordern. Präparation und Färbebedingungen müssen dabei stärker als bisher nach zytochemischen Kriterien und weniger auf maximalen Bandenkontrast ausgerichtet werden.

Literatur

- 1 Bahr G., Determination of the dry mass of small biological objects by quantitative electron microscopy. In: *Micromethods in molecular biology*. Springer, Berlin, 1973, p. 257.
- 2 Bolund L. et al., Changes in the cytochemical properties of erythrocyte nuclei reactivated by cell fusion. *J. cell sci.* 4 (1969) 71.
- 3 Brody T., Histones in cytological preparations. *Exp. cell res.* 85 (1974) 255.
- 4 Burkholder G.D., The ultrastructure of G- and C-banded chromosomes. *Exp. cell res.* 90 (1975) 269.
- 5 Caspersson T. et al., Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. cell res.* 49 (1968) 219.
- 6 Caspersson T. et al., Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia Faba* metaphase chromosomes. *Exp. cell res.* 58 (1969) 128.
- 7 Caspersson T. et al., Automatic karyotyping of Quinacrinmustard stained human chromosomes. *Exp. cell res.* 67 (1971) 233.
- 8 Darzynkiewicz Z. et al., Thermal denaturation of DNA in situ as studied by Acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp. cell res.* 90 (1975) 411.
- 9 Dick C. & E.W. Johns, The effect of two acetic acid containing fixatives on the histone content of calf thymus DNP and calf thymus tissue. *Exp. cell res.* 51 (1968) 626.
- 10 Franke W.W. et al., Losses of material during cytological preparation of nuclei and chromosomes. *Exp. cell res.* 80 (1973) 445.
- 11 Gaillard J.L.J., P. van Duijn & A. Schaberg, Photometric determination of DNA in human chromosomes. *Exp. cell res.* 53 (1968) 417.
- 12 Gebert R., in preparation.
- 13 Golomb H.M. & G. Bahr, Analysis of an isolated metaphase plate by quantitative electron microscopy. *Exp. cell res.* 68 (1971) 65.
- 14 Golomb H.M. & G. Bahr, Human chromatin from interphase to metaphase. *Exp. cell res.* 84 (1974) 79.
- 15 Granlund G.H. et al., A technique for multiple cell karyotyping. *Conf. automat. cytol.*, Asilomar 1975.
- 16 Green D.K. & P.W. Neurath, The design, operation and evaluation of a high speed automatic metaphase finder. *J. histochem. cytochem.* 22 (1974) 531.
- 17 Gropp A., I. Hilwig & P.K. Seth, Fluorescence chromosome banding patterns produced by a benzimidazole derivative. *Nobel sympos.* 23 (1973) 300.
- 18 Johnson E.T. & L.J. Goforth, Metaphase spread detection and focus using closed circuit TV. *J. histochem. cytochem.* 22 (1974) 536.
- 19 Killander D. & R. Rigler, Activation of DNP in stimulated leukocytes. *Exp. cell res.* 54 (1969) 163.
- 20 Leemann U., S. Weiss & E. Schmutz, A centrifugation technique for cytochemical preparations. *J. histochem. cytochem.* 19 (1971) 758.
- 21 Lubs H.A. & R.S. Ledley, Automated analysis of differentially stained chromosomes. A review of goals, problems and progress. *Nobel sympos.* 23 (1973) 61.
- 22 Mendelsohn M.L. et al., *Cytogenetics* 5 (1966) 223.
- 23 Mendelsohn M.L. et al., Computer-oriented analysis of human chromosomes. *J. histochem. cytochem.* 22 (1974) 554.

- 24 Modest E.J. & S.K. Sengupta, Chemical correlates of chromosome banding. Nobel sympos. 23 (1973) 327.
- 25 Nitsch B. & J. Murken, Probleme der Charakterisierung einzelner Chromosomen durch DNS-Messungen. Hum. Genet. 9 (1970) 16.
- 26 Rigler R., Interactions between acridines and DNA. A key to the understanding of banding patterns in chromosomes. Nobel sympos. 23 (1973) 335.
- 27 Rodman T.C., Human chromosome banding by Feulgen stain aids in localizing classes of chromatin. Sci. 184 (1974) 171.
- 28 Ruch F. & U. Leemann, Cytofluorometry. In: Micromethods in molecular biology. Springer, Berlin, 1973, 329.
- 29 Rudkin G.T., Photometric measurements of individual metaphase chromosomes. In vitro 1 (1965) 12.
- 30 Weisblum B. & E. Haenssler, Fluorometric properties of the benzimidazole derivative Hoechst 33 258. A fluorescent probe specific for AT-concentration in chromosome DNA. Chromosoma 46 (1974) 255.

2. Wolfgang Schnedl

(Histologisch-Embryologisches Institut der Universität Wien):

Bändermuster der Chromosomen und andere neue Verfahren der Cytogenetik

Als im Jahre 1970 Caspersson et al. unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Quinacrin eine Darstellung von Bändermustern innerhalb der menschlichen Chromosomen gelang, die für jedes Chromosom konstant und charakteristisch sind, begann für die Cytogenetik eine neue Aera. Caspersson ging von der Vorstellung aus, dass der von ihm verwendete Farbstoff, quinacrine mustard, eine alkylierende Substanz, eine besondere Affinität zu GC-reichen Chromosomenabschnitten zeigen müsste, und nahm an, dass die Quinacrin-positiven Stellen GC-reiche Abschnitte innerhalb der Chromosomen seien. Die Vermutung, dass die Bänderung der Chromosomen etwas mit der Basenzusammensetzung zu tun habe, wurde in der Folge, wenn auch in umgekehrter Weise, bestätigt; dennoch ist die Diskussion über die Beteiligung anderer Faktoren, z.B. der Proteine, noch in vollem Gang.

Wenig später wurden, ausgehend von der Methode von Arrighi und Hsu (1971), in mehreren Labors Verfahren entwickelt, die nach verschiedenen Vorbehandlungen in menschlichen und tierischen Chromosomen Bandmuster mit Hilfe einer Giemsa-Färbung darstellen (z.B. Schnedl, 1971; Abb. 1). Diese Muster stimmen weitgehend mit den Quinacrin-Bändern überein. Einige dieser Verfahren bestehen in einer Trypsinbehandlung der Chromosomen (Dutrillaux et al., 1971; Seabright, 1972), was eine Beteiligung der Proteine am Bandmuster wahrscheinlich macht. Es wurde aber gezeigt, dass die Proteinmuster der Chromosomen auch wieder von der Basenzusammen-

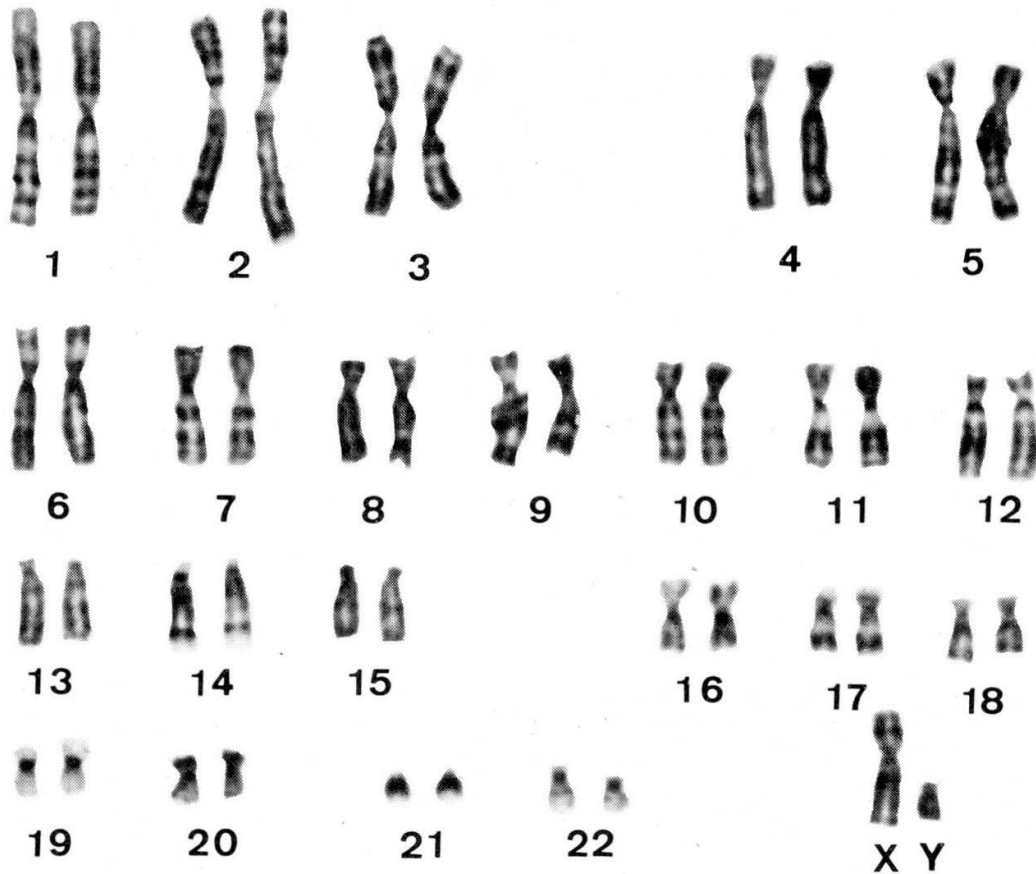


Abb. 1 Menschlicher Karyotyp (männlich); Giemsabänder-Technik.

setzung innerhalb der Chromosomen abhängig sein können (Clark and Felsenfeld, 1972).

Die Reverse-Bänder (Dutrillaux et Lejeune, 1971) gaben einen weiteren Hinweis über die Basenzusammensetzung der Chromosomen. Werden Chromosomen in cytologischen Präparaten einer dosierten Hitzebehandlung ausgesetzt, die zu einer teilweisen Denaturierung der DNS führt, so sollten AT-reiche Abschnitte eher denaturiert werden als GC-reiche Areale. Native, also doppelsträngige DNS, gibt mit Acridinorange eine gelbgrüne Fluoreszenz, einsträngige, also denaturierte DNS, eine schwächere, rötliche Fluoreszenzfarbe. Werden dosiert denaturierte Chromosomenpräparate mit Acridinorange gefärbt, so ergibt sich ein Muster aus abwechselnd hell-gelbgrünen und dunkelroten Abschnitten. Dieses Muster ist mit einigen wenigen Ausnahmen (im konstitutiven Heterochromatin) ein genaues Negativbild der Quinacrin-Bänder und wird daher Reserve-Muster genannt.

Die dunkelroten, also denaturierten Abschnitte liegen an den Quinacrin-Bändern entsprechenden Stellen der Chromosomen. Damit ist für die Quinacrin-Bänder eine Konzentration von AT-reicher DNS wahrscheinlich gemacht, die, wie oben ausgeführt, leichter denaturiert wird als GC-reiche DNS.

Bei Bindungs-Versuchen zwischen DNS-Arten verschiedener Basenzusammensetzung (aus Bakterien) und Quinacrin fanden Weisblum und DeHaseh (1972) eine verstärkte Bindung von Quinacrin und AT-reicher DNS. Ausserdem wurde gezeigt, dass AT-reiche DNS die Quinacrin-Fluoreszenz verstärkt, die dagegen durch GC-Basenpaare abgeschwächt wird. Weisblum (1973) zeigte auch, dass ein bestimmter Fluoreszenzfarbstoff, Hoechst 33 258, ein Benzimidazol, mit DNS eine strikt dem AT-Gehalt entsprechende Fluoreszenzintensität ergibt (Abb. 2). Die mit Hoechst 33 258 erhaltenen Muster ähneln wieder den Quinacrin-Mustern weitgehend.

Gleichzeitig konnte die AT-reiche Natur der Quinacrin-Bänder noch sehr elegant mit Hilfe der Immunfluoreszenz belegt werden (Dev et al., 1972). Anti-Adenosin ergibt ein Muster, das der Quinacrin-Fluoreszenz entspricht, Anti-Cytidin ein dem Reverse-Muster analoges Banding (Schreck et al., 1973).

Die chemische Grundlage für die Bändermuster liegt daher zweifellos in Verschiedenheiten der Basenverteilung längs der Chromosomen. Indirekt besagt dies auch, dass die Bänder aus zumindest teilweise repetitiver DNS bestehen müssen; sonst wäre eine bereits lichtmikroskopisch erkennbare ungleiche Verteilung der Basen nicht zu erwarten.

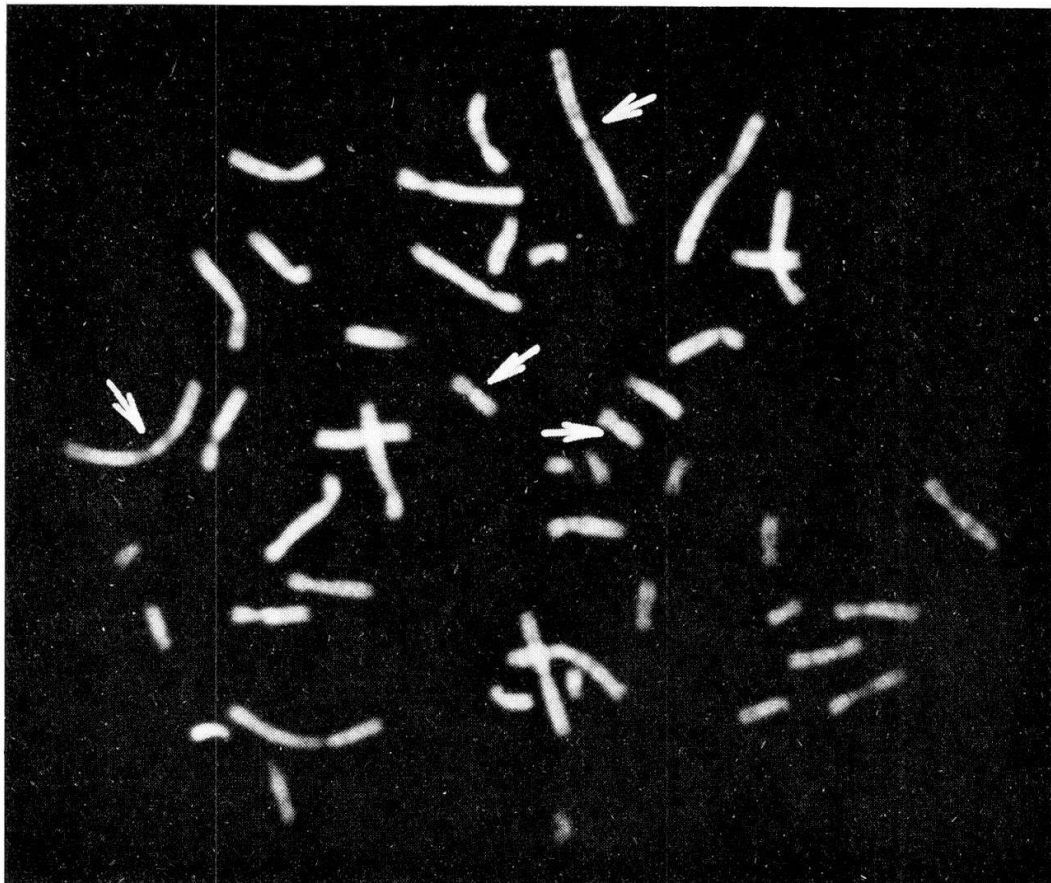


Abb. 2 Metaphase (Mensch), Fluoreszenzaufnahme nach Färbung mit Hoechst 33 258. Die Chromosomen zeigen ein Muster, das weitgehend der Quinacrin-Fluoreszenz entspricht. Abweichend davon zeigen die sekundären Konstruktionen der Chromosomen Nr. 1 und 16 intensive Fluoreszenz (Pfeile).

Unter Verwendung eines Antikörpers gegen die seltene Base 5-Methylcytosin konnte gezeigt werden, dass dieser Baustein, der beim Menschen ca. 1 % der DNS ausmacht, in ganz bestimmten Regionen der Chromosomen, die das konstitutive Heterochromatin ausmachen, konzentriert vorkommt (Miller et al., 1974). Es sind dies die sekundären Konstriktionen der Chromosomen 1, 9 und 16, der distale Abschnitt des Y und, unerwartet, der kurze Arm des Chromosoms Nr. 15 (Miller et al., 1974). Bei der Untersuchung von Chromosomen anderer Spezies zeigte sich, dass auch bei Maus, Schimpanse, Gorilla, Rind, Schaf und Ziege (Schnedl et al., 1975; Schnedl et al., 1976) das konstitutive Heterochromatin Konzentrationen von 5-Methylcytosin darstellt. Unter Umständen ist diese Base also für dieses chromosomale Material charakteristisch.

Noch vor der Entwicklung der Bänderungsmethoden gab eine Methode einen Hinweis dafür, dass längs der Chromatiden mit Hilfe des Lichtmikroskops auflösbare Unterschiede bestehen: die Untersuchung der Spätreplicationsmuster unter Verwendung von ³H-Thymidin-Markierung und Autoradiographie. Diese Befunde wurden besonders durch die Arbeiten von Schmid (1963) genau dokumentiert. Nach der Entdeckung der Quinacrin-Muster wurde gezeigt, dass diese Spätreplicationsmuster ungefähr dem Quinacrin-Muster entsprechen (Ganner und Evans, 1971; Calderon und Schnedl, 1973).

Später zeigten Zakharov et al. (1974), dass BrdU, das die Zelle anstelle von Thymidin in die DNS einbaut, verschiedene Effekte auf das Chromatin hat. Wird z.B. eine Zelle am Ende der S-Phase mit BrdU markiert, so sind die Regionen der Chromosomen, die BrdU enthalten, verdünnt und gestreckt (Zakharov et al., 1974). Mit dieser Methode erhält man also ebenfalls ein Spätreplicationsmuster der Chromosomen, das so detailreich ist, dass es zur Identifikation der Chromosomen verwendet werden kann. Besonders eindrucksvoll ist die Dehnung des spätreplicierenden X-Chromosoms bei der Frau.

Dieses BrdU-Spätmarkierungsmuster ist nach gewöhnlicher Giemsa-färbung erkennbar, aber auch im Akridinorange-Fluoreszenzbild deutlich. Bei Verwendung letzteren Verfahrens werden die BrdU-enthaltenden Areale nach einigen Minuten dauernder UV-Bestrahlung an schwächerer rötlicher Fluoreszenz erkannt, wogegen die übrigen Regionen noch hellgrünlich bleiben.

Merkwürdigerweise ist die Dehnung der Chromatiden nur ausgeprägt, wenn BrdU erst am Ende der Synthesepériode zugesetzt wird. Werden z.B. zwei ganze aufeinanderfolgende Zyklen mit BrdU markiert, so ist die Dehnung der Chromatiden zwar nachweisbar, aber geringer (Zakharov et al., 1972).

Mit einer solchen Technik lässt sich die Segregation der Chromatid-untereinheiten gut nachweisen. Werden zwei aufeinanderfolgende Synthesephasen mit BrdU markiert, so sind die Chromosomen der darauffolgenden Mitose in ihren beiden Chromatiden ungleich markiert; eine Chromatide ist in beiden Untersträngen, die andere nur in einem Unterstrang markiert (Abb. 3). Die Chromatiden unterscheiden sich auch in der Markierung, wenn nur die erste Synthesepériode mit BrdU markiert wurde (Abb. 3).

In beiden Fällen kann der Unterschied im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden, und zwar mit Acridinorange (Dutrillaux et al., 1974) oder Hoechst 33 258 (Latt, 1974). Unter Verwendung letzteren Farbstoffes und einer anschließenden speziellen Behandlung der Präparate kann der Unterschied der Chromatiden auch mit Giemsa-Färbung nachgewiesen werden (Perry und Wolff, 1974; Abb. 4).

Präparate, die auf solche Weise hergestellt wurden, können zu verschiedenen Untersuchungen verwendet werden. Da BrdU nur in DNS-Stränge eingebaut wird, die Thymidin enthalten, bleiben Unterstränge, die kein Thymidin besitzen, unmarkiert. Damit können sogenannte laterale Asymmetrien der DNS in gewissen heterochromatischen Regionen nachgewiesen werden. Solche Asymmetrien finden sich im Y-Chromosom (Latt et al., 1974) und in den sekundären Konstriktionen der Chromosomen 1 und 16 (Angell und Jacobs, 1975).

Schon normalerweise finden sich längs der Chromosomen sogenannte „sister chromatid exchanges“, Stellen, an denen die Markierung von der einen Chromatide auf die andere überspringt (Abb. 4). Diese Tatsache ist schon aus den früheren autoradiographischen Untersuchungen bekannt (z.B. Gibson und Prescott, 1972), kann aber heute mit Hilfe der BrdU-Markierung viel besser untersucht werden. Die durchschnittliche Zahl dieser Austausche liegt für Blutkulturen und BrdU-Markierung bei 10–12 pro Zelle. Diese Anzahl steigt sprunghaft, wenn die Kulturen belichtet werden, da es dadurch zu einer Photolyse des BrdU kommt (Ikushima und Wolff, 1974). Eine ganz krasse Vermehrung der Austausche tritt bei Verwendung von Mutagenen auf

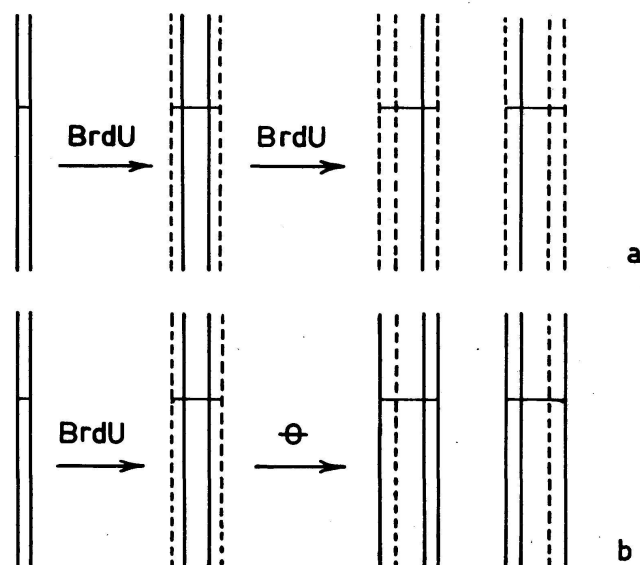


Abb. 3 Schematische Darstellung der Segregation der Chromatiduntereinheiten bei BrdU-Markierung; markierte Unterstränge strichliert. *a* Einbau von BrdU während zweier aufeinanderfolgender Zellzyklen; *b* BrdU nur während der ersten Replikationsphase anwesend. In beiden Fällen unterscheiden sich die Chromatiden der Chromosomen in der zweiten Mitose in der Markierung.



Abb. 4 Menschliche Metaphase, nachdem die zwei vorhergehenden Replikationsphasen mit BrdU markiert wurden (siehe Abb. 3a); Färbung nach Perry und Wolff (1974). Die doppelt markierten Chromatiden sind deutlich schwächer gefärbt als die nur halb markierten Chromatiden. An den Pfeilen einige Beispiele von „sister chromatid exchanges“.

(z.B. Beek und Obe, 1975); gegenwärtig wird eine lebhafte Diskussion geführt, inwieweit die Erhöhung der Austausch-Rate ein direktes Mass für die Mutagenität einer Substanz ist, da man den molekularen Zusammenhang von Mutation, DNS-Reparatursystem und sister chromatid exchange noch nicht genau kennt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den letzten fünf Jahren die Cytogenetik um eine Reihe von Methoden und Erkenntnissen bereichert wurde, deren Auswertung noch lange nicht beendet ist.

Literatur

- Angell, R.R. and Jacobs, P.A.: Lateral asymmetry in human constitutive heterochromatin. *Chromosoma* 51, 301–310 (1975).
 Arrighi, F.E. and Hsu, T.C.: Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10, 81–86 (1971).

- Beek, B. and Obe, G.: The human leukocyte test system VI. The use of sister chromatid exchanges as possible indicators for mutagenic activities. *Humangenetik* 29, 127–134 (1975).
- Calderon, D. and Schnedl, W.: A comparison between quinacrine fluorescence banding and 3H-thymidine incorporation patterns in human chromosomes. *Humangenetik* 18, 63–70 (1973).
- Caspersson, T.; Zech, L.; Johansson, C. and Modest, E.J.: Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 30, 215–227 (1970).
- Clark, R.J. and Felsenfeld, G.: Association of arginine-rich histone with GC-rich regions of DNA in chromatin. *Nature New Biol.* 240, 226 (1972).
- Dev, V.G.; Warburton, D.; Miller, O.J.; Millder, D.A.; Erlanger, B.F. and Beiser, S.M.: Consistent pattern of binding of anti-adenosine antibodies to human metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 74, 288–293 (1972).
- Dutrillaux, B.; DeGrouchy, J.; Finaz, C. and Leujeune, J.: Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier). *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 273, 587–588 (1971), Série D.
- Dutrillaux, B. and Lejeune, J.: Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 272, 2638–2640 (1971), Série D.
- Dutrillaux, B.; Fosse, A.M.; Prieur, M. and Leujeune, J.: Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. *Chromosoma* 48, 327–340 (1974).
- Ganner, E. and Evans, H.J.: The relationship between patterns of DNA replication and of quinacrine fluorescence in the human chromosome complement. *Chromosoma* 35, 326–341 (1971).
- Gibson, D.A. and Prescott, D.M.: Induction of sister chromatid exchanges in chromosomes of rat kangaroo cells by tritium incorporated into DNA. *Exp. Cell Res.* 74, 397–402 (1972).
- Ikushima, T. and Wolff, S.: Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine- and 5-iododeoxyuridine substituted chinese hamster chromosomes. *Exp. Cell Res.* 87, 15–19 (1974).
- Latt, S.A.: Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by Mitomycin C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 3162–3166 (1974).
- Latt, S.A.; Davidson, R.L.; Lin, M.S. and Gerald, P.S.: Lateral asymmetry in the fluorescence of human Y chromosomes stained with 33 258 Hoechst. *Exp. Cell Res.* 87, 425–429 (1974).
- Miller, O.J.; Schnedl, W.; Allen, J. and Erlanger, B.F.: 5-Methylcytosine localised in mammalian constitutive heterochromatin. *Nature* 251, 636–637 (1974).
- Perry, P. and Wolff, S.: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156–158 (1974).
- Schmid, W.: DNA replication patterns of human chromosomes. *Cytogenetics* 2, 175–193 (1963).
- Schnedl, W.: Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma* 34, 448–454 (1971).
- Schnedl, W.; Dev, V.G.; Tantravahi, R.; Miller, D.A.; Erlanger, B.F. and Miller, O.J.: 5-Methylcytosine in heterochromatic regions of chromosomes: chimpanzee and gorilla compared to the human. *Chromosoma* 52, 59–66 (1975).
- Schnedl, W.; Erlanger, B.F. and Miller, O.J.: 5-Methylcytosine in heterochromatic regions of chromosomes in Bovidae. *Humangenetik* 31, 21–26 (1976).
- Schreck, R.R.; Warburton, D.; Miller, O.J.; Beiser, S.M. and Erlanger, B.F.: Chromosome structure as revealed by a combined chemical and immunochemical procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 804–807 (1973).
- Seabright, M.: The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma* 36, 204–210 (1972).

- Weisblum, B. and DeHaseth, P.L.: Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylate-rich regions in DNA, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 629–632 (1972).
- Weisblum, B.: Fluorescent probes of chromosomal DNA structure: three classes of acridines. *Cold Spring Harbor Symp.* XXXVIII: 441–449 (1973).
- Zakharov, A.F. and Egolina, N.A.: Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR-revealed differentiation in chinese hamster chromosomes. *Chromosoma* 38, 341–365 (1972).
- Zakharov, A.F.; Baranovskaya, L.I.; Ibraimov, A.I.; Benjusch, V.A.; Demintsera, V.S. and Oblapenko, N.G.: Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. II. 5-Bromodeoxyuridine and 5-Bromodeoxycytidine revealed differentiation in human chromosomes. *Chromosoma* 44, 343–359 (1974).