

Demonstration von Elementarfibrillen in menschlichen Metaphasechromosomen in situ

Die Ultrastruktur der Chromosomen höherer Organismen war in den letzten Jahren häufig Gegenstand des Interesses. Übersichten über den Stand der Untersuchungen zur Chromosomenstruktur haben kürzlich Ris¹ sowie SCHWARZACHER² gegeben. Der Durchmesser der Chromatinfibrillen sowohl in Interphasekernen wie in Metaphasechromosomen wurde von verschiedenen Autoren^{1,3-11} studiert, wobei Fibrillendurchmesser von 20–500 Å beschrieben wurden. Nach der Übersicht von Ris¹ existiert ein Bauelement von 100 Å Durchmesser. Durch Faltung und Zusammenlegen verbinden sich nach der Auffassung dieses Autors zwei der 100 Å-Fibrillen zu einer Einheit von 250 Å. Über die Anordnung dieser Fibrillen im Chromosom sowie über die Lokalisierung und Anordnung von DNS und Proteinen bestehen hingegen noch wenig genaue Informationen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Silberaldehydmethode nach BRYAN und BRINKLEY¹² auf ganze mitotische Metaphasechromosomen angewendet. Zur Untersuchung dienten menschliche Blutzymphozyten. Sie wurden mit Phytohämagglutinin stimuliert, nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C mit Colchicin behandelt, dann mit 0,9% Natriumcitrat hypotonisiert und mit Äthanol-Eisessig (3:1) fixiert. Die Zellen wurden sodann in 45% Essigsäure suspendiert, die Suspension auf Collodium beschichtete Objektträger aufgetropft und die überschüssige Flüssigkeit mittels saugfähigem Papier in der Mitte des Tropfens abgesaugt¹³.

Die Färbung erfolgte nach der Methode von BRYAN und BRINKLEY¹². Die Präparate wurden 10 min bei 55°C mit 1 N HCl hydrolysiert. Nach Spülen mit destilliertem Wasser wurde das ammoniakalische Silberreagens nach

BRYAN¹⁴ aufgebracht und in einer feuchten Kammer während etwa 8 h wirken gelassen. Anschliessend wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und dann mindestens 1 h, oft auch bis zu 12 h, mit 2% Ammoniumhydroxyd behandelt. Diese Behandlung verminderte den Silberoxydniederschlag, der viele Präparate unbrauchbar machte. Die Präparate wurden dann nach Metaphasenchromosomen abgesucht, es wurden Netzchen auf die entsprechenden Stellen aufgelegt und die Collodiumfolie auf einer Wasseroberfläche abgelöst. Für die Elektronen-

- 1 H. Ris, in *Handbook of Molecular Cytology* (Ed. A. LIMA-DE-FARIA; North-Holland, Amsterdam 1969), p. 222.
- 2 H. G. SCHWARZACHER, *Humangenetik* 10, 195 (1970).
- 3 H. Ris, *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 164, 246 (1966).
- 4 H. Ris, in *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis* (Eds. V. V. KONINGSBERGER and L. BOSCH; Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York 1967), p. 11.
- 5 J. G. GALL, *Chromosoma* 20, 221 (1966).
- 6 S. L. WOLFE, *Expl. Cell Res.* 37, 45 (1965).
- 7 S. L. WOLFE, *J. Ultrastruct. Res.* 72, 104 (1965).
- 8 H. G. SCHWARZACHER und W. SCHNEDL, *Humangenetik* 4, 153 (1967).
- 9 A. J. SOLARI, *Expl. Cell Res.* 53, 553 (1968).
- 10 A. J. SOLARI, *Expl. Cell Res.* 53, 567 (1968).
- 11 R. WETTSTEIN und J. R. SOTELO, *J. Ultrastruct. Res.* 13, 367 (1965).
- 12 J. H. D. BRYAN, *Q. J. microsc. Sci.* 105, 363 (1964).
- 13 E. H. R. FORD, K. THURLEY und D. H. M. WOOLLAM, *J. Anat.* 103, 143 (1968).
- 14 J. H. D. BRYAN und B. R. BRINKLEY, *Q. J. microsc. Sci.* 105, 367 (1964).

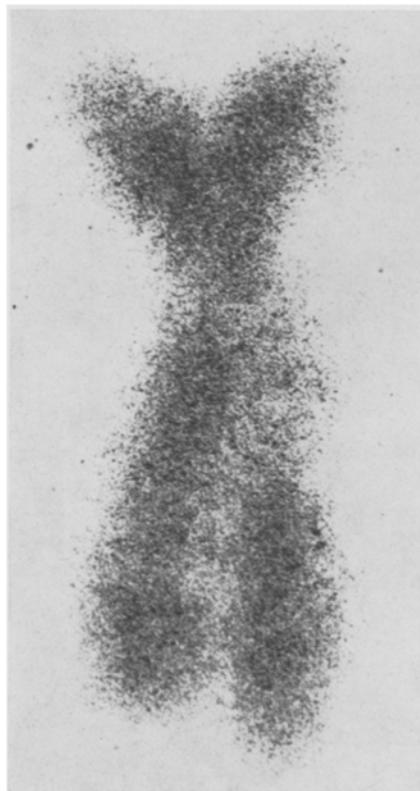


Fig. 1. Metaphasechromosom, Silberaldehydfärbung nach Hydrolyse. Vergr. 20 000 × 1,5.

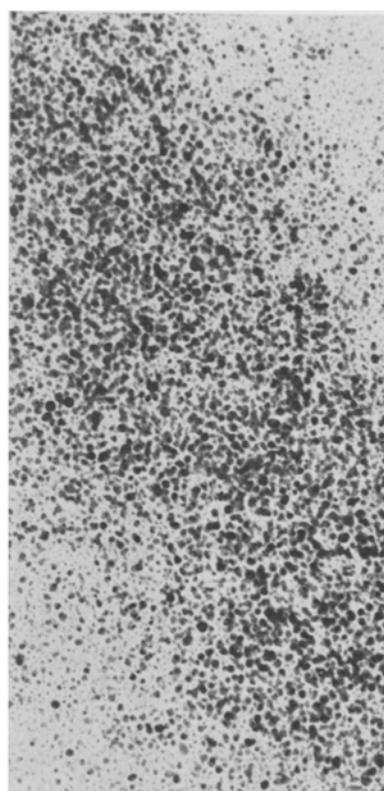


Fig. 2. Teil eines Metaphasechromosoms. Vergr. 40 000 × 2.

mikroskopie wurde ein Zeiss EM 9A verwendet, für initiale Vergrösserungen über 40.000fach ein Philips EM 300.

Bei schwächeren elektronenoptischen Vergrösserungen zeigen die Metaphasechromosomen die typischen Formen, die aus der Lichtmikroskopie bekannt sind (Figur 1). Das

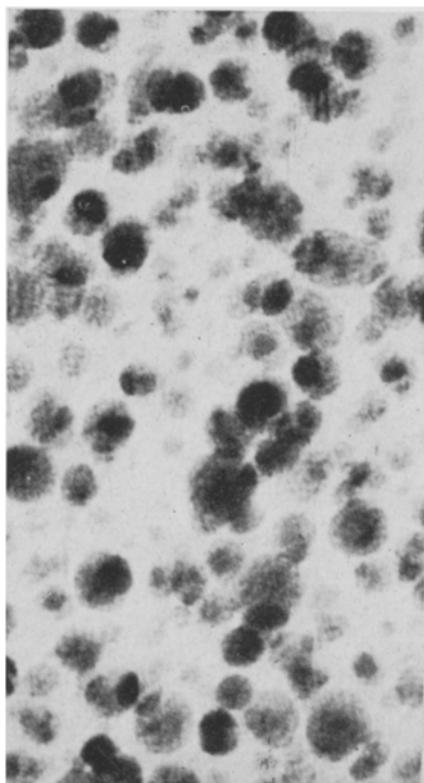


Fig. 3. Teil eines Metaphasechromosoms bei sehr starker Vergrösserung. Es lässt sich eine feine Streifung erkennen. Vergr. 250000 \times 2,25.

Chromosomenbild ist dabei in Punkte aufgelöst, die teilweise als zusammenhängende Ketten erscheinen (Figur 2). Eine ähnliche Auflösung in Punkte wurde auch von anderen Untersuchern^{8, 15} bei Kontrastierung mit Uranylacetat nach Hydrolyse gefunden. In Bildern mit elektronenoptischen Vergrösserungen von ca. 160 000 \times und 250 000 \times lässt sich eine Streifung innerhalb der gefärbten Stellen gut erkennen (Figur 3). Bei stärkerer lichtoptischer Nachvergrösserung wird ersichtlich, dass die Streifung auf das Vorhandensein einzelner Fibrillen zurückzuführen ist (Figuren 4 und 5). Dabei erscheinen im allgemeinen die Fibrillen, da wo sie über etwas längere Distanz verfolgt werden können, dicht gepackt und in unregelmässiger Weise gefaltet (Figur 4). Anderseits laufen diese Fibrillen an einzelnen Stellen parallel, wie das z.B. die Figur 5 zeigt. Hier lässt sich auch am leichtesten die Dimension der Einzelfibrillen zu ca. 20 Å bestimmen.

Aus der Figur 3 ist zu erkennen, dass sich diese Fibrillen in den Chromosomenkörper fortsetzen. Die stärker gefärbten Stellen, die als Punkte in Erscheinung treten, lassen sich so interpretieren, dass durch die Hydrolyse bei 55°C die Histone der äussersten Teile des Chromosoms weggelöst werden und diese zur Kontrastierung vorbereitet werden. Die stärker gefärbten Punkte wären somit Teile des Chromosoms, die stärker aus dem Chromosomenkörper herausragen.

Der Fibrillendurchmesser von 20 Å entspricht der Grössenordnung der DNS-Doppelhelix. Entsprechende Elementareinheiten von 15–20 Å wurden auch in Schnittpräparaten gefunden^{8, 11}. Nach Spreitung von Seeigelspermien auf Wasser wurden kleinste Fibrillen von 20–30 Å beschrieben^{9, 10}, an gespreiteten Nucleohiston-Fibrillen aus Kalbstthymus 20 Å-Einheiten in 100 Å-Fibrillen¹. Für die Unterschiede in den gefundenen Werten sind dabei wohl die verschiedenen Präparationstechniken verantwortlich. Die vorliegende Arbeit bestätigt somit die

¹⁵ N. A. BARNICOT and H. E. HUXLEY, Ann. hum. Genet. 25, 253 (1961).

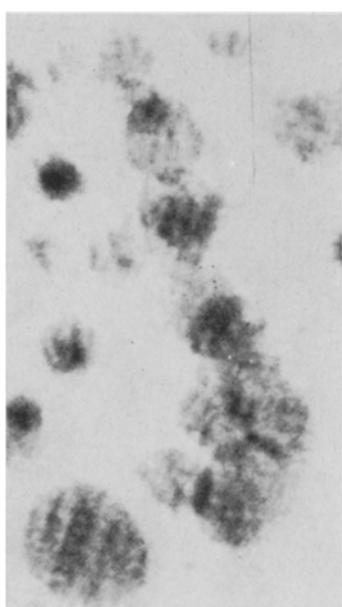


Fig. 4. Einzelheit eines Metaphasechromosoms. Vielfach gedrehte Fibrillen sind erkennbar. Vergr. 160000 \times 7.

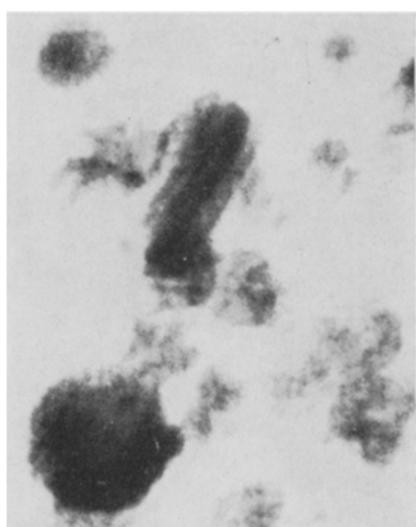


Fig. 5. Einzelheit eines Metaphasechromosoms. Es sind parallel verlaufende Fibrillen zu erkennen. Vergr. 160000 \times 7.

Existenz einer Elementarfibrille von ca. 20 Å Durchmesser und kann sie im Metaphasechromosom *in situ* demonstrieren¹⁶.

Summary. Tightly packed elementary fibrils with a diameter of 20 Å are demonstrated in human metaphase chromosomes *in situ*.

P. AUF DER MAUR

¹⁶ Für die Mithilfe bei der Präparation danke ich Frau M. BRUN DEL RE; für die Aufnahmen mit dem Philips EM 300 bin ich Herrn J. DI LULLO vom Veterinärmedizinischen Institut der Universität Bern zu Dank verpflichtet.

*Pathologisches Institut der Universität Bern,
Cytogenetisches Laboratorium, Freiburgstrasse 30,
CH-3000 Bern (Schweiz), 23 Dezember 1971.*

Pycnotic Degeneration of Ventricular Cells in Embryonic Brain Following Transplacental Exposure to 5-Azacytidine

In the present work the transplacental effect of 5-azacytidine on ventricular cells¹ of 14-day embryonic mouse brain was studied. Of special interest was the timing of the appearance of pycnotic nuclei in the ventricular zone following 5-azacytidine², as well as the increase in their number and localization. In order to find out whether these nuclei migrate prior to their pycnotic degeneration and whether they are able to synthesize DNA at that time, thymidine-³H has been administered to mothers and subsequently autoradiographic preparations have been made from embryonic mice killed at different time intervals following simultaneous administration of the label with 5-azacytidine.

Material and methods. For the experiments groups of 4 female mice (pregnancy day 14) belonging to the random-bred strain H, kept under standard conditions, were used. The mice with vaginal plugs or sperms in vagina were isolated from male, and that day was regarded as day 1 of gestation. Thymidine-³H (5.0 Ci/mmol) was injected to mothers (100 µCi/animal) i.p. simultaneously with 5-azacytidine at the dose level of 3 mg/kg. The mice were killed 4, 8, 12 and 24 h after the administration, and the foetuses were embedded in paraffin. Sections were cut at 5 µ, coated with a stripping film Kodak AR. 10 and exposed for 2 weeks at -15°C. The slides were developed and stained with hematoxylin-eosin. Two embryos from each litter were processed for autoradiography. The average background values were less than 1 grain per 10 nuclei. In each slide 1250 ventricular nuclei¹, comprising 25 nuclear layers running parallel to the inner surface of the neural tube, were evaluated; 50 nuclei were counted in each layer.

Results. Table I indicates that following 5-azacytidine the labelling of ventricular nuclei is more considerable than in the control. At 12–24 h after 5-azacytidine the number of heavily labelled nuclei (more than 6 grains per nucleus) remains unchanged, whereas their amount diminishes progressively in controls. The number of pycnotic nuclei increases between 4 and 12 h following 5-azacytidine. At all times 60–66% of pycnotic nuclei are heavily labelled (Table II). Between 12 and 24 h, pycnotic nuclei migrate from inner to external layers of ventricular zone (Figure). The emergence of pycnotic nuclei is preceded by the accumulation of heavily labelled mitotic figures in the region of the inner surface of ventricular zone at 4 and 8 h, while at 12 and 24 h the mitotic index is significantly diminished (Table III).

Comparing the number of mitotic figures and pycnotic cells present in the ventricular zone (Table IV), it seems permissible to conclude that following 5-azacytidine mitoses in their majority undergo pycnotic degeneration. If the number of ventricular mitotic nuclei and that of pycnotic nuclei present at a given time interval is added together, the value thus obtained closely corresponds to the number of pycnotic nuclei actually observed at the following time interval (Table IV).

Discussion. The pycnotic degeneration of the ventricular cells occurs as a result of the disturbance of internal

Table I. Labelling of nuclei in ventricular zone of mouse embryonic brain according to mean grain counts following simultaneous administration of thymidine-³H and 5-azacytidine *in vivo*

Time after application (h)	Nuclei (%)					
	Unlabelled	4–6 grains	7 and more grains	Unlabelled	4–6 grains	7 and more grains
8	68 ^a	50 ^b	24 ^a	24 ^b	8 ^a	26 ^b
12	80	60	16	16	4	24
24	88	64	12	12	0	24

^aControls. ^bFollowing 5-azacytidine. The nuclei have been arranged percentually into 3 classes according to their respective mean grain counts (unlabelled, 0–3; 4–6; and 7 and more grains per average nucleus).

Table II. Percentage of pycnotic nuclei in ventricular zone of mouse embryonic brain and their labelling following simultaneous administration of thymidine-³H and 5-azacytidine *in vivo*

Time after application (h)	Pycnotic nuclei (%)	Nuclei (%)		
		Unlabelled	4–6 grains	7 and more grains
8	14	32	5	63
12	36	12	22	66
24	38	13	27	60

All pycnotic nuclei have been arranged percentually into 3 different classes according to their respective mean grain counts.