

Über den Einfluß von Trenimon und Endoxan auf die Meiose der männlichen Maus*

I. Methodik der Präparation und Analyse meiotischer Teilungen

E. SCHLEIERMACHER

Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. VOGEL)

Eingegangen am 11. Januar 1966

A modified method for examination of chromosomes of meiotic cells in mammalian testes is described. A cell suspension is prepared from the tubules of the whole testis by use of hyaluronidase and stirring for 20 to 30 minutes. Using standard procedures this suspension is worked up into air — dried preparations. The method gives a very high yield of good pictures of several meiotic stages, especially of first and second metaphases and diakinesis, but also of diplotene. The slides are evaluated using a Zeiss-photomicroscop combined with a Zeiss-drawing-apparatus. This combination makes use of the advantage of drawing as well as photographing without change of the microscopic field.

A. Einführung

Für die Präparation meiotischer Teilungen aus den Testes der Säuger stehen grundsätzlich zwei Methoden zur Verfügung, die Quetschmethode (OHNO u. a., 1959; WELSHONS u. a., 1962; BÖÖK u. KJESSLER, 1964) und die Lufttrockenmethode (BENIRSCHKE u. BROWNHILL, 1963; EVANS u. a., 1964).

Die Rhythmik der Spermatogenese der Säuger mit dem wellenförmigen Ablauf der Zellbildung in Richtung der Tubuluslängsachse führt zu einer Häufung gleicher Teilungsstadien in bestimmten Tubulusabschnitten. Dieser Umstand wirkt sich bei der Quetschmethode äußerst nachteilig aus. Eine große Anzahl der hergestellten Präparate muß aus Mangel an den gewünschten Teilungsphasen verworfen werden. In anderen Präparaten führt eine starke Häufung von Teilungen zu Überschneidungen, die eine klare und sichere Beurteilung der Chromosomen nur bei wenigen Zellen zulassen.

Für Untersuchungen, die die Analyse einer größtmöglichen Zahl von meiotischen Teilungen erfordern, muß deswegen den Methoden, mittels Zellsuspensionen Lufttrockenpräparate herzustellen, der Vorzug gegeben werden. Bei einer derartigen Methode (EVANS u. a., 1964) wird die erforderliche Zellsuspension aus Hodenparenchym auf mechanischem Weg durch Ausstreifen des Tubulusinhalts mit feinen Pinzetten in 2,2%iger Natrium-Citratlösung gewonnen.

Die Anwendung von Hyaluronidase bietet eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von Zellsuspensionen. Hyaluronidase steigert die Bindegewebsthroughlässigkeit und baut Chondroitinschwefelsäure und Hyaluronsäure bis zu Monosacchariden

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

ab (RÖMPP 1962). Durch diesen Umbau der Intercellularsubstanz wird die Möglichkeit gegeben, die Zellen besonders leicht aus dem Zellverband oder dem Stützgewebe, an dem sie haften, herauszulösen. ZWEIDLER benutzt Hyaluronidase, um Zellsuspensionen aus soliden Tumoren für eine Suspensionskultur-Technik zu gewinnen. Von LEJEUNE wird Hyaluronidase bei der hypotonischen Behandlung von Blut- und Fibroblastenkulturen angewandt.

B. Beschreibung der Methode

a) Vorgehen bei der Präparation mit Hyaluronidase

Unter Ausnutzung dieser Prinzipien haben wir eine einfache und zeitsparende Methode gefunden, um Meiosen und Mitosen aus Säugertestes zu präparieren. Die Methode wurde mit dem Ziel cytogenetischer Untersuchungen der Spermatogenese der Maus entwickelt und liefert ausgezeichnete Ergebnisse.

Im einzelnen wurden folgende Schritte beachtet:

1. Präparation der Testes, nachdem die Tiere 1—2 Std nach intraperitonealer Injektion von Colcemid (0,5 ml einer 0,04%igen Lösung) getötet worden sind.

2. Dekapsulierung der Testes in Blockschälchen in 37° C warmer 1%iger Natriumcitratlösung. Sorgfältige Entfernung der Hodenhüllen. Das Hodenparenchym wird mit Irisschere und Pinzette möglichst fein zerkleinert.

3. Überführen des Materials mittels Pasteurpipette in eine frisch zubereitete Lösung von Hyaluronidase in 1%igem Natriumcitrat (150 i.E. Hyaluronidase in 10 ml Natriumcitrat. Dem entspricht 1 Amp. Kinetin (Schering) oder Apertase (Hoechst) oder 0,3 mg Hyaluronidase der Firma Serva, Heidelberg).

4. Langsames Rühren auf dem Magnetrührer 20—30 min. Nach etwa 10 min wird die vorher klare Flüssigkeit trüb.

5. Danach läßt man die groben Gewebepartikel absinken. Vorsichtiges Überführen der Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen. Wir ziehen dabei Röhrchen mit geringem Durchmesser (ca. 1 cm) den weiteren 10 oder 15 ml Zentrifugenröhrchen vor. Das gewonnene Material kann darin nach Fixierung besser ausgenutzt werden.

6. Zentrifugieren 10 min bei 1000—1200 U/min (170 g—240 g). Abpipettieren des durch unvollständig sedimentierte Spermien noch trüben Überstandes. Der Zellsatz wird in einem verbliebenen Rest der Flüssigkeit mit der Pasteurpipette sorgfältig resuspendiert.

7. Vorsichtiges Fixieren durch langsames tropfenweises Zugeben von Alkohol-Essigsäure (Methylalkohol : Eisessig = 1 : 3). Die beiden letzten Schritte müssen besonders sorgfältig ausgeführt werden, um ein Verklumpen der Zellen bei der Fixierung zu vermeiden (MOORHEAD u. a., 1960).

8. Wenige Minuten stehen lassen. Erneutes Zentrifugieren — 5—10 min — und Wechsel des Fixierungsmittels. Dann eine ½ Std bis mehrere Stunden im Kühlschrank stehen lassen.

9. Nach nochmaligem Zentrifugieren wird mit frischem Fixierungsmittel eine weißlich-trübe Suspension hergestellt (0,5—1 ml für das aus einem Testis gewonnene Material) und auf gereinigte, fettfreie Objektträger aufgetropft. 3—5 Tropfen werden durch Neigen des Objektträgers und leichtes Blasen möglichst gleichmäßig verteilt, so daß nichts über den Rand abfließt. Der Abstand der Zellkerne auf dem Präparat soll durchschnittlich nicht weniger als einen Kerndurchmesser betragen.

10. Trocknen der Präparate bei Zimmertemperatur, Färben in 1—2%igem Aceto-Orcein, Alkoholreihe, Xylol, Eindecken mit DePeX oder ähnlichem. Die orceingefärbten Präparate werden in den niederen Alkoholstufen sehr rasch ausdifferenziert und sollen deswegen jeweils nur sehr kurz dort verbleiben.

Die Schritte 5 bis 10 entsprechen im wesentlichen den allgemein üblich gewordenen Verfahren zur Herstellung von Dauerpräparaten und können in individueller Weise variiert werden.

b) Eine Anordnung für die mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Präparate nehmen wir am Zeiss-Photomikroskop vor. Wir haben auf den Tubuskopf des Photomikroskopes den Zeiss-Zeichenapparat mit einem zweiten Binocular montiert. Durch den Zeichenapparat wird die Zeichenfläche, die von einer Tischlampe beleuchtet sein muß, in die Ebene des mikroskopischen Bildes eingespiegelt. Das Binocular am Tubuskopf wird zum Beobachten und Photographieren verwandt. Mit dem zweiten Binocular wird gezeichnet. Der Wechsel zwischen den beiden Möglichkeiten geschieht durch das Reflexionssystem im Tubuskopf. Das Reflexionssystem im Zeichenapparat erlaubt eine Einstellung des mikroskopischen Bildes allein, des mikroskopischen Bildes mit der Zeichenfläche oder der Zeichenfläche allein. Die Helligkeit des mikroskopischen Bildes muß auf die Helligkeit der Zeichenfläche abgestimmt werden. Die Austrittsöffnung des Zeichenapparates und das zugehörige Binocular sind mit den Ocularen Kpl-W 12,5 x ausgerüstet. Gezeichnet wird bei Stellung 2 des Optovars mit Durchlicht oder Phasenkontrast. Die Zeichnungen erhalten unter Verwendung der Ölimmersion 100 eine 3800fache Vergrößerung. Mit dem Optovar 1,25 oder 1,6 erhält man 2300- bzw. 2900fache Vergrößerungen. Um mühelos zwischen den verschieden hohen Binocularen wählen zu können, wird ein leicht in seiner Höhe verstellbarer Bürostuhl (Lift-O-mat der Firma Bremshey, Solingen-Ohligs) benutzt, der sich durch Druck auf eine Taste senkt und dessen Sitzfläche durch Druck auf dieselbe Taste angehoben wird, wenn sie nicht belastet ist.

C. Diskussion

Die Bedeutung von Untersuchungen der Meiose wurde in den vergangenen Jahren von verschiedener Seite hervorgehoben. EVANS u. a. (1964) betonen den großen Informationsgehalt durch Beobachtung des Paarungsverhaltens strukturell abartiger Chromosomen, durch Bestimmung von Chiasmahäufigkeiten und die Schätzung der möglichen Produktion von Gameten bei Strukturheterozygoten. Besonders wertvoll sind Methoden, die die Analyse einer unbeschränkt großen Zahl von Teilungen gestatten, für die Erforschung von mutagenen Einflüssen auf die Spermatogenese der Säuger.

Die Vorteile der von uns beschriebenen Methode liegen in der Einfachheit und Sicherheit der Handhabung und in der Güte der Präparate (Abb. 1—3). Die Anwendung an mehr als 100 Mäusetesten hat immer dieselben konstanten guten Ergebnisse geliefert. In den meisten unserer Präparate finden wir mehr als 500 gute Teilungen. Damit erhalten wir von einem Tier mehr Meiosen, als wir aus zeitlichen Gründen auswerten können. Die Häufigkeit der Teilungen in unseren Präparaten liegt um mehr als das Doppelte höher als die von EVANS u. Mitarb. angegebene. Die Chromosomen werden sehr klar dargestellt und lassen in höherem Maße eine Analyse ihrer Feinstruktur zu, als es nach unseren Erfahrungen die Methode von EVANS u. Mitarb. ermöglicht. Hierdurch wird unsere Methode für die Mutationsforschung besonders geeignet.

Der Erfolg der Anwendung von Hyaluronidase zur Gewinnung von Zellsuspensionen durch ZWEIDLER (solide Tumoren) und durch uns steht in Widerspruch zu Erfahrungen in der Gewebezüchtung, nach denen durch Hyaluronidase keine dispersive Wirkung an Hühnerembryonen und erwachsenen Geweben gesehen wurde

(MOSCONA u. a. 1965). Mit Trypsin haben wir bei ähnlichen Versuchen nur negative Ergebnisse erhalten.

Unsere Methode ist ähnlich wie die von EVANS u. Mitarb. angegebene für Untersuchungen an I. und II. Metaphasen und an Diakinesen geeignet. Im Gegensatz zu diesen Autoren sehen wir auch häufig gut gestreute Diplotän-Chromosomen. Im

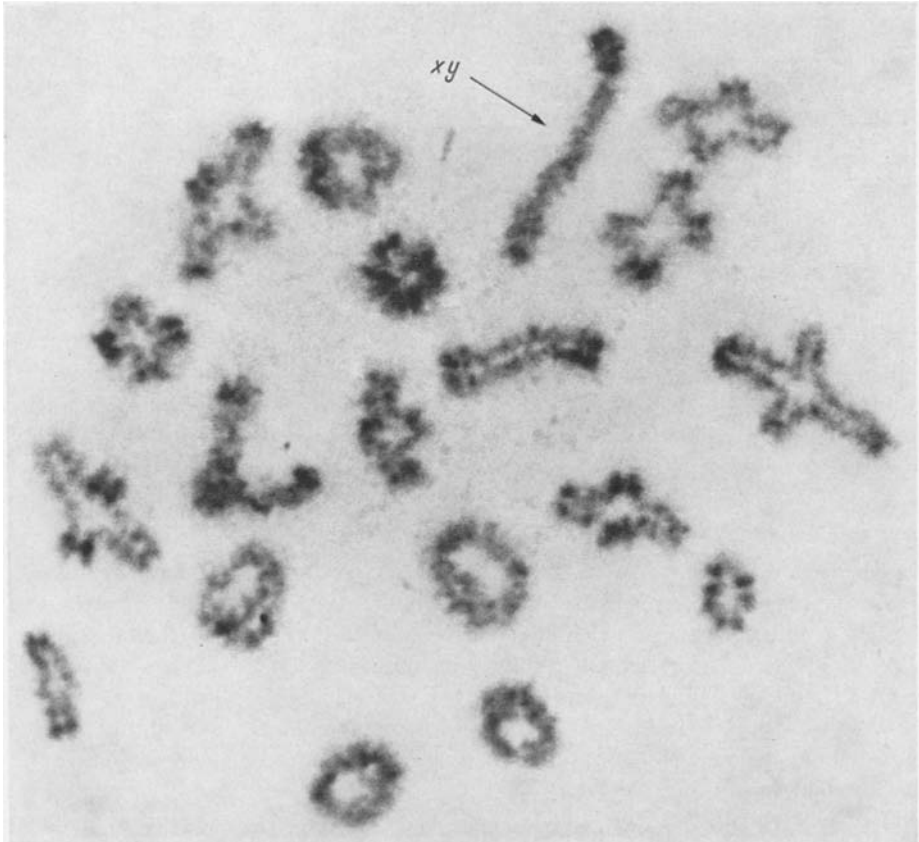


Abb. 1. Meiose der männlichen Maus, Diplotän. Die Chromosomen sind nur wenig kondensiert, die centromernahen Abschnitte sind in fast allen Bivalenten erkennbar. Das X-Chromosom im Sex-Bivalent ist weniger heteropyknotisch als das Y

Pachytän erfahren die Bivalente nur selten eine genügend gute Ausbreitung, um eine klare Beurteilung ihrer Struktur zuzulassen. Den geringen Gehalt der Präparate an Mitosen von Spermatogonien, den EVANS auf festeren Halt dieser Zellen in den Tubuli zurückführen möchte, beobachten wir auch. Diese Erscheinung geht wohl eher auf die normale Häufigkeitsverteilung der Zelltypen im Testis zurück. In Präparaten von Tieren, die mit einem Cytostatikum behandelt wurden, findet man zu bestimmten Zeiten nach der Behandlung wesentlich mehr Mitosen als Meiosen.

Die Kombination des Zeiss-Photomikroskops mit einem Zeichenapparat hat sich als sehr nützlich erwiesen. Der Wert des Zeichnens bei der mikroskopischen Analyse biologischer Objekte braucht nicht besonders hervorgehoben zu werden.

Mit unserer Anordnung kann in der üblichen Weise mikroskopiert und photographiert und ohne Änderung der mikroskopischen Einstellung kann auch gezeichnet werden. Diese Möglichkeit wirkt sich sehr zeitsparend aus, sie führt aber auch



Abb. 2. Meiose der männlichen Maus, Diakinese — I. Metaphase. Die Chromatide heben sich klar und deutlich hervor. Chiasmen sind nur in einem Teil der Bivalente terminalisiert

zu einer großen Ersparnis an photographischer Arbeit. Durch ihre Genauigkeit erhalten die Zeichnungen dokumentarischen Wert. Die übermäßige Vergrößerung, die durch die Tubusverlängerung durch den Zeichenapparat zustande kommt, und

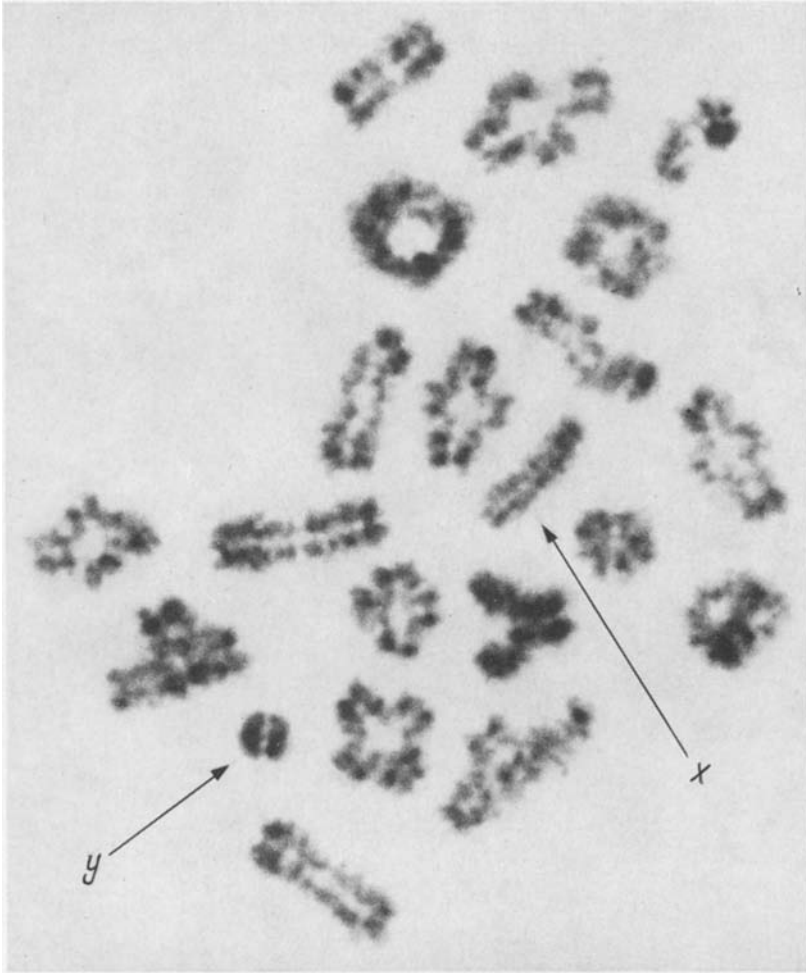


Abb. 3. Meiose der männlichen Maus, Diakinese. X- und Y-Chromosom sind durch Desynapsis getrennt und liegen als Univalente vor

das Auflösungsvermögen des Mikroskopes weit überschreitet, wirkt sich beim Zeichnen nicht nachteilig aus. Jedoch muß zur sicheren Erkennung bestimmter Feinstrukturen gelegentlich auf die normale Vergrößerung zurückgegriffen werden. Dieses kann ohne sonderliche körperliche Anstrengung mit Hilfe des „Lift-O-Mat“ an dem dafür vorgesehenen unteren Binocular geschehen.

Literatur

- BENIRSCHKE, K., and L. E. BROWNHILL: Heterosexual cells in testes of chimeric marmoset monkeys. *Cytogenetics* **2**, 331—341 (1963).
- BÖÖK, J. A., and B. KJESSLER: Meiosis in the human male. *Cytogenetics* **3**, 143—147 (1964).
- EVANS, E. P., G. BRECKON, and C. E. FORD: An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics* **3**, 289—294 (1964).
- LEJEUNE, J.: in R. TURPIN et J. LEJEUNE: *Les Chromosomes Humains*, Chapitre II. Technique, 15—44. Paris: Gauthiers-Villars, 1965.

- MOORDHEAD, P. S., W. P. NOVELL, W. J. MELLMAN, D. M. BATTIPS, and D. A. HUNGERFORD: Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **20**, 613—616 (1960).
- MOSKONA, A., O. A. TROWELL, and E. N. WILLMER: in E. N. WILLMER: *Cells and Tissues in Culture*, Vol. 1, Chapter 2, Methods, p. 19—86. London-New York: Academic Press, 1965.
- OHNO, S., W. D. KAPLAN, and R. KINOSITA: On the end-to-end association of the X- and Y-chromosomes of *Mus musculus*. *Exp. Cell Res.* **18**, 282—290 (1959).
- RÖMPP, H.: *Chemie-Lexikon*, 5. Aufl. Stuttgart: Francksche Verlagshandlung, 1962.
- WELSHONS, W. J., B. H. GIBSON, and B. J. SCANDLYN: Slide processing for the examination of male mammalian meiotic chromosomes. *Stain Technol.* **37**, 1—5 (1962).
- ZWEIDLER, A.: persönliche Mitteilung.

Dr. ENGELHARDT SCHLEIERMACHER
Institut für Anthropologie und Humangenetik
69 Heidelberg, Mönchhofstraße 15 A