

## Proportionalitätsfehler bei der Feulgen-Hydrolyse

N. BÖHM, E. SPRENGER, G. SCHLÜTER und W. SANDRITTER\*

Pathologisches Institut der Universität Freiburg (Direktor: Prof. Dr. W. SANDRITTER)

Eingegangen am 10. Juni 1968

### *Proportionality Errors during Feulgen Hydrolysis*

*Summary.* Comparing the Feulgen dye-content of different nuclei (liver cells, lymphocytes, granulocytes and sperms) after alcohol-fixation deviations were found between the measured Feulgen values and the DNA-content to be expected from the DNA-constancy law. The Feulgen values of lymphocytes and granulocytes proved to be lower (up to minus 20%) than those of diploid liver nuclei at all hydrolysis times, while in the postmaximal range of hydrolysis the values of the haploid sperms were too high (even higher than those of the diploid nuclei). Such differences did not appear when nuclei of the same cell type in different DNA-ploidy classes (liver nuclei) were compared.

Those deviations of leucocytes and sperms were no longer found *after fixation in methanol-formalin-glacial acetic acid* and, in addition, could not be confirmed by UV-absorption measurements. For that reason we suppose them to be due to proportionality errors caused by variations in the hydrolytic behaviour of the different nucleoproteins.

Thus fixation in methanol-formalin-glacial acetic acid seems to be more suitable for quantitative Feulgen measurements than alcohol-fixation, which may easily give rise to proportionality errors during Feulgen hydrolysis.

Moreover, to avoid any false interpretation of Feulgen data we should suggest control measurements using another independent method (f. e. UV-absorption), or — if this is impossible — to check the Feulgen values after different fixations and variant hydrolysis times (premaximal, maximal, postmaximal).

*Zusammenfassung.* Beim Vergleich des Feulgen-Farbgehaltes verschiedener Zellkerne (Leberzellen, Lymphozyten, Granulozyten und Spermien) traten *nach Alkoholfixierung* Abweichungen der gemessenen Feulgen-Werte von den nach dem Gesetz von der DNS-Konstanz zu erwartenden DNS-Gehalt dieser Kerne auf. Verglichen mit den Feulgen-Werten der diploiden Leberzellkerne ergaben Lympho- und Granulozyten bei allen Hydrolysezeiten zu niedrige (bis zu minus 20%), haploide Spermien im postmaximalen Hydrolysebereich zu hohe Feulgen-Werte (z. T. sogar höhere Werte als die diploiden Zellkerne). Innerhalb desselben Zelltypes wurden dagegen, auch beim Vergleich der verschiedenen Ploidiestufen der Leberkerne, keine Differenzen festgestellt.

Da die an Leukozyten und Spermien beobachteten Abweichungen nach *Methanol-Formalin-Eisessig-Fixierung* nicht mehr auftraten und auch durch UV-absorptioncytophotometrische Messungen nicht bestätigt werden konnten, muß man annehmen, daß es sich um Proportionalitätsfehler handelt, die auf Hydrolyseunterschieden beruhen.

Für die quantitative Feulgen-Cytophotometrie scheint daher die Methanol-Formalin-Eisessig-Fixierung besser geeignet zu sein als die Alkoholfixierung, bei deren Verwendung es leicht zu Proportionalitätsfehlern während der Feulgen-Hydrolyse kommen kann.

### Einleitung

In den letzten Jahren wurde wiederholt von verschiedenen Autoren über verminderte Feulgen-DNS-Werte reifer Leukozyten im Vergleich zu anderen diploiden Somazellkernen berichtet (ATKIN and RICHARDS, 1956; HALE, 1963; MAYALL, 1967). GARCIA (1967) fand darüber hinaus auch erniedrigte Farbwerte für Spermien. Da echte Abweichungen von dem Gesetz der DNS-Konstanz mit anderen Methoden (UV-Absorption) jedoch nicht nachgewiesen werden

\*Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

konnten (SANDRITTER et al., 1960), wurde als Ursache für den verminderten Feulgen-Farbgehalt ein Hydrolyse- oder Färbefehler diskutiert, durch den es zu einer Verschiebung der Proportionalität zwischen der gebundenen Farbstoffmenge und dem tatsächlichen DNS-Gehalt kommt (SRINIVASACHAR and PATAU, 1959). Die Möglichkeit eines solchen Fehlers stellt natürlich einen stark begrenzenden Faktor dar für die quantitative DNS-Bestimmung mit der Feulgen-Reaktion. In der vorliegenden Arbeit sollte daher an Beispielen von Hydrolyse-Zeit-Kurven verschiedener Zellkerne (Leberzellen, Lymphozyten, Granulozyten und Spermien) untersucht werden, unter welchen Fixierungs- und Hydrolysebedingungen möglicherweise ein Proportionalitätsfehler auftritt.

### Material und Methoden

Es wurden *Spermien* und *Leberzellen*, sowie in den Leberausstrichen enthaltene *periphere Lympho- und Granulozyten* auf jeweils einen Objektträger aufgebracht, so daß die Fixierungs-, Hydrolyse- und Färbbedingungen für alle Zellen, deren Farbgehalt unmittelbar miteinander verglichen werden sollte, gleichartig waren.

Die Spermien wurden z. T. aus dem Ejakulat eines fertilen Mannes (1. Meßreihe), z. T. aus dem Nebenhodenkopf eines Meerschweinchens (2. und 3. Meßreihe) gewonnen, in einigen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und auf sorgfältig gereinigten Objektträgern ausgestrichen.

Auf denselben Objektträgern wurden dann Lebergewebsstückchen einer in Äthernarkose getöteten und ausgebluteten weißen Maus ausgestrichen. Die Präparate wurden sofort in die Fixierungsflüssigkeiten eingestellt.

**Fixierung:** Die Präparate der 1. und 2. Meßreihe wurden in 70%igen Isopropylalkohol (Alkoholfixierung), alle übrigen Ausstriche in einer Mischung aus 85% Methanol, 10% handelsübliches Formalin und 5% Eisessig (Mischfixierung) mindestens 1 Std lang fixiert. Die mit formalinhaltigen Fixierungsmitteln behandelten Präparate wurden zusätzlich vor der Hydrolyse jeweils 10 min lang in Aqua dest. gewässert, um Formalinreste auszuwaschen.

**Hydrolyse:** Die Hydrolyse wurde in 5 N HCl (1. Meßreihe) und in 4 N HCl (2. und 3. Meßreihe) bei 28° C in einem temperaturregulierten Wasserbad ( $\pm 0,2^\circ$  C) durchgeführt (BÖHM, 1968). Die am längsten zu hydrolysierenden Ausstriche wurden jeweils zuerst in die Hydrolyseflüssigkeit gebracht, so daß am Ende einer Hydrolysereihe alle Präparate gleichzeitig aus der Säure entfernt und zusammen mit einem nicht hydrolysierten Kontrollausstrich gemeinsam gefärbt werden konnten.

**Färbung:** Die Präparate wurden in einem mit basischem Pararosanilin (C. I. Nr. 42500, Firma Merck, Darmstadt) angesetzten Schiffschens Reagens (nach GRAUMANN, 1953) 1 Std lang bei Zimmertemperatur gefärbt, danach in üblicher Weise dreimal 10 min lang in Aqua dest. ausgewaschen, durch die aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol dehydriert und in Cargille-Oil (Firma Cargille Lab., Cedar Grove, N. Y., USA) mit angepaßtem Brechungsindex ( $n_D^{20} = 1,54$ ) eingedeckt. Um ein Ausbleichen des Feulgen-Farbstoffes zu verhindern (KASTEN et al., 1962; BENWITZ, 1964), wurden die Präparate bis zu ihrer Messung im Dunkeln aufbewahrt.

Für eine methodisch unabhängige *UV-cytophotometrische Kontrollmessung* wurde ein mischfixiertes Ausstrichpräparat auf einem Quarzobjektträger 2 Std lang in eine RNase-Lösung (1 mg RNase pro 1 ml Aqua dest.; RNase 15331 der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim) inkubiert, 10 min in Aqua dest. gespült, durch die aufsteigende Alkoholreihe bis zum absoluten Alkohol dehydriert und mit einem Quarzdeckgläschen in wasserfreies Glycerin ( $n_D^{20} = 1,455$ ) eingebettet.

**Messungen:** Die cytophotometrischen Messungen des Feulgen-Farbgehaltes der Zellkerne wurden mit dem integrierenden Mikrodensitometer nach DEELEY (1955) (Firma Barr & Stroud, Glasgow) vorgenommen (Lampenspannung 9 V; Kondensator n. A. 0,3; Objektiv 100  $\times$  n. A. 1,25; Meßpunktdurchmesser 0,7  $\mu$ ; Wellenlänge  $\lambda$  565 nm; Extinktionsniveau 0,75). Jeder Kurvenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus 30 (Spermien und diploide Leberkerne), bzw. 15 Einzelwerten (Lympho- und Granulozyten, tetra- und oktaploide Leberzellkerne).

Die UV-cytophotometrischen Kontrollmessungen wurden an dem Ultramikrospektrograph (UMSPI der Firma Zeiss, Oberkochen) mit Schnellscanningansatz durchgeführt (Kondensator n. A. 0,85, abgeblendet auf 0,3; Objektiv Ultrafluor  $100\times$  n. A. 1,25; Durchmesser der Leuchtfeldblende  $2\mu$ ; Meßpunktdurchmesser  $1\mu$ ; Abstand der Scanninglinien  $1\mu$ ). Zur Berechnung des DNS-Gehaltes der Zellkerne wurde eine von SANDRITTER u. Mitarb. (1960) angegebene 3-Wellenlängen-Formel benutzt. Es wurden die Mittelwerte aus jeweils 10 Kernmessungen errechnet.

### Ergebnisse

*Alkoholfixierte Leberausstriche und menschliche Spermien, Hydrolyse in 5 N HCl* (1. Meßreihe). Die Ergebnisse der Messungen an den verschiedenen Zelltypen sind in Abb. 1 graphisch dargestellt. Der Verlauf der Hydrolysekurven ist für

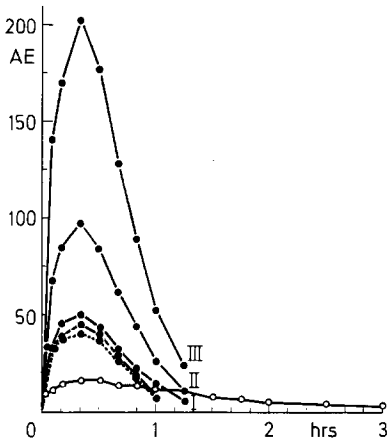


Abb. 1. Feulgen-Hydrolysekurven von Leberzellkernen (I diploide, II tetraploide, III oktaploide Kerne), Lymphozyten (●- - - ●), Granulozyten (●- - - ●) und Spermien (o-o) nach Alkoholfixierung und Hydrolyse in 5 N HCl. Ordinate: Farbmenge pro Zellkern in relativen Arbeitseinheiten (AE). Abszisse: Hydrolysedauer in Stunden (hrs)

die verschiedenen Klassen der Leberzellkerne (di-, tetra- und oktaploid), sowie für Lympho- und Granulozytenkerne sehr ähnlich. Nach einem steilen Kurvenanstieg wird nach 20 min Hydrolyse ein spitzes Maximum erreicht, danach fallen die Kurven wieder ab. Im Maximum wurden  $49,7 \pm 1,1$  AE für die diploiden (DNS-Klasse I),  $97,5 \pm 2,2$  AE für die tetraploiden (DNS-Klasse II) und  $202,0 \pm 3,0$  AE für die oktaploiden Leberzellkerne (DNS Klasse III) gemessen. Hieraus ergibt sich ein auf den diploiden Leberzellwert bezogenes Feulgenfarbstoffverhältnis von 1:1,96:2,06. Auch bei allen anderen Hydrolysezeiten stehen die in den di-, tetra- und oktaploiden Leberkernen gemessenen Feulgenwerte entsprechend dem jeweils verdoppelten DNS-Gehalt dieser Kerne im Verhältnis, 1:2:4 (BÖHM, 1968).

Da es sich bei den gemessenen Lympho- und Granulozytenkernen um diploide Kerne (DNS-Klasse I) handelt, wäre zu erwarten, daß sich die Hydrolysekurven dieser Kerne sowohl untereinander als auch mit der der diploiden Leberkerne decken. Aus Abb. 1 wird deutlich, daß dies nach Alkoholfixierung jedoch nicht der Fall ist. Die für Lympho- und Granulozytenkerne gemessenen Feulgenwerte sind bei allen Hydrolysezeiten niedriger als die der diploiden Leberzellkerne. Bei kurzen Hydrolysezeiten (nach 2 bzw. 5 min Hydrolysedauer) ist die Abweichung noch gering (minus 2—3%); im Hydrolysemaximum (nach 20 min Hydrolyse) beträgt sie für Lymphozytenkerne minus 20% ( $40,0 \pm 4,3$  AE statt 49,7 AE), und für Granulozytenkerne minus 8% ( $45,8 \pm 3,2$  AE). Diese Abweichung bleibt auch im abfallenden Kurvenschenkel etwa in der gleichen Höhe erhalten, wobei die Meßwerte der Lymphozyten immer etwas niedriger sind als die der Granulozyten. Nach 75 min Hydrolysezeit konnte in den Blutzellen, und nach 90 min Hydrolyse auch in den Leberzellen eine Anfärbung nicht mehr gemessen werden.

Die Hydrolysekurve der Spermien läßt einen von den bisher beschriebenen Kurven erheblich abweichenden Verlauf erkennen. Nach einem steilen Kurvenanstieg wird ein Gipfelplateau bei 20–30 min Hydrolyse ausgebildet. Der hier gemessene Feulgenwert erreicht mit  $16,3 \pm 1,8$  AE nur 33% des Farbgehaltes der diploiden Leberzellen, und nicht 24,8 AE (= 50%), wie es für eine haploide Zelle zu erwarten wäre. Danach fällt die Hydrolysekurve der Spermien nur sehr verzögert ab, so daß es zwischen 55 und 80 min Hydrolysedauer zu einer Überschneidung mit den Hydrolysekurven der anderen Zellen kommt. Selbst nach

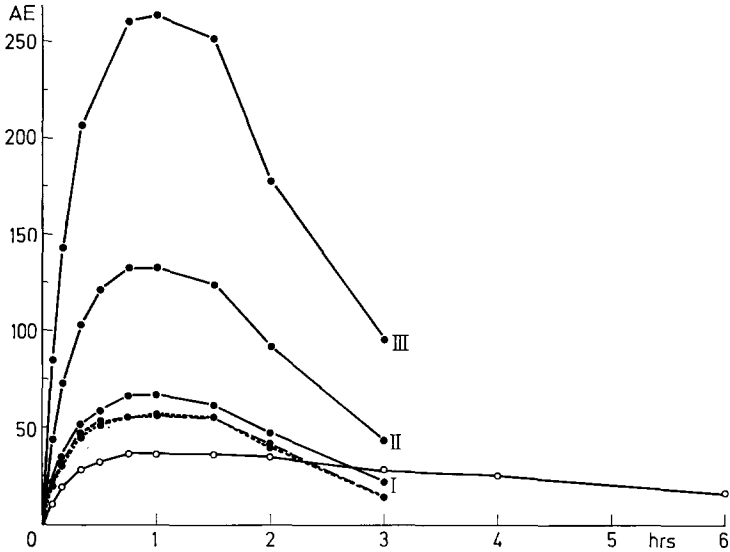


Abb. 2. Feulgen-Hydrolysekurven nach Alkoholfixierung und Hydrolyse in 4 N HCl. (Bezeichnung der Zellen und der Koordinaten wie in Abb. 1)

einer über 3 Std ausgedehnten Hydrolyse ist in den Spermien noch eine Anfärbung von  $2,8 \pm 1,4$  AE nachweisbar.

*Alkoholfixierte Leberausstriche und Meerschweinchenspermien, Hydrolyse in 4 N HCl (2. Meßreihe).* Die Ergebnisse dieser ebenfalls alkoholfixierten Meßreihe (Abb. 2) bestätigen die bereits in Abb. 1 gemachten Beobachtungen in allen wesentlichen Punkten. Durch die Verwendung einer 4 N HCl (an Stelle einer 5 N HCl in Meßreihe 1) wird der Hydrolyseablauf für alle Zellen verzögert, so daß das Hydrolysemaximum erst nach 45–60 min Hydrolyse erreicht wird, und sogar nach 3 Std andauernder Hydrolyse noch eine Anfärbung in den Leber- und Blutzellen gemessen werden konnte. Die im Maximum erreichten Feulgenwerte ( $66,7 \pm 3,8$  AE für die diploiden,  $132,4 \pm 4,1$  AE für die tetraploiden, und  $262,9 \pm 5,1$  AE für die oktaploiden Leberkerne) liegen etwas höher als die in der ersten Meßreihe erzielten Werte, stehen aber — wie auch bei allen anderen Hydrolysezeiten — wiederum entsprechend ihrem DNS-Gehalt im Verhältnis 1:2:4. Die Abweichung der Lymphozyten- und Granulozytenkerne, die hier in dieser Meßreihe praktisch gleichgroße Werte aufweisen, von den Meßwerten der diploiden Leberzellen ist ebenfalls sehr ausgeprägt. Sie ist bei kurzen Hydrolyse-

zeiten geringer (minus 5—7%) als im Hydrolysemaximum (minus 16—17%) und im abfallenden Kurvenschenkel (minus 12—18%).

Die Feulgenwerte der Meerschweinchenspermien liegen sowohl absolut als auch im Verhältnis zu den diploiden Leberzellen höher als die menschlichen Spermien in Abb. 1. Bis zum Hydrolysemaximum sind sie — entsprechend ihrem haploiden DNS-Gehalt — jeweils auch etwa halb so groß (48—54%) wie die Werte der diploiden Leberzellen. Bei längeren Hydrolysezeiten kommt es dann aber infolge einer auffallenden Hydrolyseresistenz der Spermien im abfallenden

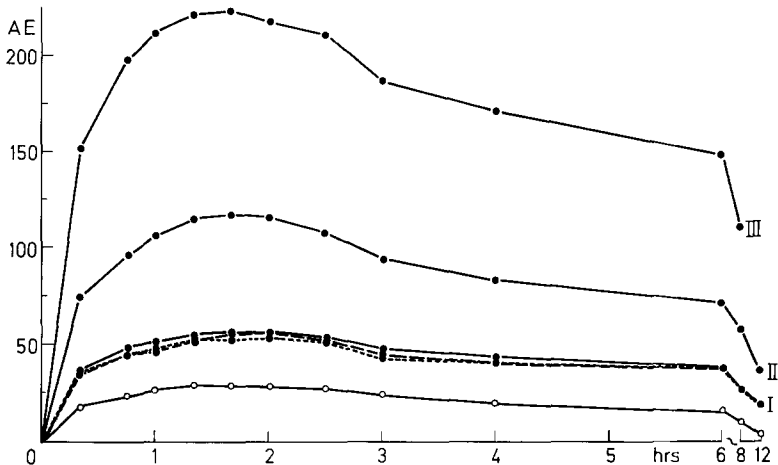


Abb. 3. Feulgen-Hydrolysekurven nach Mischfixierung und Hydrolyse in 4 N NHI. (Bezeichnung der Zellen und der Koordinaten wie in Abb. 1)

Kurvenschenkel wiederum zu einer Überschneidung der Hydrolysekurven von Leber- und Blutzellen, so daß nach 3 Std Hydrolyse die haploiden Spermien höhere Feulgenwerte zeigen als die diploiden Leberkerne. Bei Hydrolysezeiten bis zum Kurvenmaximum besteht nach Alkoholfixierung also eine gute Proportionalität zwischen den gemessenen Feulgenwerten und dem tatsächlichen DNS-Gehalt der Spermien, bei noch längeren Hydrolysezeiten dagegen nicht mehr.

*Mischfixierte Leberausstriche und Meerschweinchenspermien, Hydrolyse in 4 N HCl (3. Meßreihe).* Nach Mischfixierung (Methanol — Formalin — Eisessig) ist der Verlauf der Hydrolysekurven aller Zellen breiter als nach Alkoholfixierung, mit einem flachen Maximum nach 80—100 min und einem deutlich verzögerten Kurvenabfall (Abb. 3). Selbst nach einer über 12 Std ausgedehnten Hydrolyse konnte in allen Zellen noch eine Anfärbung gemessen werden. Im Maximum nach 100 min Hydrolyse ergaben sich folgende Werte:  $56,0 \pm 2,4$  AE für diploide,  $116,8 \pm 3,2$  AE für tetraploide,  $222,4 \pm 9,0$  AE für oktoploide Leberkerne;  $52,5 \pm 2,2$  AE für Lymphozyten- und  $55,2 \pm 1,2$  AE für Granulozytenkerne;  $28,5 \pm 3,5$  AE für Spermien. Aus diesen Zahlen errechnet sich ein auf die diploiden Leberkerne bezogenes Verhältnis von 1:2,09:3,97:0,94:0,99:0,51, das sehr gut mit dem DNS-Gehalt (Verhältnis 1:2:4:1:1:0,5) übereinstimmt. Für alle Hydrolysezeiten zwischen 5 min und 4 Std ergeben sich ähnliche Zahlenverhältnisse.

Erst bei noch längeren Hydrolysezeiten sinken die Feulgenwerte der Spermien etwas stärker ab als die der übrigen Zellen (nach 6 Std Hydrolyse weisen sie nur 40%, nach 8 Std 38%, nach 12 Std sogar nur 19% des Farbgehaltes der diploiden Leberkerne auf). Es tritt also ein Effekt ein, der dem nach Alkoholfixierung beobachteten relativen Ansteigen der Spermienhydrolysekurven bei längeren Hydrolysezeiten entgegengesetzt ist. Auffallend ist außerdem, daß auch hier die Lymphozyten- und Granulozytenkerne bei allen Hydrolysezeiten einen etwas geringeren Farbgehalt aufweisen als die diploiden Leberzellen. Allerdings ist die Differenz mit durchschnittlich minus 4% erheblich geringer als in den alkoholfixierten Meßreihen.

Tabelle. *UV-Absorptionscytrophotometrisch bestimmter DNS-Gehalt nach RNase-Behandlung*

	$\times 10^{-12}$ g DNS	Verhältnis
Leberkerne		
diploid (DNS-Klasse I)	6,57	1
tetraploid (DNS-Klasse II)	13,36	2,03
oktoploid (DNS-Klasse III)	25,40	3,87
Lymphozyten (DNS-Klasse I)	6,35	0,97
Spermien (DNS-Klasse I/2)	3,42	0,52

*UV-Cytophotometrische Kontrollmessungen.* Das Ergebnis dieser am UMSP durchgeführten Messungen ist in der Tabelle wiedergegeben. Die diploiden Leberkerne haben einen durchschnittlichen DNS-Gehalt von  $6,57 \times 10^{-12}$  g, die tetraploiden  $13,36 \times 10^{-12}$  g und die oktoploiden  $25,40 \times 10^{-12}$  g. Für Meerschweinchenspermien wurden  $3,42 \times 10^{-12}$  g DNS bestimmt. Daraus ergibt sich ein auf die diploiden Leberzellen bezogenes DNS-Verhältnis von 1:2,3:3,87:0,52. Die Lymphozyten lagen mit  $6,35 \times 10^{-12}$  g DNS um 3% unter dem diploiden Leberwert. Diese Zahl stimmt gut mit der für die mischfixierte Meßreihe ermittelten durchschnittlichen Abweichung von 5,1% der Lymphozytenwerte vom diploiden Leberwert überein. Sie dürfte an der Grenze der Meßgenauigkeit beider Methoden liegen.

### Diskussion

In den Anfängen der Feulgen-Cytophotometrie zur quantitativen Bestimmung des DNS-Gehaltes einzelner Zellen ist neben den zahlreichen optisch-photometrischen Fehlermöglichkeiten und Fehlern, die durch Inhomogenität der Zellkerne hervorgerufen werden können (Verteilungsfehler), auch der Einfluß von Proportionalitätsfehlern diskutiert worden (PATAU, 1952; PATAU und SWIFT, 1953; SIBATANI und FUKUDA, 1952). Während es im Laufe der Jahre durch zahlreiche optische und technische Verbesserungen gelungen ist, die apparativen und meßtechnischen Fehler bei der Bestimmung der absorbierenden Substanzmengen in einzelnen Zellkernen auf 3% zu vermindern, ist jedoch dem Auftreten von Proportionalitätsfehlern und ihrer Bedeutung für die quantitative Interpretation der gemessenen Feulgenwerte bisher kaum experimentelle Beachtung geschenkt worden.

Ein Proportionalitätsfehler wird dann vorliegen, wenn die in der Feulgenreaktion gebundenen Farbstoffmengen verschiedener Zellkerne nicht mit einem

für alle Zellen gleichbleibenden Proportionalitätsfaktor in den tatsächlichen DNS-Gehalt dieser Zellen umgerechnet werden können, obwohl die Fixierungs-, Hydrolyse- und Färbebedingungen für die zu vergleichenden Zellen dieselben waren (i.e. Zellen auf demselben Objektträger).

SRINIVASACHAR und PATAU (1958) stellten fest, daß solche Proportionalitätsfehler sowohl durch ein verschiedenes Alter der Schiff's Reagenzien als auch durch unterschiedliche Spüldauer in  $\text{SO}_2$ -Wasser hervorgerufen werden können. Wir haben diese Bedingungen daher konstant gehalten und unsere Versuche bei verschiedener Fixierung und abgestuften Hydrolysezeiten durchgeführt. Leberkerne ergaben dabei sehr konstante Ergebnisse. Sowohl nach Alkoholfixierung als auch nach Mischfixierung (Methanol — Formalin — Eisessig) standen bei allen Hydrolysezeiten die von den di-, tetra- und oktoploiden Leberkernen gebundenen Farbstoffmengen im Verhältnis 1:2:4, d. h. im Verhältnis der in diesen Zellkernen enthaltenen DNS-Mengen. Auch die UV-absorptionscytophotometrischen Messungen bestätigten diese Zahlen (Tabelle). Wir benutzten daher den Farbgehalt der diploiden Leberzelle in jedem Präparat als Vergleichs- und Bezugswert für die übrigen Zellen.

Nach Alkoholfixierung ist in der 1. und 2. Meßreihe der Farbgehalt der Lymphozyten und Granulozyten nach kurzen Hydrolysezeiten nur wenig niedriger (2—5%) als in den diploiden Leberzellen. Bei längeren Hydrolysezeiten werden dann bis zum Hydrolysemaximum die Unterschiede zunehmend größer (bis 20%) und bleiben auch im abfallenden Kurvenschenkel erhalten. Die UV-absorptionscytophotometrischen Kontrollmessungen zeigten aber, daß keine oder nur sehr geringe Unterschiede im tatsächlichen DNS-Gehalt der Lympho- und Granulozyten einerseits, und den diploiden Leberzellen andererseits bestehen. Es muß hier also ein nach Alkoholfixierung auftretender *Proportionalitätsfehler* vorliegen, dessen Zustandekommen man sich folgendermaßen erklären kann:

Während die Abspaltung der Purine bei kurzen Hydrolysezeiten noch proportional dem DNS-Gehalt erfolgt, verläuft die mit längeren Hydrolysezeiten immer stärker hervortretende hydrolytische Lösung der Apurinsäure in Lymphozyten und Granulozyten rascher als in den Leberzellen, so daß es bereits im Maximum zu erniedrigten Farbwerten und bei noch längerer Hydrolysedauer zu einem rascheren Abfall der Lympho- und Granulozytenkurven kommt. Die Ursache für diese leichtere hydrolytische Löslichkeit des lymphozytären und granulozytären Chromatins nach Alkoholfixierung dürfte in seiner Struktur (stärkere Heterochromatinisierung?) oder auch in chemischen Unterschieden der Kernproteine zu suchen sein.

Nach Mischfixierung tritt dieses unterschiedliche Hydrolyseverhalten der Kerne dagegen nicht auf, denn in Abb. 3 liegen die Farbwerte der Lympho- und Granulozyten im gesamten Verlauf der Hydrolysekurven gleichbleibend — und in Übereinstimmung mit den gemessenen UV-Absorptionswerten — nur sehr wenig (4—5%) unter denen der diploiden Leberkerne. Auch der zeitliche Verlauf der Hydrolyse verschiebt sich bei Verwendung der Mischfixierung erheblich. Während in Abb. 2 nach Alkoholfixierung eine 45 min dauernde Hydrolyse in 4 N HCl bereits zu einer maximalen Anfärbung der Zellen führt, ist dies in der mischfixierten Meßreihe 3 (Abb. 3) erst nach 100 min der Fall. Außerdem fallen die Hydrolysekurven nach Mischfixierung bei noch längeren Hydrolysezeiten nur

sehr verzögert ab. Sogar nach 12 Std Hydrolyse in 4 N HCl konnte noch in allen Zellen eine Kernfärbung gemessen werden, während eine solche bei Alkoholfixierung bereits nach 4 Std (bei Spermien 8 Std) nicht mehr meßbar war. Offenbar führt also hier die Verwendung eines formalinhaltigen Fixierungsmittels zu einer Stabilisierung des Kernchromatins, die darin zum Ausdruck kommt, daß einerseits die nach Alkoholfixierung beobachteten Hydrolyseunterschiede nicht mehr auftreten, und andererseits auch die allgemeine Resistenz gegenüber der HCl-Hydrolyse größer wird. Wir möchten diesen Befund auf den Vernetzungseffekt der Formalinfixierung bei der Eiweißdenaturierung zurückführen. Während die Alkoholfixierung durch Wasserentzug allein die Tertiärstruktur der Eiweißkörper zerstört, greift die Formalinfixierung durch die Ausbildung zahlreicher kovalenter Methylenbrücken zwischen den Amino-, Guanido-, Indol-, Phenyl- und Sulfhydrylgruppen der Aminosäuren (MELLON, 1958) in die Sekundärstruktur der Proteine ein. Man könnte sich vorstellen, daß das chemische Verhalten dieser im nativen Zustand unterschiedlichen Nucleoproteidkomplexe während der Säurehydrolyse weitgehend einheitlich wird. HILLARY (1939) hatte nach Osmiumsäurefixation von pflanzlichem Material ebenfalls eine ausgeprägte, zunehmende Hydrolyseresistenz beobachtet, die er auf eine „Stärkung der Bindungen zwischen den verschiedenen Gruppen des NS-Moleküls“ zurückführte.

Noch auffallender ist der Verlauf der Spermien-Hydrolysekurven. SANDRITTER u. Mitarb. (1965) war in Versuchen mit der Langzeithydrolyse (0,1 N HCl bei 37° C) bereits aufgefallen, daß Bullenspermien nach Alkoholfixierung bis zu 51 Std Hydrolyse kaum einen Abfall der Hydrolysekurven erkennen ließen. Sie erwiesen sich damit als ausgesprochen hydrolyseresistent im Vergleich zu Thymus- und Leberzellen. Unsere jetzigen Befunde in den alkoholfixierten Meßreihen 1 und 2 bestätigen diese Beobachtung. Die Hydrolysekurve der Spermien verläuft bei kurzen Hydrolysezeiten in halber Höhe der diploiden Leberkerne<sup>1</sup>, überkreuzt aber dann diejenigen der Leberzellen, Lympho- und Granulozyten zwischen 50 und 75 min (Meßreihe 1), bzw. zwischen 2 und 3 Std (Meßreihe 2), und bleibt auch nach einer Verdoppelung der Hydrolysezeit noch meßbar. Dies bedeutet aber, daß für Spermien bei allen postmaximalen Hydrolysezeiten eine zunehmend größer werdende Disproportionalität zwischen dem auf die diploide Leberzelle bezogenen Feulgenwert und dem tatsächlichen haploiden DNS-Gehalt dieser Zellen auftritt. Während die Lympho- und Granulozyten aber einen im Vergleich zu den diploiden Leberzellen erniedrigten Farbgehalt aufwiesen, ist derjenige der Spermien nach längeren Hydrolysezeiten vergleichsweise zu hoch. Hier scheinen also die kompaktere Chromatinstruktur (vielleicht auch andere bisher unbekannte Strukturunterschiede?) und die stärkeren basischen Eigenschaften des Nucleoproteids der Spermien eine geringere Löslichkeit während der Säurehydrolyse zu bewirken. Nach Mischfixierung verschwindet auch dieser Hydrolyse-Proportionalitätsfehler der Spermien weitgehend. Bis zu 3 Std Hydrolysezeit ist der Farbgehalt der Spermien halb so groß wie die der diploiden Leberkerne, danach sinken die Spermienwerte etwas stärker ab. Die Mischfixierung erwies sich also auch für die Spermien als die günstigste, obwohl formalinhaltige

<sup>1</sup> Die zu niedrigen Werte für die sehr kleinen menschlichen Spermien in Meßreihe 1 möchten wir auf einen meßtechnischen Fehler infolge Überschreitung des Extinktionsniveaus von 0,75 zurückführen (vgl. BÖHM, 1968).



Fixierungsflüssigkeiten die Hydrolyseresistenz der Spermien nicht wesentlich zu ändern scheinen.

*Schlußfolgerungen:* Zellkerne mit einer unterschiedlichen Kernaktivität (stoffwechsel-, bzw. teilungsaktive und ruhende Interphasezellen, Mitosen) oder mit einer abweichenden Nukleoproteidzusammensetzung (Spermien) weisen oft auch schon morphologisch erkennbare Strukturunterschiede (wechselnde Anteile von Eu- und Heterochromatin) auf. Werden bei vergleichenden Feulgen-DNS-Bestimmungen an solchen Kernen Abweichungen des DNS-Gehaltes von den nach dem Gesetz der DNS-Konstanz zu erwartenden Werte beobachtet, so sollte man die mit der Feulgen-Reaktion gemessenen Ergebnisse möglichst mit einer anderen, unabhängigen Methode (UV-Absorption) absichern. Wenn dies nicht möglich ist, möchten wir die Durchführung der Feulgen-Reaktion nach verschiedenen Fixierungen (z. B. auch Methanol — Formalin — Eisessig) und mit unterschiedlichen Hydrolysezeiten (prämaximal, maximal und postmaximal) empfehlen. Bleiben die prozentualen Abweichungen dabei konstant, so dürften sie auf tatsächlichen DNS-Unterschieden beruhen, differieren sie, so ist nach unseren Versuchsergebnissen das bei kurzen (prämaximalen) Hydrolysezeiten ermittelte Resultat verlässlicher, da die von uns beobachteten Proportionalitätsfehler hauptsächlich durch die verschiedene hydrolytische Löslichkeit der Nukleoproteidkomplexe in der zweiten Phase der Hydrolyse bedingt zu sein scheinen, während die Abspaltung der Purine am Anfang der Hydrolyse noch jeweils proportional dem DNS-Gehalt erfolgt.

### Literatur

- ATKIN, N. B., and B. M. RICHARDS: Deoxyribonucleic acid in human tumors as measured by microspectrophotometry of Feulgen stain: a comparison of tumors arising at different sites. *Brit. J. Cancer* **10**, 769—786 (1956).
- BENWITZ, G.: Nähere Untersuchungen zur Lichtbleichung feulgengefärbter Kerne (Mikrospektrophotometrie). *Acta histochem. (Jena)* **21**, 238—260 (1965).
- BÖHM, N.: Einfluß der Fixierung und der Säurekonzentration auf die Feulgen-Hydrolyse bei 28° C. *Histochemie* **14**, 201—211 (1968).
- BOIVIN, A., R. VENDRELEY et C. VENDRELEY: L'acide désoxyribonucleique du noyau cellulaire, dépositaire des caractères héréditaires; arguments d'ordre analytique. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **226**, 1061—1063 (1948).
- DEELEY, E. M.: An integrating microdensitometer for biological cells. *J. Sci. Instr.* **32**, 263—267 (1955).
- GARCIA, M. A.: On Feulgen-deoxyribonucleic acid haploid and diploid values. *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 778 (1967).
- GRAUMANN, W.: Zur Standardisierung des Schiff'schen Reagens. *Z. wiss. Mikr.* **61**, 225—226 (1953).
- HALE, A. J.: The leucocyte as a possible exception to the theory of deoxyribonucleic acid constancy. *J. Path. Bact.* **85**, 311—326 (1963).
- HILLARY, B. B.: Use of the Feulgen reaction in cytology: I. Effect of fixatives on the reaction. *Bot. Gaz.* **101**, 276—300 (1939).
- KASTEN, F. H.: Cytophotometric studies of deoxyribose nucleic acid in several strains of mice. *Physiol. Zool.* **29**, 1—20 (1956).
- , G. KIEFER and W. SANDRITTER: Bleaching of Feulgen stained nuclei and alteration of absorption curve after continuous exposure to visible light in a cytophotometer. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 547—555 (1962).
- MAYALL, B. H.: Variability in the stoichiometry of deoxyribonucleic acid strains. *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 762—763 (1967).

- MELLON, E. F.: Aldehyde Tannage. In: Chemistry and technology of leather (F. O'FLATHERY, W. T. RODDY and R. LOLLAR, eds.), p. 66—97. London: Chapman & Hall 1958.
- PATAU, K.: Absorption mictospectrophotometry of irregularshaped objects. *Chromosoma (Berl.)* **5**, 341—362 (1952).
- , and H. SWIFT: The DNA-content (Feulgen) of nuclei during mitosis in a root tip onion. *Chromosoma (Berl.)* **6**, 149—169 (1953).
- SANDRITTER, W., K. JOBST, L. RAKOW u. K. BOSSELMANN: Zur Kinetik der Feulgenreaktion bei verlängerter Hydrolysezeit. *Histochemie* **4**, 420—437 (1965).
- , D. MÜLLER u. O. GENSECKE: Ultraviolettmikrospektrophotometrische Messungen des Nukleinsäuregehaltes von Spermien und diploiden Zellen. *Acta histochem. (Jena)* **10**, 139—154 (1960).
- SIBATANI, A., and M. FUKUDA: Feulgen reaction and quantitative cytochemistry of deoxy-pentose nucleic acid. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **10**, 93—102 (1953).
- SRINIVASACHAR, D., and K. PATAU: Proportionality between nuclear DNA-content and Feulgen dye-content. *Exp. Cell Res.* **17**, 286—298 (1959).
- SWIFT, H.: Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Int. Rev. Cytol.* **2**, 1—76 (1953).

Dr. med. NORBERT BÖHM  
Pathologisches Institut der Universität  
7800 Freiburg i. Br., Albertstr. 19