

*Sonderdruck aus*

# Radionuklide in der klinischen und experimentellen Onkologie

Zweite Jahrestagung  
der Gesellschaft für Nuclearmedizin in Heidelberg  
22.-24. Oktober 1964

Unter dem Vorsitz von Prof. Dr. Dr. h. c. J. BECKER  
Direktor der Universitäts-Strahlenklinik (Czerny-Krankenhaus), Heidelberg

Herausgegeben von  
Prof. Dr. G. HOFFMANN  
Oberarzt der Medizinischen Universitätsklinik, Freiburg i. Br.

Unter Mitwirkung von  
Prof. Dr. K. E. SCHEER  
Direktor des Instituts für Nuklearmedizin, Heidelberg

Mit 202 Abbildungen in 256 Einzeldarstellungen, davon 9 mehrfarbig,  
und 60 Tabellen



## **Lokalisation der DNS-Synthese in den Chromosomen des ELD-Ehrlich-Asziteskarzinoms der Maus**

G. PALME, K. E. HAMPEL und K. OEFF

Die von Taylor u. Mitarb. eingeführte Methode der Markierung von Chromosomen mit  $^3\text{H}$ -Thymidin ( $^3\text{H}$ -TdR) erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von Struktur und Funktion der Chromosomen (5). Da das Ehrlich-Asziteskarzinom in der experimentellen Krebsforschung ein bevorzugtes Testsystem darstellt, und andererseits die DNS-Synthese sich als besonders empfindlich gegen verschiedene kanzerotoxische Substanzen erwiesen hat, haben wir den Versuch unternommen, den  $^3\text{H}$ -TdR-Einbau in den Asziteszellchromosomen zu analysieren. In dieser Demonstration sollen ganz kurz erste Ergebnisse gezeigt werden.

Die Untersuchungen wurden an den Chromosomen des hyperdiploiden (ELD)-Ehrlich-Karzinomstammes durchgeführt<sup>1)</sup>. 6 Tage nach Überimpfung einer definierten Tumorzellmenge erhielten die aszitestragenden Tiere  $^3\text{H}$ -TdR (1,5  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$  Körpergewicht; spez. Aktivität 1,9 Ci/mM, Schwarz BioResearch, Inc., Orangeburg, N. Y.). 15 Minuten später wurde inaktives Thymidin im Überschuß verabreicht. Zu verschiedenen Zeitintervallen zwischen 5,5 und 18 Stunden nach  $^3\text{H}$ -TdR-Gabe wurden die Tiere getötet, der Aszites entnommen und Chromosomenpräparate entsprechend der für Leukozyten angegebenen Methode von Moorhead u. Mitarb. hergestellt (3). Anschließend wurden Autoradiogramme unter Verwendung besonders feinkörniger Emulsion angefertigt.

In der Abb. 1 sind die Autoradiogramme von je einer Metaphase eines frühen und eines späten Abschnittes der DNS-Synthesephase wiedergegeben. Die Chromosomen der unteren Metaphase befanden sich zum Zeitpunkt der  $^3\text{H}$ -TdR-Verfügbarkeit am Anfang der S-Phase, die Chromosomen der oberen Metaphase waren zur Zeit der Markierung am Ende der S-Phase. Das unterschiedliche Markierungsmuster der einzelnen Chromosomen der beiden Metaphasen wird besonders beim Vergleich analoger Chromosomen im rechten Teil der Abb. 1 deutlich. Besonders auffallend ist das differente Verhalten der sog. Marker-Chromosomen A und B der beiden Metaphasen hinsichtlich ihres  $^3\text{H}$ -TdR-Einbaus. Da die beiden Marker-Chromosomen stets und sicher von den übrigen Chromosomen zu unterscheiden sind, haben wir zunächst an ihnen den Ablauf der DNS-Synthese näher untersucht. Abb. 2 zeigt das Ergebnis von 167 ausgewerteten markierten Metaphasen im Verlauf verschiedener DNS-Syntheseabschnitte. Die ausgezogene Kurve der unteren Abb. gibt den Prozentsatz der markierten Metaphasen in Abhängigkeit von

1) Herrn Prof. Dr. A. Levan, Lund, danken wir für die Überlassung des Zellstammes.

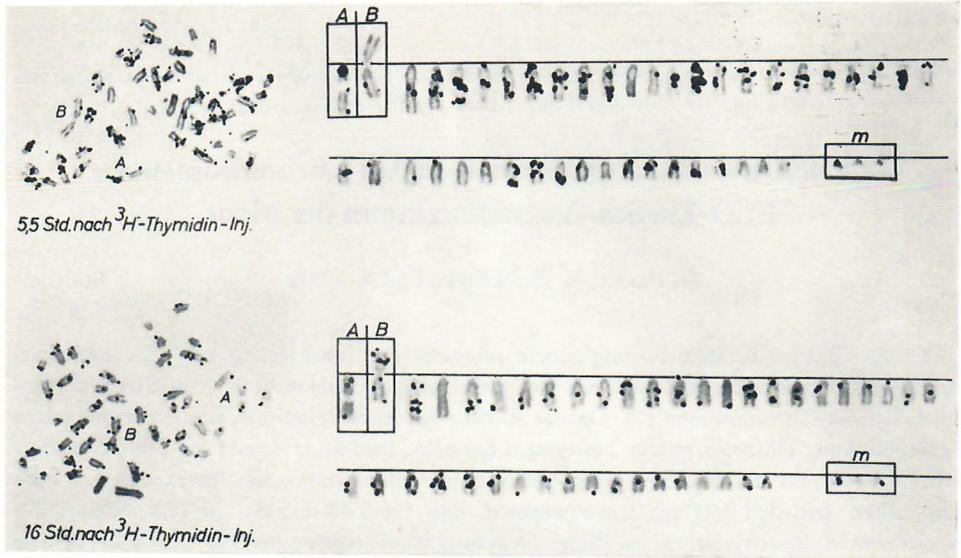


Abb. 1. Autoradiogramme von ELD-Ehrlich-Asziteschromosomen. Oben: Metaphase eines späten Abschnittes der DNS-Synthesephase. Unten: Metaphase eines frühen Abschnittes der DNS-Synthesephase.

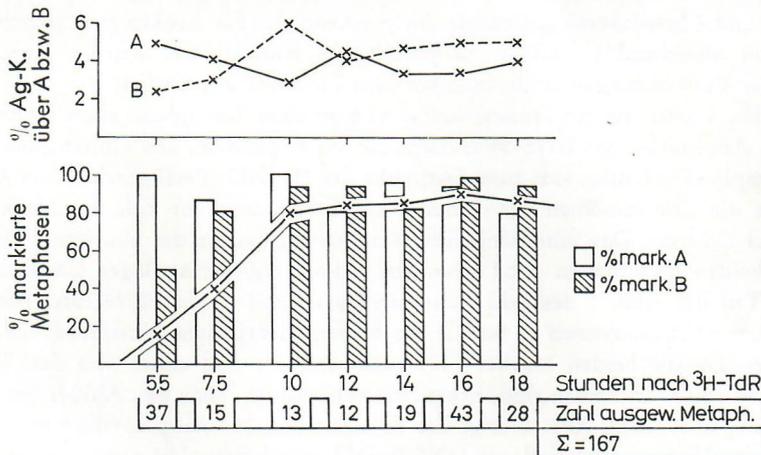


Abb. 2. Verhalten von markierten Metaphasen, markierten Marker-Chromosomen A und B sowie DNS-Syntheserate von A und B in Abhängigkeit von der Zeit nach <sup>3</sup>H-TdR-Injektion (167 ausgewertete markierte Metaphasen).

der Zeit nach  $^3\text{H-TdR}$ -Injektion an. In den markierten Metaphasen nimmt bei den verschiedenen Zeiten jedoch nur ein unterschiedlicher Prozentsatz von Marker-Chromosomen an der DNS-Synthese teil, der Rest bleibt unmarkiert. Aus dieser Darstellung geht weiter hervor, daß sich die Marker-Chromosomen A und B bezüglich des zeitlichen Ablaufes ihrer DNS-Synthese deutlich voneinander unterscheiden. Während das A-Chromosom den gesamten untersuchten Zeitraum benötigt, um seine DNS zu verdoppeln, nimmt die DNS-Synthese des B-Chromosoms meist einen deutlich kürzeren Zeitraum in Anspruch. Nur knapp die Hälfte aller B-Chromosomen ist am Ende der S-Phase noch markiert, d. h. in der DNS-Synthese. Die obere Kurve der Abb. 2 zeigt nun das Ausmaß der DNS-Synthese in den beiden Marker-Chromosomen zu den verschiedenen Versuchszeiten. Während bei den langen Versuchszeiten, in denen der Anfang der S-Phase erfaßt wird, die DNS-Syntheserate beider Marker unter Berücksichtigung der etwas unterschiedlichen Längen der Chromosomen etwa gleich ist, weist der B-Marker 10 Stunden nach  $^3\text{H-TdR}$ -Gabe einen deutlichen Gipfel in der Markierungsintensität auf. Gegen Ende der S-Phase fällt die Silberkornzahl jedoch steil ab. Der A-Marker hingegen zeigt zu diesem Zeitpunkt ein gegensätzliches Verhalten. Er hat die größte DNS-Syntheserate am Ende der S-Phase.

Als letzten Schritt haben wir sodann die prozentuale Silberkornverteilung über den einzelnen Segmenten des Marker-Chromosoms B im Verlauf der S-Phase untersucht. Das Ergebnis zeigt die Tab. 1. Das proximale Chromosomensegment, d. h. der Bereich des Zentromers, zeigt in allen geprüften Zeiten die geringste Markierungsintensität. Die höchste Silberkorndichte ist stets über den Segmenten der Chromosomenperipherie.

Tab. 1. Prozentuale Silberkornverteilung über den einzelnen Segmenten des Marker-Chromosoms B zu verschiedenen Zeitpunkten nach  $^3\text{H-TdR}$ -Gabe.

Std. nach $^3\text{H-TdR}$ -Inj.	Prozentuale Silberkornverteilung über den einzelnen Segmenten des Marker-Chromosoms B		
	proximal	intermed.	distal
5,5	4,4	20,2	28,9
7,5	5,7	29,6	14,5
10	16,3	17,3	20,8
12	4,8	16,3	28,9
14	7,7	20,4	21,7
16	10,6	18,1	21,3
18	13,5	17,8	24,5

Besonders deutlich wird der Unterschied zwischen den einzelnen Chromosomensegmenten in den Metaphasen, die am Ende der S-Phase markiert wurden. Nimmt der B-Marker zu diesem Zeitpunkt überhaupt noch an der DNS-Synthese teil, ist seine Syntheserate sehr gering und überwiegend auf die distalen Chromosomenabschnitte beschränkt.

Dieser Befund war überraschend und steht im Gegensatz zu dem Verhalten der meisten bisher untersuchten Chromosomen normaler proliferierender Zellen, denn diese weisen gegen Ende des S-Phasenabschnittes häufig eine bevorzugte Markierung des zentrosomen Abschnittes auf (1, 2, 4).

Das Ziel künftiger Untersuchungen soll es sein, die übrigen Chromosomen des Ehrlich-Karzinoms im Hinblick auf ein charakteristisches Verteilungsmuster des  $^3\text{H}$ -TdR-Einbaus zu untersuchen und den Einfluß kanzerotoxischer Verbindungen auf den Ablauf der DNS-Synthese in den Chromosomen zu prüfen.

#### Literatur

- (1) German, J. L.: III. DNA-synthesis in human chromosomes. *N. Y. Acad. Sci.* 24: 395—407 (1962).
- (2) German, J. L.: The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells. *J. Cell Biol.* 20: 37—55 (1964).
- (3) Moorhead, P. S., P. C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Battips, D. A. Hungerford: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20: 613—616 (1960).
- (4) Moorhead, P. S., V. Defendi: Asynchrony of DNA synthesis in chromosomes of human diploid cells. *J. Cell Biol.* 16: 202—209 (1963).
- (5) Taylor, J. H., P. S. Woods, W. L. Hughes: The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 43: 122—128 (1957).

\*

Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung des Bundesministeriums für wissenschaftliche Forschung durchgeführt.