

Einfluß von Cytoplasma- und Serumfaktoren auf den [³H]Thymidintriphosphat-Einbau isolierter Leberzellkerne

Effect of Cytoplasmic and Serum Factors on the Uptake of [³H]Thymidine-triphosphate (TTP) by Isolated Nuclei of Liver Cells

M. Volm und G. Merz

Deutsches Krebsforschungszentrum, Institut für experimentelle Pathologie, Heidelberg

(Z. Naturforsch. **30 c**, 107–112 [1975]; eingegangen am 10. Oktober 1974)

DNA-Synthesis, Isolated Liver Nuclei, Cytoplasm, Serum, Partial Hepatectomy

The actions of cytoplasm (ultracentrifuged supernatant 105 000 × g) and of serum on the DNA synthesis (uptake of [³H]TTP) by isolated nuclei of liver cells were studied. Cytoplasm from liver cells obtained at various intervals after partial hepatectomy revealed a variable effect only with isolated nuclei of liver cells from partially hepatectomized rats. Cytoplasm obtained from liver cells eight hours after partial hepatectomy failed to show the usual inhibitory effect. Presumably the inhibitory substances normally present in cytoplasm are inactivated within a certain time after partial hepatectomy.

Serum of partially hepatectomized animals enhanced the uptake of [³H]TTP by nuclei of normal liver cells and those from partially hepatectomized animals. The stimulating effect was present only in the serum obtained between four and twelve hours after partial hepatectomy. It remains unclear whether the effects described are growth factors specific for the liver.

Die Leberregeneration nach einer Teilhepatektomie stellt ein übersichtliches Modell dar, um Fragen des Wachstums und der Wachstumskontrolle zu untersuchen. Trotz zahlreicher Experimente, siehe^{1–4}, ist aber die Regulation der Leberregeneration unbekannt geblieben. *In vivo* Untersuchungen mit Blutaustausch^{5, 6} bzw. Lebertransplantationen⁷, ferner Versuche mit Leberzellen^{8–10} deuten auf eine humorale Regulation des Leberwachstums hin. Andererseits wird aber auch die Vorstellung vertreten, daß cytoplasmatischen Hemmsubstanzen in der Regulierung des Wachstums eine wesentliche Bedeutung zukommt^{11, 12}. Für diese Meinung spricht, daß bei verschiedenartigen Organismen eine Abhängigkeit der DNA-Synthese von cytoplasmatischen Faktoren gefunden wurde. In Experimenten mit Kerntransplantationen, Zellfusionen und isolierten Zellkernen konnte diese Abhängigkeit bestätigt werden^{13–17}.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben ebenfalls die DNA-Synthese isolierter Leberzellkerne untersucht^{18–25}. Erste Ergebnisse deuten auf einen wichtigen Einfluß sowohl des Cytoplasmas als auch des Serums hin^{22, 26}. Wirkungen von Cytoplasma und Serum, welche zu verschiedenen Zeiten nach einer

Teilhepatektomie hergestellt wurden, liegen bisher nicht vor. In dieser Arbeit sollte daher geklärt werden, ob Cytoplasma bzw. Serum – hergestellt zu verschiedenen Zeiten nach einer 2/3 Leberresektion – auf isolierte Leberzellkerne von Ratten unterschiedliche Wirkungen haben. Die Autoren glauben, durch die Beantwortung dieser Frage weitere Hinweise über den Mechanismus der Leberregeneration zu erhalten.

Material und Methoden

1. Material

1. Substanzen

Die markierten Substanzen ([³H-Methyl]-thymidine-5'-triphosphate, ammonium salt, code Nr. TRK 354) bezogen wir von Amersham-Buchler, Braunschweig. Die spezifische Aktivität betrug 30 Ci/mM. Die unmarkierten Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) stammen von der Firma Serva, Heidelberg; alle weiteren Substanzen – falls nichts anderes angegeben – von der Firma Merck, Darmstadt.

2. Lösungen

Lösung I (Homogenisationslösung): 0,25 M Saccharose, 3 mM (MgCl₂ × 6 H₂O), 0,025 M TRIS-Puffer, eingestellt mit HCl (konz.) auf pH = 7,5.

Lösung II (Saccharoselösung zur Ultrazentrifugation): 2,3 M Saccharose, 3 mM (MgCl₂ × 6 H₂O), 0,025 M TRIS-Puffer, eingestellt mit HCl (konz.) auf pH = 7,5.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. M. Volm, Deutsches Krebsforschungszentrum, Institut für experimentelle Pathologie, D-6900 Heidelberg 1, Im Neuenheimer Feld 280.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Lösung III (Inkubationsmedium für Zellkerne): 8 mM ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), 8 mM KCl, 0,025 M TRIS-Puffer, 0,235 M Saccharose, eingestellt mit HCl (konz.) auf pH=8.

3. Testsubstanzen

a. Cytoplasma (Cytosol, $105\,000 \times g$ Überstand)

Nach Tötung der Tiere wurde die Leber über die Pfortader mit eiskalter Lösung III perfundiert, die Leber entnommen und das Bindegewebe der Leberpforte vollständig abpräpariert. Das verbleibende Leberparenchym wurde in Lösung III gegeben (Verhältnis 1:4) und im Potter-Elvehjem-Homogenisator (Firma Braun, Melsungen) bei 1200 U/min zerkleinert (6–7 strokes). Das so gewonnene Homogenat wurde durch 3 Lagen Mullgaze filtriert und das Filtrat 30 min lang zentrifugiert (Beckmann, JS 21, Rotor JA 20, $36\,000 \times g$, 4°C). Nach Ultrazentrifugation (Beckmann, Spinco, Rotor Ti 50, $105\,000 \times g$, 90 min, 4°C) werden die Zentrifugenröhrchen 0,5 cm über dem Sediment von der Seite mit einer Kanüle durchstoßen und der Überstand langsam nur soweit abgezogen, bis die Lipidschicht 1 cm über der Kanülenöffnung steht. Danach sind die Überstände auf gleichen Proteingehalt eingestellt und bis zum Versuchsbeginn bei -100°C (Revco Freezer) eingefroren worden.

b. Serum

Zur Herstellung von Serum wurde das Blut durch Herzpunktion entnommen, nach Gerinnung (1 Stunde bei 4°C) 10 min zentrifugiert (Christ, UJ IV KS, $1000 \times g$), darauf das Serum abpipettiert und bis zum Versuch eingefroren.

4. Versuchstiere

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (Firma Mus-Rattus/Brunntal, München) wurden unter Standardbedingungen gehalten (Altromin®, Wasser ad libitum, 21°C , 60% Luftfeuchtigkeit, Makrolonkäfige). Bei Versuchsbeginn wogen die Tiere etwa 200 g. Die Zuteilung der einzelnen Tiere in die verschiedenen Versuchsgruppen erfolgte streng zufällig (Zufallszahlen). Die 2/3-Hepatektomien wurden nach dem von Higgins und Anderson²⁷ beschriebenen Verfahren vormittags durchgeführt: Der mittlere und linke Leberlappen wird in Äthernarkose entfernt und dadurch die gesamte Lebermasse auf ein Drittel reduziert.

II. Methoden

1. Isolierung der Leberzellkerne

Die Isolierung der Zellkerne aus Rattenleber erfolgte nach einer von Blobel und Potter²⁸ beschriebenen Methode: Nach Öffnung der Bauchhöhle wird die Leber über die Pfortader mit eiskalter Lösung I

perfundiert. Anschließend wird die Leber entnommen, das Bindegewebe entfernt und das Restparenchym mit der Schere zerkleinert. Ein Gewichtsteil Leber wird mit zwei Volumenteilen Lösung I in ein gekühltes Pottergefäß (Elvehjem Homogenisator) gegeben und mit dem Teflonstempel bei 1200 U/min homogenisiert (6–7 strokes). Das so erhaltene Homogenat wird daraufhin durch 3 Lagen Mullgaze gefiltert, um gröbere Bestandteile zurückzuhalten, danach das Homogenat im Verhältnis 1:3 mit Lösung II vermischt. Jeweils 20 ml dieser Mischung werden über 15 ml der Lösung II in Beckman-Zentrifugenröhrchen geschichtet. Nach Beendigung der Zentrifugation (Beckman, Spinco, Rotor SW 27, $40\,000 \times g$, 4°C , 60 min) bilden die Zellkerne am Boden der Röhrchen ein festhaftendes Sediment. Der Überstand in den Röhrchen wird verworfen, die Röhrchenwand mit Papiertüchern (Kleenex) gereinigt. Schließlich wird das Gewicht der Sedimente bestimmt und diesen im Verhältnis 1:100 Lösung III zupipettiert. Die Sedimente werden im Strahl einer 1 ml Pipette (Eppendorf) vom Boden gelöst, die abgelösten Sedimente in einen Elvehjem-Homogenisator mit Schliff überführt und durch schonendes Auf- und Abbewegen des Glasstempels die Sedimente in Suspension gebracht. Die Suspension wird durch Nylongewebe filtriert, anschließend die Kernzahl pro ml Suspension in der Leukozytenzählkammer (nach Neubauer) bestimmt. Bei Verdünnung der Kernsedimente mit Lösung III im Verhältnis 1:100 enthält ein ml Kernsuspension etwa 10 Millionen Zellkerne bzw. $100 \mu\text{g}$ DNA bzw. 200 mg Protein.

2. Bestimmung des Einbaues von [^3H]Thymidintriphosphat ([^3H]TTP) in den Zellkernen

In den Zellkernen wurde die Höhe der DNA-Synthese durch den Einbau von radioaktivem [^3H]Thymidintriphosphat ($1 \mu\text{Ci}$ /Inkubationsröhrchen) bestimmt: Inkubationsröhrchen mit komplettem Medium enthielten 1 ml Kernsuspension, Mercaptoäthanol ($25 \mu\text{M}$), ATP (2 mM), alle 4 Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je $60 \mu\text{M}$).

Inkubationsröhrchen mit inkomplettem Medium enthielten die gleichen Substanzen außer den 3 Desoxyribonukleotiden dATP, dCTP, dGTP. Eiswerte sind Versuchsansätze mit komplettem Medium, die anstatt bei 37°C im Eisbad inkubiert wurden.

Der Einbau der markierten Substanzen wurde im Eiswasserbad (10 min) abgestoppt. Anschließend wurden die Zellkerne abzentrifugiert (Christ UJ IV KS, $1000 \times g$, 4°C , 10 min) und der Überstand verworfen. Die Kernsedimente wurden in 2 ml eiskalter 10-prozentiger Trichloressigsäure (TCA)

aufgenommen, nach 30 min erneut zentrifugiert und nochmals mit 2 ml eiskalter 10-prozentiger TCA extrahiert. Das TCA-unlösliche Sediment wurde zweimal mit je 2 ml 96-prozentigem Äthanol durch vorsichtige Suspensions- und Zentrifugation gewaschen und schließlich die extrahierten Sedimente in jeweils 1 ml Soluene (Packard, Frankfurt) 30 min lang bei 60 °C aufgelöst. Nach Abkühlung wurden die Proben gut durchmischt (Cenco) und quantitativ in Flüssigkeitsszintillationsgläsern pipettiert. Jedem Gläschen wurden 8 ml Toluolszintillator (50 mg POPOP; 4 g PPO/L Toluol) zugesetzt. Die Radioaktivität wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler (Isocap bzw. Mark II, Nuclear Chicago) gemessen.

3. Bestimmung von Desoxyribonucleinsäure (DNA) und Protein

Die DNA wurde photometrisch mit der Diphenylreaktion bestimmt²⁹. Als Standard diente Kälberthymus-DNA. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry *et al.*³⁰. Kristallines Rinderserum (Serva) wurde als Standard benutzt.

Ergebnisse

Als Maß für die DNA-Synthese in isolierten Leberzellkernen wurde der [³H]Thymidintriphosphat-(TTP)-Einbau bestimmt. Der Einbau wurde einmal bei Anwesenheit der Nucleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, zum anderen nur bei Anwesenheit von dTTP durchgeführt. Der echte Einbau ergab sich aus der Differenz der jeweiligen Einbauraten.

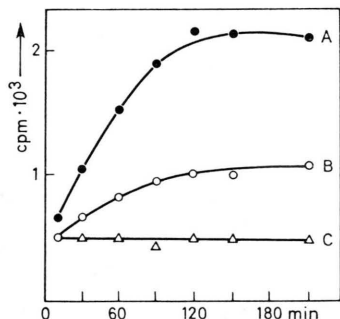


Abb. 1. Einbaukinetik von [³H]TTP in isolierte Leberzellkerne normaler Ratten. A: Inkubation bei 37 °C im kompletten Medium: 8 mM MgCl₂ × 6 H₂O, 8 mM KCl, 0,25 M Tris-HCl (pH 8), 0,235 M Saccharose, 25 mM Mercaptoäthanol, 2 mM ATP, 60 μM dATP, 60 μM dCTP, 60 μM dGTP, 60 μM dTTP. B: Inkubation bei 37 °C im unkompletten Medium: Medium wie A, jedoch ohne dATP, dCTP und dGTP. C: Inkubation bei 0 °C im kompletten Medium. A, B, C: Vorinkubationszeit 30 min, dann Zugabe von 1 μCi [³H]TTP pro Inkubationsröhrchen (10⁷ Kerne pro ml). Die Punkte repräsentieren die Mittelwerte aus 3 Experimenten mit jeweils 84 Inkubationsröhrchen.

Die Brauchbarkeit der verwendeten Isolierungs- und Inkubationsmethoden ist aus Abb. 1 und Abb. 2 ersichtlich. Die [³H]TTP-Einbaukinetik zeigt bei Anwesenheit aller vier Nucleotide (Abb. 1 A) über zwei Stunden einen linearen Anstieg. Der nucleotid-

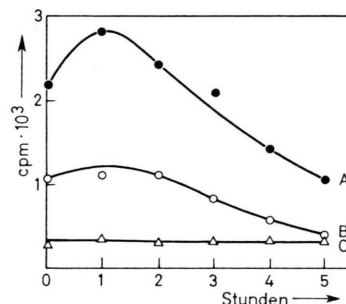


Abb. 2. [³H]TTP-Einbau in isolierte Leberzellkerne normaler Ratten nach unterschiedlichen Vorinkubationszeiten (0–5 Stunden). A: Komplettes Medium mit 4 Nucleotiden. B: Medium ohne die Nucleotide dATP, dCTP und dGTP. C: Komplettes Medium. A, B: Inkubation bei 37 °C, C: Inkubation bei 0 °C. Zugabe von [³H]TTP 40 min. Mittelwerte aus 3 Experimenten mit jeweils 72 Inkubationsröhrchen. Einzelheiten siehe Abb. 1.

unabhängige (unspezifische) Einbau (Abb. 1 B) verläuft dagegen weniger steil und die entsprechende Kurve flacht sich bald ab. Das günstige Verhältnis von spezifischem (Kurve Abb. A) und unspezifischem Einbau ist nach etwa zwei Stunden erreicht. In Abb. 1 ist zusätzlich der [³H]TTP-Einbau bei Anwesenheit aller vier Nucleotide, aber bei Inkubation bei 0 °C dargestellt (Abb. 1 C). Im Eisbad findet kein Einbau mehr statt.

In Abb. 2 ist der Vitalitätsverlust der Leberzellkerne während verschieden langer Inkubationszeit demonstriert. Um den Aktivitätsverlust zu bestimmen, wurden während verschiedenen Zeitabschnitten die [³H]TTP-Einbauraten bestimmt. Aus Abb. 2 wird deutlich, daß der nucleotidabhängige [³H]TTP-Einbau (A) während der ersten Stunde zunimmt, dann aber stetig abfällt. Der unspezifische Einbau (B) wird dagegen nur gering verändert. Die optimale Inkubationszeit der Zellkerne liegt demnach während der ersten drei Stunden. In diesem Zeitraum sollte es möglich sein, sowohl Inhibitoren als auch Stimulatoren des [³H]TTP-Einbaues zu erfassen. In den folgenden Versuchen wurden daher die Kerne 30 bzw. 60 min vorinkubiert, darauf der Einbau von [³H]TTP über 60 bzw. 120 min verfolgt. Um zu zeigen, daß bei dem hier verwendeten Testsystem tatsächlich ein echter Einbau in die DNA erfolgt, wurde die Wirkung von Actinomycin D auf

den [^3H]TTP-Einbau untersucht²². In Abb. 3 ist der [^3H]TTP-Einbau nach Zugabe von Actinomycin D dargestellt. Dieser Versuch zeigt, daß die Hemmwirkung von Actinomycin D nur beim kompletten Medium (A), nicht aber beim unkomplet-

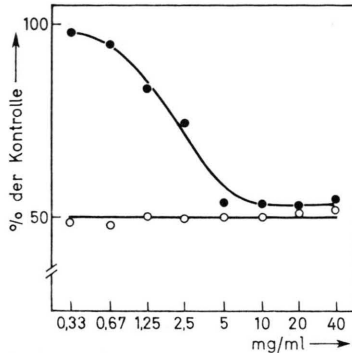


Abb. 3. Einbau von [^3H]TTP in isolierte Leberzellkerne normaler Ratten nach Zugabe von Actinomycin D (Sharp u. Dohme, München). A, ●—●—● Einbau im kompletten Medium, B, ○—○—○ Einbau im unkompletten Medium. Mittelwerte aus je 5 Inkubationsröhrchen. Einzelheiten siehe Abb. 1.

ten Medium (B) eintritt. Durch Actinomycin D wird also nur der nucleotidabhängige Einbau reduziert. 5 mg Actinomycin D pro Ansatz (1 ml) genügen, um eine 100-prozentige Hemmwirkung des echten Einbaues (Differenz der beiden Einbauraten) zu erzielen.

Die Wirkung des Lebercytoplasmas wurde in verschiedenen Konzentrationen auf isolierte Leberzellkerne untersucht. Die verwendeten Konzentrationen lagen zwischen 0,05 und 5 mg Protein pro ml Inkubationsmedium. In diesem Bereich ließen sich eindeutige Dosis-Wirkungskurven herstellen. Für die weiteren Versuche wurde die Dosis verwendet, die eine 25–50-prozentige Hemmwirkung nach einstündiger Inkubationszeit mit [^3H]TTP bewirkt (1 mg/ml Inkubationsmedium). Auch bei wiederholter Herstellung des Cytoplasmas wurde jeweils bei gleichen Dosen eine gleichstarke Wirkung erreicht.

In verschiedenen Experimenten wurde untersucht, wie Cytoplasma aus Leber, das zu verschiedenen Zeitpunkten nach 2/3 Hepatektomie bzw. Laparotomie gewonnen wurde, auf die Zellkerne wirkt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 zusammengefaßt: Cytoplasma, das von Lebern unbehandelter Tiere gewonnen wurde, unterscheidet sich in seiner Wirkung nicht von Cytoplasma, das von teilhepatektomierten Tieren hergestellt wurde. Cytoplasma — zu ver-

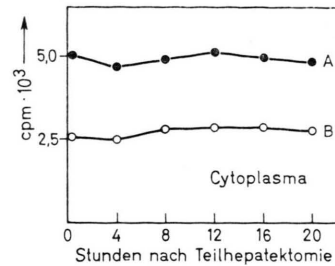


Abb. 4. Wirkung von Cytoplasma (Cytosol, 105 000 × g-Überstand) (1 mg/ml Inkubationsmedium), auf den [^3H]TTP-Einbau isolierter Leberzellkerne normaler Ratten. Das Cytoplasma stammte von verschiedenen Zeitpunkten nach einer Teilhepatektomie (Cytoplasma bei 0 = Cytoplasma unbehandelter Tiere). A: Komplettes Medium. B: Unkomplettes Medium. Mittelwerte aus 3 Experimenten mit jeweils 48 Inkubationsröhrchen. 3 verschiedene Cytoplasma-Chargen. Einzelheiten siehe Abb. 1.

schiedenen Zeitpunkten nach der Operation gewonnen — hemmt den [^3H]TTP-Einbau wie das Cytoplasma unbehandelter und laparotomierter Tiere um etwa 50%.

Cytoplasma wurde auch an Leberzellkernen getestet, welche 20 Stunden nach einer Teilhepatektomie gewonnen worden waren. Die Ergebnisse sind in Tab. I zusammengestellt: Es zeigt sich hier eine Steigerung des [^3H]TTP-Einbaues durch Cytoplasma, das 8 Stunden nach Teilhepatektomie hergestellt wurde.

In den folgenden Experimenten wurde statt Cytoplasma Blutserum verwendet. In Konzentrationen von 28% wurden die Seren, die zu verschiedenen Zeiten nach Teilhepatektomie gewonnen worden waren, zu den Kernsuspensionen gegeben. Die Wirkung der verschiedenen Seren wurde zunächst wieder bei den Zellkernen unbehandelter Ratten untersucht. Abb. 5 zeigt eine deutliche Stimulierung des

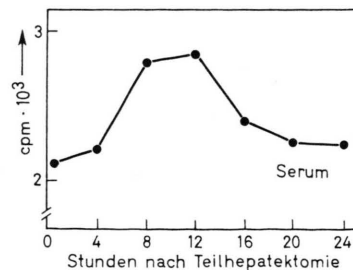


Abb. 5. [^3H]TTP-Einbau in isolierte Leberzellkerne normaler Ratten bei Inkubation mit Serum (28%) teilhepatektomierter Ratten, das 0–24 Stunden nach der Operation gewonnen wurde. Angegebene Werte: Differenz der Einbauraten im kompletten und unkompletten Inkubationsmedium, cpm pro 10⁷ Kerne. 3 Experimente mit 3 verschiedenen Serumchargen. Pro Experiment wurden 56 Inkubationsröhrchen verwendet.

Tab. I. Wirkung von Leber-Cytoplasma (A) bzw. Serum (28%) (B) — gewonnen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Teilhepatektomie — auf den $[^3\text{H}]$ TTP-Einbau isolierter Leberzellkerne, die 20 Stunden nach einer 2/3 Hepatektomie isoliert wurden. Angegebene Werte: Differenz der Einbauraten im kompletten und unkompletten Inkubations-Medium; (cpm pro 10^7 Kerne). Für jedes Experiment wurden neue Cytoplasma-Chargen bzw. Serum-Chargen hergestellt. (30 min Vorinkubation, 60 min Inkubation mit $[^3\text{H}]$ TTP.) Angegeben sind die Mittelwerte (\bar{x}) aus je 3 Inkubationsröhrchen und die entsprechenden Prozentzahlen (kursiv). Einzelheiten siehe Abb. 1 und Text.

		Stunden nach Teilhepatektomie						
A	Experiment	0	4	8	12	16	20	24
Wirkung von Cytoplasma	I \bar{x}	1585	1585	2458	1642	1645	1699	1668
	%	100	100	155	104	104	107	105
	II \bar{x}	1246	1259	1538	1227	1191	1324	1223
	%	100	101	123	98	96	106	98
	III \bar{x}	1572	1804	2233	1806	1573	1891	1529
	%	100	115	142	115	100	120	97
B Wirkung von Serum	I \bar{x}	1829	2642	2361	2238	2146	1916	1917
	%	100	145	129	122	117	105	105
	II \bar{x}	1450	1842	1756	1649	1566	1461	1466
	%	100	127	121	114	108	101	101
	III \bar{x}	1444	2553	2380	1802	1676	1495	1482
	%	100	177	165	125	116	104	103

$[^3\text{H}]$ TTP-Einbaues in den Zellkernen durch Seren, die 8 bzw. 12 Stunden nach Teilhepatektomie gewonnen worden waren.

Die Wirkung der Seren wurde ebenfalls auf Kerne untersucht, die von teilhepatektomierten Tieren stammten (Tab. I). Seren, welche 8 und 12 Stunden nach einer Leberresektion hergestellt worden waren, zeigen auch bei diesen Kernen einen stimulierenden Effekt. Zusätzlich bewirkt Serum, das 4 Stunden nach der Operation gewonnen wurde, eine stimulierende Wirkung, welche wesentlich größer als bei anderen Zeitpunkten ist. Somit zeigt Serum im Gegensatz zu Cytoplasma sowohl auf den $[^3\text{H}]$ TPP-Einbau isolierter Kerne unbehandelter als auch teilhepatektomierter Ratten eine deutliche Wirkung.

Diskussion

In Geweben und Organen eines ausgewachsenen Organismus besteht zwischen Zellvermehrung und Zellverlust ein Gleichgewicht. Nur eine ständige Kontrolle des Wachstums kann dieses Gleichgewicht aufrechterhalten. Die bisherigen Experimente konnten jedoch nicht eindeutig klären, wodurch die Wachstumsregulation der Leber zustande kommt³¹⁻³⁴. Durch Anwendung neuer Methoden, wie z. B. der DNA-Synthese-Bestimmung in isolierten Zellkernen sind neue Möglichkeiten zur Erforschung dieser Regulationsvorgänge geschaffen worden.

Bei Anwendung einer modifizierten Methode von Blobel und Potter²⁸ konnten unbeschädigte und

weitgehend von Zellmembranen und Cytoplasma befreite Zellkerne hergestellt werden. Dies ließ sich durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nachweisen³⁵. Beim Inkubationsmedium haben wir uns weitgehend auf andere Autoren gestützt und konnten deren Ergebnisse bestätigen¹⁸⁻²⁶. In Versuchsansätzen mit kompletten und unkompletten Medien konnten wir die unspezifisch gebundene Radioaktivität sowie die Poly- $[^3\text{H}]$ TTP-Bildung von der spezifisch an die DNS gebundene Radioaktivität abgrenzen. Diese Art der Kontrolle erscheint hinreichend genau, um Cytoplasma- und Serumwirkung auf die DNA-Synthese isolierter Leberzellkerne zu erfassen. Versuche mit Actinomycin D zeigten, daß mit dieser Substanz lediglich der spezifische Einbau blockiert wurde.

Tatsächlich konnten wir auch eine dosisabhängige Depression des $[^3\text{H}]$ TTP-Einbaues durch Cytoplasma feststellen. Allerdings zeigte Cytoplasma, das zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Teilhepatektomie hergestellt worden war, nur bei isolierten Leberzellkernen teilhepatektomierter Ratten eine unterschiedliche Wirkung. In diesem Versuchsansatz besaß Cytoplasma, das 8 Stunden nach Teilhepatektomie gewonnen worden war, die übliche Hemmwirkung nicht. Dieser Befund ist dadurch erklärbar, daß die normalerweise im Cytoplasma vorliegenden Hemmsubstanzen zu einem bestimmten Zeitraum nach Teilhepatektomie inaktiviert werden und somit die herrschende Repression aufgehoben wird. Ein Anlaufen der DNA-Synthese wäre dadurch

möglich. Inwieweit diese Wirkung jedoch leberspezifisch ist, bleibt noch offen. Orientierende Untersuchungen über Proteingehalt und über die Aktivitäten verschiedener Enzyme zeigten, daß sowohl nach Laparotomie als auch nach Teilhepatektomie erhebliche Verschiebungen in der Zusammensetzung des Cytoplasmas eintreten können³⁵. DNA-Synthese stimulierende oder hemmende Faktoren könnten demnach auf solche Veränderungen zurückgehen. Die Unterschiede in der Proteinkonzentration konnten wir in dieser Versuchsanordnung ausschließen, die Unterschiede in den Enzymaktivitäten nicht.

Die Stimulierung der DNA-Synthese der Leber durch Serum teilhepatektomierter Tiere ist seit langem bekannt³⁶. Morioka und Mitarbeiter²⁶ fanden diese stimulierende Wirkung auch bei isolierten Leberzellkernen. Allerdings haben Morioka *et al.* das Serum nur zu einem Zeitpunkt nach der Teilhepatektomie überprüft, zeitliche Zusammenhänge blieben unberücksichtigt. Wir untersuchten deshalb die Wirkung von Serum, das zu verschiedenen Zeit-

punkten (0–24 Stunden) nach Teilhepatektomie gewonnen worden war, auf die DNA-Synthese von Leberzellkernen normaler und teilhepatektomierter Ratten. Die stimulierende Wirkung auf die DNA-Synthese findet sich bei allen Zellkernen. Jedoch steigert nur Serum, das 4–12 Stunden nach Teilhepatektomie gewonnen wurde, den [³H]TTP-Einbau in isolierten Kernen. Auch bei diesen Untersuchungen konnte bisher nicht geklärt werden, ob die beschriebenen stimulierenden Wirkungen spezifischer Natur sind. Auch muß berücksichtigt werden, daß gerade bei den Versuchen mit Serum die physiologische Kontrolle des Cytoplasmas ausgeschaltet war. Weitere Versuche müssen daher zeigen, inwieweit es sich bei den Wirkungen des Cytoplasmas und des Serums auf isolierte Zellkerne um leberspezifische Wachstumsregulatoren handelt.

Wir danken Fräulein G. Starker für ihre gewissenhafte, ausgezeichnete Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente.

- ¹ N. L. R. Bucher, *Int. Rev. Cytol.* **15**, 245 [1963].
- ² J. W. Grisham, *Normal and Malignant Cell Growth* (W. H. Kirsten, ed.), p. 28, Reihe: Recent Results in Cancer Research. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1969.
- ³ E. Grundmann u. H. J. Seidel, *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. VI, 2, p. 129, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1969.
- ⁴ S. Bengmark, *Tumors of the Liver* (G. T. Pack and A. H. Islami, eds.), p. 187, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1970.
- ⁵ J. W. Grisham, G. F. Leong, M. L. Albright u. J. D. Emerson, *Cancer Res.* **26**, 1476 [1966].
- ⁶ F. L. Moolten u. N. L. R. Bucher, *Science* **158**, 272 [1967].
- ⁷ M. Virolainen, *Exp. Cell Res.* **33**, 588 [1964].
- ⁸ J. F. Scaife, *Experientia* **26**, 1071 [1970].
- ⁹ D. Paul, H. Leffert, G. Sato u. R. W. Holley, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **69**, 374 [1972].
- ¹⁰ G. D. Morley u. H. Kingdon, *Biochim. Biophys. Acta* **308**, 260 [1973].
- ¹¹ P. Weiss u. J. L. Kavanau, *J. Gen. Physiol.* **41**, 1 [1957].
- ¹² W. S. Bullough, *Cancer Res.* **25**, 1683 [1964].
- ¹³ J. B. Gurdon, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 545 [1967].
- ¹⁴ H. J. Harris, *Cell Sci.* **2**, 23 [1967].
- ¹⁵ D. M. Prescott u. L. Goldstein, *Science* **155**, 469 [1967].
- ¹⁶ D. L. Friedman u. G. C. Mueller, *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 455 [1968].
- ¹⁷ H. V. Hershey, J. F. Stieber u. G. C. Mueller, *Eur. J. Biochem.* **34**, 385 [1973].
- ¹⁸ M. Hyodo u. T. Ono, *Exp. Cell Res.* **60**, 401 [1970].
- ¹⁹ W. E. Lynch, R. F. Brown, T. Umeda, S. G. Langreth u. I. Lieberman, *J. Biol. Chem.* **245**, 3911 [1970].
- ²⁰ S. Seeber u. U. Weser, *Nature* **225**, 5233 [1970].
- ²¹ W. E. Lynch, T. Umeda, M. Uyeda u. I. Lieberman, *Biochim. Biophys. Acta* **287**, 28 [1972].
- ²² G. S. Probst, E. Bikoff, S. J. Keller u. R. Meyer, *Biochim. Biophys. Acta* **281**, 216 [1972].
- ²³ H. V. Tuzek u. H. M. Rabes, *Beitr. Path.* **147**, 221 [1972].
- ²⁴ A. Alonso u. H. P. Arnold, *FEBS Letters* **29**, 333 [1973].
- ²⁵ W. Frank, *Z. Naturforsch.* **20 b**, 479 [1965].
- ²⁶ K. Morioka, H. Shimada u. H. Terayama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **51**, 451 [1973].
- ²⁷ C. M. Higgins u. R. M. Anderson, *Arch. Path.* **14**, 42 [1931].
- ²⁸ G. Blobel u. R. Potter, *Science* **154**, 1662 [1966].
- ²⁹ A. J. Shatkin, *Fundamental Techniques in Virology* (K. Habel u. N. P. Sulzmann eds.), Academic Press, New York 1969.
- ³⁰ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 [1951].
- ³¹ W. G. Verly, Y. Deschamps, J. Pushpathadam u. M. Desrosiers, *Can. J. Biochem.* **49**, 1376 [1971].
- ³² M. Volm, J. Mattern u. K. Wayss, *Exp. Path.* **7**, 84 [1972].
- ³³ M. Volm, A. D. Ho, J. Mattern u. K. Wayss, *Exp. Path.* **8**, 341 [1973].
- ³⁴ K. Wayss, J. Mattern u. M. Volm, *Exp. Path.* **8**, 384 [1973].
- ³⁵ G. Merz, Dissertation, Univ. Heidelberg 1974.
- ³⁶ H. Wrba and R. Rabes, *Cancer Res.* **23**, 1116 [1963].