

## Cytochemischer Nachweis phasen- und regionsspezifischer Veränderungen des DNS-Gehaltes während der Embryogenese von *Triturus vulgaris*

Im Gegensatz zur RNS unterliegt die DNS als genetisches Material infolge ihrer Stoffwechselstabilität in der Regel keinen quantitativen Veränderungen. Hiervon abweichende Angaben (Zusammenstellungen bei<sup>1-3</sup>) beziehen sich vornehmlich auf experimentell beeinflusste adulte Gewebe, wobei zum Teil die interphasische DNS-Verdoppelung unberücksichtigt blieb. Über die Verhältnisse in schnellwachsenden embryonalen Geweben liegen bisher keine exakten Angaben vor. Die Annahme liegt jedoch nahe, dass beim Durchlaufen der pluripotenten embryonalen Zellen durch die Prozesse der Determination und Differenzierung quantitative DNS-Veränderungen auftreten, die möglicherweise Ausdruck starker genetischer Aktivität in bestimmten Keimregionen und in bestimmten Entwicklungsphasen sind.

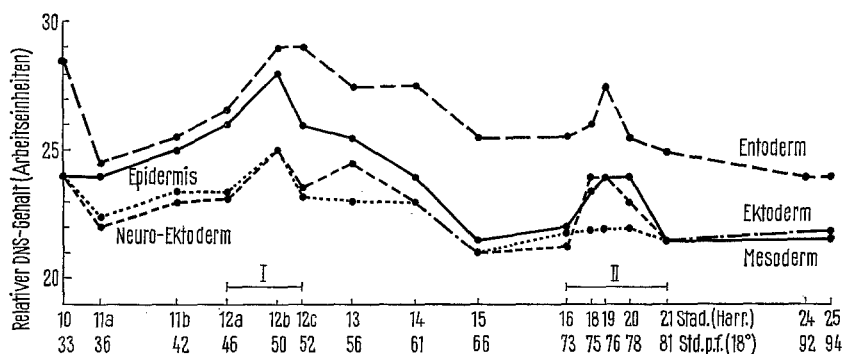
Aus verschiedenen Regionen (Entoderm, Chordamesoderm, Neuroektoderm und präsumptive Epidermis) von *Triturus vulgaris*-Embryonen in den Harrison-Stadien 7-25 (Morula bis frühe Schwanzknospe) wurden kleine Gewebestückchen entnommen, die Kerne isoliert und einer standardisierten Feulgen-Reaktion unterworfen (Fixierung: Äthanol-Eisessig 9:1; Hydrolyse: 5*n* HCl, 20°, 30 min<sup>4,5</sup>). Aus jedem Gewebestück wurden ca. 70 Kerne mit einem integrierenden Mikrodensitometer (Barr & Stroud, Glasgow) gemessen. Wegen der Asynchronie der Teilungen lassen sich Karyogramme aufstellen, die die interphasische DNS-Verdoppelung erkennen lassen und die zur Aufstellung von Kurven erforderlichen Basis-Werte (2*n*) liefern.

Ausgehend von ziemlich hohen Werten in der Morula nimmt die DNS-Menge in allen Keimbereichen kontinuierlich ab und erreicht zu Beginn der Gastrulation ein vorläufiges Minimum (Figur). Der Wert für das Ektoderm (Neuroektoderm und präsumptive Epidermis) entspricht hier dem definitiven 2*n*-Wert (doppelte Menge eines Sperma-Kerns), während Mesoderm und Entoderm signifikant höhere Werte aufweisen (11%). In der Folge finden sich zwischen den 4 Keimbereichen sowohl erhebliche Unterschiede als auch Übereinstimmungen. Während des gesamten berücksichtigten Entwicklungszeitraumes haben die Entoderm-Kerne immer die höchste DNS-Menge. Das steht in Einklang mit Befunden an *Xenopus*, nach denen das Entoderm im gleichen Entwicklungszeitraum eine wesentlich höhere Synthese von t- und wahrscheinlich auch m-RNS aufweist als die anderen Keimblätter<sup>6</sup>. Das Mesoderm ist bis zum mittleren Dotterpropf-Stadium

weitgehend dem Entoderm angeglichen, nähert sich dann aber mehr und mehr dem Ektoderm. In den Kernen aller Keimbereiche erfolgt bis gegen Ende der Gastrulation eine gleichartige DNS-Vermehrung um jeweils etwa 12% und anschliessend bis zum Neurula-Stadium 15 wieder eine Verminderung, wobei das Ektoderm zum zweitenmal, das Mesoderm erstmalig den Definitivwert (2*n* = doppelte Menge eines Spermakerns) erreicht. Dieser Wert ist für die Epidermis endgültig, während im Neuroektoderm und im Chordamesoderm in der zweiten Hälfte der Neurulation eine zweite DNS-Zunahme auftritt. Eine solche Vermehrung erfolgt gleichzeitig auch im Entoderm, aber nicht in der Epidermis. Bemerkenswerterweise ist das Mass der Zunahme (ca. 11%) von der gleichen Grössenordnung wie bei der ersten Vermehrung; jedoch ist ihre Dauer erheblich kürzer (8 h gegenüber 30). Die steilen Flanken der Maxima der ersten Zunahme (Stadium 12b) lassen jedoch erkennen, dass auch hier der Hauptteil der DNS-Zunahme im gleichen Zeitraum (ca. 6 h) und im gleichen Ausmass (11%) erfolgt (vergleiche die mit I und II bezeichneten kurzfristigen Kurvenanstiege der Figur).

Während des Schwanzknospen-Stadiums (ab Stadium 25) stellt sich der endgültige DNS-Wert ein. Im Entoderm ist dies erheblich später der Fall. (Der genaue Zeitpunkt muss noch festgestellt werden.)

Das DNS-Maximum I ist zeitlich korreliert mit dem Übergang der embryonalen Zellen in den Zustand der Determination beziehungsweise beginnenden Cytodifferenzierung (Kompetenzverlust des Ektoderms, Auftreten typischer Nucleolen sowie charakteristischer Strukturen des Grundplasmas). Das DNS-Maximum II ist zeitlich korreliert mit dem Beginn der organologischen Differenzierung (Neuralrohr-Schluss, Chordadifferenzierung usw.). Das Ausbleiben des zweiten DNS-Anstieges in der präsumptiven Epidermis kann deshalb so erklärt



Veränderung des DNA-Gehaltes in den Zellkernen verschiedener Regionen von *Triturus vulgaris* - Embryonen. Ordinate: Relativer DNS-Gehalt in Arbeits-Einheiten (Integral der Gesamttextinktion). Abszisse: Entwicklungsstadien nach HARRISON sowie Stunden nach Besamung (bei 18°C).

<sup>1</sup> H. ROELS, Int. Rev. Cytol. 19, 1 (1966).

<sup>2</sup> A. J. HALE, in *Introduction to Quantitative Cytochemistry* (Academic Press, New York 1966), p. 183.

<sup>3</sup> R. AROLD und W. SANDRITTER, Histochemie 10, 88 (1967).

<sup>4</sup> J. JORDANOV, Acta Histochem. 15, 135 (1963).

<sup>5</sup> N. BÖHM, Histochemie 14, 201 (1968).

<sup>6</sup> H. R. WOODLAND und J. B. GURDON, J. Embryol. exp. Morph. 19, 363 (1968).

werden, dass hier zu diesem Zeitpunkt keine vergleichbare organologische Differenzierung stattfindet.

Messungen an Explantaten von nicht-induziertem Ektoderm aus einer frühen Gastrula stimmen vollkommen überein mit den Werten für die Epidermis in situ: Auftreten der ersten, Fehlen der zweiten DNS-Zunahme. Das stützt die Annahme, dass die erste Zunahme mit der Cytodifferenzierung (Ektodermzelle  $\rightarrow$  atypische Epidermiszelle), die zweite mit der organologischen Differenzierung in Verbindung steht. (Das explantierte, nicht-induzierte Ektoderm ist bekanntlich zu keinerlei organologischer Differenzierung befähigt.) Unter Dauereinwirkung von Actinomycin D (1  $\mu$ g/ml) werden die DNS-Werte vollständig nivelliert, das heisst auch die erste DNS-Vermehrung unterbleibt. Dieser Befund ist sehr überraschend, zumal, wie aus den Karyogrammen ersichtlich ist, die interphasische DNS-Replikation sowie die Kern- und Zellteilung erwartungsgemäss ungestört ablaufen. Es ist daher anzunehmen, dass die Synthese der kurzfristig zusätzlich erscheinenden DNS unabhängig ist von der normalen interphasischen DNS-Verdoppelung. Eine eingehendere Analyse der Karyogramme, durch die

weitere Aufschlüsse über das Synthesegesehen während der Interphase zu erwarten sind, ist im Gange. Ähnliche Untersuchungen an Explantaten von induziertem Ektoderm einer späten Gastrula (ohne und mit Actinomycin) sowie an Explantaten von Chordamesoderm und Dotterentoderm wurden durchgeführt, bedürfen aber noch der Auswertung.

**Summary.** The DNA content of isolated cells of *Triturus vulgaris* embryos (morula through early tail-bud) was measured cytophotometrically. In various regions (entoderm, chordamesoderm, neuroectoderm, presumptive epidermis) considerable differences occur. In particular, some phase-specific DNA increases (approximately 11%) of short duration were detected, which are correlated with the onset of cyto- and organodifferentiation, respectively, and which are caused independent of the interphase DNA reduplication.

K. LOHMANN und W. VAHS

Zoologisches Institut (I) der Universität Köln,  
D-5 Köln-Lindenthal (Deutschland), 25. Juli 1969.

## Glycogenesis Type II: Glycogen Storage in Cell Cultures from Muscle

Glycogenesis type II or Pompe's disease is characterized by extensive deposition of normal glycogen with massive involvement of striated muscle. The absence of the  $\alpha$ -1-4-glucosidase, a lysosomal enzyme, has been demonstrated in this condition by HERS<sup>1</sup>. The  $\alpha$ -1-4-glucosidase deficiency is reported in almost all tissues of affected subjects<sup>2</sup>; nevertheless, there is disagreement as to whether this enzymatic defect alone can cause glycogen storage<sup>3-5</sup>.

Recently NITOWSKY and GRUNFELD<sup>6</sup> have studied fibroblast cell cultures derived from the skin of a 5-month-old patient. The cultured fibroblasts showed no glycogen deposits even though  $\alpha$ -1-4-glucosidase was absent.

We had the opportunity to study with histochemical reactions, cell cultures from the skin and muscle of a 1-year-old female with glycogenesis type II. The diagnosis was based on clinical features, histological patterns of muscle biopsy and  $\alpha$ -1-4-glucosidase deficiency biochemically determined in the fresh muscle and skin.

Tiny fragments obtained from a surgical biopsy of the skin and the gastrocnemius were plated on to coverslips placed in T-flasks with Eagle's synthetic medium plus 15% calf foetal serum and antibiotics. The muscle cultures were allowed to grow for 13 days and the skin cultures for 32 days. Then the coverslips were removed and stained for phosphorylase<sup>7</sup>, ATPase<sup>8</sup> and glycogen, with periodic acid-Schiff reagent before and after digestion with diastase. Fibroblast cultures from normal skin and muscle cultures from 4 children aged 6-13 months, without muscular or metabolic diseases, were used as controls.

The fibroblast cultures from the patient's skin and those of the control subjects demonstrated some difference in staining with PAS reagent. A more evident PAS positivity was noticed in the patient's fibroblasts. However it was not reduced by diastase incubation in a significant way.

The muscle cultures of our patient and those of the controls after 13 days of growth were mainly composed

of fibroblast-like cells. They were rather dumpy, often connected by cytoplasmic bridges or aggregated in bi- or multinucleated cells. In the muscle cultures of the control subjects PAS positive material was present in 2 different patterns, one diffused throughout the cytoplasm and the other confined to a few cytoplasmic granules. Only the latter were absent in the slides incubated with diastase.

In the muscle cultures of the patient with glycogenesis type II, PAS positive material was plentifully present in the majority of the cells (Figure 1). This material appeared in intensely stained granules which almost completely filled the cytoplasm in some cells (Figure 2). After diastase digestion the PAS positive granules were absent and a faint PAS positivity could be seen.

Phosphorylase and ATPase reactions were strongly positive in the cell cultures from the muscle of both patients and control subjects, while they were weakly positive in the fibroblast skin cultures.

We are not able to assess the nature of the cells deriving from the muscle. However, the peculiar morphology and the strong phosphorylase and ATPase activity in these cells allow us to distinguish them from common fibroblast ones. A lack of glycogen accumulation, at least histochemically detectable, in the skin cultures in contrast

<sup>1</sup> H. G. HERS, *Biochem. J.* **86**, 11 (1963).

<sup>2</sup> K. STEINITZ, in *Advances In Clinical Chemistry* (Eds. H. SOBOTKA and C. P. STEWART; Academic Press Inc., New York, London 1967), p. 289.

<sup>3</sup> R. D. CARDIFF, *Pediatrics* **37**, 249 (1966).

<sup>4</sup> G. HUG, J. C. GARANCIS, W. K. SCHUBERT and S. KAPLAN, *Am. J. Dis. Child.* **117**, 457 (1966).

<sup>5</sup> J. C. GARANCIS, *Am. J. Med.* **44**, 289 (1968).

<sup>6</sup> H. M. NITOWSKY and A. GRUNFELD, *J. Lab. clin. Med.* **69**, 472 (1967).

<sup>7</sup> T. TAKEUCHI and G. G. GLENNER, *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 227 (1960).

<sup>8</sup> H. A. PADYKULA and E. HERMAN, *J. Histochem Cytochem.* **3**, 170 (1955).