

Quantitativ-histochemische Untersuchungen über den Gesamtproteingehalt in Zellkernen epidermal-dermaler und korialer Pigmentnaevi

G. EHLERS und W. MEYHÖFER

Universitäts-Hautklinik Gießen (Direktor: Prof. Dr. R. M. BOHNSTEDT)

Eingegangen am 12. Dezember 1968

Quantitative-Histochemical Investigations over the Whole Protein-Content in Nuclei from Epidermal-Dermal and Corial Pigmented Naevi

Summary. An account over the total protein content in nuclei of resting pigmented naevi with various types of histoarchitectonical configuration was presented, basing this work on the previous cytophotometrical studies. Precursively, the DNA, histon protein—as well as arginin content on identical tissue material has been discussed.

In contrast to human thymus lymphocytes, a statistical increase of the nucleohiston, arginin and total protein in pigmented naevi of corial type could be shown.

A displacement of the DNA peak in the interdiploid-tetraploid or tetraploid phase towards the right as well as an increase of the histon protein and arginin could be noticed in epidermal-dermal naevi with junctional activity. A statistical significant increase of the total protein could not be observed in opposite to pigmented naevi from corial type, despite the displacement of the total protein towards the right.

Zusammenfassung. Aufgrund der vorliegenden cytophotometrischen Untersuchungen wird über den Gesamtproteingehalt (Naphthol-Yellow-Färbung) in Zellkernen ruhender Pigmentnaevi unterschiedlicher histoarchitektonischer Ausgestaltung berichtet. Ergebnisse des DNS-, Histonprotein- und Arginingehaltes am gleichen Gewebsmaterial wurden bereits früher mitgeteilt.

Naevi pigmentosi des korialen Typs lassen bei einer diploiden DNS-Ausstattung einen statistisch signifikanten Nucleohiston-, Arginin- und Gesamtproteinanstieg gegenüber menschlichen Thymuslymphocyten erkennen.

Epidermal-dermale Naevi mit junctionaler Aktivität weisen eine Rechtsverschiebung der DNS-Gipfel in die interdiploid-tetraploide oder tetraploide Phase sowie eine weitere Zunahme der Histonproteine und des Arginins auf. Obgleich die Gesamtproteinsäulen ebenfalls nach rechts verschoben sind, läßt sich kein statistisch signifikanter Gesamtproteinanstieg im Vergleich zu Naevi pigmentosi vom korialen Typ nachweisen.

Quantitativ-cytochemische Untersuchungen an ruhenden Naevuszellen lassen erkennen, daß die Desoxyribonucleinsäure (DNS)-Ausstattung vom histologisch-histoarchitektonischen Aufbau abhängig ist (KNOTH, EHLERS u. MEYHÖFER, 1967; EHLERS u. KNOTH, 1968). Naevi

pigmentosi des epidermal-dermalen und korialen Typs weisen unterschiedliche DNS-Verteilungsmuster auf. Bei Nucleohistonbestimmungen können mit der DNS-Ausstattung vergleichbare, jedoch nicht so deutliche Differenzen festgestellt werden. Die Überprüfung des Arginin-gehaltes (EHLERS, 1968) am gleichen Untersuchungsgut hat ergeben, daß mit der DNS- und Nucleohistonzunahme epidermal-dermaler Naevi ein gleicher Befund auch für Arginin nachweisbar ist.

Weitere Untersuchungen betreffen die Ermittlung des Gesamtproteingehaltes.

Material und Methodik

Zur Untersuchung gelangten fünf pigmentierte Naevi naevocellulares, die in Lokalanästhesie operativ entfernt wurden. Hinweise über Alter und Geschlecht der Patienten, Erstmanifestation, Lokalisation und Wachstumstendenz der Naevi sowie über deren klinische und histologische Morphologie finden sich bei der Besprechung der Fälle 1–5 unserer vorausgegangenen Mitteilungen.

Von der Schnittfläche entsprechender Naevi pigmentosi entnommene Naevuszellen wurden auf mehreren Objektträgern ausgestrichen und über einen Zeitraum von 20 min in 96%igem Alkohol fixiert. Die Färbung erfolgte mit der von DEITCH angegebenen Methode (Naphthol-Yellow-S, pH 2,72). Die Messungen des Gesamtproteingehaltes konnten mit dem integrierenden Mikrodensitometer nach DEELEY im sichtbaren Licht bei der Wellenlänge 435 nm vorgenommen werden. Der DNS-Gehalt wurde nach Durchführung der Feulgen-Färbung (Hydrolysezeit 10 min) bereits zu einem früheren Zeitpunkt am gleichen Gerät bei der Wellenlänge 570 nm ermittelt. Menschliche Spermien und Thymuslymphocyten wurden zur Bestimmung des DNS- und Gesamtproteingehaltes in haploiden und diploiden Zellen gleichen färbereischen Bedingungen unterzogen. In der Ordinate entsprechender Säulendiagramme wurden die Zellzahl der gemessenen Zellen n , in der Abszisse die Arbeitseinheiten (AE = Integrationswert der gemessenen Extinktionen während des Abstrastervorganges) aufgetragen.

Zur statistischen Berechnung der Meßergebnisse der Naphthol-Yellow-Cytophotometrie verwendeten wir die Signifikanzberechnung nach dem Student-Verfahren (P-Test).

Die Gesamtprotein-Bestimmungen wurden an folgenden Naevustypen durchgeführt:

Fall 1 (D. F., JN 97/68 HK). Naevus pigmentosus et papillomatosus partim verrucosus, korialer Typ.

Fall 2 (C. H., JN 158/68 HK). Naevus pigmentosus et papillomatosus partim verrucosus, korialer Typ.

Fall 3 (B. W., JN 159/68 HK). Naevus pigmentosus et papillomatosus partim verrucosus, korialer Typ.

Fall 4 (W. P., JN 136/68 HK). Naevus pigmentosus et papillomatosus partim verrucosus, epidermal-dermaler Typ mit junktionaler Aktivität.

Fall 5 (D. K., JN 128/68 HK). Naevus pigmentosus, epidermal-dermaler Typ mit junktionaler Aktivität.

Cytophotometrische Untersuchungen

1. DNS-Ermittlung nach Feulgen-Färbung

a) *Menschliche Spermien*. Die Zellen gruppieren sich entsprechend ihres DNS-Gehaltes um das haploide Zentrum bei 13,5 AE. Die Meßwertstreuung liegt zwischen 5 und 15 AE. Der mittlere DNS-Gehalt \bar{x} (\bar{x} Mittelwert aller Meßergebnisse) weist einen Wert von 9,58 AE auf.

b) *Menschliche Thymuslymphocyten*. Regelrechtes DNS-Verteilungsmuster mit diploider Gipfelbildung um 27 AE. Meßwertstreuung zwischen 15 und 40 AE. Mittlerer DNS-Gehalt $\bar{x} = 26,19$ AE.

c) *Naevuszellen*. Fall 1. Diploide DNS-Verteilung mit Gipfelbildung um 27 AE. Streuung der Arbeitseinheiten zwischen 15 und 40 AE. Mittelwert der Meßergebnisse $\bar{x} = 24,79$ AE.

Fall 2. Diploide DNS-Ausstattung mit Gruppierung der Meßwerte um 27 AE. Meßwertstreuung zwischen 15 und 45 AE. Mittlerer DNS-Gehalt $\bar{x} = 27,43$ AE.

Fall 3. Diploides DNS-Verteilungsmuster mit Gruppierung der Arbeitseinheiten um 27 AE. Streuung der Meßwerte zwischen 15 und 40 AE. Mittlerer DNS-Gehalt $\bar{x} = 25,70$ AE.

Fall 4. Rechtsverschiebung des DNS-Gipfels in die hyperdiploide Phase mit Gruppierung der Arbeitseinheiten um 32,5 AE. Zunahme der Meßwertstreuung bis in den hypertetraploiden Bereich bei 60 AE. Mittelwert der Meßergebnisse $\bar{x} = 31,48$ AE.

Fall 5. Weitere Rechtsverschiebung der Meßwerte mit Ausbildung eines DNS-Gipfels im hypotetraploiden Raum um 47,5 AE. Der größte Anteil der gemessenen Zellen weist Werte zwischen 2c und 4c auf. Mittlerer DNS-Gehalt $\bar{x} = 41,23$ AE.

2. Gesamtproteinbestimmung nach Naphthol-Yellow-S-Färbung

a) *Menschliche Spermatozoenköpfe*. Deutliche Gipfelbildung um 12,5 AE. Streuung der Arbeitseinheiten zwischen 5 und 25 AE. Mittlerer Gesamtproteingehalt $\bar{x} = 13,09$ AE.

b) *Menschliche Thymuslymphocyten*. Zunahme der Meßwertstreuung bis 55 AE. Ausbildung eines Gesamtproteingipfels um 17,5 AE. Mittlerer Gesamtproteingehalt $\bar{x} = 25,45$ AE.

c) *Naevuszellen*. Fall 1. Gruppierung der Arbeitseinheiten mit Gipfelbildung um 32,5 AE. Meßwertstreuung zwischen 20 und 60 AE. Mittelwert der Meßergebnisse $\bar{x} = 35,67$ AE.

Fall 2. Säulenbildung um 32,5 AE mit Streuung der Arbeitseinheiten zwischen 20 und 60 AE. Mittlerer Gesamtproteingehalt $\bar{x} = 37,82$ AE.

Fall 3. Ausbildung des Gesamtproteingipfels um 27,5 AE. Meßwertstreuung zwischen 25 und 65 AE. Mittelwert der Meßergebnisse $\bar{x} = 40,21$ AE.

Fall 4. Deutliche Gruppierung der Meßwerte um 37,5 AE mit Streuung der Arbeitseinheiten bis 60 AE. Mittlerer Gesamtproteingehalt $\bar{x} = 37,48$ AE.

Fall 5. Ausgeprägte Gipfelbildung um 37,5 AE. Streuung der Meßwerte bis 60 AE. Mittlerer Gesamtproteingehalt $\bar{x} = 37,29$ AE.

Besprechung der Ergebnisse

Aufgrund quantitativ-histochemischer Untersuchungen an Zellkernen ruhender Naevi pigmentosi konnte festgestellt werden, daß die Desoxyribonucleinsäureverteilung vom histologisch-histoarchitektonischen Aufbau abhängig ist. Während Pigmentnaevi vom korialen Typ eine typische diploide DNS-Ausstattung aufweisen, lassen solche vom epidermal-dermalen Typ mit junktionaler Aktivität unter Zunahme der Meßwertstreuung DNS-Gipfelbildungen im interdiploid-tetraploiden oder tetraploiden Raum erkennen.

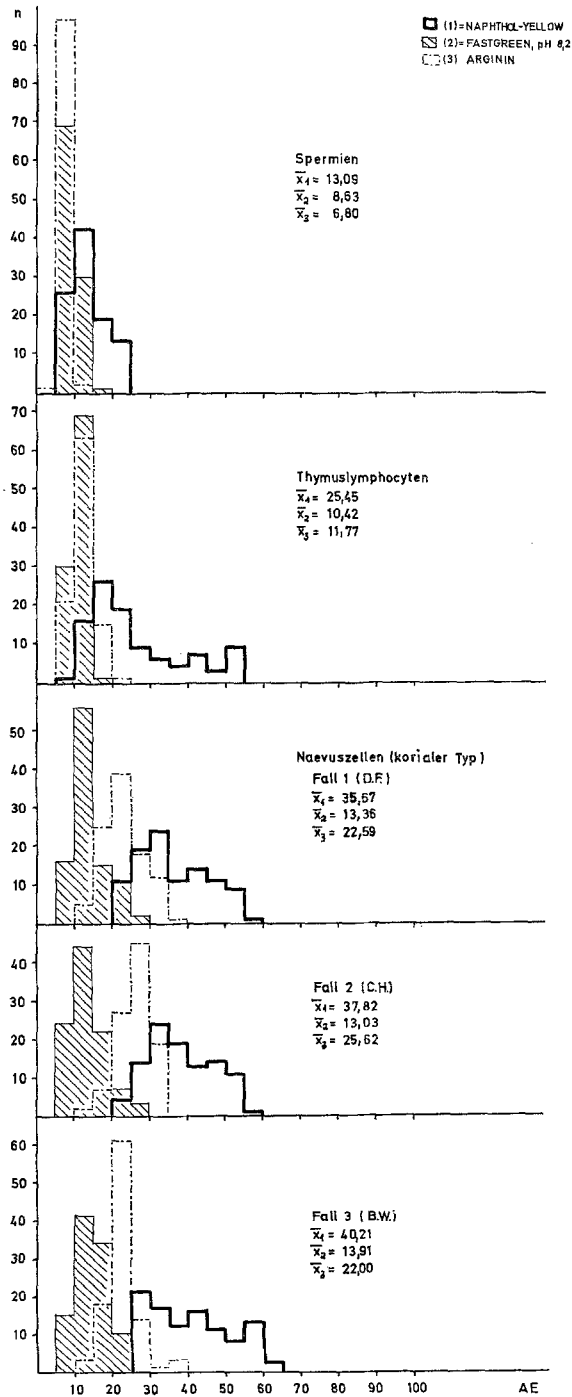
Auch bei der Bestimmung der Histonproteine sind von normalen diploiden Zellen abweichende Befunde nachzuweisen; mit der Zunahme der Meßwertstreuung steigt der mittlere Histonproteingehalt an. Zellkerne epidermal-dermaler Naevi pigmentosi weisen im Vergleich zu menschlichen Thymuslymphocyten und Naevuszellen des korialen Typs einen weiteren Nucleohistonanstieg auf, welcher mit der DNS-Verteilung vergleichbar ist (Abb. 1 und 2).

Bei der Ermittlung des Arginingehaltes am gleichen Gewebsmaterial konnte festgestellt werden, daß entsprechend der Zunahme des Nucleohistongehaltes in Zellkernen korialer und epidermal-dermaler Naevi gleiche Befunde auch für Arginin zu verzeichnen sind (Abb. 1 und 2).

In Fortführung unserer cytophotometrischen Untersuchungen erschien auch die Überprüfung des Gesamtproteins in Zellkernen ruhender Naevi pigmentosi von Interesse. Ein Vergleich entsprechender Cytoграмme (Abb. 3 und 4) läßt erkennen, daß der mittlere Gesamtproteingehalt in Naevuszellen der Gruppe I (koriale Naevi pigmentosi: Fall 1—3) gegenüber Thymuslymphocyten statistisch signifikant höhere Werte ($P \ll 0,001$) aufweist. Die Gesamtproteingipfel sind um 10—15 AE nach rechts verschoben. Dieser Befund entspricht den Untersuchungsergebnissen über die Nucleohiston- und Argininausstattung des gleichen Untersuchungsmaterials. Bei Naevuszellen der Gruppe II (epidermal-dermale Naevi: Fall 3 und 4) fällt eine weitere Rechtsverschiebung der Gesamtproteinsäulen auf. Statistische Berechnungen der Meßergebnisse der Naphthol-Yellow-Cytophotometrie weisen jedoch im Gegensatz zur schematischen Darstellung der Gesamtproteinverteilung zwischen beiden Naevusgruppen keine signifikanten Unterschiede nach.

Die cytophotometrischen Untersuchungen an ruhenden Naevuszellen haben ergeben, daß die DNS-Verteilung korialer Pigmentnaevi mit

Naphthol-Yellow-Fastgreen-Arginin Cytophotometrie



Naphthol-Yellow-Fastgreen-Arginin Cytophotometrie

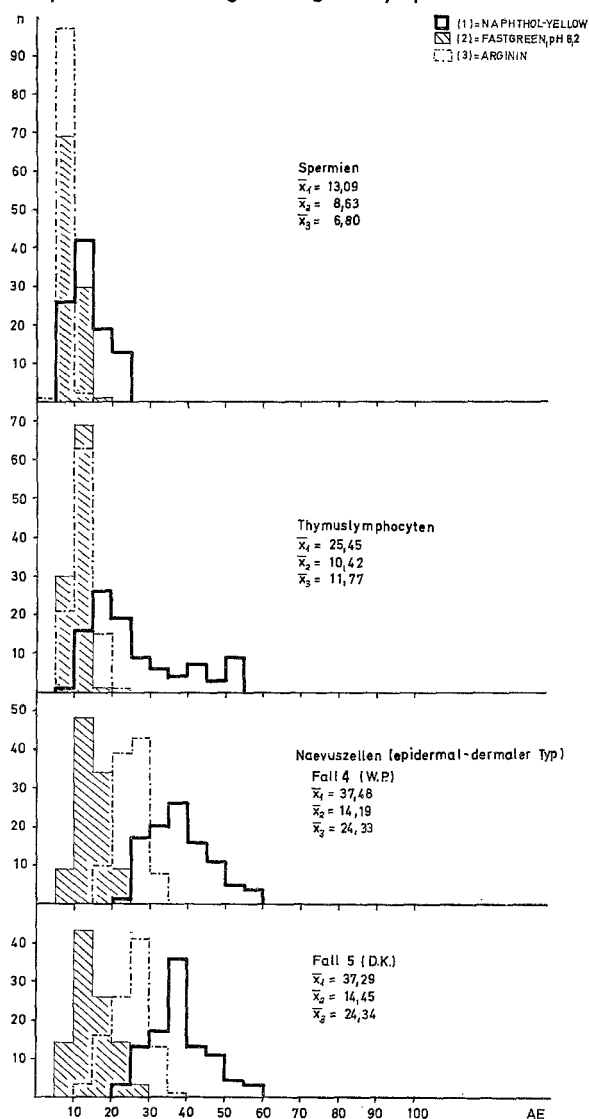


Abb. 1 und 2. Säulendiagramme der Naphthol-Yellow-, Fastgreen- und Arginin-Cytophotometrie an menschlichen Spermatozoenköpfen, Thymuslymphocyten sowie Naevuszellen. Nicht schraffierte Säulen: Meßergebnisse nach Naphthol-Yellow-Färbung (Gesamtprotein). Schraffierte Säulen: Meßergebnisse nach Fastgreen-Färbung (Histonprotein). Punkt-Strich-Säulen: Meßergebnisse nach Sakaguchi-Deitch-Färbung (Arginin). Ordinate: n = Anzahl der gemessenen Zellen. Abszisse: AE = Arbeitseinheiten

Feulgen-Naphthol-Yellow Cytophotometrie

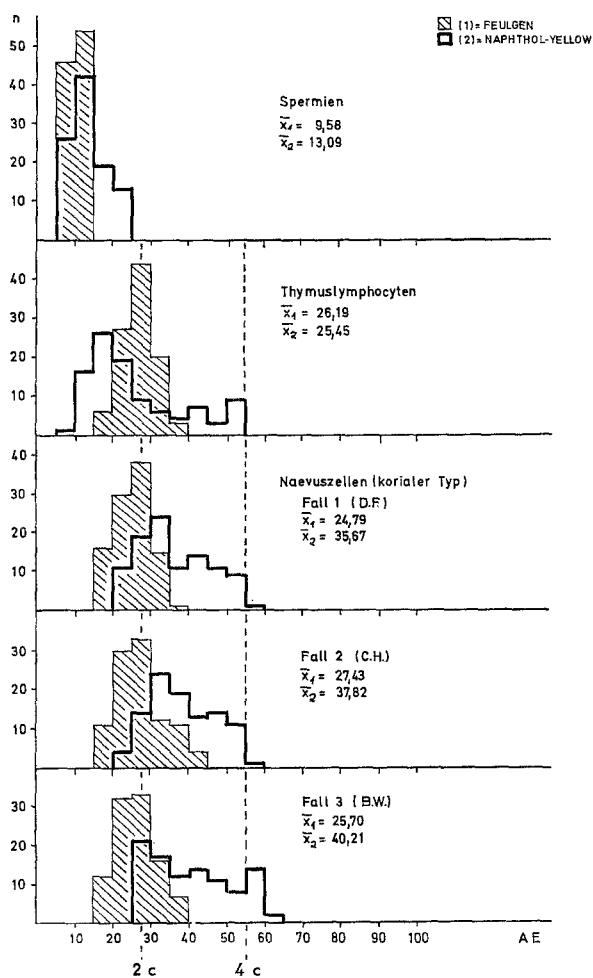


Abb. 3

der menschlicher Thymuslymphocyten vergleichbar ist. Der mittlere Nucleohistongehalt steigt statistisch signifikant an. Argininbestimmungen weisen eine weitere Zunahme bis zur Verdopplung ihrer Werte gegenüber normalen somatischen Zellen auf. In Naevuszellkernen des epidermal-dermalen Typs ist außer dem gesteigerten DNS-Stoffwechsel eine signifikante Zunahme des Nucleohiston- und Arginingehaltes gegenüber koralen Pigmentnaevi auffällig. Mit der Naphthol-Yellow-Cytophotometrie lassen sich zwischen beiden Naevusgruppen keine signi-

Feulgen-Naphthol-Yellow Cytophotometrie

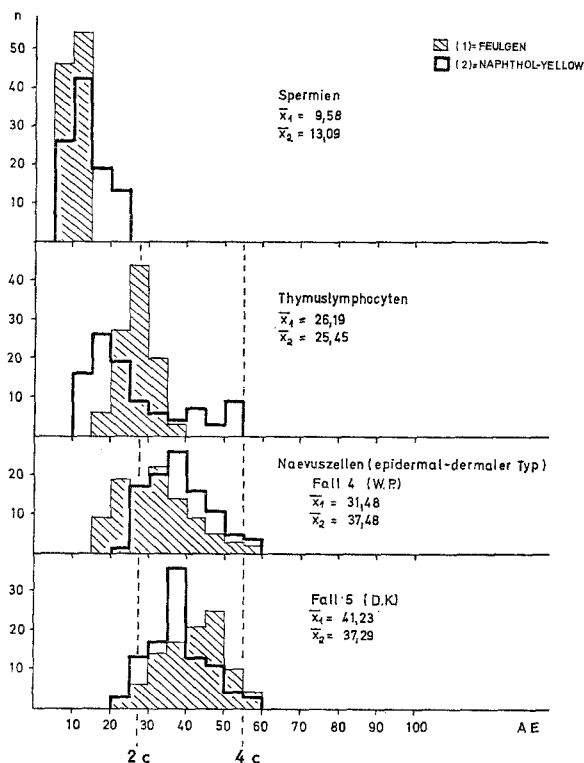


Abb. 4

Abb. 3 und 4. Säulendiagramme der Feulgen- und Naphthol-Yellow-Cytophotometrie an menschlichen Spermatozoenköpfen, Thymuslymphocyten sowie Naevuszellen. Schraffierte Säulen: Meßergebnisse nach Feulgen-Färbung (DNS). Nicht schraffierte Säulen: Meßergebnisse nach Naphthol-Yellow-Färbung (Gesamtprotein). Ordinate: n = Anzahl der gemessenen Zellen. Abszisse: AE = Arbeitseinheiten. $2c$ = diploider; $4c$ = tetraploider DNS-Gehalt

fikanten Unterschiede nachweisen, obgleich bei Naevuszellen der Gruppe II eine weitere Rechtsverschiebung der Gesamtproteinsäulen zu beobachten ist. Diese Befunde weichen von Untersuchungsergebnissen an Tumorzellen ab (LEDERER, 1966; SEED, 1966; LEDERER u. SANDRITTER, 1967; EHLERS, 1968), die eine Korrelation in der Zunahme von DNS, Nucleohiston- und Kerngesamtprotein während des Interphasewachstums erkennen lassen.

Literatur

- DEELEY, E. M.: An integrating microdensitometer for biological cells. *J. Sci. Instrument.* **32**, 263—267 (1955).
- DEITCH, A. D.: Microspectrophotometric study of the binding of the anionic dye Naphthol Yellow-S, by tissue sections and by purified proteins. *Lab. Invest.* **4**, 324—351 (1955).
- EHLERS, G.: Cytophotometrische Messungen des Gesamtproteingehaltes in Zellkernen von Basalzellepitheliomen. *Arch. klin. exp. Derm.* **233**, 90—98 (1968).
- Cytophotometrische Untersuchungen über den Arginingehalt in ruhenden Zellen epidermal-dermaler und korialer Naevi pigmentosi. *Arch. klin. exp. Derm.* **233**, 191—196 (1968).
- , u. W. KNOTH: Feulgen- und Fastgreen-Cytophotometrie an ruhenden Zellen epidermal-dermaler und korialer Pigmentnaevi. *Arch. klin. exp. Derm.* **233**, 82—89 (1968).
- KNOTH, W., G. EHLERS u. W. MEYHÖFER: Cytophotometrische DNS-Bestimmungen an ruhenden Naevuszellen. *Arch. klin. exp. Derm.* **229**, 1—6 (1967).
- LEDERER, B.: Simultane quantitativ-histochemische Darstellung von Desoxyribonukleinsäure, Histon- und Gesamtprotein an normalen und Tumorzellen. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **1966**, 453—455.
- Protein- und DNS-Gehalt des Vaginalepithels unter Oestrogeneinwirkung. *Krebsarzt* **22**, 172—175 (1967).
- , and W. SANDRITTER: DNA and protein in the interphase growth of an Ehrlich ascites tumor. *Europ. J. Cancer* **3**, 21—24 (1967).
- SEED, J.: The relations between DNA, RNA and protein in normal embryotic cell nuclei and spontaneous tumor cell nuclei. *J. Cell Biol.* **20**, 17—23 (1964).
- The synthesis of DNA, RNA and nuclear protein in normal and tumor strain cells. *J. Cell Biol.* **28**, 233—239 (1966).

Priv.-Doz. Dr. G. EHLERS
Dermatologische Klinik
und Poliklinik der
Technischen Hochschule München
8 München 23, Biedersteinerstr. 21—29

Prof. Dr. med. W. MEYHÖFER
Univ.-Hautklinik
6300 Gießen, Gaiffkystr. 14