

Histochemische Untersuchungen während der Wallerschen Degeneration bei C3H/An und C57bl-Mäusen

Bei experimentellen Untersuchungen des Markscheidenabbaues während der Wallerschen Degeneration wurde eine starke Aktivitätssteigerung verschiedener Hydrolasen festgestellt. Ihnen wird deshalb eine Beteiligung am Markscheidenabbau zugeschrieben^{1,2}.

Wir untersuchten den Ablauf der Wallerschen Degeneration bei C3H- und C57bl-Mäusezuchtstämmen. Die C3H-Mäuse besitzen auf Grund eines genetischen Defektes nur eine sehr geringe β -D-Glucuronidase-Aktivität. Es sollte geklärt werden, ob die Verschiedenheit des Enzymgehaltes bei den zwei Mäusestämmen einen Unterschied im Ablauf der Wallerschen Degeneration bewirkt. Ausser auf β -D-Glucuronidase und saure Phosphatase (Methoden nach HAYASHI³) wurden Parallelschnitte mit verschiedenen Methoden zur Lipoiddarstellung (Sudan-schwarz, Scharlachrot, Nilblausulfat, Otan)⁴ untersucht. Die Tiere wurden 1 Tag bis 5 Monate nach Durchtrennung des rechten N. ischiadicus getötet. Danach wurden der proximale und der distale Stumpf davon entnommen, in CO₂ eingefroren und im Kryostaten 7–9 μ dicke Schnitte angefertigt. Im linken, d.h. intakten Nerven der C3H-Mäuse liess sich β -Glucuronidase nicht nachweisen. Bei dem C57bl-Stamm ist im Zytoplasma der Schwannschen Zellen ein feingranuläres, rotes Reaktionsprodukt vorhanden. Die saure Phosphatasereaktion fällt bei beiden Tierarten etwa gleich aus.

Bereits 24 h nach Durchtrennung der Nerven zeigt sich sowohl am proximalen wie am distalen Stumpf eine deutliche Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase. Sie ist anfangs vorwiegend in den Axonen des Stumpfes nachweisbar. Nach 2 und 4 Tagen überwiegt jedoch die positive Enzymreaktion in den Schwannschen Zellen und in den sich vermehrenden Makrophagen des distalen Stumpfes. Es besteht eine enge Korrelation zwischen dem Zerfall der Markscheiden und der Aktivität der sauren Phosphatase. Dementsprechend sind die Veränderungen am proximalen Stumpf nur auf einen schmalen Bereich direkt an der Durchschneidungsstelle beschränkt. Unterschiede zwischen den beiden Tierstämmen sind nicht nachweisbar. Diese Aktivitätszunahme der sauren Phosphatase in den Schwannschen Zellen ist noch Monate nach der Nervendurchtrennung vorhanden.

Bei den C57bl-Mäusen zeigt die β -Glucuronidase ein ähnliches Verhalten, nur ist die histochemisch nachweisbare Aktivitätssteigerung nicht so auffallend wie bei der sauren Phosphatase. Sie ist auf Schwannsche Zellen und Makrophagen beschränkt und tritt ebenfalls immer an den Stellen besonders auffällig in Erscheinung, wo Mark-

scheidenfragmente abgebaut und phagozytiert werden. Diese Enzymvermehrung ist nachweisbar, solange noch Myelinreste zu beobachten sind.

Überraschend ist jedoch, dass auch bei C3H-Mäusen am proximalen Stumpf, nahe der Durchschneidungsstelle, und im gesamten distalen Segment Schwannsche Zellen und Makrophagen auftreten, in deren Zytoplasma β -Glucuronidase nachweisbar ist. Die Enzymreaktion fällt zwar schwächer aus als bei den C57bl-Mäusen, ist aber vom 4. bis 21. Tag nach Durchtrennung des Nerven in allen untersuchten Fällen vorhanden. Nach 3 Wochen sind kaum noch β -Glucuronidase-positive Zellen zu beobachten. Auch für die β -Glucuronidase ist charakteristisch, dass sie in den Zellen am stärksten reagiert, die am Abbau des Myelins beteiligt sind.

Betrachtet man den Markscheidenabbau mit den angegebenen Lipoidfärbungen, so lässt sich bei beiden Tierstämmen ein zeitlich normaler Ablauf erkennen. Das Marchi- und Scharlachrotstadium ist nach ca. 8 Tagen bzw. 3 Wochen erreicht.

Diese Befunde zeigen, dass auch bei C3H-Mäusen mit niedriger β -Glucuronidase-Aktivität der Markscheidenabbau normal verläuft. Auffallend ist, dass sich in den Schwannschen Zellen und Makrophagen während der Wallerschen Degeneration bei diesen Tieren β -Glucuronidase nachweisen lässt⁵.

Summary. The reduction of the myelin sheath during the Wallerian degeneration is not delayed in C3H/An mice with reduced activity of β -D-glucuronidase. After section of the sciatic nerve, an increase of glucuronidase activity in Schwann's cells and macrophages can be shown here too.

F. HANEFELD und T. WIECHMANN

*Kinderklinik der Freien Universität Berlin,
Auguste-Victoria-Haus, 1 Berlin 19 (Deutschland),
24. Februar 1969.*

¹ D. M. HOLLINGER und R. J. ROSSITER, *Biochem. J.* 52, 659 (1952).

² F. HANEFELD, *Dt. Z. Nervenheilk.* 188, 357 (1966).

³ M. HAYASHI, Y. NAKAJIMA und W. H. FISHMAN, *J. Histochem. Cytochem.* 12, 293–298 (1964).

⁴ T. BARKA und P. J. ANDERSON, *Histochemistry* (Hoeber Medical Division, New York 1963).

⁵ Die Untersuchungen wurden mit freundlicher Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Carcinogenesis and Inhibited Biosynthesis of Soluble Mouse Skin Proteins by Actidione

The role of protein synthesis for the initiation of mouse skin by carcinogenic polycyclic hydrocarbons is still unknown. Puromycin, a common inhibitor of protein synthesis, failed to influence protein synthesis in mouse skin^{1,2}. With actidione, however, we found that the synthesis of soluble skin proteins may be blocked. Actidione thus proved useful in learning whether protein synthesis was necessary for the initiation process.

Actidione produced no visible signs of intoxication at 0.1 mg/g mouse (NMRI). At 0.2 mg/g, however, 3 out of 10 mice died after 24 h. Mouse skin was isolated and prepared according to WIEST and HEIDELBERGER³. The tissue was powdered in liquid nitrogen, sonicated (20 sec)

in 1.15% KCl solution and centrifuged at 2×10^4 g/0.1 ml aliquots of the supernatant were put on filter paper discs and counted by liquid scintillation counting^{4,5}. Before counting protein-bound hydrocarbons, the disks were

¹ H. V. GELBOIN, M. KLEIN und R. R. BATES, *Proc. natn. Acad. Sci.* 53, 1353 (1965).

² H. BRESCH und E. HECKER, personal communication (1967).

³ W. G. WIEST und C. HEIDELBERGER, *Cancer Res.* 13, 246 (1953).

⁴ R. J. MANS und G. D. NOVELLI, *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 47 (1961).

⁵ M. VOLM, R. SPIELHOFF und R. SÜSS, *Naturwissenschaften* 55, 390 (1968).

extracted with cyclohexane. A single dose of actidione rapidly inhibited (80%) the synthesis of soluble proteins of mouse skin (Figure); its effect faded after 2-3 h.

In a quantitative BERENBLUM-experiment using DMBA as an initiator and the phorbol ester A-1 as cocarcinogen⁶, we tested to see whether the blocking of protein synthesis by actidione had any effect on tumour-yields. Experimental results, given in Table I, show that tumour-yields remained unchanged, indicating that the initiation process is independent of newly synthesized proteins.

Since HEIDELBERGER⁷, among others, suggests that binding of carcinogens to specific proteins might be essential for tumour induction, we experimented to find out whether actidione reduced the reaction of hydrocarbons with soluble proteins of mouse skin. A typical experiment, given in Table II, reveals that the binding of 3,4-benzpyrene (BP) is sensitive to actidione. Other experiments also with 7,12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA), produced similar results. Binding of BP and DMBA to soluble proteins remained reduced even after 24 h, thus excluding the possibility that residual hydrocarbons were bound after the actidione effect had disappeared.

It is possible that inhibition of protein synthesis is responsible for the reduced binding of carcinogens. Older results of GELBOIN⁸ suggest such a direct relationship. WEISBURGER et al.⁹, however, found that chloramphenicol does not reduce protein synthesis in liver but does reduce binding of carcinogen to proteins. On the other hand, the same authors found that puromycin blocks protein synthesis without blocking the binding of carcinogens to proteins.

Whatever the cause may be for the reduced binding of carcinogens under the influence of actidione, this system appears to supply a preliminary answer to the question whether the protein-carcinogen conjugates are a necessary prerequisite for the initiation process. It would be expected that reduced binding of protein would lead to a decrease in tumour-yield. Such, however, was not the case, which would suggest that the conjugates are not essential for carcinogenesis. One could object that even under actidione sufficient protein-carcinogen complexes are still present to ensure normal induction of tumour. This would mean that under normal conditions more conjugates are formed than necessary. The dose response of tumour-yields within the concentrations of carcinogen used, however, contradicts such a hypothesis. So one might conclude that carcinogen-protein-complexes are side products of the initiation process in mouse skin. This conclusion is restricted

to our experimental conditions: studies of carcinogen binding should be extended to forms of carcinogen application other than local painting, to avoid the hazards of this method.

To summarize, actidione effectively inhibits synthesis of soluble proteins of mouse skin and reduces the binding of locally applied carcinogens (BP and DMBA) to soluble proteins without affecting tumour-yields in a BERENBLUM-type experiment.

Table I. Effect of actidione on the tumour-yield

Treatment	No. of animals after 12 weeks	No. of animals with papillomas	Total number of papillomas	Papillomas/animal
Actidione (33 µg/g mouse)	14	8	15	1.1
Actidione (100 µg/g)	13	8	18	1.4
Saline	13	9	19	1.5

The previously shaven backskin of each male NMRI-mouse was painted with 0.02 µM 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, dissolved in 0.1 ml acetone. 1 week later each animal was painted with 0.01 µM phorbol ester A₁ (6) dissolved in 0.1 ml acetone; this treatment was continued twice a week.

Table II. Inhibition of the binding of 3,4-benzpyrene-³H to soluble mouse skin proteins by actidione

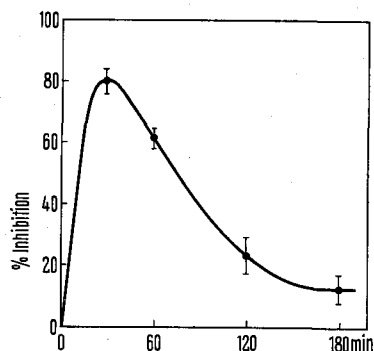
Tritiated compound	Actidione	Protein concentration of the extract (mg/ml)	Specific activity of the extract (cpm/ml)	Specific activity of the TCA prec. protein (cpm/ml)	Inhibition by actidione in % of the control
L-Leucine-4,5- ³ H	+	5.4	6,210	1,150	43.1
3,4-Benzpyrene- ³ H	—	4.5	9,020	2,020	
3,4-Benzpyrene- ³ H	+	11.0	21,890	1,990	33.9
3,4-Benzpyrene- ³ H	—	12.1	35,910	3,010	

Five male mice received 33 µg actidione per g (i.p.). 60 min later one group was given L-leucine-4,5-³H (s.a. 5C per mM, 3 µC/g animal) i.p. and killed after 60 min. The group was painted with 3,4-benzpyrene-³H, dissolved in 0.1 ml acetone (specific activity 3.8C/mM, 30 µC per approx. 7.5 cm² previously shaved backskin) and killed after 360 min.

Zusammenfassung. Actidion hemmt die Synthese löslicher Proteine der Mäusehaut, reduziert die Bindung lokal applizierter Karzinogene (BP und DMBA) an lösliche Proteine, ohne die Tumorausbeute im BERENBLUM-Experiment zu beeinflussen.

R. SÜSS, M. VOLM,
V. KINZEL and R. MAURER

*Institut für experimentelle Pathologie und
Biochemisches Institut, Deutsches Krebsforschungszentrum,
6900 Heidelberg 1 (Germany), 6 January 1969.*



Time dependency of actidione inhibited biosynthesis of soluble mouse skin proteins. 5 male mice were given 100 µg actidione/g animal i.p. At the times indicated they were injected i.p. with 3 µC L-leucine-4,5-³H (s.a. 5C/mM) per g animal and killed 80 min later. Standard errors of the mean are given (3 experiments).

⁶ E. HECKER, *Molekulare Biologie des malignen Wachstums* (17. Coll. Ges. physiol. Chem. 1966; Springer Verlag 1966), p. 105.

⁷ C. HEIDELBERGER, *J. Cell comp. Physiol.* 64 (suppl. 1), 129 (1964).

⁸ H. V. GELBOIN, J. A. MILLER and E. C. MILLER, *Cancer Res.* 18, 608 (1958).

⁹ I. H. WEISBURGER, Y. SIRASU, P. H. GRANTHAM and E. K. WEISBURGER, *J. biol. Chem.* 242, 372 (1967).