

Until now, narrowings of the synaptic cleft without interposition of a basement membrane material were only seen in motor endings of special types of striated muscle fibres; they have so far not been found in common skeletal muscle fibres. However, further investigation is necessary in order to show whether we are actually dealing with a peculiar structural property of specialized types of motor nerve endings and whether these structures have a special functional meaning.

Zusammenfassung. In motorischen Endplatten der quergestreiften inneren Augenmuskulatur des Huhnes und

multipel innervierter Muskelfasern der äusseren Augenmuskeln der Ratte werden Verengungen des synaptischen Spaltes beschrieben. Die Plasmamembranen der terminalen Nervenfaser und der Muskelfaser nähern sich an diesen Stellen auf ca. 160 Å und die für die motorische Endplatte typische Basalmembranschicht fehlt im verengten synaptischen Spalt.

R. MAYR and W. ZENKER

*Institut für Anatomie der Ruhr-Universität Bochum,
A-1090 Wien (Austria), 21 July 1969.*

Quantitative Untersuchungen über die Proteinsyntheseaktivität von Epidermiszellen während der Extremitätenregeneration der Urodelen¹

Für die Regeneration der Urodelenextremität ist der direkte Kontakt von Corium-freiem Wundepithel und unterliegendem Gewebe von grosser Bedeutung². Das einschichtige Wundepithel, das etwa innerhalb eines Tages die Wundfläche verschliesst, verdickt sich zu einer mehrschichtigen soliden Epideriskappe, unter der sich in Abhängigkeit von ihrer Lage³ die Zellen des mesodermalen Blastems sammeln^{4,5}. Diese apikale Epideriskappe stellt eine Ansammlung von Zellen dar, die von der intakten Epidermis zugewandert sind^{6,7}.

Untersuchungen über die Enzymaktivität dieser Epidermiszellen⁸ sowie autoradiographische Nachweise über den Aminosäure-Einbau in dieser Region⁹⁻¹¹ ergaben wichtige Hinweise über die relative Erhöhung ihres Stoffwechsels. Da nun die Epidermiszellen während des Wundverschlusses und der Ausbildung der Apikalkappe eine Volumenänderung erfahren, wurde untersucht, welche Zusammenhänge zwischen der Aktivierung der Proteinsynthese und den Volumenänderungen dieser Zellen bestehen.

Bei juvenilen *Triturus vulgaris* (12-15 Wochen nach der Metamorphose bei 18 °C) wurden die regenerierenden Vorderextremitäten vom 2. bis zum 22. Tag nach der Amputation auf ihre Proteinsyntheseaktivität hin untersucht. An medianen Längsschnitten der Regenerate wurde an Hand von Silberkornzählungen in Autoradiogrammen die Einbaurate von i.p. injiziertem ³H-Phenylalanin (Inkubationszeit: 3 h) ermittelt. Die Bestimmung von Zell- und Zellkerngrösse erfolgte in denselben Präparaten mit einem Mikroplanimeter¹². Bei den Untersuchungen wurden drei Epidermisbereiche geprüft: 1. Die Basis der Extremität (P); 2. der Bereich der Amputationsebene (A) und 3. die Regeneratspitze (D), das heisst das Wundepithel beziehungsweise die Apikalkappe. In jeder Region eines Regenerates wurden 60 Zellen gemessen und ausgezählt. Die Untersuchungen beschränkten sich auf die Basalschicht der Epidermis als ein System gleichartiger Zellen.

Die vom Wundrand über das Wundgewebe wandernden Epidermiszellen vergrössern ihr Volumen im Vergleich zu den Kontrollwerten intakter Extremitäten signifikant (Figur a). Die grössten Epidermiszellen lassen sich im untersuchten Zeitraum an der Regeneratspitze (D) nachweisen, und um den 7. Tag findet man hier maximale Volumenzunahme. Aus den Flächendaten lässt sich bestimmen, dass diese Zellen ihr Volumen etwa verdoppelt haben. Auch im Bereich der Amputationsstelle (A)

zeigen die Zellen eine deutliche Vergrösserung, jedoch nicht in einem solchen Ausmass wie die distalen Zellen. An der Extremitätenbasis (P) findet man in den ersten sechs Tagen Werte wie in der unbeeinflussten Epidermis. Danach können auch in diesem Bereich die Auswirkungen der Wundsetzung an Hand von Zellvergrösserungen nachgewiesen werden. Nach dem 10. Tag vermindern die vergrösserten Epidermiszellen wieder kontinuierlich ihr Volumen, und es ist ersichtlich, dass sich die Unterschiede mit zunehmender Differenzierung des Regenerates nivellieren. Die Volumenzunahme der Epidermiszellen beruht auf einer Vergrösserung der Zellkerne und – in weitaus grösserem Masse – auf einer Zunahme des Zytoplasmas. Nach dem Delesseischen Prinzip¹³ lässt sich aus den Anschnitten angenähert das Volumenverhältnis von Kern und Zytoplasma bestimmen (siehe Figur b).

In der Basalschicht der unbeeinflussten Epidermis der Extremität nimmt der Zellkern etwa $\frac{2}{3}$ des gesamten Zellvolumens ein, das Volumenverhältnis ist also annähernd 2. Dieses Verhältnis verringert sich nach der Amputation in allen drei Messbereichen kontinuierlich bis zum 10. Tag und beträgt bei maximal vergrösserten Zellen (D) annähernd 1,0; Kern und Zytoplasma nehmen also in diesen Zellen etwa gleiches Volumen ein. Nach dem 10. Tag nimmt – besonders deutlich an der Extremitäten-

¹ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

² M. SINGER and M. M. SALPETER, in *Growth in Living Systems* (Basic Books Inc., New York 1961), p. 277.

³ C. S. THORNTON, in *Regeneration in Animals and Related Problems* (Eds. V. KIORTSIS and H. A. L. TRAMPUSCH; North Holland Publishing Co., Amsterdam 1965), p. 333.

⁴ H. J. ANTON, in *Regeneration in Animals and Related Problems* (Eds. V. KIORTSIS and H. A. L. TRAMPUSCH; North Holland Publishing Co., Amsterdam 1965), p. 377.

⁵ H. J. ANTON, Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org. 161, 49 (1968).

⁶ D. T. CHALKLEY, J. Morph. 94, 21 (1954).

⁷ E. D. HAY and D. FISCHMAN, Devl. Biol. 3, 26 (1961).

⁸ A. J. SCHMIDT, *The Molecular Basis of Regeneration: Enzymes* (University of Illinois Press, Urbana and London 1966).

⁹ C. W. BODEMER and N. B. EVERETT, Devl. Biol. 1, 327 (1959).

¹⁰ H. J. ANTON, Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org. 153, 363 (1961).

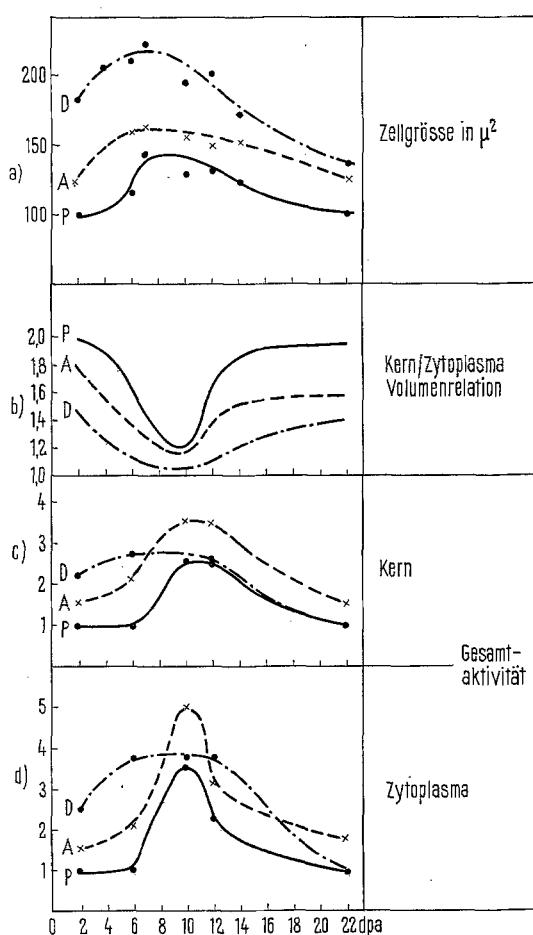
¹¹ H. J. ANTON, Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org. 161, 49 (1968).

¹² T. CASPERSSON, T. FREDRIKSSON and K. G. THORSSON, Hereditas 39, 201 (1953).

¹³ A. HENNIG, Mikroskopie 12, 174 (1957).

basis und an der ehemaligen Amputationsstelle – das Volumenverhältnis wieder zu. Die maximale Veränderung dieser Volumenrelation der Epidermiszellen während aller Regenerationsphasen liegt um den 10. Tag, zu einem Zeitpunkt also, zu dem ihre Mitoserate anzusteigen beginnt und zu dem das mesodermale Blastem ebenfalls stark zu wachsen anfängt.

Bei der Auswertung der Autoradiogramme wurde der Gesamteinbau der Kerne im Messbereich der unbeeinflussten Epidermis gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte auf dieses Mass bezogen. Auf diese Weise lassen sich die relativen Werte für die Proteinsynthese während der verschiedenen Regenerationsstadien miteinander vergleichen. Zunächst ist hervorzuheben, dass die Änderung des Einbaus in Kern und Zytoplasma ähnlich verläuft. Auch die maximale Inkorporation findet in der gesamten Basalschicht der regenerierenden Extremität um den 10. Tag nach Amputation statt (Figur c, d). Die Kerne an der Amputationsstelle (A) inkorporieren dann etwa das 3,5-fache, die mittlerweile ebenfalls aktivierten Kerne an der Extremitätenbasis (P) das 2,5fache des Kontrollwertes. Im Zytoplasma ist die Steigerung der Syntheseaktivität noch deutlicher. Im Bereich der Amputationsstelle (A) erhöht sich der Einbau um den Faktor 5, in der proximalen Epidermis (P) um den Faktor 3,5 des Einbaus in das Zytoplasma ungestörter Zellen.



Daten aus den 3 Messbereichen in der basalen Epidermis der regenerierenden Extremität vom 2. bis zum 22. Tag nach Amputation (dpa). P, Extremitätenbasis; A, Amputationsstelle; D, Wundepithel beziehungsweise Apikalkappe.

Während die Aktivierung der Aminosäure-Inkorporation in den Zellen an der Amputationsebene (A) und im proximalen Extremitätenstumpf (P) recht ähnlich ist und sich nur um einen annähernd konstanten Betrag unterscheidet, zeichnen sich die Zellen an der Regeneratspitze (D) durch ein andersartiges Einbaumuster aus. Die einmal erhöhte Proteinsynthese wird hier vom 6. Tag an etwa eine Woche lang auf gleichem Niveau gehalten. In den Zellkernen dieser Region wird in diesem Zeitraum im Vergleich mit den Kernen der unbeeinflussten Epidermis mehr als das 2,5fache eingebaut. Das Zytoplasma erreicht dabei den Faktor 3,5 der Kontrollwerte. Nach dieser Phase gleicher Syntheseaktivität nimmt die Inkorporation stark ab und weist im Kern und Zytoplasma am 22. Tag bereits wieder die gleiche Aktivität auf wie in der ungestörten Epidermis.

Zwischen der Proteinsyntheseaktivität der ganzen Zellen und dem Volumenverhältnis von Kern und Zytoplasma ist ein Zusammenhang festzustellen. Die Änderung beider Größen verläuft gleichförmig. Zunehmender Proteinsyntheseaktivität entspricht eine Verminderung der Kern-Plasma-Relation, jedoch ist diese Beziehung nicht proportional. Für die Epidermis der regenerierenden Extremität besteht die einfache Relation zwischen Kerngrösse und Eiweißsynthese, wie sie von MAURER und Mitarbeitern für Säugerzellen gefunden wurde^{14,15}, also nicht. Die Änderung der Volumenverhältnisse und der Syntheseaktivität zeigt an der Amputationsstelle (A) und an der Extremitätenbasis (P) einen ähnlichen Verlauf. Das Inkorporationsmuster der distalen Zellen (D) folgt ebenfalls dem Verlauf der Kern-Plasma-Relation dieser Region, die gemessene Gesamtaktivität liegt jedoch um einen konstanten Betrag zu niedrig. Da aber anzunehmen ist, dass die Beziehung zwischen Volumenrelation und Proteinsyntheseaktivität für alle Zellen gleich ist, kann man die Sonderstellung der Zellen des Wundepithels und der Apikalkappe so interpretieren, dass ein Teil der innerhalb der Inkubationszeit synthetisierten Proteine wieder verschwindet. Will man nicht annehmen, dass hier Proteine von besonders kurzer Lebensdauer gebildet werden, so bleibt der Schluss, dass ein Teil der neu gebildeten Proteine die Zellen sehr bald verlässt, so dass die gemessene Gesamtaktivität um eben diesen Betrag zu gering angegeben wird.

Summary. In the regenerating urodele limb the epidermal cells increase their volume significantly. The nucleocytoplasmic volume ratio and the protein synthesis rate obviously change in a similar manner. But in this scheme the incorporation pattern of the cells in the wound epithelium and the apical cap differs from that of all other epidermal cells by an approximately constant rate.

S. DARDA und H. J. ANTON

*Lehrstuhl für experimentelle Morphologie,
Isotopenlaboratorium,
Zoologisches Institut der Universität,
D-5 Köln (Deutschland), 25. Juni 1969.*

¹⁴ B. SCHULTZE, P. CITOLER, K. HEMPEL, K. CITOLER and W. MAURER, in *The Use of Radioautography in Investigating Protein Synthesis* (Eds. C. P. LEBLOND and K. B. WARREN; Academic Press, New York and London 1965), p. 107.

¹⁵ P. CITOLER, K. COTOLER, K. HEMPEL, B. SCHULTZE and W. MAURER, *Z. Zellforschg.* 70, 419 (1966).