

Enzymhistochemische Untersuchungen der Calcitonineinwirkung auf das Corpus pineale bei der Ratte

Nach Pinealektomie wurden eine erhöhte Nebenschilddrüsenaktivität¹, ein mässiger Blutcalciumanstieg¹, eine Aktivitätssteigerung der C-Zellen² sowie ihre Differenzierung in dunkle und helle Zellen beobachtet³. Diese Befunde beweisen, dass zwischen der Zirbeldrüse und der Calcium-Homöostase gesicherte indirekte Beziehungen bestehen⁴. In der Absicht, einen weiteren Anhaltspunkt für diese zu gewinnen, haben wir die Aktivitäten einiger Enzyme der Zirbeldrüse nach Calcitoninverabreichung untersucht.

Material und Methoden. Drei Gruppen von je 5 männlichen Wistar-Ratten von 250 g Körpergewicht bei Versuchsbeginn wurden 8 Wochen lang täglich 300 MRC Mikroeinheiten Calcitonin subkutan injiziert. Als Kontrolle dienten ebenfalls 3 Gruppen von je 5 unbehandelten Ratten gleichen Alters und Geschlechtes. Nach 2, 4 und 8 Wochen wurden die Zirbeldrüsen je einer Versuchs- und Kontrolltiergruppe in Äthernarkose um 9 Uhr entnommen und sofort in mit CO₂ gekühltem Isopentan eingefroren. Die Schnittdicke wurde im Kryostaten auf 14 µm eingestellt. Folgende enzymhistochemische Reaktionen wurden durchgeführt: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase⁵, Lactat-Dehydrogenase⁵, Isocitrat-Dehydro-

Nach 2- und 4 wöchiger Calcitoninzufuhr fällt die Reaktion jedoch etwas schwächer aus. Nach 8 Wochen ist die Aktivität dieses Enzyms wieder gleich wie bei den Kontrolltieren.

Im Vergleich mit der Malat-Dehydrogenase ist die Succinat-Dehydrogenase in der Zirbeldrüse ein schwach aktives Enzym. Die Cytochrom-Oxydase-Aktivität ist noch niedriger. Für beide Enzyme werden keine Abweichungen nach Calcitoninverabreichung festgestellt, und das gleiche gilt für die in den Kapillarwänden aktive alkalische Phosphatase.

Diskussion. Aus den vorliegenden enzymhistochemischen Befunden geht hervor, dass es nach 2- und besonders 4 wöchiger Calcitoninverabreichung in den Zellen der Zirbeldrüse zu einer Abnahme der Energieproduktion und damit zu einer Aktivitätseinschränkung kommt.

Nach Untersuchungen von BELL⁹ vermindert Calcitonin in vitro den Glucoseverbrauch sowie die Lactatproduktion. Diese Beeinflussung einer Stufe des Glucosemetabolismus vor dem Zitronensäurezyklus führt in der Knochenkultur zu einem Absinken des Citratgehaltes¹⁰. Unsere Untersuchungsergebnisse, besonders die abgeschwächte Aktivität der Lactat- und Isocitrat-Dehydro-

Aktivität der untersuchten Enzyme im Corpus pineale nach 2-, 4- und 8wöchiger Calcitoninverabreichung

Enzyme	2 Wochen		4 Wochen		8 Wochen	
	Kontrolle	Calcitonin	Kontrolle	Calcitonin	Kontrolle	Calcitonin
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase		=		>		=
Lactat-dehydrogenase		>		>		=
Isocitrat-dehydrogenase		>		>		>
Succinat-dehydrogenase		=		=		=
Malat-dehydrogenase		>		>		=
Cytochrom-oxydase		=		=		=
Alkalische Phosphatase		=		=		=

nase⁵, Succinat-Dehydrogenase⁶, Malat-Dehydrogenase⁵, Cytochrom-Oxydase⁷ und alkalische Phosphatase⁸.

Befunde. Die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist in der Zirbeldrüse mässig stark. Sie bleibt nach 2- und 8 wöchiger Calcitoninverabreichung bei Kontroll- und Versuchstieren gleich, während es nach 4 wöchiger Calcitoninapplikation zu einer Aktivitätsverminderung bei den Versuchstieren kommt (Tabelle).

Die stärkste Aktivität aller untersuchten Enzyme zeigt die Lactat-Dehydrogenase. In der ersten Hälfte der Calcitoninbehandlung (2. und 4. Woche) ist sie bei den Kontrollen grösser. Nach 8 Wochen hat sich die Differenz in der Aktivität dieser Dehydrogenase zwischen Versuchs- und Kontrolltieren ausgeglichen.

Die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase – ein in der Zirbeldrüse mässig aktives Enzym – ist während der ganzen Dauer der Calcitoninverabreichung höher als bei den Kontrolltieren.

Die Malat-Dehydrogenase ist im Corpus pineale von behandelten und unbehandelten Ratten stark positiv.

genase nach der Calcitoninverabreichung, sprechen zugunsten der Arbeitshypothese, dass auch in der Zirbeldrüse ein ähnlicher Wirkungsmechanismus vorliegen könnte.

¹ R. KRSTIĆ, Z. Zellforsch. 77, 8 (1967).

² R. MILINE, M. ŠĆEPOVIĆ und R. KRSTIĆ, C. r. Ass. Anat. 139, 893 (1968).

³ R. KRSTIĆ, Z. Anat. Entw.-Gesch. 129, 353 (1969).

⁴ R. MILLINE und R. KRSTIĆ, Z. Zellforsch. 69, 428 (1966).

⁵ A. G. E. PEARSE, in *Theoretical and Applied Histochemistry* (Churchill, London 1960), p. 85.

⁶ M. M. NACHLAS, K. C. TSO, E. DE SOUZA, C. S. CHENG und A. M. SELIGMAN, J. Histochem. Cytochem. 5, 420 (1957).

⁷ M. S. BURSTONE, J. Histochem. Cytochem. 8, 63 (1960).

⁸ M. ARNOLD, in *Histochemie* (Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1968), p. 146.

⁹ N. H. BELL, Ann. Rev. Med. 18, 299 (1967).

¹⁰ J. NISBET und B. E. C. NORDIN, in *Calcitonin*, Proceedings of the Symposium on Thyrocalcitonin and the C Cells (W. Heinemann, London 1968), p. 230.

Infolge einer Aktivierung der Nebenschilddrüsen durch die experimentelle Calcitoninzufuhr^{11, 12} dürfte auch das Parathormon bei der Aktivitätsverminderung der Isocitrat-Dehydrogenase¹³ in den Pinealzellen eine Rolle spielen. Somit schliessen wir aus unseren Befunden, dass

das Calcitonin¹⁴ nicht nur direkt, sondern auch indirekt eine hemmende Wirkung auf die Zirbeldrüse hat.

¹¹ E. ALTENÄHR, Virchows Arch. Path. Anat. 351, 122 (1970).

¹² S. BELLWINKEL, G. DELLING und R. ZIEGLER, Z. ges. exp. Med. 156, 239 (1971).

¹³ D. K. PARKINSON und I. C. RADDE, in *Calcitonin 1969*, Proceedings of the Second International Symposium (W. Heinemann, London 1970), p. 471.

¹⁴ Das Schweinecalcitonin wurde uns in dankenswerter Weise von der Firma Ciba-Geigy AG, Basel, zur Verfügung gestellt.

Résumé. Après injection, pendant 2, 4 et 8 semaines, de 300 MRC microunités de Calcitonine porcine à des rats Wistar mâles de 250 g, on a constaté, par des méthodes histoenzymologiques, une diminution de l'activité des glandes pinéales.

R. KRSTIĆ und E. TARSOLY

*Histologisch-Embryologisches Institut der Universität,
Rue du Bugnon 9, CH-1011 Lausanne (Schweiz),
24. April 1972.*

The Electrophoretic Mobility of Somatic Cell Hybrids

Alterations of the cell surface electric charge arising from the removal or addition of ionogenic groups can be detected in a quite satisfactory manner by utilizing the technique of cell electrophoresis. Changes of this nature are usually expressed as changes in the cell electrophoretic mobility and surface charge density. Since the electrophoretic mobility and surface charge density reflect net changes at the surface (the quantity and quality of which may be controlled by the cell genome), it was of interest to explore the surfaces of interspecific somatic cell hybrids and their parental lines. It should be noted that hybrids are particularly suitable for these type of studies since 1. both parental sets of chromosomes are functional in the hybrid, and the hybrid, therefore, exhibits the hereditary characteristics of both parent cells, and 2. the hybrids lose some of their chromosomes, which permits assignment of single gene-products to specific chromosomes.

The aim of the present study was to compare the electrokinetic behavior of hybrids between human diploid skin fibroblasts and aneuploid mouse, or hamster cells, with the electrokinetic behavior of their parental lines. Since chromosomal studies have revealed that most of the human chromosomes in these hybrids have been lost, it was of interest to determine whether an interspecific hybrid carrying only a few human chromosomes would exhibit altered electrokinetic behavior.

Materials and methods. The electrokinetic behavior of hybrids between human diploid skin fibroblasts (strains: Ms58, Ms63, and Ms64) and aneuploid mouse (cell line A9), or Syrian hamster (cell line TG 2, kindly provided by Dr. LITTLEFIELD) cells (Table), was compared with the electrokinetic behavior of either of their parents. The cells were hybridized by Drs. M. SINISCALCO and K. H. GRZESCHIK utilizing inactivated Sendai virus. The hybrids were selected in medium containing hypoxanthine, aminopterin, thymidine, and glycine (HAT)¹ and maintained in the same medium for 3–7 months post-hybridization. The parental cell lines were grown in minimal essential medium. Cells were prepared for karyotyping according to conventional methods.

Prior to electrophoresis, confluent cell cultures were rapidly washed in Ca- and Mg-free MEM, and trypsinized for 60–90 sec in 0.25% trypsin at 37°C. The cells were prepared for electrophoretic mobility measurements by washing and resuspending in Earle's balanced salt solution (ionic strength 0.160) at pH 7.2. The cell electrophoretic mobility was measured at 37°C in a cylindrical tube apparatus². The cells were timed across a distance of 13.3 µm in a 3.22 V/cm field gradient when 1.95 mA of

current was flowing. The reliability of the instrument was ascertained by calibrating against the constant electrophoretic mobility values for human red blood cells reported in the literature³.

Results. The results from the electrophoretic mobility measurements (Table) have indicated that the electrokinetic properties of our hybrids were similar ($P > 0.02$), or identical ($P < , > 0.05$) to the electrokinetic properties of their mouse or hamster parental line. In all instances, however, the electrophoretic mobility values for the hybrid cells were significantly different ($P < 0.01$, or 0.001) from the values determined for their human parental lines.

Discussion. Karyotype analyses have indicated that the interspecific hybrids utilized in this study have lost most of their human chromosomes and have kept virtually the entire or the double genome of the mouse or hamster (Table). This spontaneous elimination of human chromosomes is a well established trend affecting interspecific hybrids between human and mouse, or hamster cell populations^{4, 5}.

The true nature of our hybrids, however, was indicated by the fact that the cells were able to grow in HAT medium, for which the presence of the human X-chromosome is necessary¹. In this connection, the enzyme analyses performed on all hybrid types indicated the presence of glucose 6-phosphate-dehydrogenase and 3-phosphosylcerate kinase of the human type. This confirmed the presence of the human X-chromosome in the hybrids, to which the genes associated with the production of the above enzymes are linked. Furthermore, upon karyotype analysis, hybrids B82/Ms2 and TG 2/Ms63 revealed the presence of 18 and 2 autosomes, respectively, in addition to the mouse or hamster genomes (Table).

Our preliminary results (Table) tend to indicate that significant changes in the electrokinetic properties of the interspecific hybrids between human and mouse, or hamster, cell populations may not be brought about by the presence of a few human chromosomes in the hybrid genome (although in some instances $P > 0.02$). Studies on somatic

¹ J. LITTLEFIELD, Science 145, 709 (1964).

² A. D. BANGHAM, D. H. HEARD, R. FLEMANS and G. V. SEAMAN, Nature, Lond. 182, 642 (1958).

³ R. S. HARTMAN, J. B. BATEMAN and M. A. LAUFER, Archs Biochem. Biophys. 39, 56 (1952).

⁴ M. C. WEISS and H. GREEN, Proc. natn. Acad. Sci., USA 58, 1104 (1967).

⁵ K. H. GRZESCHIK, A. GRZESCHIK and M. SINISCALCO, unpublished.