

## Der Einfluss von Colchizin und Ethidium-Bromid auf den Gehalt radioaktiv markierter Uridin-Verbindungen in optischen Axonen von Teleosteern

Im Achsenzylinder einer Nervenzelle fliesst ein ständiger Neuroplasmastrom<sup>1</sup>. Die mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten transportierten Stoffe sind vorwiegend Proteine<sup>2,3</sup>, aber in geringem Ausmass auch RNS und niedermolekulare Uridin-Verbindungen<sup>4-6</sup>. Nach Untersuchungen mit dem spezifisch mitochondrialen RNS-Synthese-Hemmer Ethidium-Bromid (EthBr) scheint der Grossteil dieser RNS in den axonalen Mitochondrien synthetisiert zu werden<sup>6</sup>. Unklar ist bisher, ob der Transport der Uridin-Verbindungen ähnlich wie der der Proteine auch an die Neurotubuli geknüpft ist<sup>7</sup>. Dazu war es angezeigt, bei der Untersuchung des Transportes dieser Uridin-Verbindungen die Funktion der Tubuli durch Behandlung mit Colchizin zu beeinträchtigen. Dabei musste allerdings erst einmal die Blockierung des axonalen Proteintransports durch Colchizin bestätigt werden, um sicherzugehen, ob die Droge im vorliegenden Versuchssystem (optischer Trakt von *Scardinius erythrophthalmus*, Teleosteer) entsprechend wirkt. Ausserdem wurde geprüft, ob Colchizin die Wirkung von EthBr auf die Inkorporation von <sup>3</sup>H-Uridin in hochmolekulare RNS beeinflussen kann.

36 Exemplare von *Scardinius erythrophthalmus* erhielten intraoculare Injektionen folgender Stoffe in folgender

Dosierung: <sup>3</sup>H-Histidin (30 µCi/Tier, spez. Akt. 5 Ci/mM); <sup>3</sup>H-Uridin (30 µCi/Tier, spez. Akt. 5-30 Ci/mM; beide Tracer vom Radiochemical Centre, Amersham, England); Colchizin (Fa. Merck; 33,3 µg/ml; davon 30 µl, entsprechend 1 µg); EthBr (Fa. Burroughs Wellcome u. Co; 200 µg/ml; davon 30 µl, entsprechend 6 µg). Nach bestimmten Inkorporationszeiten wurden die optischen Trakte in 4 Segmente zergliedert (1. und 2. vor dem Chiasma, 3. hinter dem Chiasma, 4. das Tectum opticum) und deren Gesamtaktivität oder die der hochmolekularen Komponenten bestimmt (Extraktion der Gewebeproben in 1 ml 10%iger Trichloressigsäure (TCE), 24h, 2°C). Die auf Toluol-Basis im Packard-Flüssigkeits-Szintillations-

<sup>1</sup> P. WEISS und H. B. HISCOE, J. exp. Zool. 107, 315 (1948).

<sup>2</sup> B. S. McEWEN und B. GRAFSTEIN, J. Cell Biol. 38, 494 (1968).

<sup>3</sup> H. RAHMANN, Zool. Anz. Suppl. 33, (Verh. Zool. Ges. 1969) 430 (1969).

<sup>4</sup> L. CASOLA, G. A. DAVIS und R. E. DAVIS, J. Neurochem. 16, 1037 (1969).

<sup>5</sup> H. RAHMANN und H. WOLBURG, Experientia 27, 903 (1971).

<sup>6</sup> H. WOLBURG, Expl. Brain Res. 15, 348 (1972).

<sup>7</sup> K. A. C. JAMES, J. J. BRAY, J. G. MORGAN und L. AUSTIN, Biochem. J. 117, 767 (1970).

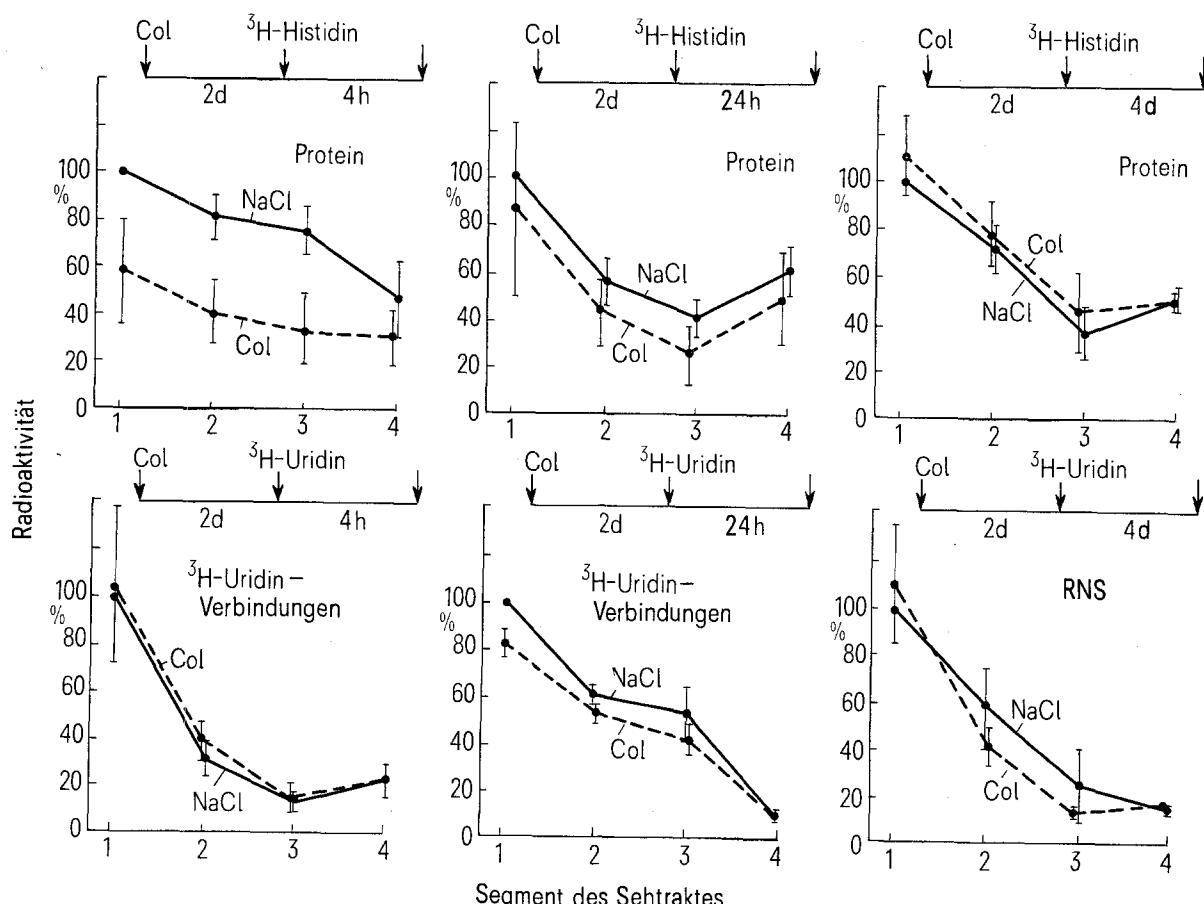


Fig. 1. Darstellung der Radioaktivitätsverteilung <sup>3</sup>H-Histidin-markierten Proteins (obere Reihe) und von TCE-löslichen <sup>3</sup>H-Uridin-Verbindungen bzw. hochmolekularer RNS (untere Reihe) im Verlauf der 4 Segmente des Tractus opticus von *Scardinius erythrophthalmus*. Inkubationszeit des einseitig intraocular injizierten Colchizins (Col) 2d, Inkorporationszeiten von beidseitig intraocular injizierten Tracern 4h, 24h und 4d. Durchschnittswerte von jeweils 3-5 Tieren; die Schwankungsbreite wurde als mittlere Abweichung vom Mittelwert errechnet.

zähler (Modell 3320) gemessenen Werte wurden auf cpm/mg Frischgewicht umgerechnet.

In Figur 1 ist die Radioaktivitätsverteilung von  $^3\text{H}$ -Histidin-markierten Proteinen bzw.  $^3\text{H}$ -Uridin-markierten Verbindungen in den 4 Segmenten des Tractus opticus nach Inkorporationszeiten von 4 h, 24 h und 4 d dargestellt. Dabei wurde Colchizin nach einmaliger Injektion einseitig intraocular 2 d lang vorinkubiert, bevor der Tracer beidseitig intraocular appliziert wurde. Die 2tägige Dauer der Vorinkubation wurde in annähernder Übereinstimmung mit der Literatur<sup>7,8</sup> und nach eigenen Voruntersuchungen vorgenommen. Nach 4 h Inkorporationszeit des Proteintracers ist eine erhebliche Erniedrigung der Einbaurate durch Colchizin festzustellen: im Nervus opticus um durchschnittlich 48%, im Tectum um 30%. Das Radioaktivitätsverteilungsmuster zeigt an, dass es sich um die schnelle Protein-Transportrate handeln muss, da das 3. Segment bereits fast so stark markiert ist wie das 2. Nach 24 h bzw. 4 d p.i. ergibt sich ein verändertes Bild, da nun der langsame Transport, der nach KIDWAY und OCHS<sup>9</sup> die Hauptmenge des Gesamt-Proteintransports ausmacht, die schnell wandernde Proteinfraction überlagert. Die Hemmwirkung von Colchizin ist stark vermindert bzw. aufgehoben.

Im Falle der  $^3\text{H}$ -Uridin-Verbindungen konnte weder für niedermolekulare (nach 4 bzw. 24 h) noch für hochmolekulare Verbindungen (nach 4 d) eine signifikante Hemmung des axonalen Transportes durch Colchizin festgestellt werden.

Da durch Colchizin vorwiegend die schnelle Protein-Transportrate gehemmt und damit bestätigt wurde, dass diese an die Neurotubuli geknüpft ist, scheint ausgeschlossen zu sein, dass die Uridin-Verbindungen ebenfalls an diese geknüpft sind, da ihr Transport durch die Droge nicht beeinflusst wird.

Colchizin scheint jedoch außer der Assoziation mit den Tubuli-Proteinen auch die Eigenschaft eines zellphysio-

logischen Aktivators zu besitzen, der im neuronalen Perikaryon u.a. die Vermehrung der Ribosomen und des gr. ER bewirken kann<sup>10</sup>. Wegen der zu fordernden Gleichheit der zellphysiologischen Ausgangssituation wurden daher in einem weiteren Versuch beide Augen mit Colchizin vorbehandelt. Um nun noch prüfen zu können, ob Colchizin den Fluss axonaler RNS hemmt, musste die RNS-Synthese einseitig blockiert werden. Wenn nämlich der RNS-Transport an die Tubuli geknüpft und damit Colchizin-anfällig wäre, müsste der RNS-Gehalt in beiden Nerven wegen der beidseitigen Colchizin-Inkubation sinken. Damit würde der Markierungsunterschied zwischen dem Nerven mit und dem ohne RNS-Synthesehemmung geringer als 70–80% ausfallen, wie er ohne Colchizin-Einwirkung gemessen worden ist<sup>6</sup>. Da die axonale RNS im wesentlichen an die Mitochondrien gebunden ist, war es angezeigt, die RNS-Synthese mit EthBr zu hemmen.

Figur 2 zeigt die Radioaktivitätsverteilung nach beidseitig intraocularer Colchizin-Injektion (2 d), einseitig intraocularer EthBr-Injektion (3 h) und anschliessender  $^3\text{H}$ -Uridin-Applikation. Die Dauer der EthBr-Vorbehandlung von 3 h ergab sich aus Vorversuchen mit verschiedenen Inkubationszeiten als am effektivsten; die Inkorporationszeit von  $^3\text{H}$ -Uridin betrug 4 d. Ohne Colchizin-Behandlung hemmte EthBr im Nervus opticus den  $^3\text{H}$ -Uridin-Einbau um ca. 79% (WOLBURG<sup>6</sup>). Nach vorheriger Colchizin-Behandlung ist die Hemmwirkung von EthBr auf ca. 37% gesunken.

Colchizin vermag also in der angegebenen Dosierung nach einmaliger Injektion eine Erniedrigung der EthBr-Wirkung zu verursachen. Danach scheint der axonale Transport an Mitochondrien gebundener RNS doch in Verbindung mit den Neurotubuli zu stehen. Einseitig appliziertes Colchizin ohne nachfolgende EthBr-Gabe vermochte allerdings den Gehalt radioaktiv markierter axonaler RNS nicht zu erniedrigen. Der Widerspruch ist zu erklären, wenn man berücksichtigt, dass Colchizin eventuell perikaryale Synthesevorgänge steigern kann; diese elektronenmikroskopisch sichtbare Wirkung bleibt in den Retinazellen des Kaninchens bis zu 6 d und länger nach der Colchizin-Injektion aufrechterhalten<sup>8</sup>. Es ist dann – auch für das optische System von *Scardinius* – nicht auszuschliessen, dass in das Axon ein grösserer Anteil an extramitochondrialer RNS fliesst, der den Verlust an mitochondrialer RNS kompensiert. So wäre die Angleichung der Markierungen beider Nerven (mit und ohne RNS-Synthesehemmung) verständlich. Dies zu bestätigen, müssen jedoch die entsprechenden axonalen Fraktionen auf ihre spezifische Radioaktivität hin untersucht werden. Wenn sich überdies nachweisen liesse, dass sich unter Colchizin-Einfluss die Mitochondrien-Zahl im Axon verringert, wäre ein weiterer wesentlicher Hinweis auf die Assoziation der axonalen Mitochondrien mit den Neurotubuli gewonnen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus jüngster Zeit, die diese Assoziation direkt zeigen, liegen bereits vor<sup>11</sup>.

*Summary.* After application of colchicine to one eye, and subsequent injections of  $^3\text{H}$ -histidine or  $^3\text{H}$ -uridine into both eyes, a blockage of the transport in the optic

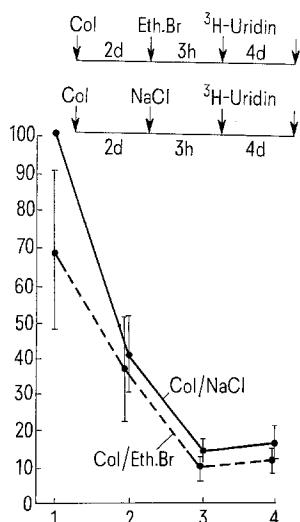


Fig. 2. Darstellung der Radioaktivitätsverteilung hochmolekularer RNS im Verlauf der 4 Segmente des Tractus opticus von *Scardinius erythrophthalmus*. Der beidseitig intraocularen Colchizin (Col)-Injektion folgen nach 2d eine einseitig intraocularer EthBr-Injektion und nach weiteren 3h eine beidseitig intraocularer Injektion des Tracers  $^3\text{H}$ -Uridin; die Inkorporationszeit betrug 4d. Die Hemmrate beträgt nur durchschnittlich 37%. Durchschnittswerte von 6 Tieren; die Schwankungsbreite wurde als mittlere Abweichung vom Mittelwert errechnet. Die Radioaktivität des ersten augennahen Segments des Kontrollnerven beträgt 100%.

<sup>8</sup> J.-O. KARLSSON, H. A. HANSSON und J. SJÖSTRAND, Z. Zellforsch. 175, 265 (1971).

<sup>9</sup> A. M. KIDWAY und S. OCHS, J. Neurochem. 16, 1105 (1969).

<sup>10</sup> A. NORSTRÖM, H. A. HANSSON und J. SJÖSTRAND, Z. Zellforsch. 173, 271 (1971).

<sup>11</sup> C. S. RAINES, B. GHETTI und M. L. SHELANSKI, Brain Res. 34, 389 (1971).

system of teleosts could be demonstrated only for the fast protein-components. However, colchicine is able to depress the effectivity of ethidium-bromide, a blocker of mitochondrial RNA-synthesis. This finding is discussed

<sup>12</sup> Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, die Herrn Prof. Dr. H. RAHMANN (Münster) die Mittel zu dieser Untersuchung zur Verfügung stellte.

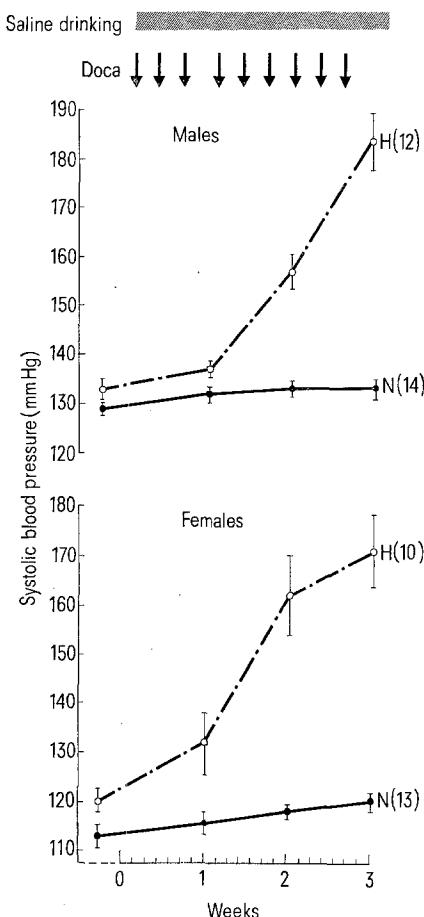
in connection with the possibility that axonal mitochondria are associated with the neurotubules.

H. WOLBURG<sup>12</sup>

I. Zoologisches Institut der Universität,  
Stephanstrasse 24, D-63 Giessen (BR Deutschland),  
25. Mai 1972.

### Separation of Two Strains of Rats with Inbred Dissimilar Sensitivity to Doca-Salt Hypertension

The development of hypertensive strains of animals has provided an important experimental tool for the study of hypertension. In 1958, SMIRK and HALL<sup>1</sup> described a colony of Otago rats with inherited hypertension. DAHL et al.<sup>2</sup> evolved from a stock of Sprague-Dawley rats, 2 strains of animals which differed markedly in their susceptibility to salt-induced hypertension. They were designated as 'sensitive' (S) and 'resistant' (R), according to their blood pressure response to dietary salt. Subsequently, OKAMOTO and AOKI<sup>3</sup> derived from Wistar rats a strain of spontaneous hypertensive or SH rats, that has been extensively investigated in recent years.



Blood pressure changes induced by Doca-salt in rats with dissimilar susceptibility to hypertension. The rats, members of the 6th generation ( $S_6$ ) were 2 months old at 0 weeks. H, hypertensive strain (Δ). N, normotensive strain (●). Values are average  $\pm$  S.E. The number of animals is shown in parentheses.

During the past years, through selective breeding, we have developed an additional colony of hypertensive rats. The response to Doca-salt was the criterion for selecting the hypertensive strain. Concomitantly a second colony was separated whose blood pressure is practically unchanged by Doca-salt. We have used the symbols H for hypertensive and N for normotensive, to designate the 2 new strains derived from the Hebrew University, 'Sabra' rats.

*Material and methods.* 25 male and an equal number of female rats, aged 2 months, were taken at random to constitute the pool from which the parental generation (P) was chosen. The schedule used in this and subsequent breedings is presented in Table I. The total amount of Doca<sup>4</sup> administered to each rat was 22.5 mg over a period of 3 weeks. Systolic B.P. was measured by a modification of the microphonic method of FRIEDMANN and FREED<sup>5</sup>.

Table I. Schedule for selection of breeder rats

Day 1.	Pre-treatment B.P. followed by left nephrectomy.
Days 5-27.	Doca-salt regimen: 0.9% NaCl as drinking fluid; Doca in oil, 2.5 mg/rat s.c. on alternate days 3 × /week.
Day 28.	Post-treatment B.P. Selection of siblings with highest B.P. in the H strain and with lowest B.P. in the N strain for mating.

Table II. Blood pressure of normotensive (N) and hypertensive (H) rats, before and after Doca-salt

Group	No. of rats	Systolic B.P. $\pm$ S.D.	
		Before	After
Males	N	19	127 $\pm$ 5.8*
	H	22	137 $\pm$ 8.4
Females	N	20	111 $\pm$ 7.5*
	H	21	121 $\pm$ 7.6

\*  $p < 0.01$ .

<sup>1</sup> F. H. SMIRK and W. H. HALL, Nature 182, 727 (1958).

<sup>2</sup> L. K. DAHL, M. HEINE and L. TASSINARI, Nature, Lond. 194, 480 (1962).

<sup>3</sup> K. OKAMOTO and K. AOKI, Jap. Circulation J. 27, 282 (1963).

<sup>4</sup> Doca: Desoxycorticosterone acetate in oil (Organon).

<sup>5</sup> L. K. DAHL, M. HEINE and L. TASSINARI, J. exp. Med. 115, 1173 (1962).