Zeitschrift: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

Herausgeber: Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften

Band: 22 (1966)

Artikel: Biochemische und zellbiologische Aspekte der Geweberückbildung in der Entwicklung

Autor: Weber, Rudolf

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-307636

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

D.K.: 591.34:591.1.04:577.15:597.6

Zoologisches Institut, Abteilung für Zellbiologie und chemische Embryologie,
Universität Bern

Biochemische und zellbiologische Aspekte der Geweberückbildung in der Entwicklung

RUDOLF WEBER

1. Die Geweberückbildung als Prinzip der Formbildung

Differenzierung und Wachstum gelten allgemein als wichtigste Kennzeichen der Entwicklung. Es ist daher verständlich, daß das Problem der Formbildung auf Grund der Vorstellungen über Differenzierungs- und Wachstumsprozesse zu lösen versucht wird. Indessen geht aus zahlreichen Beob-

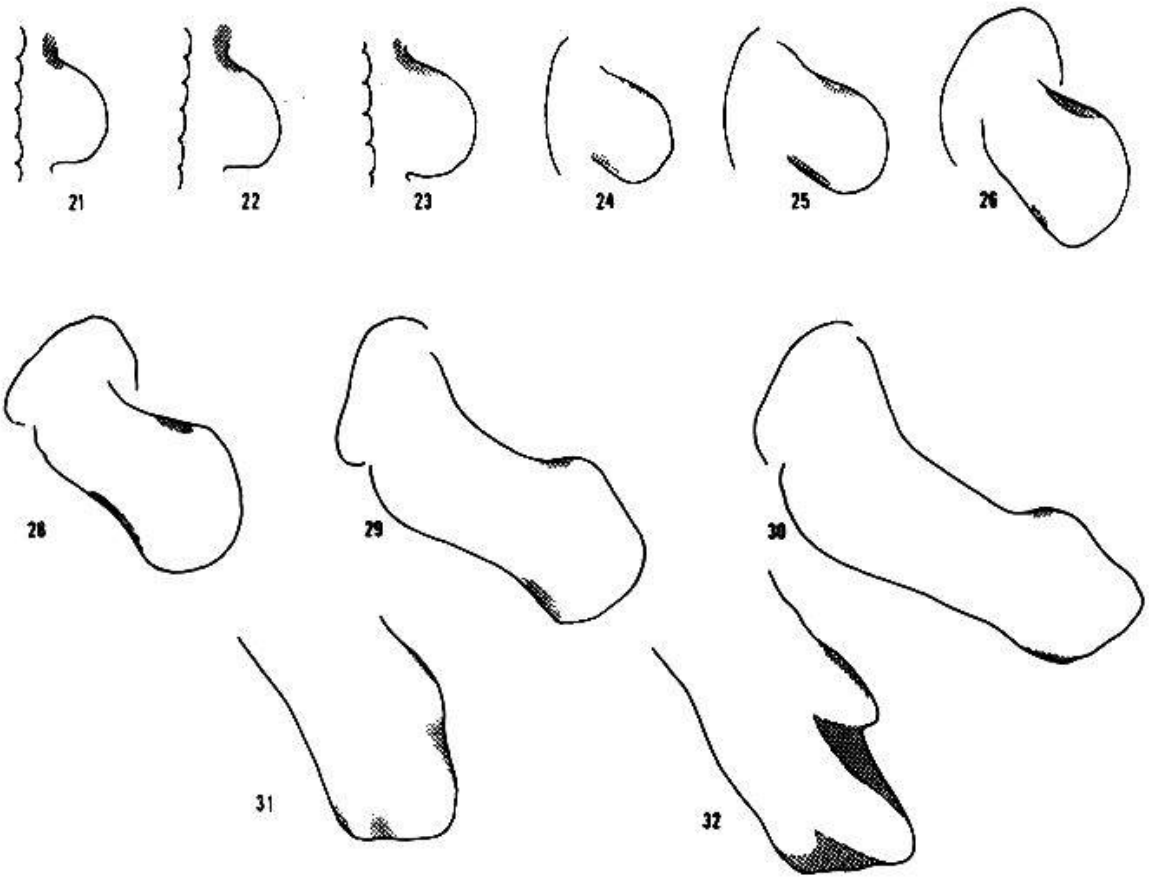

Abb. 1. Ausbildung der Flügelanlage beim Hühnerembryo. – Durch ein zeitlich und räumlich festgelegtes Muster von Nekroseherden (durch Schraffur hervorgehoben) wird die Kontur der Flügelanlage allmählich herausgebildet. 21-32: Entwicklungsstadien nach HAMBURGER und HAMILTON. (Nach SAUNDERS u. Mitarb. 1962.)

achtungen hervor, daß auch der umgekehrte Vorgang, nämlich die lokalisierte Rückbildung von Geweben und Organen, als morphogenetisches Prinzip verwirklicht ist (GLÜCKSMANN 1951).

Ein eindrückliches Beispiel bietet die Entstehung der Flügelanlage beim Hühnerembryo, die nach Untersuchungen von SAUNDERS u. Mitarb. (1962) durch ein zeitlich und räumlich festgelegtes Muster von mesodermalen Zellnekrosen gewissermaßen modelliert wird (Abb. 1); durch elegante Verpflanzungsexperimente an Flügelknospen haben diese Autoren ferner nachgewiesen, daß die Zellnekrosen in spezifischer Weise durch innerzellige Faktoren bzw. durch Einflüsse von Nachbargeweben ausgelöst werden. Andererseits hat WOLFF (1953) auf die Bedeutung von Geschlechtshormonen für Auslösung und Steuerung des Rückbildungsprozesses der Müllerschen Gänge im männlichen Hühnerembryo hingewiesen.

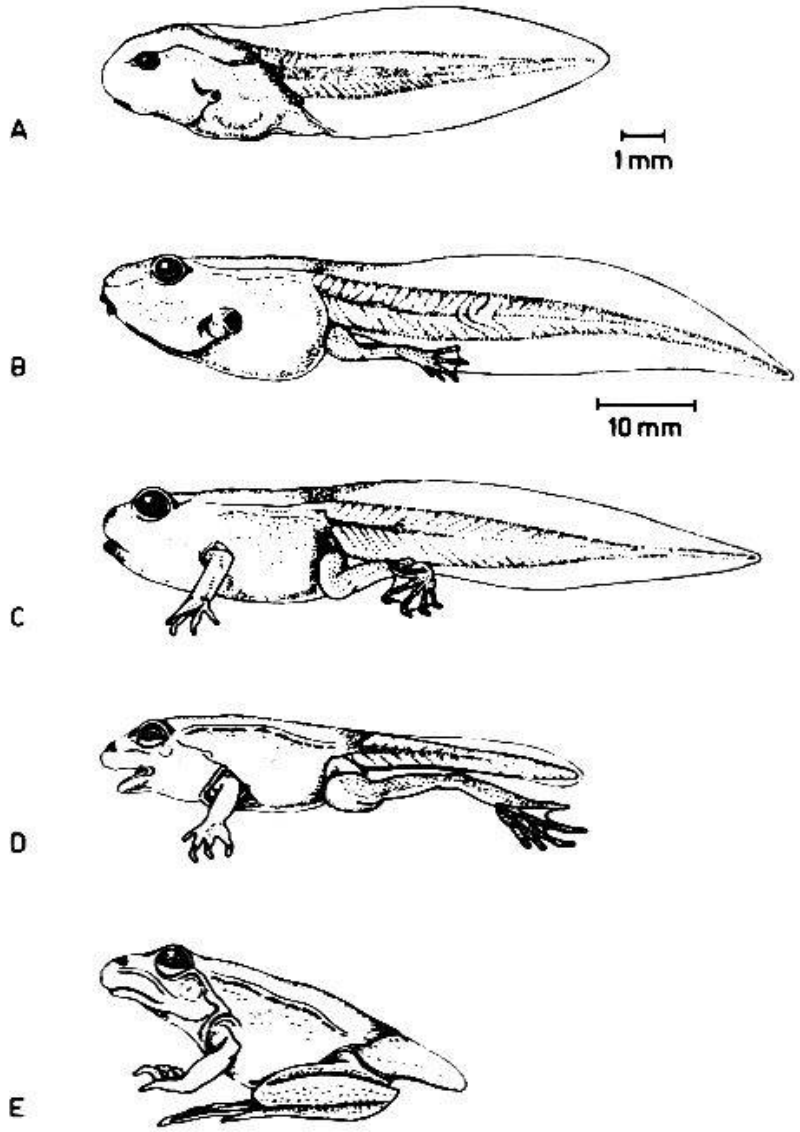

Abb. 2. Die Metamorphose der Kaulquappe. – Larvale Entwicklungsstadien von Rana pipiens: A = Prämetamorphose, B = Prometamorphose, C, D, E = Metamorphoseklimax, den Übergang von der Kaulquappe zum Jungfrosch darstellend. (Nach WITSCHI 1956.)

Ein ungleich größeres Ausmaß jedoch erreicht die Geweberückbildung während der Metamorphose. Diese kritische Spanne der postembryonalen Entwicklung, welche abgesehen von der Einschmelzung larvaler Gewebe durch die Aktivierung von Wachstums- und Differenzierungsprozessen gekennzeichnet ist, dient der Verwandlung von «Larvenformen» in die arttypische Adultform. Bei Wirbeltieren ist die Entwicklung der Froschlarven oder Kaulquappen durch eine besonders tiefgreifende Metamorphose gekennzeichnet; ihr auffälligstes Merkmal ist die Einschmelzung des Kaulquappenschwanzes (Abb. 2). Dieser Vorgang wird wie alle Erscheinungen der Kaulquappenverwandlung durch die Hormone der Schilddrüse ausgelöst und eignet sich daher in besonderem Maße zur experimentellen Analyse der Geweberückbildung.

Der Anstoß zur systematischen Erforschung der Geweberückbildung kam von biochemischer Seite, nachdem DE DUVE (1958, 1959) in der «Lysosomen»-Hypothese ein überzeugendes Modell für den Mechanismus der Zellautolyse vorgeschlagen hatte. Nach dieser Vorstellung besitzt die Zelle eine besondere Kategorie von Cytoplasmapartikeln oder «Lysosomen» mit einem spezifischen Muster an hydrolytischen Fermenten, deren Freisetzung aus den Partikeln die Selbstauflösung der Zelle zur Folge hat (Abb. 3). Die Hypothese, wonach die Stabilität bestimmter Cytoplasmaorganelle gewissermaßen über Leben und Tod der Zelle entscheiden soll, hat großen Anklang gefunden, da hier Möglichkeiten zur Kontrolle von Wachstum und Formbildung angedeutet wurden.

Im folgenden möchte ich das Problem der Geweberückbildung am Beispiel der Kaulquappenmetamorphose an Hand von biochemischen und zellbiologischen Befunden diskutieren. Damit soll gezeigt werden, daß hier die

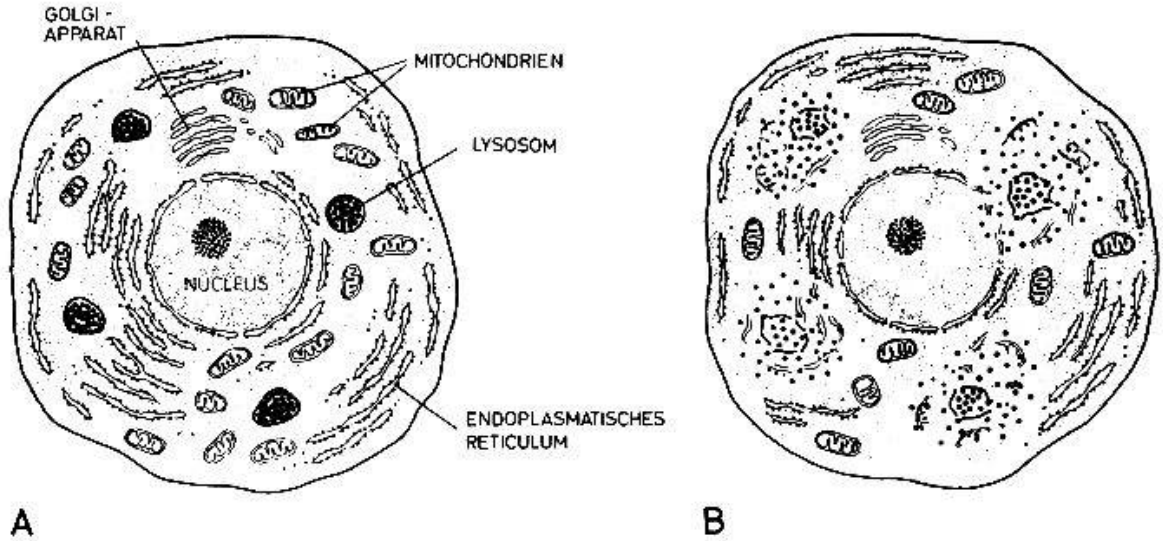

Abb. 3. Lysosomen und Zellautolyse. – A = normale Zelle: Lysosomenfermente inaktiv, da von impermeabler Membran umschlossen. B = Zerstörung der Lysosomenmembran führt zur Freisetzung der sauren Hydrolasen, welche durch Auflösung von Zellbestandteilen den Zelltod herbeiführen. (Nach DE DUVE 1963 a.)

Geweberückbildung auf prinzipiell ähnlichen Kontrollmechanismen beruhen dürfte wie die Zelldifferenzierung.

2. *Biochemische Kennzeichen der Schwanzresorption bei spontaner Metamorphose*

Bei Kaulquappen des südafrikanischen Krallenfrosches (Xenopus laevis) beginnt die Schwanzresorption mit der Einschmelzung des Flossensaumes. Erst vier Tage nach Eintritt des «Metamorphoseklimax» ist eine Längenabnahme festzustellen. Anschließend kommt es zu einer raschen Verkürzung des Schwanzes, so daß am 8. Tag nurmehr ein kleiner Stummel vorhanden ist (Abb. 4). Aus den Werten für den Gewebestickstoff (Weber 1957 b), läßt sich berechnen, daß in diesem kurzen Zeitintervall etwa 5 mg Gewebeproteine abgebaut werden.

Untersuchungen über das Verhalten von Fermenten im Schwanzgewebe ergaben übereinstimmend, daß eine Reihe von Hydrolasen mit saurem pH-Optimum, nämlich Kathepsine (Agrell 1951; Weber 1957 a, b; Eeckhout 1963, 1965), saure Phosphatase (Yanagisawa 1953; Weber und Niehus 1961), Desoxyribonuclease (Coleman 1962; Eeckhout 1963, 1965), Ribonuclease (Eeckhout 1963, 1965) und β-Glukuronidase (Kubler und Frieden 1964; Eeckhout 1963, 1965) bezogen auf Gewebeeinheiten im regredierenden Schwanz um das 5- bis 40fache an Aktivität zunehmen (Abb. 5), während andere Fermente, wie z. B. die Mg^{++}-abhängige ATP-ase, unter den gleichen Bedingungen an Aktivität einbüßen (Niehus und Weber 1961). Es ist bemerkenswert, daß alle diese sauren Hydrolasen in die Gruppe der von de Duve (1958, 1959) postulierten Lysosomenfermente gehören. Die Tatsache, daß diese Fermente trotz intensiver Proteolyse im Gewebe erhalten

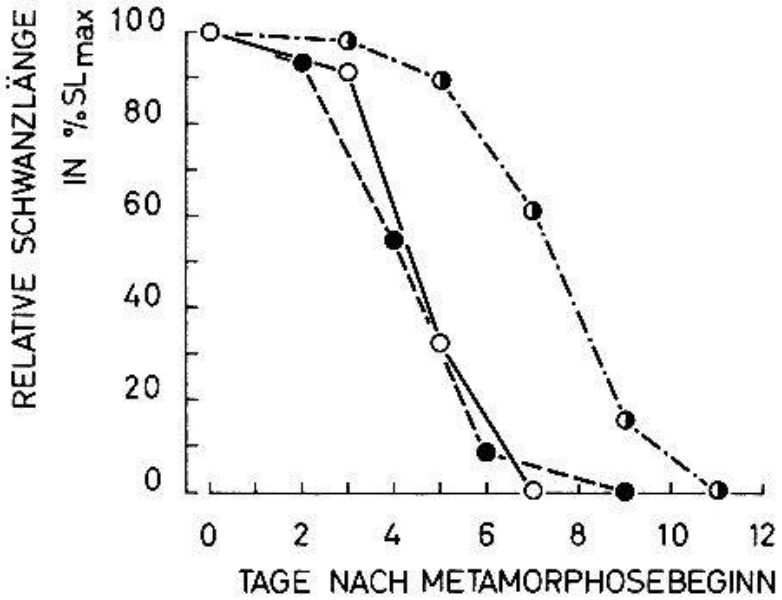

Abb. 4. Die Rückbildung des Schwanzes während der Metamorphose der Xenopuslarve. – Abnahme der Schwanzlänge für drei Kaulquappen bei 20°C. (Nach Weber 1957 b.)

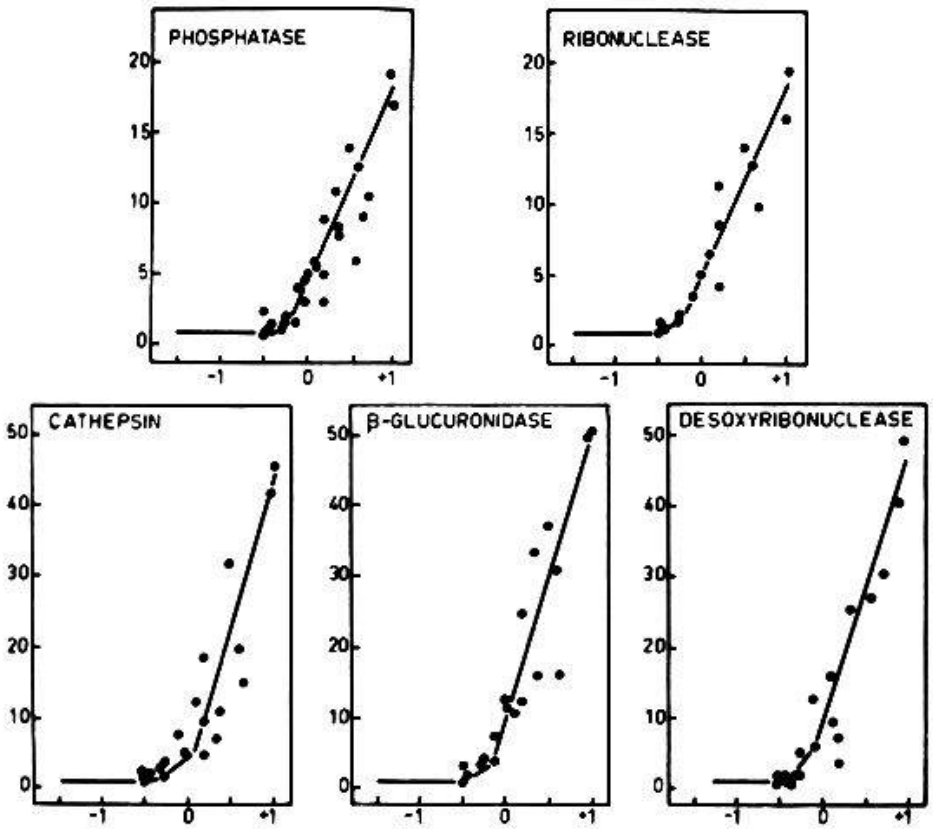

Abb. 5. Aktivitätszunahme der Lysosomenfermente im regredierenden Schwanz von Xenopuslarven. – Ordinate: Spezifische Aktivität von Metamorphosestadien bezogen auf Vormetamorphosestadien. Abszisse: Metamorphoseindex. (Nach EECKHOUT 1965.)

bleiben, könnte bedeuten, daß sie – entsprechend der Vorstellung von DE DUVE (1958, 1959) – funktionell mit der Geweberückbildung verknüpft sind.

Damit stellt sich nun die Frage, welcher Mechanismus für die Zunahme der Aktivität der sauren Hydrolasen im regredierenden Kaulquappenschwanz verantwortlich ist. Ein erster Hinweis ergibt sich aus dem Verhalten der Gesamtaktivität pro Schwanz. Wie aus Abb. 6 hervorgeht, zeichnen sich die typischen Lysosomenfermente Kathepsin und saure Phosphatase im regredierenden Schwanz durch eine weitere Zunahme um 100 bzw. 20% aus, wobei die Maximalwerte der Gesamtaktivität zeitlich mit der Phase intensivsten Gewebeabbaus zusammenfallen. Umgekehrt verhält sich die Mg^{++}-abhängige ATP-ase, die funktionell mit dem Energiestoffwechsel bzw. der kontraktilen Substanz der Muskelzellen gekoppelt ist; für dieses Fermentsystem ist ein markanter Abfall der Aktivität schon zu Beginn der Resorptionsphase charakteristisch, was zum Teil mit dem Zerfall der Schwanzmuskulatur im Zusammenhang stehen dürfte. Unsere Befunde über das Verhalten der Kathepsine und die saure Phosphatase konnten durch EECKHOUT (1965) quantitativ bestätigt werden. Außerdem wurde für die β-Glukuronidase (KUBLER und FRIEDEN 1964; EECKHOUT 1965) wie auch die Desoxyribonuclease (EECKHOUT 1965) eine 3fache Zunahme im regredierenden Schwanz nachgewiesen.

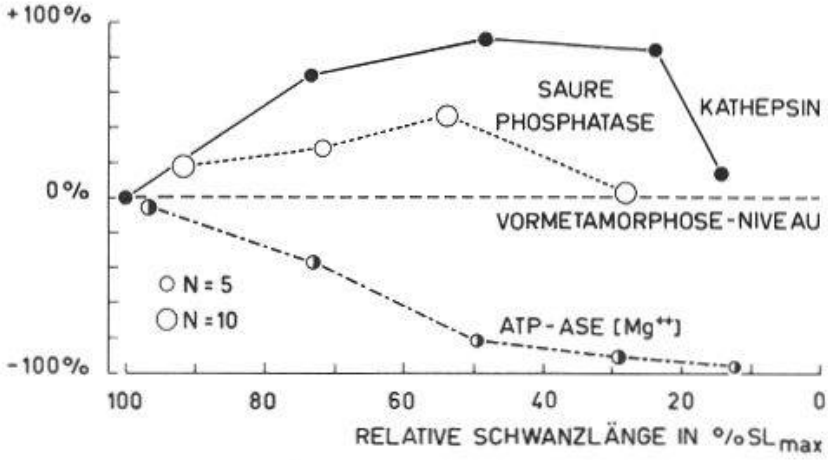

Abb. 6. Veränderungen der Gesamtaktivität von Fermenten im Schwanzgewebe von Xenopuslarven bei spontaner Metamorphose. – Ordinate: relative Zunahme oder Abnahme der Aktivität je Schwanz bezogen auf das mittlere Aktivitätsniveau (0-Linie) metamorphosebereiter Larven. Abszisse: Relative Schwanzlänge zur Kennzeichnung der Metamorphosestadien in % der bei Eintritt der Metamorphose gemessenen Schwanzlänge (SL_{max} = 100%). Einzelwerte für bestimmte Intervalle zusammengefaßt; die Kreisflächen sind proportional der Zahl der untersuchten Individuen. (Nach Weber 1963 a.)

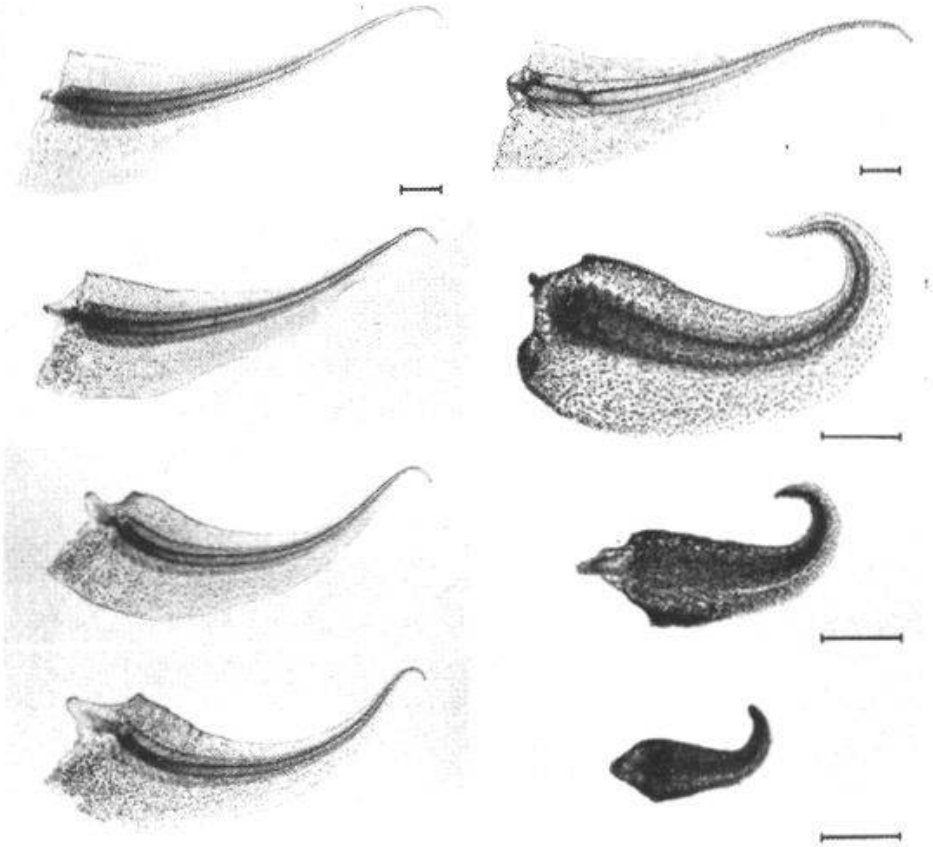

Abb. 7. Die Rückbildung isolierter Schwanzspitzen unter der Einwirkung von Thyroxin. – Links, von oben nach unten: Kontrollspitzen 6, 8, 10 und 12 Tage nach Amputation in Holtfreterlösung. Rechts, von oben nach unten: In vitro regredierende Schwanzspitzen gleichen Alters wie die Kontrollen nach 3, 5, 7 und 9 Tagen Behandlung mit DL-Thyroxin 1:5 Millionen. Vergleichsstrecke = 1 mm. (Nach Weber 1963 c.)

In Anbetracht der Tatsache, daß die Aktivitätsbestimmungen nach Freisetzung allfällig gebundener Fermente durchgeführt wurden, ist es ausgeschlossen, die Zunahme der sauren Hydrolasen durch die Annahme eines progressiven Zerfalls von präformierten Zellorganellen oder «Lysosomen» zu deuten. Im Gegensatz zur ursprünglichen Hypothese von DE DUVE (1958, 1959) ist für die Schwanzresorption eine Zunahme an Enzymen zu fordern, wobei als Mechanismen die Zuwanderung oder die Synthese an Ort gleichermaßen möglich erscheinen.

3. Die Aktivierung der Kathepsinsynthese in der isolierten Schwanzspitze durch Thyroxin

Mit Bezug auf die Schwanzresorption der Kaulquappe erwog NEEDHAM (1942) seinerzeit die Möglichkeit einer Auslösung der Histolyse durch einwandernde Leukocyten. Angesichts ihres hohen Gehalts an sauren Hydrolasen wäre es in der Tat möglich, die Zunahme dieser Fermente durch die Anreicherung von Leukocyten im Schwanzgewebe zu erklären.

Da es aber gelingt, isolierte Schwanzspitzen in vitro durch Zugabe von Thyroxin zur Rückbildung zu veranlassen, ist bewiesen, daß die Zuwanderung von Leukocyten für die Auslösung der Geweberegression nicht erforderlich ist.

Die auf Versuche von SHAFFER (1957, 1963) zurückgehende Methode der in vitro induzierten Organrückbildung (Abb. 7) wurde im Hinblick auf die biochemischen Untersuchungen folgendermaßen standardisiert: 12–15 mm lange Schwanzspitzen von noch im Wachstum begriffenen Xenopuslarven werden in nährstofffreier Holtfreterlösung + 0,05% Sulfathiazol übertragen. Nach 3 Tagen, d. h. nach der Verwachsung der Amputationswunde, werden die Spitzen in Kulturlösung + DL-Thyroxin (1 : 5 Millionen) übertragen. Nach einer Latenzzeit von 3–5 Tagen ist bei den behandelten Isolaten eine raschverlaufende Gewebeschrumpfung zu beobachten; diese erfaßt zunächst die Spitze und den Flossensaum und erst später auch die zentrale Muskelmasse. Etwa 12 Tage nach Einsetzen der Thyroxinbehandlung ist in der Regel nurmehr eine kleine, mit Melaninkörnern gefüllte Epidermiskugel vorhanden (WEBER 1963 a).

An diesem Modellsystem wurden bisher folgende biochemischen Befunde erhoben: Um den Verlauf der Geweberegression quantitativ erfassen zu können, wurde der Gehalt an Totalstickstoff (TN) für einzelne Schwanzspitzen bestimmt. Abb. 8 ist zu entnehmen, daß bei unbehandelten Kontrollspitzen in nährstofffreier Holtfreterlösung ein spontaner Verlust an TN auftritt, der 11 Tage nach Amputation etwa ein Drittel des Ausgangswertes beträgt. Bei Thyroxinbehandlung kommt es nach einer Latenzzeit von 3–4 Tagen zu einem ungleich größeren Verlust an TN, der am 11. Tag nach Amputation ca. 80% des TN-Gehaltes frisch amputierter Spitzen erreicht; in diesem Zeitpunkt beträgt der TN-Gehalt behandelter Spitzen im Durchschnitt etwa $\frac{1}{3}$ des Wertes von Kontrollen gleichen Alters. Es bestehen auch Anhalts-

punkte dafür, daß die Intensität der Rückbildung, nicht aber die Latenzzeit von der Thyroxinkonzentration abhängig sind (WEBER 1963 a, b, c).

Das Verhalten der sauren Hydrolasen sei zunächst am Beispiel der Kathepsine (WEBER 1963 a, b, c) erläutert. In diesem Zusammenhang ist nur das Verhalten der Gesamtaktivität von Bedeutung, da diese als ein Maß für den Enzymgehalt der Schwanzspitzen betrachtet werden kann. Aus Abb. 9 ist ersichtlich, daß in unbehandelten Spitzen – entgegen den Erwartungen – eine beträchtliche Zunahme (+ 258%) der Kathepsinaktivität zu verzeichnen ist. In behandelten Spitzen dagegen kommt es nach einer Latenzzeit von etwa 3 Tagen zu einem sprunghaften Anstieg der Kathepsinaktivität; am 11. Tag nach Amputation übertreffen die Kathepsinwerte von behandelten Spitzen diejenigen von Kontrollen noch um 135%. Es ist wahrscheinlich, daß die spontane Aktivitätszunahme der Kontrollspitzen einen Hungereffekt darstellt. Für eine solche Deutung sprechen jedenfalls Befunde von BENZ (1957), der bei hungernden Xenopuslarven eine beträchtliche Zunahme der Schwanzkathepsine nachweisen konnte.

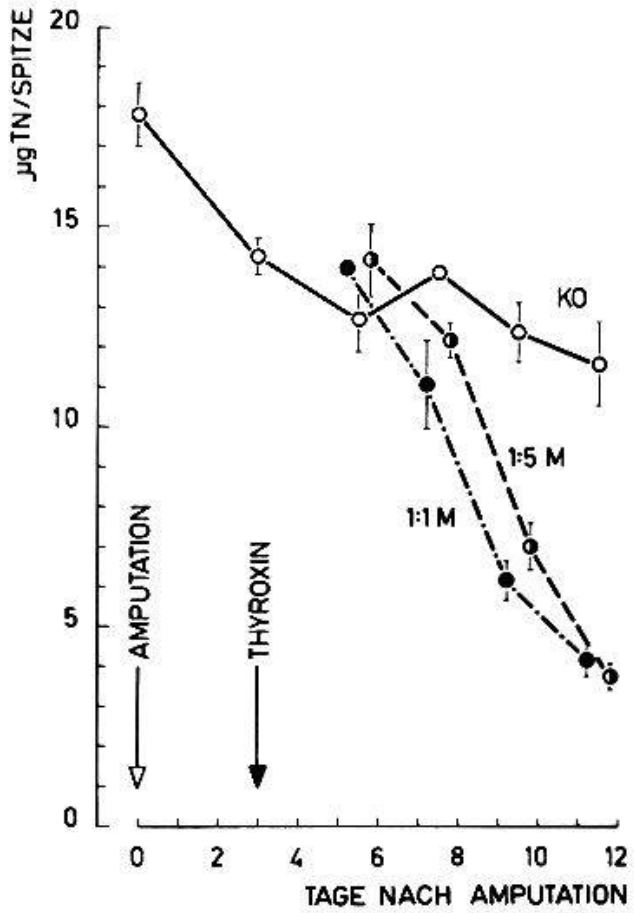

Abb. 8. Verlust an Totalstickstoff in isolierten Schwanzspitzen bei thyroxin-induzierter Rückbildung. – Mittelwerte von je 6 Schwanzspitzen aus zwei Versuchen, wobei Einzelwerte für den 7./8., 9./10. und 11./12. Tag zusammengefaßt sind. KO = Kontrollspitzen. 1 : 1 M, 1 : 5 M = mit DL-Thyroxin behandelte Spitzen. Vertikale Striche = Streuung der Mittelwerte. (Nach WEBER 1963 c.)

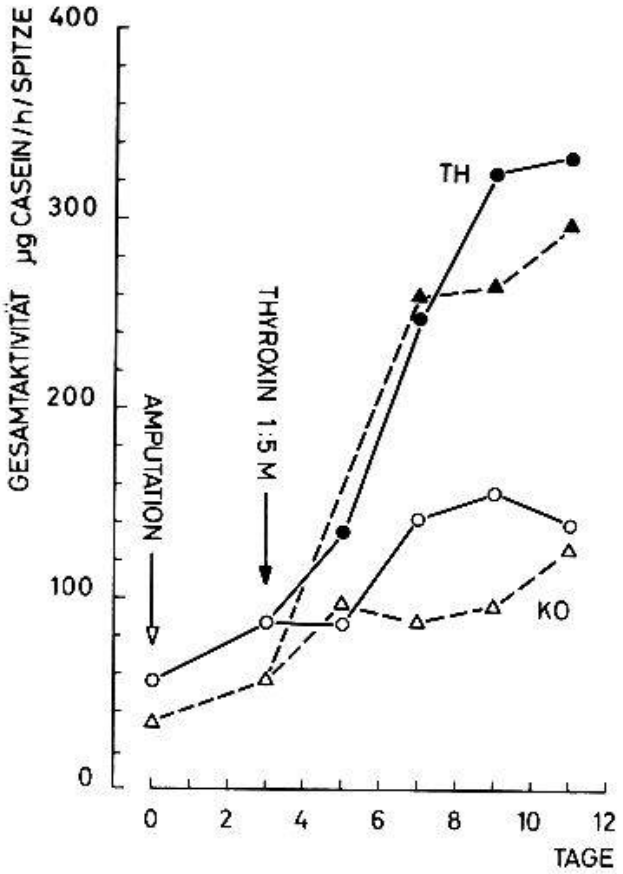

Abb. 9. Zunahme der Kathepsinaktivität in isolierten Schwanzspitzen bei thyroxin-induzierter Rückbildung. – Meßpunkte aus zwei Versuchen, in welchen die Aktivität an Homogenaten von 5–10 Schwanzspitzen bestimmt wurde. (Nach WEBER 1963 b.)

In Ergänzung dieser Befunde muß noch erwähnt werden, daß EECKHOUT (1965) unter Verwendung der gleichen Versuchsanordnung nach 6–12 Tagen Thyroxinbehandlung für die wichtigsten Lysosomenfermente eine erhebliche Zunahme nachweisen konnte (Tab. 1).

Tabelle 1

Proteingehalt und Gesamtaktivität von Lysosomenfermenten in isolierten Schwanzspitzen bei thyroxin-induzierter Rückbildung (nach EECKHOUT 1965)

	Verhältnis $\frac{\text{Thyroxinspitzen*}}{\text{Kontrollspitzen}}$
Proteine	0,62
Saure Phosphatase	1,07
Desoxyribonuclease	1,36
β-Glukuronidase	1,92
β-Acetyl-aminodesoxyglukosidase	1,53

* Die Werte beziehen sich auf Messungen zwischen dem 6. und 12. Tag der Thyroxinbehandlung.

Die Befunde an isolierten Schwanzspitzen beweisen, daß die Zunahme der sauren Hydrolasen im regredierenden Gewebe nicht auf die Infiltration von Leukocyten zurückgeführt werden kann, sondern vielmehr eine lokale Gewebereaktion auf den Thyroxinreiz darstellt. Die Tatsache, daß die Reaktion erst nach einer Latenzzeit einsetzt, spricht ferner für einen indirekten Wirkungsmechanismus des Thyroxins. Somit erscheint die seinerzeit von BRACHET (1960) geäußerte Hypothese, wonach Hormone die Geweberückbildung durch direkte Freisetzung von Lysosomenfermenten hervorrufen könnten, als wenig wahrscheinlich.

4. Hemmung der Geweberückbildung und der Kathepsinsynthese durch Actinomycin D

Im Zusammenhang mit der Frage nach dem Mechanismus der Geweberegression erscheint es angezeigt, die Wirkung von Hemmstoffen für die Proteinsynthese zu untersuchen. Wir haben zunächst die Wirkung von Actinomycin[1] auf die spontane Rückbildung des Schwanzes bei Xenopuslarven untersucht. Da Actinomycin in spezifischer Weise die Synthese von Boten-RNS blockiert (REICH 1963), wäre zu erwarten, daß dieser Stoff wohl die Synthese von sauren Hydrolasen im Schwanzgewebe, nicht aber deren Freisetzung aus präformierten Cytoplasmapartikeln beeinflußt.

Aufgrund der bisherigen Beobachtungen führt die einmalige intraperitonäale Injektion von 0,1γ Actinomycin zu Beginn der Metamorphosekrise zu einer eindeutigen Hemmung der Metamorphoseprozesse (WEBER 1965), auch wenn noch zusätzlich L-Thyroxin (1 : 50 Millionen) verabreicht wird. So ist bei behandelten Larven die Umwandlung der Kiemenregion und des Darmes wie auch die Einschmelzung des Schwanzes erheblich verzögert (Abb. 10); außerdem ist an den Extremitäten eine teratogene Wirkung dieses Stoffes zu beobachten. Dieser Befund beweist, daß Actinomycin D nicht etwa die Ausschüttung der Metamorphosehormone blockiert – d. h. zentral angreift –, sondern vielmehr seine Wirkung an der Peripherie entfaltet, indem das Reaktionsvermögen der larvalen Gewebe blockiert wird.

Die Tatsache, daß Actinomycin D die Rückbildung des Kaulquappenschwanzes verhindert, erlaubt es nun, das Verhalten der Lysosomenfermente bei verzögerter Geweberegression zu untersuchen. In Tabelle 2 sind die bisher vorliegenden Ergebnisse für die Schwanzkathepsine (WEBER 1965) zusammengestellt. Daraus ist ersichtlich, daß die spezifische Aktivität für normal metamorphosierende Larven diejenige von behandelten Larven mit gehemmter Schwanzresorption um etwa das 13fache übertrifft. Dieser Unterschied kommt auch in der Gesamtaktivität deutlich zum Ausdruck, indem der Kathepsingehalt in Schwänzen von gehemmten Larven nur ein Viertel der normal metamorphosierenden Kontrollarven erreicht.

---

[1] Die freundliche Überlassung von Actinomycin D durch die Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway (N. J./USA) sei hier bestens verdankt.

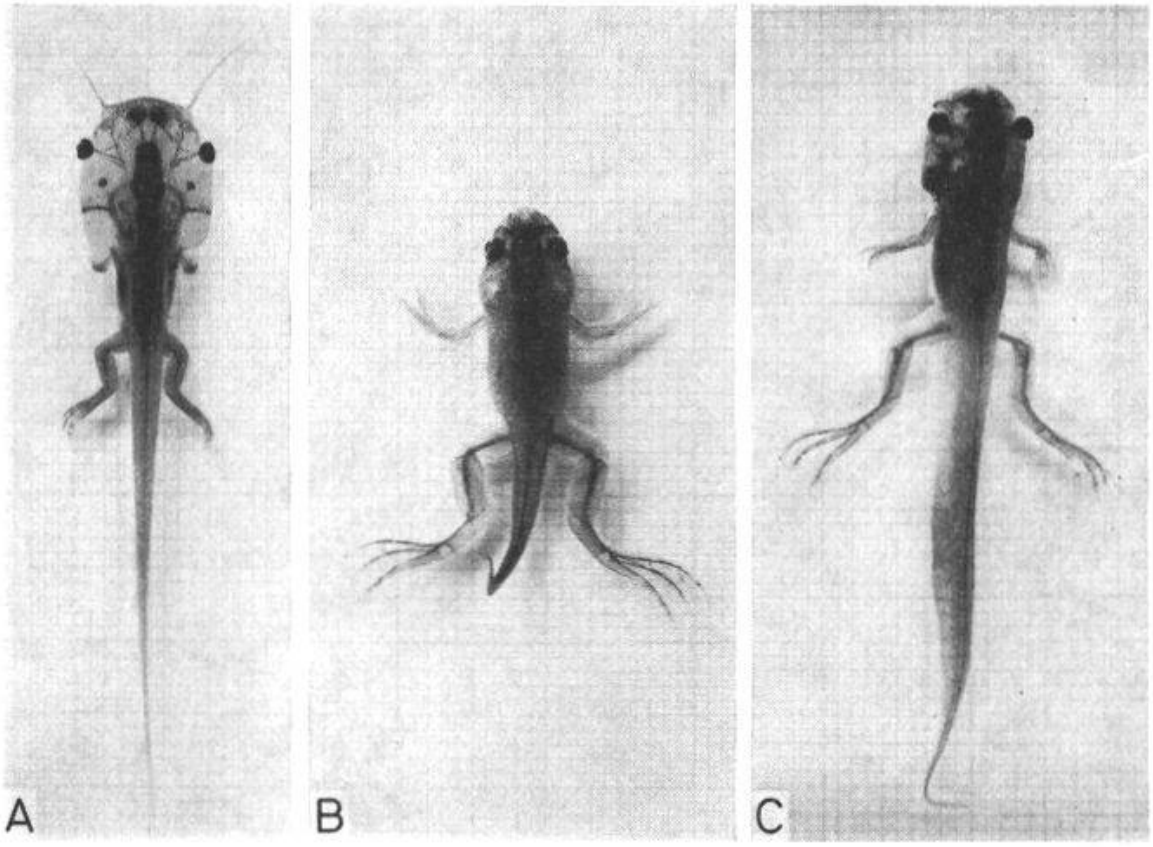

Abb. 10. Die Metamorphosehemmung durch Actinomycin D bei Xenopuslarven. – A = Kaulquappe zu Beginn des Metamorphoseklimax. B = Kaulquappe 7 Tage nach Beginn des Metamorphoseklimax. C = Kaulquappe gleichen Alters wie B, welcher bei Beginn des Metamorphoseklimax 0,1γ Actinomycin D intraperitonäal injiziert wurden. Die Metamorphosehemmung ist deutlich, insbesondere zeigt der Schwanz noch keine Anzeichen der Rückbildung.

Die Befunde an actinomycinbehandelten Kaulquappen erlauben nun folgende Schlüsse: (1) Die Tatsache, daß die Kathepsine bei gehemmter Geweberegression nur eine geringe Aktivität aufweisen, bedeutet, daß diese Fermente bei der Histolyse eine wesentliche Rolle spielen. (2) Da Actinomycin D die Zunahme der Gewebekathepsine blockiert, muß angenommen werden, daß die Aktivitätszunahme dieses Enzyms im regredierenden Schwanz auf einer Neusynthese beruht. (3) In bezug auf die Wirkungsweise der Metamorphosehormone muß postuliert werden, daß das Thyroxin seine Wirkung im Metamorphosegeschehen durch differentielle Aktivierung von Genen entfaltet.

5. Zellbiologische Aspekte der Geweberegression

a) Die histochemische Lokalisation von sauren Hydrolasen im Kaulquappenschwanz

Da der Kaulquappenschwanz aus verschiedenen Gewebetypen, nämlich Muskulatur, Neuralrohr und Bindegewebe aufgebaut ist, stellt sich die Frage, ob die Zunahme der sauren Hydrolasen eine allgemeine oder eine gewebespezifische Reaktion darstellt.

Tabelle 2

Kathepsinaktivität im Schwanzgewebe von Xenopuslarven bei Metamorphosehemmung duch Actinomycin (nach WEBER 1965)

Versuch	Stadium: Tage nach Beginn des Metamorphoseklimax	Actinomycin D	Kathepsin			
			spez. Aktivität		Totalaktivität	
		γ/Larve	γ-Casein/h/TN	KO/AMD*	γ-Casein/h/Schwanz	KO/AMD
1 KO	5	0	30,77	13,6	2981,6	3,82
AMD		0,2	2,26		781,1	
2 KO	7	0	45,38	12,5	2913,8	3,82
AMD		0,1	3,63		763,4	
3 KO	7	0	32,88	13,5	3224,2	3,48
AMD		0,1	2,44		924,4	
Mittel KO/AMD:				*13,2*		*3,71*

* KO = Kontrollen spontan metamorphosierend, AMD = mit Actinomycin D behandelte Larven.

Da heute ausgezeichnete Methoden zum histochemischen Nachweis von sauren Hydrolasen zur Verfügung stehen, war es naheliegend, die Verteilung solcher Fermente im Schwanzgewebe zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurden 5–7 μ dicke Kryostatschnitte von in Ca^{++}-Formol fixiertem Gewebe verwendet. Saure Phosphatase wurde mit Hilfe der Azokupplungsmethode nach BURSTONE (1958) unter Verwendung von Naphthol-AS-TR-phosphat (Substrat) und Fast Dark Blue (Diazonium-salz) bei pH 5,2 nachgewiesen. Für den Nachweis der Kathepsine wurde die modifizierte Esterasemethode von HESS und PEARSE (1958) verwendet, wobei als Substrat ein substituiertes Indoxylacetat verwendet wurde. Die Vorbehandlung der Schnitte mit E_{600} zur Hemmung der spezifischen Cholinesterase bzw. die Nachbehandlung der Schnitte mit Cystein als Aktivator für Kathepsine war ohne sichtbaren Effekt und wurde daher weggelassen.

Mit diesen Methoden fanden wir im regredierenden Schwanz übereinstimmende Verteilungsmuster für die saure Phosphatase und kathepsinartige Esterasen (SALZMANN und WEBER 1963). Entgegen allen Erwartungen ergab sich bei fortgeschrittenen Stadien der Metamorphose, in welchen die Muskulatur schon weitgehend resorbiert war, eine eindeutige Lokalisation dieser Fermente im Bindegewebe, und zwar in makrophagenähnlichen Zellen (Abb. 11). In solchen Zellen ist die Aktivität besonders ausgeprägt im Fall der sauren Phosphatase auf cytoplasmatische Einschlüsse von 1–10 μ Durchmesser beschränkt; diese Einschlüsse sind wahrscheinlich als «Phagosomen» zu deuten, d. h. als Vakuolen, welche durch die Phagocytosetätigkeit der Makrophagen entstanden sind.

Es ist bemerkenswert, daß sowohl Nervengewebe als auch Muskulatur, obschon in Rückbildung begriffen, keine nennenswerte Reaktion für saure Hydrolasen ergeben. Ferner fehlen aktive Makrophagen vollständig im Schwanzgewebe von Vormetamorphoselarven. Vorläufige Befunde (SALZMANN und WEBER, unveröffentlicht) machen wahrscheinlich, daß die Makrophagen zuerst im Bindegewebe des Flossensaumes und erst später im Bindegewebe des Schwanzstammes auftreten.

Das Ergebnis der histochemischen Analyse läßt sich dahin zusammenfassen, daß die Schwanzrückbildung mit einer Aktivierung der Makrophagen verknüpft ist und daß diese Zellen im Zusammenhang mit der Phagocytosetätigkeit saure Hydrolasen neu synthetisieren.

b) Submikroskopische Kennzeichen der Schwanzregression

Bei der Annahme, daß die Stimulation von Histiocyten die celluläre Grundlage für die Zunahme der hydrolytischen Fermente darstellt, ist es klar, daß damit nur ein Symptom, aber nicht die Ursache der Geweberückbildung erfaßt ist. Es stellt sich daher die Frage, welche Faktoren bei der Aktivierung der Makrophagen eine Rolle spielen könnten.

Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist es gelungen, Veränderungen im feinstrukturellen Gefüge von Muskelfasern (WEBER 1964) sowie im Bindegewebe des Flossensaumes (GROSS 1964) nachzuweisen. Im

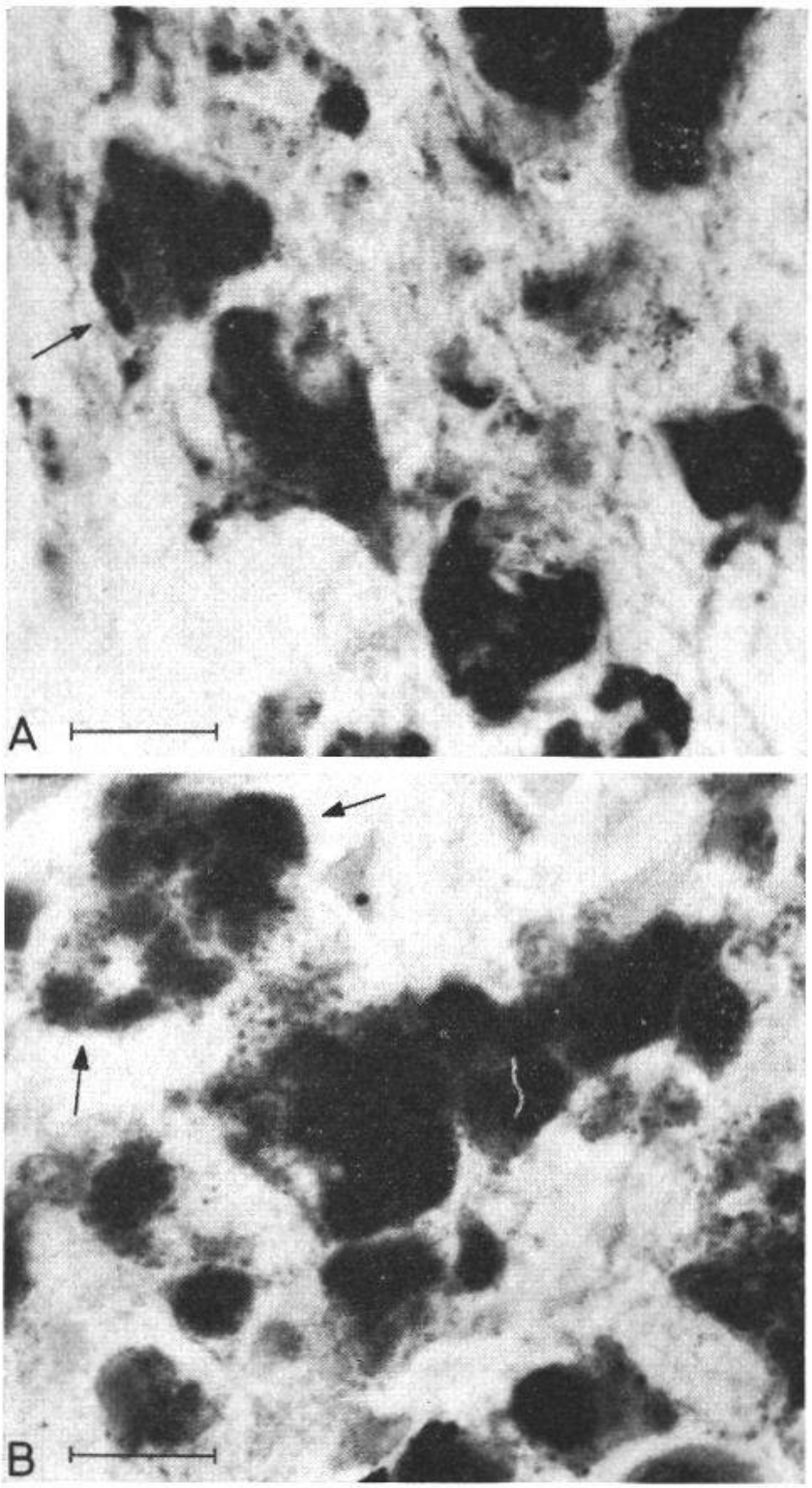

Abb. 11. Die Lokalisation von sauren Hydrolasen im regredierenden Schwanzgewebe von Xenopuslarven. – In Kryostatschnitten von vorgerückten Stadien der Schwanzregression sind die Reaktionsorte für saure Phosphatase (A) bzw. kathepsinartige Esterasen (B) vorwiegend auf Makrophagen des subepidermalen Bindegewebes beschränkt. Die Enzyme zeigen eine cytoplasmatische Lokalisation in Einschlüssen, welche vermutlich «Phagosomen» darstellen (↑). Eingezeichnete Vergleichsstrecke = 10 μ. (Nach SALZMANN und WEBER 1963.)

folgenden beschränke ich mich auf eine Darstellung der Befunde an der Schwanzmuskulatur.

Im elektronenmikroskopischen Bild zeigen intakte Muskelzellen gestreckte Myofibrillenbündel mit einer typischen Querstreifung, welche durch die Folge von A- und I-Banden zustande kommt. Die Mitochondrien oder Sarcosomen enthalten ein System von eng gepackten «cristae». Im Sarcoplasma findet man granuläre Partikel, vermutlich Ribosomen und Glykogen sowie ein schlauchförmiges sarcoplasmatisches Reticulum (Abb. 12 A). Elektronenoptisch sind submikroskopische Strukturveränderungen bereits am 3. Tag der Metamorphosekrise nachweisbar, nämlich: (1) Faltung der Myofibrillenbündel und Verlust der Querstreifung und (2) Zerfall der Cristae in den Mitochondrien (Abb. 12 B). Bei vorgerückten Stadien der Rückbildung ist das Sarcoplasma stark verändert und besonders reich an granulafreien Mikrobläschen. Es bestehen ferner Anhaltspunkte dafür, daß das Sarcoplasma und Bestandteile von Muskelzellen in den Intercellularraum austreten. In Schwanzstummeln, in welchen die Muskulatur zur Hauptsache

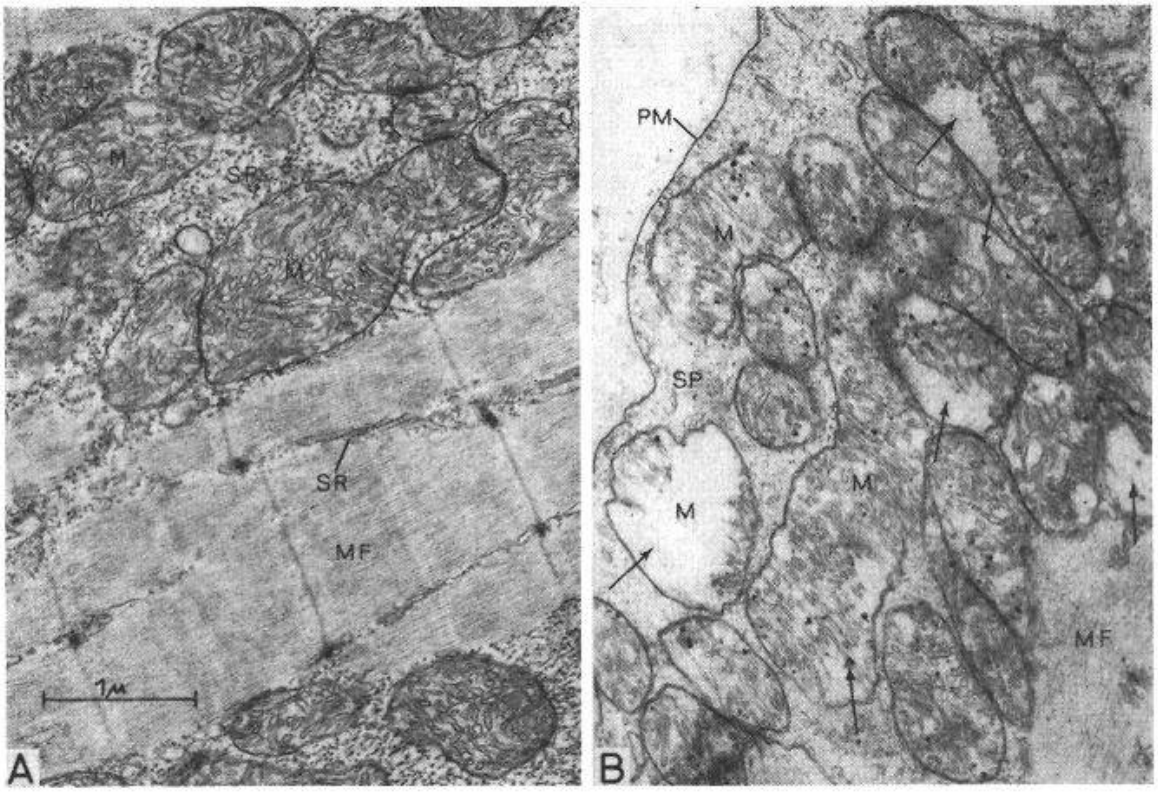

Abb. 12. Submikroskopische Strukturveränderungen in der Schwanzmuskulatur von Xenopuslarven. – A = Ausschnitt aus Schwanzmuskulatur einer Vormetamorphoselarve. MF = Myofibrillen mit Querstreifung, SR = Sarcoplasmatisches Reticulum. M = Mitochondrien mit enggepackten Cristae. SP = Sarcoplasma mit granulären Einschlüssen, vermutlich Ribosomen und Glykogen darstellend. B = Ausschnitt aus Schwanzmuskulatur einer Larve vom 3. Tag des Metamorphoseklimax. Regressive Strukturveränderungen sind nachweisbar an den Myofibrillen (MF) im Verlust der Querstreifung, in den Mitochondrien (M) als Korrosion der Cristae (↑) und im Sarcoplasma (SP) in der Abnahme der granulären Einschlüsse. PM = Plasmamembran noch intakt. Fixierung: OsO_4, Nachkontrastierung: mit Pb-citrat. (Nach Weber 1964.)

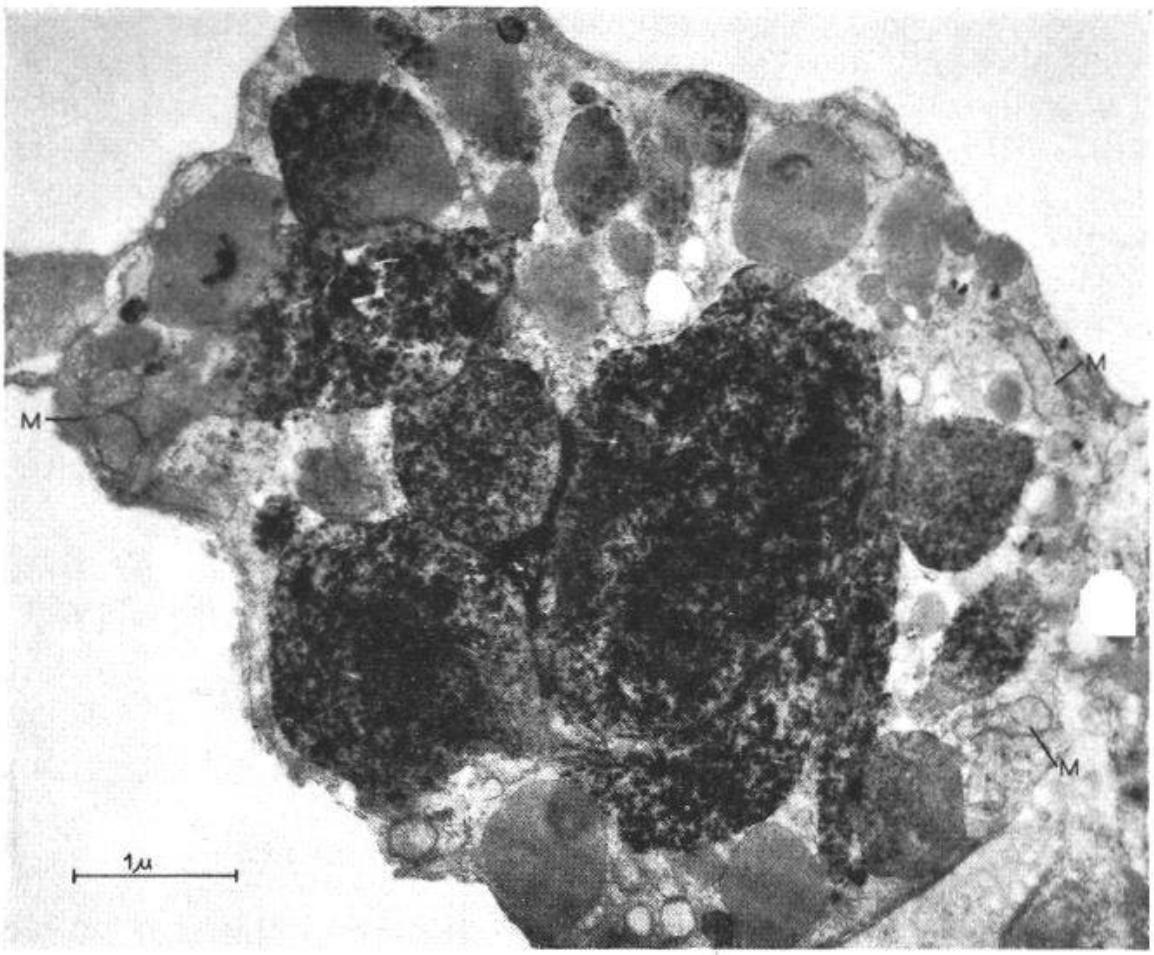

Abb. 13. Lokalisation von saurer Phosphatase in Makrophage. – Präparat vom Schwanzstummel einer Xenopuslarve mit positiver Reaktion für saure Phosphatase (schwarze Partikel) in cytoplasmatischen Einschlußkörpern eines Makrophagen. M = kleine Mitochondrien mit deutlichen Cristae. Nachfixierung: OsO_4, Kontrastierung mit Pb-citrat. (Nach WEBER 1964.)

abgebaut ist, sind Makrophagen leicht nachzuweisen. Sie enthalten kleine Mitochondrien mit intakten Cristae, typische Golgi-Lamellen und ein gut ausgebildetes endoplasmatisches Reticulum, freie Ribosomen sowie zahlreiche große Einschlußkörper, welche zum Teil eine positive Reaktion für saure Phosphatase ergeben (Abb. 13).

Für die Schwanzmuskulatur ist somit der Nachweis erbracht, daß im submikroskopischen Gefüge der Zellorganelle regressive Veränderungen auftreten, bevor die Geweberückbildung makroskopisch in Erscheinung tritt. Wahrscheinlich wird durch den autolytischen Zerfall der Muskelzellen eine wesentliche Voraussetzung für die lokale Aktivierung von Makrophagen geschaffen.

Über den Mechanismus dieser frühen, vermutlich autolytischen Degenerationserscheinungen in den Muskelzellen ist zur Zeit noch keine Aussage möglich. Jedenfalls ist der Strukturzerfall der Mitochondrien nicht etwa als eine Bestätigung der von MARTIUS (1955) geäußerten Hypothese zu deuten, wonach Thyroxin die Geweberegression bei metamorphosierenden Kaulquappen

durch Entkupplung der oxydativen Phosphorylierung, d. h. durch Drosselung der energieliefernden Prozesse, auslöst; denn im Schwanzisolat bewirkt Thyroxin erst nach einer Latenzzeit von mehreren Tagen eine signifikante Zunahme der Gewebeatmung (HEINEMANN und WEBER, unveröffentlichte Befunde). Anderseits ist in Analogie zu Befunden bei erblich bedingter Muskeldystrophie (RICHTERICH, persönliche Mitteilung) mit der Möglichkeit zu rechnen, daß infolge von Veränderungen in der Permeabilität der Zellmembranen funktionsspezifische Enzyme aus Muskelzellen in das interzelluläre Kompartiment austreten. Unter solchen Bedingungen könnte das funktionelle und strukturelle Gefüge der Muskelzellen unter Ausschluß von lytischen Fermenten zusammenbrechen.

Zusammenfassung

Abschließend läßt sich die hormonal bedingte Geweberegression bei metamorphosierenden Kaulquappen wie folgt kennzeichnen:

1. Da die sauren Hydrolasen oder Lysosomenfermente im regredierenden Gewebe trotz intensiver Proteolyse erhalten bleiben, ist anzunehmen, daß diese Fermente bei der physiologischen Geweberückbildung eine wesentliche Rolle spielen.

2. Die Aktivitätszunahme der sauren Hydrolasen im regredierenden Gewebe beruht *nicht* auf einer Freisetzung vorgebildeter, inaktiver Fermentmoleküle, sondern auf einer *Neu*synthese durch Makrophagen. Im Verhalten der Lysosomenfermente kommt die Aktivierung der Makrophagen zum Ausdruck. Damit ist aber nur ein Symptom, nicht aber die Ursache der Geweberückbildung erfaßt.

3. Es bestehen Anhaltspunkte dafür, daß die Geweberegression durch subcelluläre Strukturveränderungen eingeleitet wird, deren Mechanismus noch unbekannt ist. Durch diese autolytischen Prozesse[2] werden die für die Aktivierung der Makrophagen notwendigen Bedingungen erst geschaffen.

4. Da Actinomycin D auch die regressiven Prozesse der Kaulquappenmetamorphose hemmt, ist anzunehmen, daß der auslösende hormonale Faktor auf dem Niveau der Desoxyribonucleinsäure angreift und die Abgabe von genetischer Information in den Zellen der larvalen Gewebe hervorruft. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Geweberückbildung durch ähnliche Mechanismen kontrolliert wird wie die progressive Differenzierung von embryonalen Zellen.

Résumé

Des recherches récentes sur l'involution de la queue chez les têtards en métamorphose permettent de caractériser la régression tissulaire, induite par voie hormonale, de la façon suivante:

[2] In neuerer Zeit ist die Lysosomen-Hypothese beträchtlich erweitert worden. So weist DE DUVE (1963) ausdrücklich darauf hin, daß die Geweberückbildung in bestimmten Fällen durch den autolytischen Zerfall von Zellen ausgelöst werden kann.

1. Bien que le tissu en voie de régression soit le siège d'une protéolyse intense, l'activité des hydrolases acides ou enzymes lysosomiques y demeure constante ou est même augmentée, ce qui suggère une participation de ces enzymes au processus histolytique.

2. A partir de recherches biochimiques et histochimiques, on peut conclure que l'augmentation d'activité des hydrolases acides dans le tissu en voie de régression n'est pas due à la mise en liberté de molécules d'enzymes préexistantes sous forme inactive, mais plutôt à l'apparition de nouvelles molécules d'enzymes, synthétisées par les macrophages. Par conséquent, il est probable que le comportement des hydrolases acides représente un témoin de la régression tissulaire, plutôt que sa cause primaire.

3. A l'échelle submicroscopique des structures intracellulaires, on a pu observer des modifications dégénératives précoces, dont le mécanisme est actuellement inconnu, mais qui pourrait donner l'explication de l'activation locale des macrophages.

4. Le fait que l'involution des tissus chez le têtard soit inhibée par l'actinomycine D laisse penser que l'hormone thyroïdienne pourrait exercer son effet morphogénétique par activation différentielle des gènes. Par conséquent l'involution tissulaire obéirait aux mêmes lois que la différenciation progressive des cellules embryonnaires.

Riassunto

La regressione dei tessuti nei girini in fase di metamorfosi e sotto l'influsso ormonale si caratterizza in conclusione come segue:

1. Dato che le idrolasi acide o fermenti lisosomi si conservano nei tessuti in fase regressiva malgrado intensa disintegrazione delle proteine, bisogna supporre che questi fermenti abbiano un ruolo di importanza nella regressione fisiologica dei tessuti.

2. L'aumento d'attività delle idrolasi acide nel tessuto in fase regressiva non si basa su una emissione di molecole di fermenti inattive e preformate, bensì su una nuova sintesi mediante macrofagi. L'attivazione dei macrofagi si manifesta nel comportamento dei fermenti lisosomi. Con ciò si afferra solo un sintomo, non però la causa della regressione dei tessuti.

3. Si hanno delle ragioni per credere che la regressione dei tessuti viene iniziata da cambiamenti della struttura subcellulare il cui meccanismo ancora non è noto. Mediante tali processi autolitici vengono create solo le condizioni necessarie per l'attivazione dei macrofagi.

4. Dato che l'actinomicina D inibisce anche i processi di regressione durante la metamorfosi dei girini, bisogna dedurne che il fattore ormonale iniziante agisca al livello dell'acido desossiribonucleinico, provocando la consegna di informazioni genetiche alle cellule dei tessuti della larva. E perciò probabile che la regressione dei tessuti sia controllata da meccanismi simili a quelli della differenziazione progressiva delle cellule embrionali.

Summary

From recent investigations on tail atrophy in metamorphosing tadpoles hormone-dependent tissue involution in anuran larvae may be characterized as follows:

1. In spite of intense proteolytic activity in the regressing tissue, the activity of acid hydrolases or lysosomal enzymes remains unchanged or even increases, thus indicating a specific role of these enzymes in tissue breakdown.

2. Various lines of evidence indicate that the increase in activity of acid hydrolases in the regressive tissue does not result from the release of preformed inactive enzyme molecules, but rather from the appearance of new enzyme that is synthesized by macrophages. Therefore the behaviour of acid hydrolases is more likely to represent a symptom than the causative event in tissue breakdown.

3. There is evidence of early degenerative changes involving the ultrastructural organization of cell components, the mechanism of which is still unkown. However, these autolytic changes may produce the necessary condition for the local activation of macrophages.

4. The inhibition of tissue involution in tadpoles by actinomycin D points to the possibility that the thyroid hormone produces its morphogenetic effects by eliciting specific genetic information in the cells of larval tissues. It is suggested that tissue involution is controlled by a mechanism similar to that involved in determining progressive differentiation of embryonic cells.

Die eigenen Untersuchungen wurden durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt Nr. 2456) unterstützt. An dieser Stelle sei Herrn T. WYLER für seine fachkundige technische Assistenz bestens gedankt.

AGRELL I: Acta physiol. scand. *23*, 179 (1951). – BENZ G.: Rev. suisse Zool. *64*, 337 (1957). – BRACHET J.: The biochemistry of development. Pergamon Press, London 1960. – BURSTONE M. S.: J. nat. Cancer Inst. *21*, 523 (1958). – COLEMAN J. R.: Develop. Biol. *5*, 232 (1962). – DE DUVE C.: Bull. Acad. roy. Med. Belg. *23*, 608 (1958). – DE DUVE C.: In: Subcellular Particles, hrsg. T. HAYASHI, S. 128–159. Ronald, New York 1959. – DE DUVE C.: Sci. Amer. *208*, 64 (1963 a). – DE DUVE C.: In: Ciba Found. Symp. on Lysosomes, hrsg. A. V. S. DE REUCK und M. P. CAMERON, S. 1–31. Churchill, London 1963 b. – EECKHOUT Y.: Zit. nach C. DE DUVE, in: Ciba Found. Symp. on Lysosomes, hrsg. A. V. S. DE REUCK und M. P. CAMERON, S. 301. Churchill, London 1963. – EECKHOUT Y.: Contribution à l'étude de la métamormophose caudale des amphibiens anoures. Thèse Louvain (Fac. Sci.)1965. – GLÜCKSMANN A.: Biol. Rev. Cambridge philos. Soc. *26*, 59 (1951). – GROSS J.: Medicine *43*, 291 (1964). – HESS R. und PEARSE A. E. G.: Brit. J. exp. Path. *39*, 292 (1958). – KUBLER H. und FRIEDEN E.: Biochim. biophys. Acta (Amst.) *93*, 635 (1964). – MARTIUS C.: In: 5. Coll. Ges. physiol. Chem. Mosbach/Baden, S. 143–156. Springer Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1955. – NEEDHAM J.: Biochemistry and Morphogenesis. University Press, Cambridge 1942. – NIEHUS B. und WEBER R.: Helv. physiol. pharmacol. Acta *19*, 344 (1961). – REICH E.: Cancer Res. *23*, 1428 (1963). – SALZMANN R. und WEBER R.: Experientia (Basel) *19*, 352 (1963). – SAUNDERS J. W., GASSELING M. T. und SAUNDERS L. C.: Develop. Biol. *5*, 147 (1962). –

SHAFFER B. M.: Demonstration am 9. Int. Kongr. für Zellbiologie, St. Andrews 1957. – SHAFFER B. M.: J. Embryol. exp. Morph. *11*, 77 (1963). – WEBER R.: Experientia (Basel) *13*, 153 (1957 a). – WEBER R.: Rev. suisse Zool. *64*, 326 (1957 b). – WEBER R.: Experientia (Basel) *18*, 84 (1962). – WEBER R.: In: 13. Coll. Ges. physiol. Chem. 1962 Mosbach/Baden, S. 235–240. Springer Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1963 a. – WEBER R.: In: Ciba Found. Symp. on Lysosomes, hrsg. A. V. S. DE REUCK und M. P. CAMERON, S. 282–300. Churchill, London 1963 b. – WEBER R.: Helv. physiol. pharmacol. Acta *21*, 277 (1963 c). – Weber R.: J. Cell Biol. *22*, 481 (1964). – WEBER R.: Experientia (Basel) *21*, 665 (1965). – WEBER R. und NIEHUS B.: Helv. physiol. pharmacol. Acta *19*, 103 (1961). – WITSCHI E.: Development of vertebrates. Saunders, Philadelphia 1956. – WOLFF ET.: Experientia (Basel) *9*, 121 (1953). – YANAGISAWA T.: Repts. Liberal Arts Fac. Shizuoka Univ. Nat. Sci. *4*, 20 (1953).

Adresse des Autors: Prof. Dr. R. Weber, Zoologisches Institut der Universität, Sahlistraße 8, CH 3000 Bern