

### Zum Proliferations-Stoffwechsel der Rattenleber nach Teilhepatektomie. Autoradiographische Untersuchungen mit $^3\text{H}$ -Cytidin, -Phenylalanin und -Thymidin<sup>1</sup>

Biochemische Tracer-Studien haben in den ersten Stunden nach partieller Hepatektomie (pH) einen Anstieg der Kern-RNS- (Literatur bei<sup>2</sup>) und der Zell-Eiweiss (EW)-Synthese<sup>3,4</sup> ergeben. Unsere autoradiographischen Untersuchungen befassen sich mit dem Umfang der zellulären RNS-Synthese, der RNS-Migrations-Kinetik und der EW-Neubildung im Verlauf der 1. Regenerationswelle nach pH. In diesem Zeitintervall wird der im ausgewachsenen Tier übliche «langsame» Proliferationsmodus der Leberepithelien<sup>5</sup> auf die «schnelle» Form mit Verkürzung der DNS-Synthesephase (S), der postsynthetischen praemitotischen Phase G<sub>2</sub> und der Mitose (M) bei gleichzeitiger Erhöhung der DNS-Syntheserate (= Neubildung/Zeiteinheit) umgestellt<sup>6</sup>. Durch eine Doppelinjektion von  $^3\text{H}$ -Vorläufern soll dabei zusätzlich der cytoplasmatische Proliferations-Stoffwechsel<sup>7</sup> sowohl an Zellen mit, als auch ohne DNS-Neubildung im Kern nach pH geprüft werden.

Versuchsbedingungen (vgl. Tabellen I und II): Typische  $2/3$  Teilhepatektomie an 28 ausgewachsenen männlichen Sprague-Dawley-Ratten, 270–360 g. Serie (a): i.p. Injektion von  $^3\text{H}$ -Cytidin 22 h pH (2,0 Ci/Tier, spezifische Aktivität 1,75 Ci/mM, Schwarz Bio Research, New York), Tötung 20, 50 min, 3, 15 h nach Aktivitätsgabe; Injektion von  $^3\text{H}$ -Cytidin 39, 6 h pH, Tötung 20 min später. Serie (b): Injektion von  $^3\text{H}$ -l-Phenylalanin 23 und 39 h pH (3,0 Ci/Tier, spezifische Aktivität 39, 4 Ci/mM;<sup>8</sup> Tötung 60 min nach Aktivitätsgabe. Serie (c): Injektion von  $^3\text{H}$ -Cytidin (1,0 Ci/Tier) und Tötung der Ratten wie in (a), jedoch zusätzlich i.p. Injektion von  $^3\text{H}$ -Thymidin 21,3; 21,8 und 22 sowie 39 h pH (500  $\mu$  Ci/Tier, spezifische Aktivität 3,0 Ci/mM, Schwarz Bio Research, New York). Serie (d): Versuchsbedingungen wie in (b) und zusätzlich 1 h vor der Tötung Injektion von  $^3\text{H}$ -Thymidin. Serie (e): Kontrolltiere, Injektion von  $^3\text{H}$ -Cytidin bzw.  $^3\text{H}$ -Phenylalanin wie in (a) bzw. (b).

Tab. I. Mittl.  $\text{SKZ}_{1d}/(\text{mCi/g})$  = mittlere, auf 1 Tag Expositionszeit umgerechnete Silberkornzahl korrigiert durch verabfolgte Radioaktivität pro g Lebendgewicht der Ratte.

Mittl. $\text{SKZ}_{1d}/(\text{mCi/g})$ für Cytoplasma Leberparenchym				
Injektionszeit pH	radioaktive Versuchszeit	bei einfachen markierten Kernen	bei doppelt markierten Kernen	Tötung pH
22 h	20 min Cyt			
21,3 h	1 h Thym	120,15	148,93	22,3 h
22 h	50 min Cyt			
21,8 h	1 h Thym	200,92	335,26	22,8 h
22 h	3 h Cyt			
22 h	3 h Thym	743,36	940,33	25 h
22 h	15 h Cyt			
	15 h Thym	1065,15	1040,76	37 h
39,6 h	20 min Cyt			
39 h	1 h Thym	134,81	153,81	40 h
23 h	1 h Phe			
	1 h Thym	876,66	877,81	24 h
39 h	1 h Phe			
	1 h Thym	1011,49	992,09	40 h

Folgende Ergebnisse zeichnen sich ab: Im Verlauf der 1. Regenerationswelle nach pH (Literatur bei<sup>9</sup>) wird einmal die nukleare RNS-Synthese und zum anderen die Migration von RNS aus dem Kernraum in das Cytoplasma gesteigert. Gleichzeitig weist der Umfang der nukleolären und karyoplasmatischen, besonders aber der cytoplasmatischen EW-Synthese sowohl am Anfang wie auch am Ende dieser Regenerationswelle höhere Werte als bei den Kontrollen auf. Die pH auftretende Volumenzunahme von Nukleolus (Faktor 3,7) und Karyoplasma (Faktor 1,5) (Vgl.<sup>7</sup>) sowie die Flächenzunahme des Cytoplasmas (Faktor 1,8) sind stets mit einer noch stärkeren Steigerung der Silberkorndichte (= Silberkornzahl/ $\mu^2$ ) verbunden und demnach Ausdruck einer echten Aktivierung dieser Zellbestandteile (Tabelle I). Diese Phänomene dienen unseres Erachtens in erster Linie einer Neubildung spezifischer, im Proliferations-Stoffwechsel benötigter Proteine, wobei sowohl an Histone und Nihthiston-Proteine der sich reduplizierenden Chromosomen, als auch an für die Mitose benötigte cytoplasmatische Spindelproteine zu denken ist (vgl.<sup>10–11</sup>).

Dabei läuft die RNS-Migrations-Kinetik aus Nukleolus und Karyoplasma ins Cytoplasma bei Versuchstieren und Kontrollen etwa gleich ab (Figur). Lediglich bei kürzeren radioaktiven Versuchszeiten liegen die Prozentwerte für

Tab. II.  $\text{SKD}_{1d}/(\text{mCi/g})$  = mittlere, auf 1 Tag Expositionszeit umgerechnete Silberkorndichte (=  $\text{SKZ}/\mu^2$ ), korrigiert durch verabfolgte Radioaktivität pro g Lebendgewicht der Ratte.

$\text{SKD}_{1d}/(\text{mCi/g})$  für Nukleolus, Karyoplasma und Cytoplasma. Leberparenchym nach Injektion von  $^3\text{H}$ -Cytidin bzw.  $^3\text{H}$ -l-Phenylalanin

Vorläufer Kontrollen		$^3/4$ pH						
$^3\text{H}$ -Cy	Radioaktive Versuchszeit	Nu	Ka	Cyt	Injektionszeit pH	Nu	Ka	Cyt
	20 min	11,08	2,57		22 h	33,34	4,70	
	50 min	38,76	6,13		22 h	46,69	7,54	
	3 h	34,84	6,42		22 h	28,00	6,52	
	15 h	4,13	4,09	1,83	22 h	6,82	5,65	3,12
	20 min				39,6 h	15,53	3,95	
$^3\text{H}$ -Phe	1 h				23 h	5,75	4,29	3,70
	1 h	3,62	2,61	2,27	39 h	3,86	3,72	3,34

<sup>1</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>2</sup> G. SIEBERT, Verh. dt. Ges. Path. 50, 119 (1966).

<sup>3</sup> W. BUSANNY-CASPARI und MARIA DEIMEL, Z. ges. exp. Med. 136, 456 (1963).

<sup>4</sup> H. RABES, Naturwissenschaften 53, 386 (1966).

<sup>5</sup> E. STÖCKER und W.-D. HEINE, Beitr. path. Anat. 131, 410 (1965).

<sup>6</sup> E. STÖCKER, Verh. dt. Ges. Path. 50, 53 (1966).

<sup>7</sup> H.-W. ALTMANN, Verh. dt. Ges. Path. 50, 15 (1966).

<sup>8</sup> Für die Synthese danken wir Herrn Dr. K. HEMPEL, Institut f. Med. Strahlenkunde der Universität Würzburg.

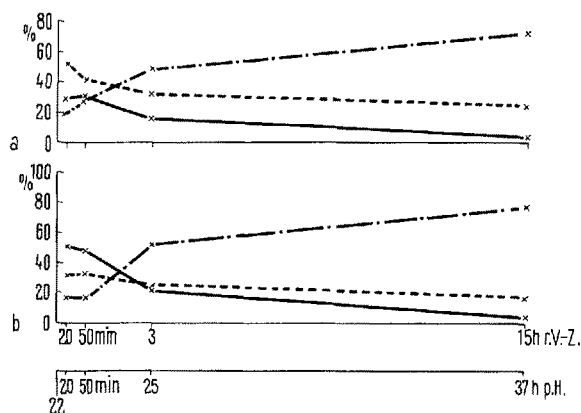
<sup>9</sup> I. LIEBERMANN, R. ABRAMS und P. OVE, J. biol. Chem. 238, 2141 (1963).

<sup>10</sup> E. W. TAYLOR, J. Cell Biol. 19, 1 (1963); Expl Cell Res. 40, 316 (1965).

<sup>11</sup> E. STÖCKER, W. LIEBSCHER und V. HÖPER, im Druck.

die nukleoläre Aktivität im Versuchskollektiv etwas höher, was mit der starken Grössenzunahme und besonders intensiven Markierung des Kernkörperchens zusammenhängt. Auch das Verhältnis der gesamten cytoplasmatischen zur gesamten Kern-EW-Synthese<sup>12</sup> unterliegt keinen nennenswerten Schwankungen (Aktivität Cytoplasma/Aktivität Kern: Kontrollen = 6,15; 24 h pH 7,05; 40 h pH 5,85). Bei einer starken Steigerung der gesamten RNS- und EW-Synthese der Zelle bleibt demnach die Relation der metabolischen Aktivität der einzelnen Zellbestandteile zueinander weitgehend erhalten.

Durch eine Doppelinjektion von <sup>3</sup>H-Cytidin + <sup>3</sup>H-Thyminid bzw. von <sup>3</sup>H-Phenylalanin + <sup>3</sup>H-Thyminid



Mittlerer Prozentsatz der <sup>3</sup>H-Cytidin-RNS-Aktivität/Zellstruktur (Schnittfläche; — Nukleolus; --- Karyoplasma; - · - Cytoplasma) als Funktion der radioaktiven Versuchszeit (r.V.-Z.) und der Zeit nach partieller Hepatektomie (pH) für Kontrollen (a) und Versuchstiere (b).

sind solche Zellen, deren Kerne sich in der S-Phase befinden oder sie durchlaufen haben, auf Grund einer wesentlich stärkeren nuklearen Markierung eindeutig zu erkennen und von Zellen mit Kernen ausserhalb der DNS-Synthesephase abzugrenzen. Dabei läuft in Zellen mit DNS synthetisierenden Kernen die RNS-Migration ins Cytoplasma und die cytoplasmatische EW-Synthese genau so ab wie in den Zellen, deren Kerne nicht in die DNS-Synthese eingetreten sind (Tabelle II; vgl.<sup>13</sup> Lit.).

**Summary.** During the first wave of parenchymal liver regeneration in adult rats after partial hepatectomy, the cellular synthesis and migration of RNA and the metabolism of protein were studied by autoradiography following an injection of <sup>3</sup>H-cytidine or <sup>3</sup>H-l-phenylalanine and double injections of 1 of these precursors + <sup>3</sup>H-thymidine. The following results were obtained: the synthesis and migration of RNA and the metabolism of protein are enhanced under these conditions of proliferation. In spite of this, the relation of metabolic activity in nucleolus, karyoplasm and cytoplasm remains constant. By double injection techniques it is proved that no differences exist in migration of RNA into the cytoplasm and cytoplasmic protein synthesis between cells with or without DNA synthesizing nuclei.

E. STÖCKER, W. LIEBSCHER und H.-W. ALTMANN

Pathologisches Institut der Universität Würzburg (Deutschland), 27. Januar 1967.

<sup>12</sup> P. CITOLER, KARIN CITOLER, K. HEMPEL, BRIGITTE SCHULTZE und W. MAURER, Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 70, 419 (1966).

<sup>13</sup> R. BASERGA, Cancer Res. 25, 581 (1965).

## Metabolism of Pyridoxal Phosphate in the Liver of Hypo- and Hyperthyroid Rats

Several investigators have observed that in the liver of hyperthyroid rats there is a reduction of the activity of enzymes known to require pyridoxal phosphate as prosthetic group<sup>1-3</sup>. This holds for L-serine dehydratase, L-threonine dehydratase, cysteine desulphhydrase, but not for aspartate aminotransferase. L-serine and L-threonine dehydratase activity is restored by in vitro addition of pyridoxal phosphate to the enzyme preparations<sup>3</sup>. These modifications are supposed to be due to a decrease in the liver pyridoxal phosphate content<sup>4,5</sup>. According to MASCITELLI-CORIANDOLI and BOLDRINI<sup>4</sup>, such a reduction is related to an impairment of the phosphorylation processes. In contrast to this hypothesis is the observation, made by HORWATH, according to whom even pyridoxine, added in vitro, restores L-serine and L-threonine dehydratase activities<sup>3</sup>. Therefore it seems more likely that the rate of catabolism of the prosthetic group is increased in hyperthyroidism rather than its rate of synthesis decreased.

In the attempt to explain how thyroid hormones control pyridoxal phosphate content in liver, we have measured the activity of the enzymes which synthesize

the cofactor, pyridoxal kinase and pyridoxaminephosphate oxidase, and of the first enzyme which catalyzes its degradation, a phosphatase, in the liver of normal, hypo- and hyperthyroid rats. Determinations of the amount of pyridoxic acid excreted in urine have also been made.

Male rats, strain Wistar, weighing 50–60 g, have been used for the experiments. One group was fed for 6 weeks a normal diet (Diet Z, Zoofarm, Padova); a second group received for the same time the normal diet plus 0.15% of propylthiouracil; a third group was fed the same normal diet, plus 2% of thyroid powder (Costantino, Favria Canavese) in the last 10 days. All the animals were fasted for 8 h before the experiment.

The rats were killed by decapitation and the livers were rapidly excised, chilled in ice, and homogenized in 4 parts

<sup>1</sup> G. LITWACK, J. biol. Chem. 228, 823 (1957).

<sup>2</sup> B. JOLLIS-BERGERET, J. LABOUESSE and F. CHATAGNER, Bull. Soc. Chim. biol. 42, 51 (1960).

<sup>3</sup> A. HORWATH, Nature 179, 968 (1957).

<sup>4</sup> E. MASCITELLI-CORIANDOLI and R. BOLDRINI, Experientia 15, 229 (1959).

<sup>5</sup> J. LABOUESSE, F. CHATAGNER and B. JOLLIS-BERGERET, Biochim. biophys. Acta 39, 372 (1960).