

## **Autoradiographische Untersuchung des Einbaus von $^{35}\text{S}$ -Methionin in die Proteine des Kaninchengehirns**

F. GALLYAS, E. GYENGE, ST. LISSÁK und F. T. MÉREI

Neurologisch-Psychiatrische Universitätsklinik Pécs

Eingegangen am 4. November 1966

OEHLERT, SCHULTZE u. MAURER (1958) untersuchten mit Hilfe einer autoradiographischen Methode die Größe des Eiweißstoffwechsels der verschiedenen Zellen des Kaninchengehirns. Es zeigte sich, daß sich die Nervenzellen der verschiedenen Kern- und Rindenareale, auf Grund der Höhe ihres Eiweißumsatzes, bezogen auf Thioaminosäuren, in Gruppen einteilen lassen. Diese Untersuchungen haben experimentell bestätigt, daß die Nervenzellen zu den Zellen mit dem größten Eiweißstoffwechsel gehören. Dagegen wurde für Glia und Mark ein wesentlich geringerer Eiweißstoffwechsel gefunden, welcher dem der Muskulatur und des Bindegewebes entsprach.

Wir (MÉREI u. GALLYAS, 1964a) haben eine autoradiographische Methode ausgearbeitet, die quantitative Untersuchungen auch bei serienweiser Bearbeitung größeren Tiermaterials ermöglicht. Mit dieser Methode haben wir festgestellt (MÉREI u. GALLYAS, 1964b), daß die verschiedenen Kerngebiete des Rattengehirns auf Grund des Einbaus von markierten Thioaminosäuren in sieben Gruppen eingeteilt werden können.

In der vorliegenden Arbeit soll über eine ausführliche autoradiographische Untersuchung des Eiweißumsatzes der verschiedenen Gebiete des Kaninchengehirns (mit Ausnahme der hypothalamischen Kerne) nach intraperitonealer (i. p.) Verabreichung von  $^{35}\text{S}$ -markiertem Methionin berichtet werden.

### **Methodik**

Neun gesunde, ausgewachsene Kaninchen erhielten i.p.  $150\ \mu\text{C}$  in  $2,02 \cdot 10^2\ \mu\text{g}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin/100 g Körpergewicht. Nach der Injektion wurden je drei Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten durch Entbluten getötet, und zwar nach 1, 8 und 24 Std; der Kopf wurde von der Aorta aus mit 2%iger Formaldehydlösung in physiologischer Kochsalzlösung durchgespült.

Die Gehirne wurden für weitere 2 Tage in 4%iger Formaldehydlösung fixiert, dann in 2 mm dicke frontale Scheiben zerlegt. Um die histologische und autoradiographische Identifizierung der einzelnen Kerngebiete zu erleichtern, wurde die von WINKLER u. POTTER (1913) gebrauchte Schnittführung gewählt. Nach Paraffineinbettung wurden die Gehirne in Schnittserien zerlegt. Die Schnittdicke betrug

10  $\mu$ . Die weitere Behandlung der Schnitte und die photometrische Bestimmung der relativen Isotopenkonzentration wurde mit der von uns beschriebenen Methode ausgeführt (MÉREI u. GALLYAS, 1964a).

Die relative  $^{35}\text{S}$ -Konzentration der wichtigsten Ebenen ist aus Abb. 1—10 ersichtlich, so daß wir diese als autoradiographischen „Atlas“ des Kaninchengehirns für unser Problem ansehen können. Die Identifizierung der einzelnen Kerngebiete erfolgte in Anlehnung an den Atlas des Kaninchengehirns von WINKLER u. POTTER. Von den Serien haben wir jeden zweiten Schnitt zur Herstellung der Autoradiogramme benützt, während die dazwischen liegenden Schnitte mit Kresylviolett oder Galloxyanin-Chromalaun gefärbt wurden.

Die Fehler, die in den verschiedenen Schnitten bei diesem Verfahren entstehen können, wurden sorgfältig beseitigt, wie es in unserer früheren Arbeit genau beschrieben wurde (MÉREI u. GALLYAS, 1964a).

### Ergebnisse

Die Abbildungen geben eine Übersicht über die relative Konzentration des  $^{35}\text{S}$  in den Proteinen der verschiedenen Kerngebiete des Zentralnervensystems. Die Autoradiogramme wurden in Positivbildern wiedergegeben, da wir Veränderungen des Schwärzungsunterschiedes durch Reduktion des Umkehrverfahrens möglichst vermeiden wollten.

Unsere Meßergebnisse sind in der Tabelle wiedergegeben. Die relative Konzentration liegt in den motorischen Kerngebieten im Durchschnitt etwas höher als in den sensorischen. Es besteht aber innerhalb aller funktionell zusammenfaßbaren Gruppen eine verhältnismäßig große Differenz zwischen den einzelnen Kernen.

Innerhalb der einzelnen Kerngebiete wurde immer dieselbe relative  $^{35}\text{S}$ -Konzentration gefunden. Dies stimmt mit den Befunden von OEHLERT, SCHULZE u. MAURER überein, die von der oben beschriebenen Tatsache nur eine Ausnahme, nämlich die der Purkinjeschen Zellen, gesehen haben.

### Besprechung

Die Frage, ob das i. p. verabreichte und vom Gehirn aufgenommene  $^{35}\text{S}$ -Methionin tatsächlich in die Proteine eingebaut wird, wurde bereits vielfach untersucht (COHN, RICHTER u. GAITONDE, 1954; MAURER, NIKLAS u. LEHNERT, 1954; GAITONDE u. RICHTER, 1956; CLOUET u. GAITONDE, 1956). Es wurde festgestellt (MAURER, NIKLAS u. LEHNERT), daß während der Fixierung und weiteren Behandlung der Gewebsschnitte alle wasser- und alkohollöslichen  $^{35}\text{S}$ -markierten Verbindungen, z. B. freie  $^{35}\text{S}$ -Thioamino-säure, Sulfate, herausgelöst werden. Die  $^{35}\text{S}$ -haltigen Lipide, die im Zentralnervensystem nur in geringer Menge vorhanden sind, werden durch den Einbettungsprozeß entfernt.

Mit histochemischen Methoden haben wir früher gezeigt, daß das i. p. verabreichte Methionin in die Proteine des Zentralnervensystems eingebaut wird (MÉREI u. GALLYAS, 1964a).

Tabelle

	Relative Isotopen- konzentration			Relative Isotopenkonzentration (in Prozent der Cortexaktivität)		
	1 Std	8 Std	24 Std	1 Std	8 Std	24 Std
Cortex	2,7	3,9	3,2	100	100	100
<i>Geruchsystem</i>						
Subiculum Cornu Ammonis	4,4	3,9	3,9	162	100	122
Fascia dentata	4,3	4,8	3,8	159	123	119
Corpus mammillare:						
Ggl. mediale	3,5	4,9	4,0	129	125	125
Ggl. laterale	2,4	3,7	2,8	88	94	87
N. habenulae	2,9	3,5	3,2	107	89	100
Ggl. interpedunculare	2,5	3,8	3,5	92	97	109
<i>Sehsystem</i>						
Corpus quadrigeminum ant.:						
Str. grisea	1,8	2,5	2,6	66	64	81
Str. medullare	1,4	1,8	1,8	51	46	56
Ggl. geniculatum lat.:						
Ggl. dorsomediale	2,6	3,4	3,2	96	87	100
Ggl. ventrolaterale	2,1	2,6	2,6	71	66	81
<i>Hörsystem</i>						
Corpus quadrigeminum post.	2,6	3,9	3,8	96	100	119
Ggl. geniculatum med.:						
N. ventralis	1,8	2,9	2,6	66	74	81
N. dorsalis	1,8	2,6	2,6	66	66	81
N. lateroventralis	1,8	2,5	2,4	66	64	75
N. lat. lemnisci lat.	2,8	4,3	3,5	103	110	109
Oliva superior	2,2	3,6	3,3	81	92	103
N. dorsalis n. VIII.	2,7	4,7	3,3	100	120	103
N. ventralis n. VIII.	3,2	4,7	3,7	118	120	116
<i>Vestibularkerne</i>						
N. Deiters	3,4	4,8	3,9	125	123	122
N. Bechterew	3,0	4,3	4,9	111	110	153
<i>Thalamus</i>						
N. ventralis	2,2	3,0	2,8	81	76	87
N. sensibilis n. V.	2,6	5,2	4,4	96	133	137
<i>Motorische Hirnnervenkerne</i>						
N. n. III.	5,4	5,5	7,8	200	141	243
N. n. VII.	—	5,4	5,4	—	138	169
N. motorius n. V.	3,0	4,8	4,2	111	123	131
N. n. VI.	3,6	4,4	4,3	133	112	134
<i>Extrapiramidale Gebiete</i>						
Cortex cerebelli	5,6	9,4	8,8	207	241	274
N. dentatus	2,6	4,6	3,7	96	117	116
N. fastigii	2,2	4,1	3,2	81	105	100

Tabelle (Fortsetzung)

	Relative Isotopen- konzentration			Relative Isotopenkonzentration (in Prozent der Cortexaktivität)		
	1 Std	8 Std	24 Std	1 Std	8 Std	24 Std
N. ruber	3,5	4,0	4,0	129	102	125
Substantia nigra	2,6	3,5	3,3	96	89	103
Putamen	2,1	3,1	2,4	77	79	75
N. pontis lat.	3,2	5,6	4,0	118	143	125
N. pontis med.	2,9	5,5	4,1	107	141	128
N. pontis ventr.	2,8	4,8	3,9	103	123	122
<i>Weißer Substanz</i>						
Lemniscus medialis	1,0	1,6	1,3	37	41	40
Substantia alba cerebelli	0,8	1,6	1,4	29	41	44
Fasciculus long. post.	1,0	1,5	1,6	37	38	50
Lamina medialis ventr.	1,1	1,4	1,2	40	35	37
Pyramis	0,7	1,2	1,2	26	30	37
<i>Sonstige Gebiete</i>						
N. ventr. griseae centr.	3,0	5,8	4,2	111	148	131
N. parolvaris	2,9	5,4	4,3	107	138	134
N. dors. brachii conj.	2,2	4,0	3,8	81	102	119
N. ventr. Formatio retic.	2,0	3,8	3,2	74	97	100
Locus caeruleus	2,3	3,7	2,4	85	94	75
Formatio reticularis	1,5	2,5	2,5	55	64	78
Substantia grisea centr.	1,4	1,9	1,8	51	48	56
N. Westphal-Edinger	3,6	4,4	5,0	133	112	156
<i>Thalamus</i>						
N. lateralis dors.	3,8	6,0	4,0	140	153	125
N. anterior	2,4	4,6	3,5	88	117	109
N. medialis	2,4	3,8	3,3	88	97	103
N. lateralis ventr.	2,0	3,1	2,8	74	79	87

Auf Grund der chromatographischen Trennung der Hydrolysate von Eiweißproben verschiedener Organe konnte gezeigt werden, daß die  $^{35}\text{S}$ -Aktivität von  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{35}\text{S}$ -Cystin herkommt. GAITONDE u. RICHTER (1956) sowie VLADIMIROV (1957) fanden, daß nach i. p. Injektion des markierten Methionins die  $^{35}\text{S}$ -Aktivität der Hirneiweiße zu 94% dem gebundenen  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{35}\text{S}$ -Cystin (etwa 2%) zuzuschreiben ist.

QUINCKES (1956) Versuche sprechen dafür, daß das i. v. gegebene  $^{35}\text{S}$ -Methionin sehr rasch mit dem übrigen freien Methionin des Organismus in Diffusionsgleichgewicht gerät. In einer anderen Arbeit berichteten GALLIAS, GYENGE u. MÉREI darüber, daß nach i. p. oder intraarterieller Verabreichung von Methionin das  $^{35}\text{S}$ -Diffusionsgleichgewicht zwischen Plasma und Gewebe ungefähr in 15 min hergestellt wird.

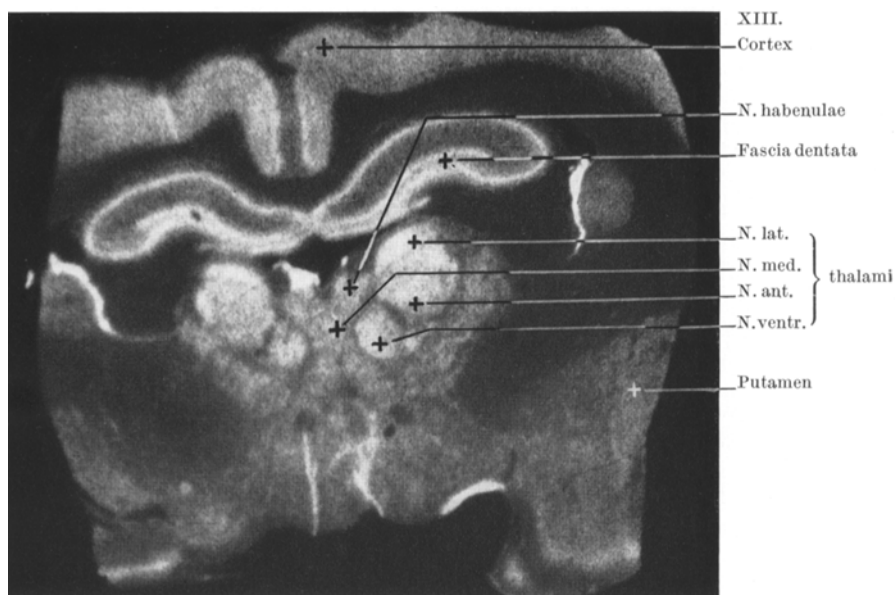


Abb. 1

Abb. 1—10

Bilder aus der autoradiographischen Schnittserie des Hirnstamms des Kaninchens. Die römischen Ziffern entsprechen der Bezifferung der Tafeln im Atlas des Kaninchengehirns von WINKLER u. POTTER

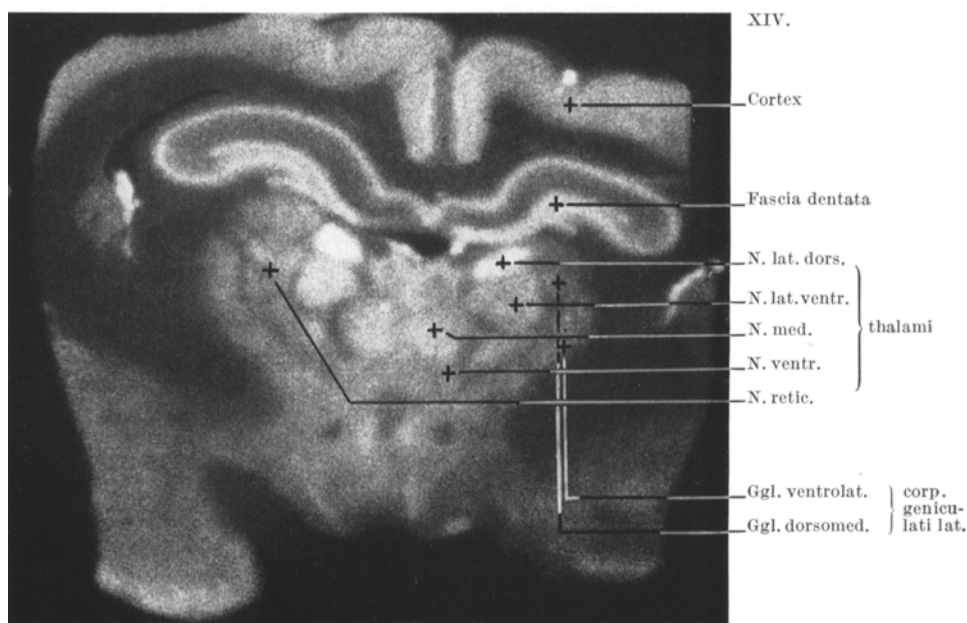


Abb. 2

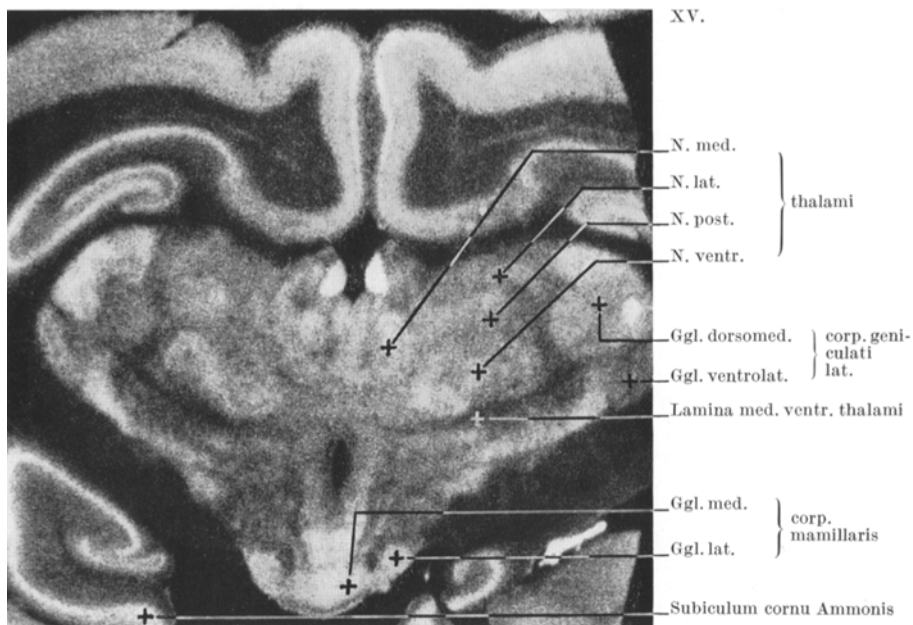


Abb. 3

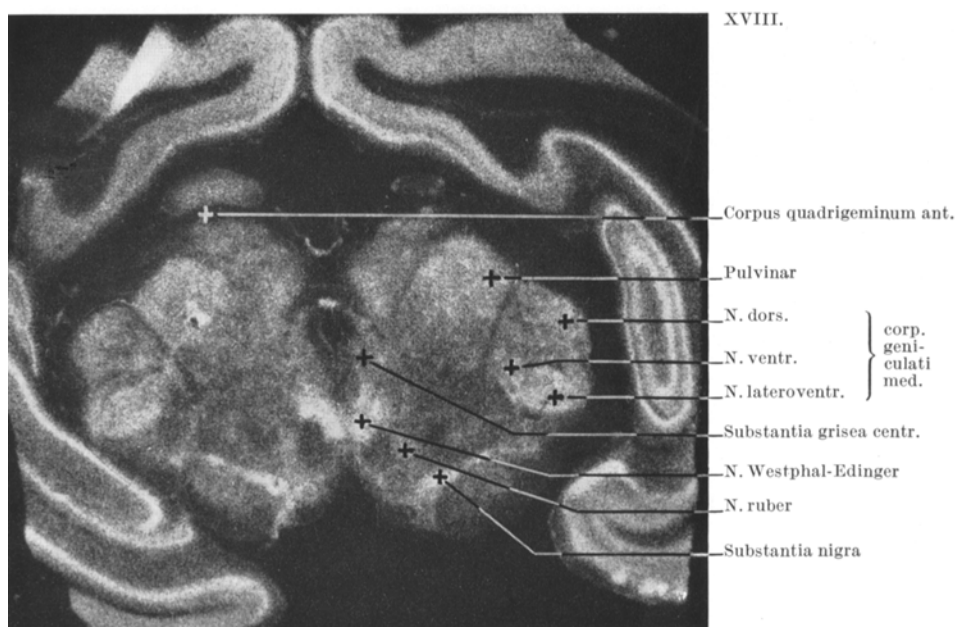


Abb. 4

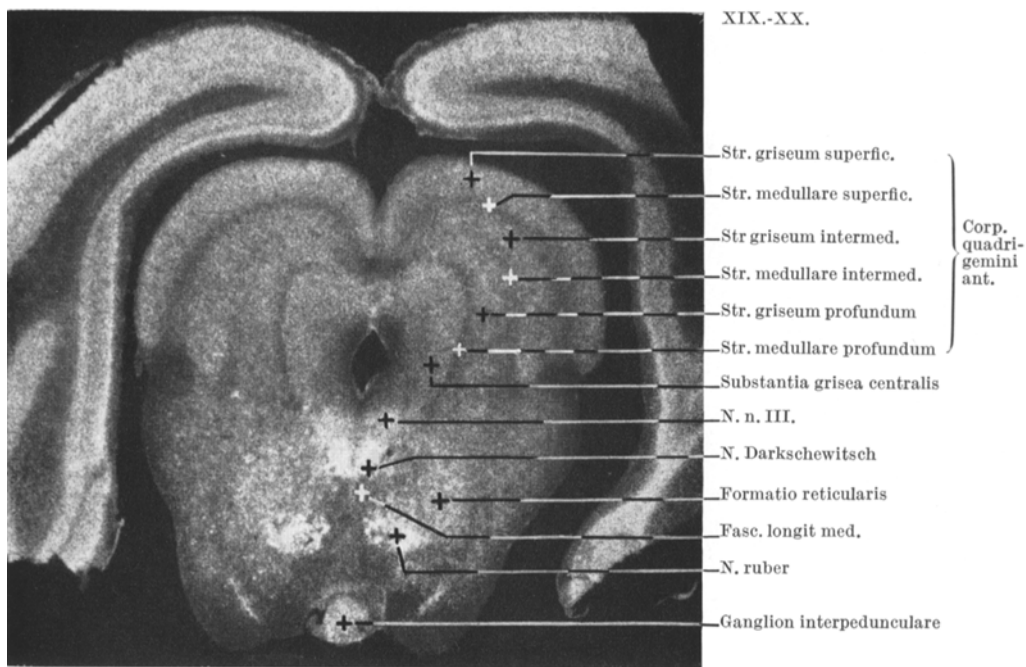


Abb. 5

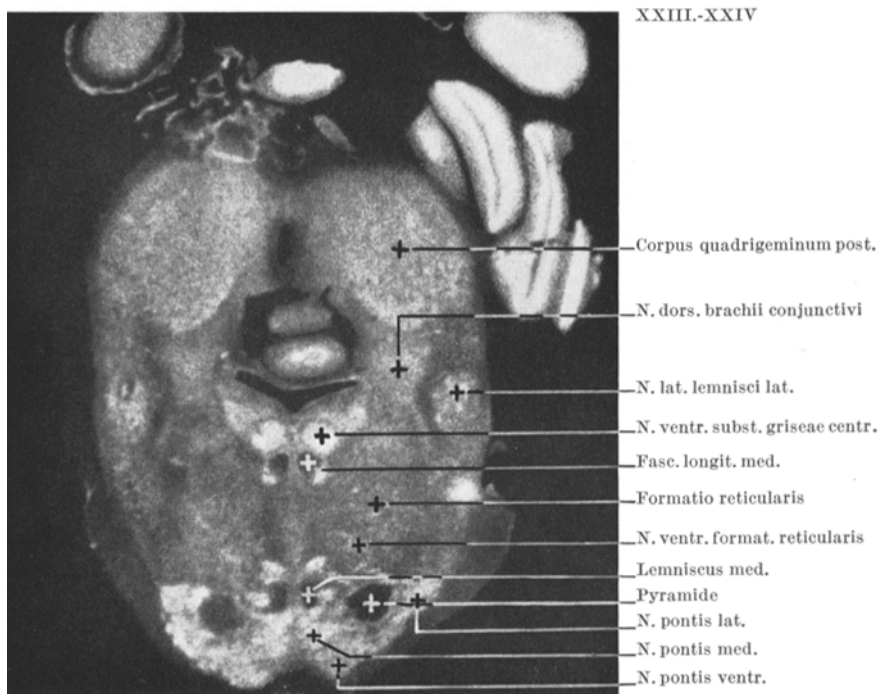


Abb. 6

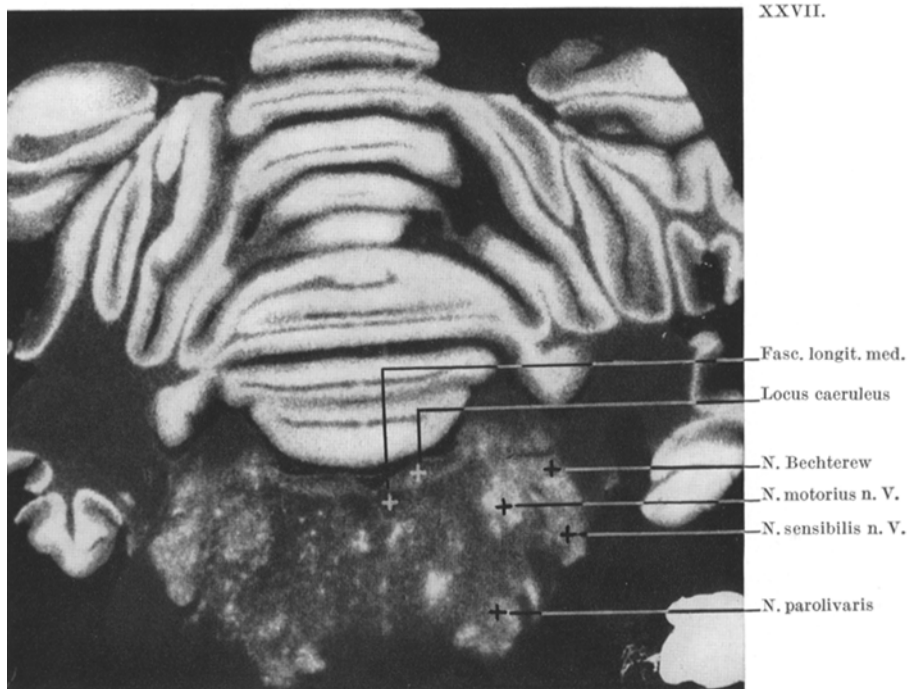


Abb. 7

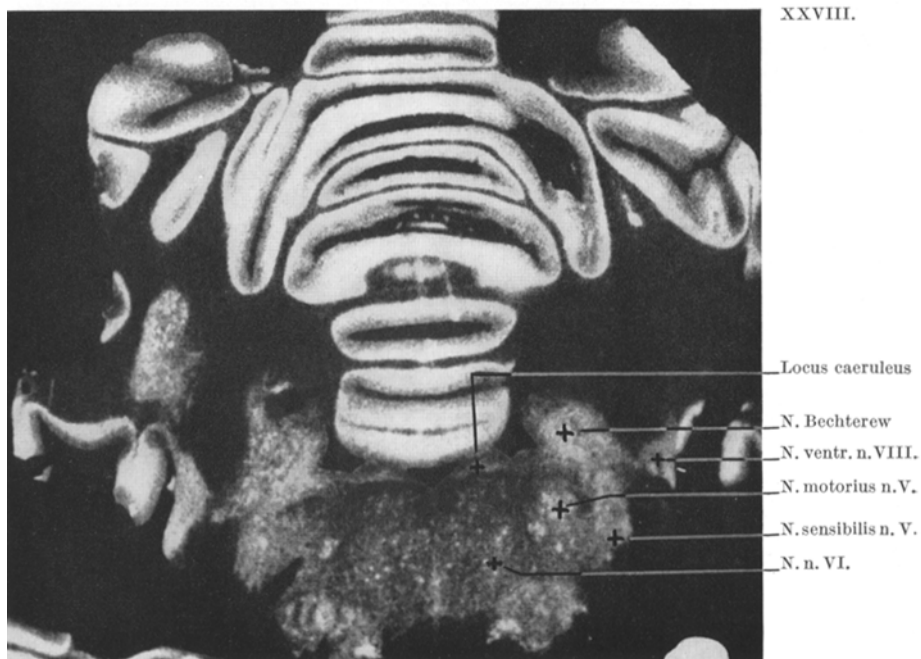


Abb. 8



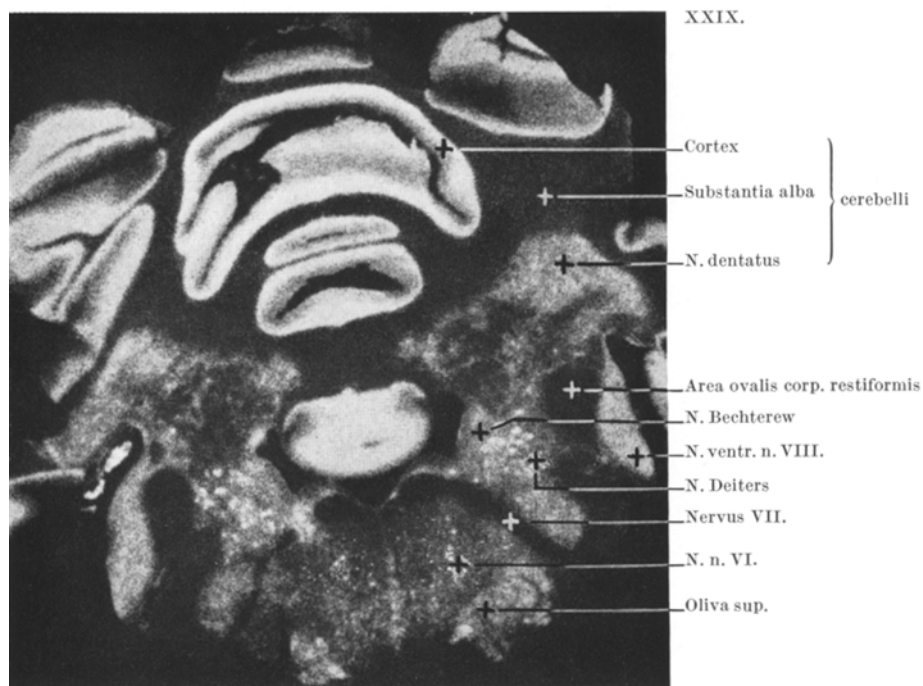


Abb. 9

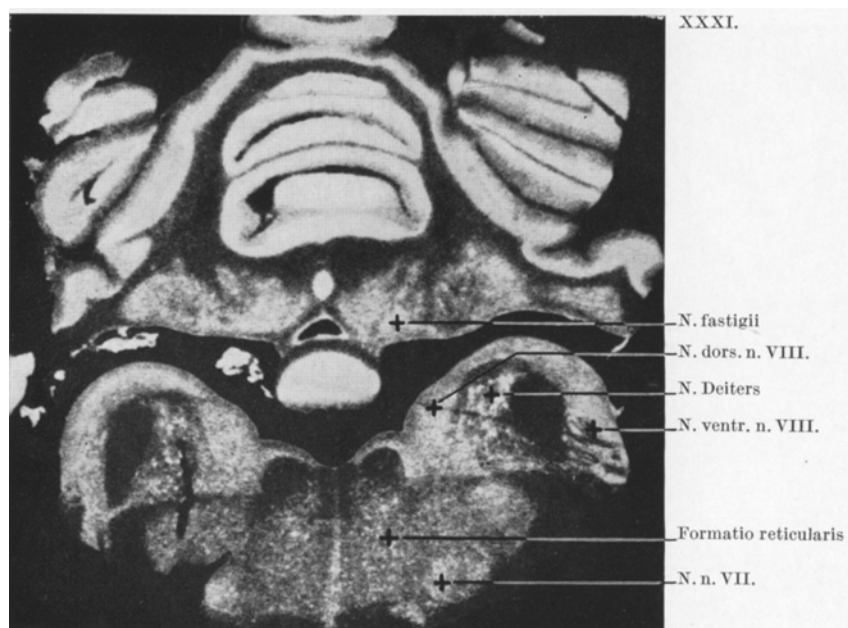


Abb. 10

Wie bereits erwähnt, haben OEHLERT, SCHULZE u. MAURER die verschiedenen Nervenzellen auf Grund des in autoradiographischen Untersuchungen festgestellten Einbaus von  $^{35}\text{S}$  in Gruppen eingeteilt.

Die erste Gruppe bilden in der Hauptsache jene Zellen, die zu den motorischen und neurosekretorischen Systemen gehören: die großen Pyramidenzellen der Rinde und des Ammonshorns, die Nn. supraopticus, paraventricularis, habenulae, Zellgruppen der lat. Thalamuskern, N. ruber, Nn. orig. n. III., n. IV., mot. n. V., VI., VII., XII., radialis mesenc. n. V., Locus caeruleus, Nn. ambiguus caudalis, alaris, Formatio reticularis, Nn. raphes magnus, N. cochlearis, Deiters, dentatus, die Purkinjeschen Zellen, die mot. Vorderhornzellen des Rückenmarkes, Adenohypophyse, Plexusepithelien.

In die zweite Gruppe gehören die Zellen, die einen vier- bis sechsmal kleineren Eiweißumsatz besitzen: die übrigen Zellen der Großhirnrinde, N. caudatus, Globus pallidus, Putamen, Nucl. amygdalae, Thalamuskern, Corpus geniculatum med. und lat., Substantia nigra, Nn. sens. n. V., tract. spin. trigemini, triangularis, Bechterew, emboliformis, globiformis, Zellen der Körnerschicht des Kleinhirns, Zellen der Hinterhörner des Rückenmarkes. Dies sind also hauptsächlich Zellen, die zu den sensorischen und extrapyramidalen Kernen gehören.

Eine dritte Gruppe wurde für die Gliazellen und die Marksubstanz aufgestellt.

Für die Nervenzellen fanden OEHLERT, SCHULTZE u. MAURER (1958) „eine bis zu 70 mal größere Umsatzrate als für Glia und Mark, und zwar bezogen auf gleiches Gewicht“. In unseren Untersuchungen wurden ihre Resultate auch bezüglich der Unterschiede zwischen den funktionell verwandten Arealen bestätigt. Es war eine Differenz auch zwischen den einzelnen Regionen innerhalb der einzelnen funktionell zusammenhängenden Gruppen zu finden, wie es aus der Tabelle zu ersehen ist. Mithin muß man annehmen, daß die relative Isotopenkonzentration eines Kernes entweder von der Zelldichte oder von den metabolischen Eigenschaften seiner Nervenzellen abhängt. In diesem Sinne läßt es sich werten, daß z. B. die neurosekretorischen Areale eine hohe Umsatzrate besitzen (MESS u. KOLOUŠEK, 1962).

### Zusammenfassung

Der Einbau von  $^{35}\text{S}$ -Methionin in verschiedene Kern-, bzw. Rindenareale des Kaninchengehirns nach intraperitonealer Gabe wurde untersucht.

Die relative Isotopenkonzentration lag in den motorischen Arealen im Durchschnitt höher als in den sensorischen. Es bestehen aber innerhalb der funktionell verwandten Gruppen verhältnismäßig große Differenzen zwischen den einzelnen individuellen Arealen.

Die aus den Schnittserien zusammengestellte Abbildungsfolge kann gleichsam als „autoradiographischer Atlas“ des Hirnstamms des Kaninchens dienen.

### Literatur

- CLOUET, D. H., and M. K. GAITONDE: The changes with age in the protein composition of the rat brain. *J. Neurochem.* **1**, 126 (1956).
- COHN, P., M. K. GAITONDE, and D. RICHTER: The localisation of protein formation in the rat brain. *J. Physiol. (Lond.)* **126**, 7 (1954).
- GAITONDE, M. K., and D. RICHTER: The metabolic activity of the proteins of the brain. *Proc. roy. Soc. B* **145**, 83 (1956).
- GALLYAS, F., E. GYENGE u. F. T. MÉREI: Die Einkörperung des  $^{35}\text{S}$ -Methionins in Proteine des Zentralnervensystems bei jungen und ausgewachsenen Ratten. *Acta biochim. et biophys. (Hung.)* (Im Druck.)
- MAURER, W., A. NIKLAS u. G. LEHNERT: Messung der Umsatzrate von Serum-eiweiß und Körpereweiß beim normalen Kaninchen mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin. *Biochem. Z.* **326**, 28 (1954).
- MESS, B., u. J. KOLOUŠEK: Kernvariationsstatistische und autoradiographische Untersuchungen über den Methionin-Umsatz des Hypothalamus mittels  $^{35}\text{S}$ -markierten Methionins. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **68**, 39 (1962).
- MÉREI, F. T., and F. GALLYAS: Quantitative determination of ( $^{35}\text{S}$ ) methionine incorporated into proteins of cell groups or nuclei of the CNS. *J. Neurochem.* **11**, 251 (1964).
- — Quantitative determination of the uptake of ( $^{35}\text{S}$ ) methionine in different regions of the normal rat brain. *J. Neurochem.* **11**, 257 (1964).
- OEHLERT, W., B. SCHULTZE u. W. MAURER: Autoradiographische Untersuchungen der Größe des Eiweißstoffwechsels der verschiedenen Zellen des Zentralnervensystems. *Beitr. path. Anat.* **119**, 343 (1958).
- — — Autoradiographische Untersuchung zur Frage der Eiweißsynthese innerhalb des Kerns und des Cytoplasmas der Zelle. *Beitr. path. Anat.* **122**, 289 (1960).
- QUINCKE, E.: Vergleichende Messung der Konzentrationen des freien Methionins in Serum und in der Leber von Kaninchen. *Biochem. Z.* **327**, 383 (1956).
- VLADIMIROV, G. E.: International Conference on Radioisotopes in Scientific Research, Paris 1957. Nr. 167 B.
- WINKLER, C., and A. POTTER: An anatomical guide to the experimental research on the rabbits brain. Amsterdam: W. Versluys 1913.

F. GALLYAS  
Neurologisch-Psychiatrische Universitäts-  
klinik Pécs  
Rét-u. 2 Pécs (Ungarn)