Autoradiographische Darstellung von Phospho-Proteinen in Gewebsschnitten mit Hilfe von Radiophosphor*

VON EBERHARD HARBERS und RUPERT BACKMANN

Aus dem Institut für medizinische Physik und Biophysik der Universität Göttingen
(Direktor Prof. Dr. E. Witte)

(Z. Naturforsch. 10 b, 385—388 [1955]; eingegangen am 11. Mai 1955)

Bei der autoradiographischen Lokalisation von Radiophosphor in Gewebsschnitten geht ein beträchtlicher Teil der in der Photoemulsion ausgelösten Schwärzung auf radioaktiv gewordene Phospho-Proteine zurück. Die Übertragung der Gewebefraktionierung nach Schneider auf histologische Schnitte macht es möglich, bei der Autoradiographie die Phospho-Proteine angenähert selektiv darzustellen. Es wurde der Anteil der Phospho-Proteine an der gesamten Radioaktivität des Gewebes nach der im einzelnen beschriebenen Vorbehandlung der Schnitte quantitativ bestimmt. Vergleichende Untersuchungen an fixierten Organen und am Gewebshomogenat ergaben, daß die Phospho-Proteine bei Fixierung in Carnoyscher Lösung durch die histologische Vorbehandlung keine Verluste erleiden.

Radioaktiver Phosphor, als anorganisches Phosphat verabfolgt, wird von tierischen Organen in beträchtlicher Menge in die sog. Phospho-Proteine eingebaut. Da sich diese aus Gewebsschnitten praktisch kaum extrahieren lassen¹, ist bei der autoradiographischen Untersuchung solcher Organe die in der Photoemulsion ausgelöste Schwärzung zum großen Teil auf radioaktiv gewordene Phospho-Proteine zurückzuführen. Der den Phospho-Proteinen zugehörige Anteil am Gesamtgehalt des Gewebes an Radiophosphor hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie Organart, Zeitspanne zwischen Verabfolgung des Isotops und Tötung der Versuchstiere, Vorbehandlung des Gewebes, und so weiter. Um eine bessere Bewertung der autoradiographischen Präparate entsprechend den Forderungen der Histochemie zu ermöglichen², ist es wünschenswert, die Phospho-Proteine möglichst selektiv darzustellen. Hierzu sind die Schnitte vor dem Zusammenbringen mit der Photoemulsion so zu behandeln, daß alle phosphorhaltigen Gewebsbestandteile bis auf die Phospho-Proteine extrahiert werden. Zu diesem Zweck wurde das Fraktionierungsverfahren von Schneider³, das bereits als histochemische Methode zur Extraktion der Nucleinsäuren aus Gewebsschnitten benutzt wird, angewandt.

* Die Untersuchungen wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

¹ E. Harbers u. K. Neumann, Z. Naturforsch. 9 b, 175 [1954].

² E. Harbers u. K. Neumann, Klin. Wschr. 32, 337 [1954].

³ W. C. Schneider, J. biol. Chemistry 161, 293 [1945].

In den meisten Organen ist die Menge der Phospho-Proteine recht klein. Ihre Bezeichnung gründet sich darauf, daß bei alkalischer Hydrolyse der nicht-säurelöslichen Phosphat-Fraktion aus Eiweiß-Stoffen anorganisches Phosphat freigesetzt wird. Über Art des Einbaues dieses Phosphats in die Proteine, ihre funktionelle Bedeutung usw. ist bisher noch wenig bekannt. Nach neueren Untersuchungen von Kennedy^{4,5} liegt das Phosphat in erster Linie als Phospho-Serin vor. Davidson⁶ machte darauf aufmerksam, daß die Phospho-Proteine ungewöhnlich viel Radiophosphor aufnehmen, also offenbar einen sehr intensiven Umsatz haben. Zunächst gehegte Zweifel, ob der hohe Gehalt an ³²P tatsächlich nur den Phospho-Proteinen zuzuschreiben sei und nicht von Verunreinigungen herrühre, wurden durch weitere Untersuchungen, insbesondere von Johnson und Albert⁷, beseitigt. Die Befunde der letztgenannten Autoren weisen zugleich auf die Bedeutung der Phospho-Proteine für den Zellstoffwechsel hin.

Methodik

Versuchstiere waren Wistar-Ratten und erbreine Mäuse der Stämme B1 und C3H. Untersucht wurde in erster Linie die Leber. Abgewogene Gewebsmengen wurden parallel einmal als Gewebshomogenat aufgearbeitet, zum anderen in Carnoyscher Lösung fixiert und eingebettet.

⁴ E. P. Kennedy, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 1, 29 [1953].

⁵ E. P. Kennedy u. S. W. Smith, J. biol. Chemistry 207, 153 [1954].

⁶ J. N. Davidson, S. C. Frazer u. W. C. Hutchinson, Biochem. J. 49, 311 [1951].

⁷ R. M. Johnson u. S. Albert, J. biol. Chemistry 200, 335 [1953].

Die Gewebsblöcke wurden mit dem Mikrotom völlig aufgeschnitten und die gesamten Schnitte gemeinsam den histochemischen Reaktionen ausgesetzt. Zur quantitativen analytischen Auswertung (Phosphatbestimmung und Zählrohrmessung) wurden die Schnitte entweder verascht oder noch weiter fraktioniert, wie nachstehend beschrieben. Die Injektion des Radiophosphor erfolgte intraperitoneal (als Na_2HPO_4); Dosis $2 \mu\text{C/g}$ Körpergewicht für die chemisch-analytischen, $10\text{--}20 \mu\text{C/g}$ für die autoradiographischen Untersuchungen.

a) **Untersuchungen am Gewebshomogenat:** Aus frisch abgewogenem Gewebe ($200\text{--}500 \text{ mg}$) wurden nach Homogenisieren zunächst mit eiskühler 10-proz. Trichloressigsäure die säurelösliche Phosphatfraktion, anschließend mit Alkohol und Alkohol-Äther die Phospholipide extrahiert. Diese Fraktionierung erfolgte mittels der Frittenmethode von Lavik⁸. Der Gewebsrückstand wurde nun zur Extraktion der Nucleinsäuren 15 min lang mit 5-proz. Trichloressigsäure bei 90°C im Wasserbad exponiert. Der dann noch im Gewebe verbliebene Phosphor soll den Phospho-Proteinen zuzuordnen sein. Vergleichende Untersuchungen verschiedener Autoren zeigten jedoch, daß die auf diese Weise ermittelten Analysewerte immer größer waren als die, welche sich bei Anwendung der Methode von Schmidt und Thannhauser⁹ ergaben. Johnson und Albert⁷ konnten nun zeigen, daß die Extraktion durch die 5-proz. Trichloressigsäure offenbar unvollständig ist. Wenn dieser jedoch eine alkalische Hydrolyse mit $n\text{-NaOH}$ (20 Stdn. bei 37°C) angeschlossen und das dabei freigesetzte anorganische Phosphat bestimmt wurde, entsprachen die Analysewerte denen der Schmidt-Thannhauser-Methode. Aus diesem Grunde wurde von uns ebenfalls im Anschluß an die Extraktion der Nucleinsäuren der Gewebsrückstand mit $n\text{-NaOH}$ 18 bis 20 Stdn. bei 37°C exponiert. Aus dem nach Neutralisieren und Füllen mit 5-proz. Trichloressigsäure nun gewonnenen Extrakt wurde das freie Orthophosphat entweder mit Magnesia-Mixtur gefällt oder zur Zählrohrmessung papierchromatographisch isoliert¹⁰. Die Phosphatbestimmung erfolgte kolorimetrisch nach den Angaben von Gomori¹¹. Es wurden jeweils wenigstens 3 Parallelanalysen durchgeführt. Der mittlere Fehler der Einzelwerte lag um $\pm 10\%$, stieg bei der nachstehend beschriebenen quantitativen Untersuchung der histochemischen Reaktionen mitunter bis auf 20 Prozent.

b) **Quantitative Untersuchung der histochemischen Reaktionen:** Die Fixierung des Gewebes erfolgte in Carnoyscher Lösung, da dabei schon eine weitgehende Extraktion der säurelöslichen Phosphate und der Phospholipide stattfindet. Nach völligem Aufschneiden der Gewebsblöcke wurden alle Schnitte gemeinsam mit Xylol entparaffiniert und in üblicher Weise die absteigende Alkoholreihe bis zum dest. Wasser durchgeführt. Zur gründlicheren Extraktion der Phospholipide wurden dabei die Schnitte entsprechend den Angaben von Brattgard und Hyden¹² nach dem 96-proz. Alko-

hol zunächst 2-mal mit Chloroform behandelt. Nach Extraktion der Nucleinsäuren mit 5-proz. Trichloressigsäure bei 90°C (15 min) und anschließendem mehrfachen Spülen mit 5-proz. Trichloressigsäure wurden die Gewebschnitte entweder verascht (zur Bestimmung des Gesamtphosphats und des Radiophosphors) oder weiterfraktioniert wie bei den Untersuchungen am Gewebshomogenat.

Die praktische Durchführung dieser Untersuchungen wurde wesentlich dadurch erleichtert, daß die Paraffinschnitte jeweils in eine ausreichend große Fritte gebracht wurden, deren Boden mit einer festen Schicht Filterhilfe („Celite“ der Johns-Manville Company, Ltd., U.S.A., oder Nr. 0114 von Schleicher & Schüll) bedeckt war. Durch vorsichtiges Absaugen des Xylols, Alkohols usw. konnten so die verschiedenen bei der histologischen Behandlung des Gewebes üblichen Schritte durchgeführt werden, ohne daß durch ständiges Überführen Verluste eintraten. Die Filterhilfe am Boden der Fritten darf hierbei zunächst nicht aufgeführt werden; vielmehr bildet sie eine Art Schlammfang und verhindert damit ein Verstopfen der Fritte. Im Anschluß an die histochemischen Reaktionen kann dann in der gleichen Fritte die weitere Fraktionierung vorgenommen werden.

c) **Autoradiographische Technik:** Die Behandlung der Schnitte erfolgte in der gleichen Weise, wie im vorigen Abschnitt beschrieben. Nach Extraktion der Nucleinsäuren wurden die Objektträger mit den Gewebschnitten noch je 3-mal in 5-proz. Trichloressigsäure (Zimmertemperatur) gebracht und nach 3-maligem Wässern (je 5 min) mit Hämalaun-Eosin schwach gefärbt. Durch die Trichloressigsäure-Extraktion verlor das Gewebe fast völlig seine Basophilie. Zur Autoradiographie wurde Stripping-Film (Kodak/England) nach der Methode von Pelc¹³ verwendet. Gemäß den Vorschriften von Kodak wurden die Objektträger vor der Benutzung mit verdünnter Chromschwefelsäure gereinigt, nach gründlichem Wässern kurz in eine 0,5-proz. Gelatinelösung getaucht und an der Luft getrocknet; auf diese Weise kam es zu einer zuverlässigen Bindung des anschließend in der Dunkelkammer aufgetragenen Films. Entwickelt wurde nach beendeter Exposition mit Kodak D-19b-Entwickler (4 bis 5 min), fixiert in 30-proz. Natriumthiosulfatlösung (30 min); anschließend wurden die Präparate gut gewässert und dann getrocknet.

Ergebnisse

Es wurde zunächst die Extraktion, wie sie Schneider³ ursprünglich beschrieb, parallel am Homogenat und an Carnoy-fixierten Geweben durchgeführt. Dabei ergab sich regelmäßig, daß die Menge des im Gewebe verbliebenen Gesamt-Phosphors unter dem Einfluß der histologischen Behandlung wesentlich kleiner wurde. Die spezifische Aktivität dieses Phosphats

¹⁰ R. Backmann u. E. Harbers, *Naturwissenschaften* **41**, 64 [1954].

¹¹ G. Gomori, *J. Lab. clin. Med.* **27**, 955 [1941].

¹² S. O. Brattgard u. H. Hyden, *Acta Radiologica* [Stockholm] Suppl. **94**, [1952].

¹³ S. R. Pelc, *Nature* [London] **160**, 749 [1947].

⁸ P. S. Lavik, H. Harrington u. G. W. Buckaloo, *Western Res. Univ., Atomic Energy Med. Res. Proj., Unclassified Docum.*, NYO-1625 [1951].

⁹ G. Schmidt u. S. J. Thannhauser, *J. biol. Chemistry* **161**, 83 [1945].

Gewebsart	Gewebshomogenat		Gewebsschnitte, fixiert	
	mg P/g Gewebe	spezif. Aktiv.	mg P/g Gewebe	spezif. Aktiv.
Mäuseleber	0,35	147 000	0,112	402 000
Rattenleber	0,39	83 000	0,149	135 000

Tab. 1. Vergleich der Analysewerte für Phospho-Proteine von Gewebshomogenat und fixiertem Gewebe bei Anwendung der Methode von Schneider³. Die Zahlen sind jeweils Mittelwerte von 3 Parallelanalysen. Die spezifische Aktivität ist angegeben in Zählrohrimpulsen/min/mg P.

	Aktivität/g Gewebe (Rattenleber)
Gewebshomogenat	14 200 $\pm$ 1380
Carnoy fixiert	15 200 $\pm$ 1710

Tab. 2. Vergleich der Aktivitäten des papierchromatographisch isolierten anorganischen Phosphats, das im Anschluß an die Fraktionierung nach Schneider durch alkalische Hydrolyse freigesetzt wurde. Die Aktivität ist angegeben in Zählrohrimpulsen/min.

war dagegen im fixierten Gewebe immer sehr viel größer als im Homogenat (Beispiel in Tab. 1).

Nun sind erfahrungsgemäß die Phospho-Proteine unter den gewählten Versuchsbedingungen (die Zeitspanne zwischen Verabfolgung des Radiophosphors und der Tötung der Versuchstiere betrug jeweils nur wenige Std.) stets die Phosphat-Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität. So war aus diesen Befunden zu schließen, daß durch die Fixierung des Gewebes kaum Phospho-Proteine extrahiert wurden, wohl aber ein Teil der Substanzen, welche bei der Schneider-Methode am Gewebshomogenat zu zu hohen Analysewerten führt⁷. Um die Richtigkeit dieser Überlegung zu prüfen, wurde nach Extraktion der Nucleinsäuren mit heißer 5-proz. Trichloressigsäure der Gewebsrückstand mit *n*-NaOH hydrolysiert, um den Phosphor der Phospho-Proteine als anorganisches Phosphat freizusetzen. Nach papierchromatographischer Isolierung dieses Phosphats ergaben Zählrohrmessungen, daß die Aktivität pro g Gewebe in Homogenat und fixiertem Gewebe praktisch gleich waren (Tab. 2). Damit wird die Deutung der zuerst geschilderten Befunde, daß durch Fixierung keine Phospho-Proteine verlorengehen, als richtig bestätigt. Die Isolierung des anorganischen Phosphats aus dem alkalischen Hydrolysat erlaubt jedoch zugleich, fest-

Gewebsart	Aktivität/g Gewebe		Anteil der Phospho-Proteine an der verbliebenen gesamten Radioaktivität des Gewebes [%]
	nach Vorbehandlung entspr. der Methode von Schneider	Phospho-Proteine (anorg. Phosphat nach alkal. Hydrolyse)	
Leber	19 900	15 250	77
Niere	17 900	15 100	84
Gehirn	860	600	70
Milz	36 800	23 900	65
Tumor (Mammacarcinom C ₃ H)	15 700	12 400	79

Tab. 3. Bestimmung des Anteils der Phospho-Proteine an der gesamten verbliebenen Radioaktivität von Gewebsschnitten, nachdem diese entsprechend der Methode von Schneider vorbehandelt waren. Zeitspanne zwischen Verabfolgung des Radiophosphors und der Tötung der Versuchstiere (C₃H-Mäuse) jeweils 3 Stunden. Die Aktivität ist angegeben in Zählrohrimpulsen/min.

zustellen, welchen Anteil die Phospho-Proteine an der gesamten Radioaktivität der Gewebsschnitte haben, wenn zuvor die einfache Fraktionierung nach Schneider durchgeführt wurde. Je größer dieser Anteil, um so mehr ist die Autoradiographie derartig vorbehandelter Schnitte als selektive der Phospho-Proteine anzusprechen. Tab. 3 gibt die Ergebnisse solcher Analysen von verschiedenen Geweben wieder und läßt erkennen, daß in der Tat der überwiegende Teil der Radioaktivität den Phospho-Proteinen zuzuordnen ist.

Bei erster Anwendung der geschilderten Methode zur Untersuchung verschiedener Organe der Maus ließen sich von Leber, Milz, Niere und einem Tumor (Mäusesarcom 180) positive Autoradiographien herstellen. Die Aktivität war dabei innerhalb der Gewebe offenbar recht gleichmäßig verteilt. Von den Phospho-Proteinen des Tumors wurde anscheinend in nekrotischen Gewebsbereichen wenig oder gar kein Radio-Phosphat mehr aufgenommen. Wenn andererseits das Gewebe nicht mit Trichloressigsäure extrahiert worden war, ließ sich auch in den Nekrosen Radiophosphor nachweisen.

Da uns leider nur eine recht unempfindliche Photoemulsion zur Verfügung stand, ließen sich von anderen Organen mit geringerem Umsatz der Phospho-Proteine (Gehirn, Lungen, Herz und Testes) nach der Trichloressigsäure-Extraktion keine brauchbaren autoradiographischen Präparate herstellen, es sei denn, die Dosis des verabfolgten ³²P wäre um ein Vielfaches

erhöht worden. Mit empfindlicheren Emulsionen dürfte jedoch die autoradiographische Darstellung der Phospho-Proteine in den meisten Organen keine prinzipiellen Schwierigkeiten bereiten.

Diskussion

Die geschilderten Untersuchungen haben gezeigt, daß eine angenähert selektive autoradiographische Darstellung der Phospho-Proteine in tierischen Geweben mit einfachen Mitteln möglich ist; die übrigen Phosphat-Fractionen nehmen alle relativ wenig ^{32}P auf und lassen sich außerdem verhältnismäßig gut aus den Gewebsschnitten extrahieren. Die Situation ist damit gerade umgekehrt wie bei der autoradiographischen Darstellung der Nucleinsäuren, die ohne Überlagerung durch die Radioaktivität der Phospho-Proteine nicht möglich ist¹. Bei Fixierung des Gewebes in Carnoyscher Lösung kommt es zu keinen Verlusten der Phospho-Proteine; dagegen wird durch diese Gewebsbehandlung ein Teil derjenigen Phosphor-Verbindungen mit extrahiert, welche bei Anwendung der Methode von Schneider³ am Gewebshomogenat zu hohe Analysewerte bewirken⁷. Die günstigen Verhältnisse, wie sie die Werte der Tab. 3 wiedergeben, bestehen jedoch nur für eine begrenzte Zeitspanne nach der Injektion des Radiophosphors, während der es — entsprechend dem hohen Umsatz der Phospho-Proteine — zu einem steilen Anstieg der spezifischen Aktivität kommt¹⁴. Die Zeit zwischen der Verabfolgung des radioaktiven Phosphats und der Tötung der Versuchstiere sollte mindestens 1 Stde. betragen, da sonst das anorganische Phosphat mit seinem anfangs sehr hohen Gehalt an ^{32}P nicht ausreichend aus den Gewebsschnitten extrahiert werden kann. Wenn andererseits mehr als 5 bis

6 Stdn. zwischen Injektion und Tötung verstreichen, besteht die Gefahr, daß die Phospho-Proteine bereits das Maximum ihrer ^{32}P -Aufnahme überschritten haben und sich nun die unvollständige Extraktion der Nucleinsäuren, die derweil auch beträchtlich radioaktiv geworden sind, ungünstig auswirkt.

Nach Abschluß unserer Versuche wurde uns eine Arbeit von Taylor¹⁵ bekannt, in der u. a. über die autoradiographische Darstellung der Phospho-Proteine an pflanzlichen Objekten berichtet wird. Die Extraktion der Nucleinsäuren erfolgte dabei ebenfalls mit heißer Trichloressigsäure oder durch enzymatische Hydrolyse. Eine quantitative Bestimmung des Anteils der Phospho-Proteine an der nach dieser Vorbehandlung im Gewebe verbliebenen Radioaktivität wurde jedoch nicht vorgenommen.

Da die Phospho-Proteine allen Versuchen, sie aus Gewebsschnitten unter Erhaltung der Struktur zu extrahieren, widerstehen, hat zwangsläufig der von ihnen aufgenommene Radiophosphor einen mehr oder weniger großen Anteil an der gesamten Radioaktivität des Gewebes. Das Ausmaß dieses Anteiles wird leicht unterschätzt, und so werden daher häufig die Phospho-Proteine — zwar nicht selektiv — autoradiographisch dargestellt, wenn durch gebräuchliche histologische Vorbehandlung zuvor die übrigen Phosphat-Fractionen weitgehend extrahiert wurden. Solche Präparate werden dann oft zu Unrecht als Nucleinsäure-Autoradiographien gedeutet.

Über die funktionelle Bedeutung der Phospho-Proteine ist bisher fast nichts bekannt. Das geschilderte Untersuchungsverfahren mag ein Ansatzpunkt sein, mit histochemischer Methodik das Wissen darüber zu erweitern.

¹⁴ E. Harbers, *Klin. Wschr.* **32**, 392 [1954].

¹⁵ J. H. Taylor u. S. H. Taylor, *J. Heredity* **44**, 129 [1953].