

Antagonismus von Glucagon und Insulin dabei eine Rolle spielt, wird das Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Research Corporation, New York, durchgeführt.

W. RUNGE und H. HEINRICH

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Hamburg¹ und der Universitäts-Frauenklinik Hamburg-Eppendorf, den 3. Oktober 1955.

Summary

A single subcutaneous injection of synthalrin-A does not affect the cytoplasma of A-cells in pancreatic islets of the rat during the 1st–5th day of life, in contrast to adult animals. Selective action was found on mitotic A-cells: reduction of mitotic frequency to 25% of the normal rate, and pathological mitoses in the sense of the so-called primary effect. The mitoses of B-cells, exocrine pancreatic cells and intestinal epithelia seemed to be unchanged, although the mitotic rate was higher than in A-cells.

¹ Die Arbeit stand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. FERNER.

Purin- und Pyrimidinbasen der Desoxyribonukleinsäure des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Karzinoms¹

Die Nukleinsäuren (NS) gehören zu den wichtigsten Bausteinen sowohl des genetischen wie des funktionellen Apparates der Zelle und spielen zweifellos auch eine erhebliche Rolle in den verschiedenen Stadien des Karzinomwachstums. Es wurden daher zahlreiche Untersuchungen über die Konzentration und Verteilung der NS in den malignen Tumoren durchgeführt. Die Unterschiede, die dabei im Vergleich zu normalen Geweben gefunden wurden, können jedoch nicht als charakteristisch für das maligne Wachstum angesehen werden, da eine Erhöhung des NS-Gehaltes ein allgemeines Kennzeichen aller schnellwachsenden Gewebe ist. GREENSTEIN² weist daher bei der zusammenfassenden Begründung derartiger Untersuchungen darauf hin, dass quantitative Abweichungen im NS-Gehalt ziemlich unwichtig sind gegenüber möglichen qualitativen Unterschieden im Aufbau und der Zusammensetzung der NS von normalen und von Tumorgeweben.

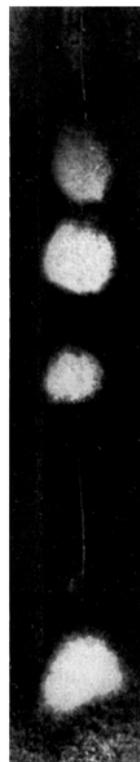
Mit Hilfe der Papierchromatographie konnte gezeigt werden, dass der Anteil an Purin- und Pyrimidinbasen sowohl bei der Desoxyribonukleinsäure (DNS) als auch bei der Ribonukleinsäure (RNS) Unterschiede aufweist, die auf eine Art- bzw. Organspezifität hinweisen. Die daraufhin an Tumoren durchgeführten Untersuchungen haben die Frage nach qualitativen Abweichungen der Tumor-DNS bisher noch nicht eindeutig beantwortet³.

¹ Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

² J. P. GREENSTEIN, *Biochemistry of Cancer* (Academic Press Inc., New York 1954).

³ E. CHARGAFF, Exper. 6, 201 (1950). — E. CHARGAFF und R. LIPSHITZ, J. Amer. chem. Soc. 75, 3658 (1953). — A. C. GRIFFIN und A. RHEIN, Acta Unio intern. contra Cancrum 7, 363 (1951). — Y. KHOUVINE und J. GRÉGOIRE, Bull. Soc. Chim. biol. 35, 603 (1953). — S. G. LALAND, W. G. OVEREND und M. WEBB, J. chem. Soc. (London) 1952, 3224. — E. E. POLLINI: in: PIRWITZ, *Grundlagen und Praxis chemischer Tumorbehandlung* (Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954), S. 98. — L. L. UZMAN und C. DESOER, Arch. Biochem. 48, 63 (1954). — D. L. WOODHOUSE, Acta Unio intern. contra Cancrum 7, 394 (1951); Biochem. J. 58, 349 (1954).

Die vorliegende Arbeit ist als vorläufige Mitteilung unserer Untersuchungsergebnisse am Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Karzinom gedacht, wobei der Purin- und Pyrimidin gehalt der aus den Karzinomzellen isolierten DNS bei verschiedenem Tumoralter quantitativ bestimmt und mit den Werten der DNS aus Leber und Niere normaler Mäuse verglichen wird.



Papierchromatogramm der DNS aus den Zellen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Karzinoms.

Material und Methoden. Wir verwendeten ein Ehrlichsches Mäuse-Ascites-Karzinom, dessen Chromosomensatz hyperdiploid ist¹. Das in üblicher Weise gezüchtete Ascites-Karzinom wurde a) nach 6–8 Tagen, b) nach 9–10 Tagen und c) nach 13–15 Tagen entnommen und die Zellen abzentrifugiert. Aus ihnen wurde die DNS nach SCHMIDT und THANNHAUSER² isoliert und von der RNS getrennt. Bei Prüfung der Trennung ergab sich aus dem vorhandenen Uracil, dass die derart isolierte DNS, wie auch von anderer Seite mitgeteilt wird, etwa 4–5% RNS enthält (Abb.). Nach Überchloräsurehydrolyse³ wurden die Basen in einer Isopropanol-Wasser-Salzsäure-Lösung papierchromatographisch getrennt und ihr Standort am Chromatogramm durch Ultraviolettkontaktphotographie⁴ bestimmt. Nach Eluierung der Basen in 4 ml 0,1 n HCl wurden die Absorptionswerte im Zeiss'schen Spektral-Photometer M 4 Q zwischen 220 und 310 m μ gemessen und daraus die Menge der einzelnen Substanzen nach VISCHER und CHARGAFF⁵ berechnet. Die Absorptionskurven zeigten

¹ K. BAYREUTHER, Z. Naturforsch. 7b, 554 (1952).

² G. SCHMIDT und S. J. THANNHAUSER, J. biol. Chem. 161, 83 (1945).

³ A. MARSHAK und H. J. VOGEL, J. biol. Chem. 189, 597 (1951).

⁴ G. R. WYATT, Biochem. J. 48, 584 (1951).

⁵ R. MARKHAM und J. D. SMITH, Biochem. J. 45, 294 (1949).

⁶ E. VISCHER und E. CHARGAFF, J. biol. Chem. 176, 703 (1948).

Molares Verhältnis der Purine und Pyrimidine in der DNS (in %)

	Anzahl der Tiere	Guanin	Adenin	Cytosin	Thymin
Leber (Normaltier)	2	17,5 ± 0,2	26,5 ± 1,0	22,6 ± 2,3	33,4 ± 2,3
Leber (Normaltier)	2	16,7 ± 1,0	26,5 ± 0,8	24,3 ± 0,7	32,5 ± 0,8
Leber (Normaltier)	3	16,5 ± 1,3	27,4 ± 0,6	21,8 ± 0,5	34,3 ± 2,4
Niere (Normaltier)	3	17,0 ± 0,8	27,6 ± 0,6	20,8 ± 1,4	34,6 ± 0,9
Niere (Normaltier)	4	16,6 ± 1,7	27,4 ± 2,5	21,7 ± 0,8	34,3 ± 0,7
Durchschnittswert		16,9 ± 1,2	27,0 ± 1,1	22,3 ± 2,0	33,8 ± 1,5
Ascites-Karzinom 6 Tage.	2	21,0 ± 1,3	27,5 ± 1,8	21,7 ± 2,8	29,9 ± 2,0
Ascites-Karzinom 7 Tage.	3	20,3 ± 2,3	28,3 ± 1,5	20,9 ± 0,6	30,5 ± 2,6
Ascites-Karzinom 8 Tage.	2	19,8 ± 0,2	25,9 ± 0,4	20,2 ± 0,6	34,1 ± 1,1
Ascites-Karzinom 9 Tage.	2	20,5 ± 1,2	27,4 ± 1,7	19,6 ± 1,2	32,5 ± 1,4
Ascites-Karzinom 10 Tage.	2	19,6 ± 0,6	27,4 ± 0,4	21,3 ± 0,8	31,7 ± 1,2
Ascites-Karzinom 13 Tage.	2	18,9 ± 0,6	26,5 ± 0,9	21,2 ± 0,4	33,4 ± 1,0
Ascites-Karzinom 15 Tage.	2	20,8 ± 1,5	27,8 ± 0,7	20,5 ± 0,8	30,9 ± 0,7
Durchschnittswert		20,1 ± 1,5	27,5 ± 1,4	20,5 ± 1,8	31,9 ± 2,6

Jeder Wert ist das Mittel aus durchschnittlich 3 Bestimmungen von einer DNS-Isolierung. Die Standardabweichung wird nach

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$$

berechnet, wobei d die Abweichung vom Mittelwert und n die Anzahl der Bestimmungen ist.

eine gute Übereinstimmung mit den Kurven von HOTCHKISS¹ und mit solchen, die wir aus Testsubstanzen erhielten.

Ergebnisse. Das Ergebnis unserer Untersuchung ist in der obigen Tabelle zusammengefasst.

Die Tabelle zeigt, dass sowohl die DNS aus Leber und Niere normaler Mäuse als auch die aus den Zellen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Karzinoms dem «AT-Typ» nach CHARGAFF² angehört. Darüber hinaus ist einmal das Basenverhältnis der DNS aus Leber und Niere der Normaltiere sehr ähnlich; die geringen Unterschiede liegen innerhalb der Standardabweichung. Auch in den Zellen des Ascites-Karzinoms ist der Aufbau der DNS trotz des verschiedenen Wachstumsalters des Materials fast gleich. Eine Ausnahmestellung nimmt die DNS aus 13 Tage altem Ascites ein, die sich von den anderen Analysen etwas unterscheidet, ohne dass wir jedoch daraus Schlüsse auf Veränderungen im Verlauf der Tumor-Entwicklung ziehen möchten. Hierzu bedarf es einiger größeren Untersuchungsmaterials.

Der Vergleich der Durchschnittswerte zeigt, dass die DNS des Ehrlichschen Ascites-Karzinoms mehr Guanin und weniger Cytosin und Thymin enthält als die DNS aus den Organen der normalen Maus. Bestimmt man zur Prüfung der Signifikanz dieser Unterschiede die Zufalls wahrscheinlichkeit P^3 , so erhält man für Guanin: $P < 0,001$, Cytosin: $P < 0,05$ und Thymin: $P < 0,05$. Das bedeutet, dass beim Guanin dieser Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten statistisch sehr signifikant ist, während er beim Cytosin und Thymin nicht als einwandfrei gesichert betrachtet werden kann.

Diskussion. Die von uns ermittelten Werte für das Basenverhältnis zeigen für die DNS aus Leber und Niere normaler Tiere eine weitgehende Übereinstimmung. Dieser Befund entspricht der von CHARGAFF⁴ postulierten und in anderen Untersuchungen bestätigten Kon-

stanz des Purin- und Pyrimidinanteils der DNS in den verschiedenen Organen der gleichen Spezies. Unsere Untersuchungen zeigen, dass die DNS des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Karzinoms von dieser Regel abweicht, obwohl sich dieser Tumor von einem spontanen Mamakarzinom der Maus ableitet, also der gleichen Art entstammt, und auf Mäusen weitergezüchtet wurde.

Vergleichende Untersuchungen über die Basenzusammensetzung der DNS normaler und maligne entarteter Gewebe sind bisher nur vereinzelt durchgeführt worden. Obwohl die Ergebnisse nicht einheitlich sind, existieren einige interessante Parallelen zu unseren eigenen Beobachtungen. WOODHOUSE¹ und LALAND, OVEREND und WEBB² untersuchten die DNS einiger Mäusetumoren. Hier ergibt sich, dass das Basenverhältnis der DNS aus dem transplantablen Brust-Adenokarzinom von WOODHOUSE mit dem von der DNS des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Karzinoms gut übereinstimmt. In einer früheren Arbeit findet WOODHOUSE³ in der DNS eines Rattensarkoms einen höheren Wert für das Verhältnis Guanin:Thymin als in normaler Rattenleber und in der Leber sarkomtragender Ratten. GRIFFIN und RHEIN⁴ stellten fest, dass sich während der experimentellen Karzinogenese mit 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzol der Guaninanteil in der DNS erheblich vermehrt. Von anderen Autoren wurden Guaninverminderung⁵, Thyminvermehrung⁶ und Adeninverminderung⁷ mitgeteilt. Dem stehen Beobachtungen gegenüber⁸, die,

¹ D. L. WOODHOUSE, Biochem. J. 56, 349 (1954).

² S. G. LALAND, W. G. OVEREND und M. WEBB, J. chem. Soc. (London) 1952, 8224.

³ D. L. WOODHOUSE, Acta Unio intern. contra Cancrum 7, 394 (1951).

⁴ A. C. GRIFFIN und A. RHEIN, Acta Unio intern. contra Cancrum 7, 363 (1951).

⁵ D. L. WOODHOUSE, Biochem. J. 56, 349 (1954).

⁶ Y. KHOUVINE und J. GRÉGOIRE, Bull. Soc. Chim. biol. 35, 603 (1953). — D. L. WOODHOUSE, Biochem. J. 56, 349 (1954).

⁷ Y. KHOUVINE und J. GRÉGOIRE, Bull. Soc. Chim. biol. 35, 603 (1953).

⁸ E. E. POLLINI in: PIRWITZ, Grundlagen und Praxis chemischer Tumornebenhandlung (Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954), S. 98. — L. L. UZMAN und C. DESOER, Arch. Biochem. 48, 63 (1954).

¹ R. D. HOTCHKISS, J. biol. Chem. 175, 315 (1948).

² E. CHARGAFF, Exper. 6, 201 (1950).

³ H. BORNSCHEIN in: ANTOINE, Klinische Fortschritte Gynäkologie (Wien und Innsbruck 1954), S. 1.

⁴ E. CHARGAFF, Exper. 6, 201 (1950).

wie vor allem auch diejenigen von CHARGAFF¹, keine Veränderungen im Basenverhältnis der Tumor-DNS zeigten, bzw. zu keinen eindeutigen Ergebnissen gelangten.

Die beobachteten Veränderungen wurden gelegentlich mit der erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorzellen in Zusammenhang gebracht. Ob eine erhöhte mitotische Aktivität aber wirklich das Basenverhältnis der DNS beeinflusst, ist bis jetzt noch nicht geklärt². Die beim Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Karzinom gefundene Veränderung seiner Wachstumsplatz³ drückt sich offenbar, soweit sich das bei dem relativ geringen Umfang des bisher untersuchten Materials sagen lässt, nicht durch eine veränderte Basenzusammensetzung der DNS aus.

Eine interessante Parallele zu den von uns beobachteten Abweichungen im Aufbau der Karzinomzellen gegenüber normalen Körperzellen ergibt sich morphologisch beim Vergleich der chromosomalen Zusammensetzung dieser beiden Zellarten. Nach den Untersuchungen von BAYREUTHER⁴ zeigen die Chromosomen der Zellkerne des Ascites-Karzinoms gegenüber denen der normalen Körperzellen charakteristische Veränderungen. Ob diese mit einer Veränderung im chemischen Aufbau der DNS einhergehen, lässt sich heute noch nicht entscheiden. Die Parallelität beider Befunde eröffnet jedenfalls eine Reihe von Aspekten sowohl für die Biochemie der Nukleinsäuren wie auch für die Krebsforschung, die noch einer weiteren Untersuchung bedürfen.

W. SCHNEIDER und H. EBNER

Universitäts-Frauenklinik Heidelberg, den 17. September 1955.

Summary

The proportion of purines and pyrimidines in the DNA of the Ehrlich mouse ascites carcinoma is examined and compared with the base proportion of the DNA from liver and kidney of the normal mouse. The following findings were obtained: The DNA of the ascites tumor contains more guanine and less cytosine and thymine than the DNA of the normal mouse. For guanine this difference is statistically significant. The changed base compound is discussed with regard to the changed growing rate in tumors and the altered chromosome structure in the Ehrlich ascites carcinoma.

¹ E. CHARGAFF, Exper. 6, 201 (1950). — E. CHARGAFF und R. LIPSHITZ, J. Amer. chem. Soc. 75, 3658 (1953).

² R. ABRAMS, Phosphorus Metabolism 2, 335 (1952), zitiert nach K. K. REDDI, Biochim. biophys. Acta 15, 585 (1954). — N. I. GOLD und S. H. STURGIS, J. biol. Chem. 196, 143 (1952); 206, 51 (1954). — K. K. REDDI, Biochim. biophys. Acta 15, 585 (1954). — D. V. N. REDDY, M. E. LOMBARDO und L. R. CERECEDO, J. biol. Chem. 198, 267 (1952).

³ G. KLEIN und L. Révész, J. nat. Canc. Inst. 14, 229 (1953). — E. F. HUTH, Z. Krebsforsch. 59, 230 (1953).

⁴ K. BAYREUTHER, Z. Naturforsch. 7b, 554 (1952).

follicles¹, and that the phase of hair regeneration profoundly affects skin responses to carcinogens².

It is also now generally accepted that carcinogenesis may be accelerated or increased by the application of carcinogens to healed wounds, or by wounding areas previously treated with carcinogens³; that carcinomas regularly develop at the edges of scars in some types of wounds⁴ or within scar epithelium of other types of wounds⁵, and that damage to the dermis, in some unaccountable way, plays an important rôle in the pathogenesis of skin carcinomas⁶.

We have repeatedly demonstrated the invariable occurrence, during wound healing, of invasions of regenerating epithelium into sub-epithelial new connective tissues. Depending on the type of wound and treatment, such epithelial invasions of the dermis may either (a) be eliminated through epithelial pearl-formation and subsequent foreign-body reaction and fibrosis, or (b) form new hair follicles and sebaceous glands⁷. At the time of our first communication, this finding was not in conformity with generally accepted views summarized by WOLBACH who stated: "In the mouse, new follicles do not form from the epidermis, under any circumstances, after the original post-natal formation has been completed." Considerable substantiation for our views, however, has recently been provided by BREEDIS⁸ who clearly demonstrated that neo-genesis of hairs and sebaceous glands can occur in scar epithelium.

In a large series of mice, under various experimental conditions, we found that painting the skin repeatedly with methylcholanthrene leads to almost total elimination of hair follicles and to damage of the important connective tissue of the stratum papillaris and surrounding the hair follicles. This trauma to the skin is followed by epithelial hyperplasia and by invasions of the dermis by epithelium with the consequent formation of pseudo-rete-pegs, similar to those seen during wound healing. In mice, these invading epithelial processes may be induced to form new hair follicles and sebaceous glands with repilation, if the underlying connective tissue can respond by the neo-genesis of hair papillae. If the dermis is grossly altered by previous insults, or, as commonly occurs, by the formation of cysts and micro-ulcers, then hair formation ceases. The epithelial spurs invading the dermis, in the course of normal healing, may then fail to form new hairs, but instead become hyperplastic, cystic and papillomatous or develop directly into subcutaneous carcinomata, depending on local and systemic conditions.

¹ N. C. FOOT, Amer. J. Path. 23, 1 (1947); Ann. N. Y. Acad. Sci. 53, 749 (1951). — W. F. LEVER, Arch. Derm. Syph. 57, 679, 709 (1948). — F. B. MALLORY, *Principles of Pathologic Histology* (W. B. Saunders, Philadelphia 1914), p. 371. — S. B. WOLBACH, Ann. N. Y. Acad. Sci. 53, 517 (1951).

² E. ANDREASEN, Acta path. microbiol. scand. 32, 157 (1953). — E. ANDREASEN und J. ENGELBRETH-HOLM, Acta path. microbiol. scand. 32, 165 (1953). — H. B. CHASE und W. MONTAGNA, Proc. Soc. exper. Biol. 76, 35 (1951). — A. LACASSAGNE und R. LATARJET, Cancer Res. 6, 183 (1946). — S. B. WOLBACH, Ann. N. Y. Acad. Sci. 53, 517 (1951).

³ A. LACASSAGNE und R. LATARJET, Cancer Res. 6, 183 (1946). — F. LINELL, Acta path. microbiol. scand. [suppl.] 71, 1 (1947). — R. W. PICCAGLI et al., J. invest. Derm. 22, 317 (1954).

⁴ A. LACASSAGNE und R. LATARJET, Cancer Res. 6, 183 (1946).

⁵ J. MARCHANT und J. W. ORR, Brit. J. Cancer 7, 329 (1953).

⁶ T. GILLMAN et al., Brit. J. plast. Surg. 6, 153 (1953); (1955), in press; Brit. J. Surg. (1955), in press; Brit. J. Cancer, 9, 272, (1955). — J. MARCHANT und J. W. ORR, Brit. J. Cancer 7, 329 (1953). — J. W. ORR, J. Path. Bact. 49, 159 (1939).

⁷ T. GILLMAN et al., Brit. J. plast. Surg. 6, 153 (1953); (1955), in press; Brit. J. Surg. (1955), in press; Brit. J. Cancer, 9, 272 (1955).

⁸ C. BREEDIS, Cancer Res. 14, 575 (1954).

Implications of Epidermal-Dermal Relations Following Injury for Understanding Association of Carcinogenesis with Hair Regeneration or Scars

It is widely maintained that in man and in animals skin carcinomas invariably develop in relation to hair