

*Graphische Auswertung der Versuchsdaten.* Es hat sich gezeigt, dass es vorteilhaft ist, anstelle der Logarithmen der Durchschnitte der Stichproben die Durchschnitte der Logarithmen der Einzelwerte aufzutragen, da diese *logarithmischen Durchschnitte* die Gerade besser bestimmen.

Wählen wir für den Stichprobenumfang  $N_i$  und die Stichprobenanzahl  $M$  je die Zahl 4, so gelten folgende Beziehungen:

$$\bar{y}_i = \frac{\log w_{i1} + \log w_{i2} + \log w_{i3} + \log w_{i4}}{4} = \frac{\frac{y_{i1} + y_{i2}}{2} + \frac{y_{i3} + y_{i4}}{2}}{2}$$

und

$$\bar{y} = \frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_2 + \bar{y}_3 + \bar{y}_4}{4} = \frac{\frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_2}{2} + \frac{\bar{y}_3 + \bar{y}_4}{2}}{2}$$

Dabei bedeuten:  $w_{ij}$  die Trockengewichte der Mycelien in mg,  $y_{ij}$  die Logarithmen der Trockengewichte,  $\bar{y}_i$  den logarithmischen Durchschnitt einer Stichprobe,  $\bar{y}$  den logarithmischen Gesamtdurchschnitt der vier Stichproben einer Regression.

Mit Hilfe eines Nomogrammes lassen sich diese gesuchten Mittelwerte leicht aus den Versuchsdaten bestimmen. Das Nomogramm besteht aus fünf parallelen, in gleichen Abständen angeordneten Skalenträgern a, b, c d, und e. b und d sind Hilfsskalen ohne Einteilung; a, c und e tragen die Funktion  $y = \log w$ . Links vom Skalenträger sind die Werte für  $y$ , rechts davon diejenigen für  $w$  eingezeichnet<sup>3</sup>. Wie aus geometrischen Gründen leicht einzusehen ist, liefern die Hilfsskalen b bzw. d den Durchschnitt der Funktionswerte auf a und c bzw. e und c, und auf der Skala c kann der Durchschnitt der Funktionswerte auf b und d abgelesen werden.

Um den logarithmischen Durchschnitt  $\bar{y}_i$  einer Stichprobe zu bestimmen, gehen wir mit zwei Werten  $w_{i1}$  und  $w_{i2}$  auf den Skalen a und c ein; dabei benützen wir die rechten Einteilungen, da es sich um die ursprünglichen

Messwerte handelt. Durch Verbinden der beiden Punkte mit einer Geraden erhalten wir auf b einen Hilfspunkt. In analoger Weise bestimmen wir mit  $w_{i3}$  und  $w_{i4}$  auf e und c einen Hilfspunkt auf d. Der Schnittpunkt der Verbindungsgeraden der beiden Hilfspunkte mit der Skala c liefert uns den gesuchten Funktionswert  $\bar{y}_i$ .

Um den Wert  $\bar{y}$  zu finden, gehen wir in gleicher Weise mit den vier logarithmischen Durchschnitten  $\bar{y}_1 \dots \bar{y}_4$  auf den Skalen a, c und e ein. Dabei sind die linken Einteilungen zu benützen, da es sich bei den  $\bar{y}_i$  um Logarithmen handelt (vgl. das eingezeichnete Beispiel zu Figur 1).

Mit Hilfe dieser nomographisch bestimmten logarithmischen Durchschnitte können alsdann in einer graphischen Darstellung die gesuchten Parameter der Regressionsgeraden geschätzt werden.

Die nomographisch ermittelten logarithmischen Durchschnitte weichen um weniger als 0,01 vom berechneten Wert ab, und die graphisch bestimmten Schnittpunkte der Regressionsgeraden liegen innerhalb der Vertrauensgrenzen nach FELLER für die Irrtumswahrscheinlichkeit  $P = 0,05$ .

*Summary.* A nomogram has been constructed for the estimation of the logarithmic mean of four measurements. This nomogram makes it possible to transform the empirical data without tables and without computing.

H. THÖNI

*Botanisches Institut der Universität Bern (Schweiz),  
12. November 1962.*

<sup>3</sup> Die logarithmische Skala lässt sich leicht von käuflichem logarithmischem Papier (Einheit = 100 mm) übertragen; die lineare Skala erhält sodann eine mm-Einteilung. Ein einfacheres Nomogramm lässt sich unmittelbar auf Papier mit einfacher logarithmischer Teilung herstellen, wobei Maßstab und Bereich den Messwerten angepasst werden können. Der logarithmische Durchschnitt kann darauf jedoch nicht direkt abgelesen werden, sondern nur der entsprechende Numerus. Die dem logarithmischen Durchschnitt entsprechende Strecke kann aber mit dem Zirkel auf die graphische Darstellung übertragen werden.

## Genetische und biochemische Untersuchungen über die Bedeutung der Amino- und Nucleinsäuren im Ursachengefüge von Neoplasmen (Tumoren und Gallen). Ein Dauermodifikations- bzw. Prädeterminationsphänomen<sup>1</sup>

Bei den Auseinandersetzungen über das Wesen der Neoplasmen<sup>2</sup> hat es sich im Verlaufe der letzten Jahre abgezeichnet, dass das Tumorproblem u.a. ein Problem der Proteinsynthese ist. Aus diesem Grunde stehen die Aminosäuren als Eiweissbausteine und die Nucleinsäuren als Hauptakteure der Proteinbiosynthese im Mittelpunkt vieler neuerer Arbeiten über die Krebsentstehung<sup>2-5</sup>.

In eigenen Arbeiten wurde zunächst nur die Bedeutung der sogenannten freien Aminosäuren für die Tumorbildung bei bestimmten Arten, Rassen, Genotypen und deren Bastarden bei Tabak (*Nicotiana*)<sup>7</sup>, Zahnkarpfen (*Poeciliidae*)<sup>8,9</sup> und *Drosophila*<sup>9</sup> untersucht, wobei wir uns bemühten, unnatürliche Eingriffe in den Stoffwechsel zu vermeiden. Dabei kamen wir zu dem Ergebnis, dass die freien Aminosäuren im Ursachengefüge der Tumorbildung unserer Versuchsobjekte einen so hervorragenden

<sup>1</sup> Den Herren Prof. Dr. G. DE LATTIN (Zoologisches Institut der Universität des Saarlandes) und Prof. Dr. B. HUSFELD (Forschungsinstitut für Rebenzüchtung Geilweilerhof/Pfalz) sind wir für die Förderung dieser Arbeit zu grosstem Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. C. KOSWIG (Zoologisches Institut der Universität Hamburg) verdanken wir viele Anregungen und die freundliche Überlassung von ingezüchteten Stämmen für unsere Fischkreuzungen. – Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

<sup>2</sup> A. GRAFFI und H. BIELKA, *Probleme der experimentellen Krebsforschung* (Leipzig 1959).

<sup>3</sup> J. P. GREENSTEIN, *Biochemistry of Cancer* (New York 1954).

<sup>4</sup> S. KIT in J. T. EDSALL, *Amino Acids, Proteins and Cancer Biochemistry* (New York and London 1960).

<sup>5</sup> E. ROBERTS and D. G. SIMONSEN, in J. T. EDSALL, *Amino Acids, Proteins and Cancer Biochemistry* (New York and London 1960).

<sup>6</sup> E. LE BRETON and Y. MOULÉ, in J. BRACHET and A. E. MIRSKY, *The Cell*, Bd. 5 (New York and London 1961).

<sup>7</sup> F. ANDERS und F. VESTER, *Exper.* 16, 65 (1960). – F. VESTER und F. ANDERS, *Biochem. Z.* 332, 396 (1960).

<sup>8</sup> F. ANDERS, F. VESTER, K. KLINKE und H. SCHUMACHER, *Exper.* 17, 549 (1961); *Biol. Zbl.* 81, 45 (1962).

<sup>9</sup> F. ANDERS, A. ANDERS und K. KLINKE, *Verh. Deutsch. Zool. Ges. in Wien* (1962), im Druck.

Platz einnehmen, dass eine allgemeine Erhöhung der Aminosäurenkonzentration, die sowohl genetisch als auch modifikatorisch bedingt sein kann, die Tumorgenese auszulösen und zu fördern vermag, wenn bestimmte genetisch bedingte wachstumsaktive Gewebe vorhanden sind und weitere genetische Voraussetzungen, die seit langem bekannt sind<sup>10–12</sup> und mehrmals erörtert wurden<sup>8,9</sup>, erfüllt sind. Umgekehrt kann die Tumorbildung bei Individuen, die auf Grund ihrer genetischen Konstitution tumordisponiert sind, durch eine allgemeine genetisch oder modifikatorisch bedingte Senkung des Aminosäurespiegels unterdrückt oder wenigstens gehemmt werden. Eingehendere Analysen zeigten, dass hierbei offenbar alle gefundenen Aminosäuren beteiligt sind, wenn auch einige davon, wie zum Beispiel Glutaminsäure, Asparaginsäure und Glykokoll eine Vorrangstellung einnehmen.

Die folgenden Versuche an Zahnkarpfen zeigen nun, dass bei der Tumorgenese noch andere Substanzen, deren Bildung oder Aktivität vom Angebot freier Aminosäuren abhängt, am Werke sind.

Wenn man zum Beispiel bestimmte Bastarde der beiden Zahnkarpfenarten *Platypleurodon maculatus* und *Xiphophorus helleri*, die durch Makromelanophoren bedingte Zeichnungsflecken tragen und deshalb gewisse erbliche Voraussetzungen für die Tumorbildung erfüllen<sup>8,9,11,12</sup>, in verdünntes Meerwasser von 0,25% Salzgehalt setzt, dann steigt der Aminosäurespiegel der Tiere innerhalb weniger Stunden, und schon nach 3 bis 10 Tagen ist die Zuwachsrate der Makromelanophoren so sehr vergrößert, dass die Zeichnungsflecken abnorm schnell an Grösse zunehmen und im Verlaufe von 3 bis 8 Monaten zu Melanomen auswachsen<sup>8,9,14</sup>. Nach Rückführung der Fische in Süßwasser sinkt der Aminosäurespiegel in wenigen Stunden wieder auf den Normalwert. Die erhöhte Zuwachsgeschwindigkeit der Farbzellen bleibt jedoch erhalten, so dass das Tumorstadium in dem eingeschlagenen Tempo autonom weiterläuft. Die Salzbehandlung, die den Aminosäurespiegel hebt und dadurch die Tumorbildung in Gang setzt, hat also eine Nachwirkung, die nicht auf der vorübergehend erhöhten Aminosäurenkonzentration beruhen kann. Aus diesem Grunde haben wir zunächst in Anlehnung an andere genetisch orientierte Autoren<sup>15,16</sup> angenommen, dass bei den Makromelanophoren eine irreversible Eigenschaftsänderung im Sinne einer oder mehrerer somatischer Mutationen eingetreten sei, die auf alle folgenden Tochterzellen übertragen würde.

Weitere mannigfach variierte Versuche zeigen indessen, dass die Nachwirkung bzw. Eigenschaftsänderung, die zur Autonomie des Tumorstadiums führt, wahrscheinlich eine ganz andere biologische Grundlage hat.

Wenn man zum Beispiel ♀♀ von *X. helleri*<sup>17</sup>, die von fleckenbedingenden X-Spermien von *P. maculatus* besamt sind und deshalb bestimmte einheitlich gefleckte Bastardnachkommen gebären sollen<sup>8,9</sup>, vorübergehend in verdünntes Meerwasser setzt und dadurch den Aminosäurespiegel hebt<sup>18</sup>, dann wird die Fleckenbildung der Jungtiere durch eine Erhöhung der Makromelanophorenzuwachsgeschwindigkeit zur Tumorbildung gesteigert, obwohl diese jungen Fische niemals mit Meerwasser in Berührung gekommen sind. Figur 1 veranschaulicht dasselbe an Rückkreuzungsbastarden. Oben ist ein 7 Monate alter Kontrollfisch dargestellt; er wurde vor der Salzbehandlung der Mutter geboren. Darunter befindet sich ein 3,5 Monate alter Versuchsfisch, der nach der Salzbehandlung desselben Muttertieres geboren wurde; die mütterliche Keimzelle, aus der er hervorging, befand sich noch in der Entwicklung, als das Muttertier in verdünntem Meerwasser von 0,25% (94. bis 81. Tag vor der Geburt des Versuchstieres) und 0,5% Salzkonzentration

(81. bis 39. Tag vor der Geburt) gehalten wurde. – Alle Kontrollfische dieses Versuchs blieben das ganze Individualleben hindurch tumorfrei, während die Versuchstiere schon im Jugendalter Melanome bildeten.

In Figur 2 ist ein entsprechender Versuch, der mit einem Muttertier und dessen 147 gefleckten Nachkommen einer 1:1-Spaltung (gefleckt:ungefleckt) aus 9 Würfen durchgeführt wurde, graphisch dargestellt. Die ersten beiden Würfe dienten als Kontrollen; sie waren tumorfrei. Im ersten Teil des Versuches wurde nun das Muttertier während der ersten Septemberhälfte in verdünntes Meerwasser von 0,25% Salzgehalt überführt. Daraufhin setzte bei den gefleckten Jungtieren des 3. und 4. Wurfes, also bei Nachkommen, die bis zu 1,5 Monaten nach der Salzbehandlung der Mutter geboren wurden, ein so steiler Anstieg der Makromelanophorenzuwachsgeschwindigkeit ein, dass dieselben im Alter von 8,5 Monaten Melanome bildeten. Beim 5. und 6. Wurf klang die gesteigerte

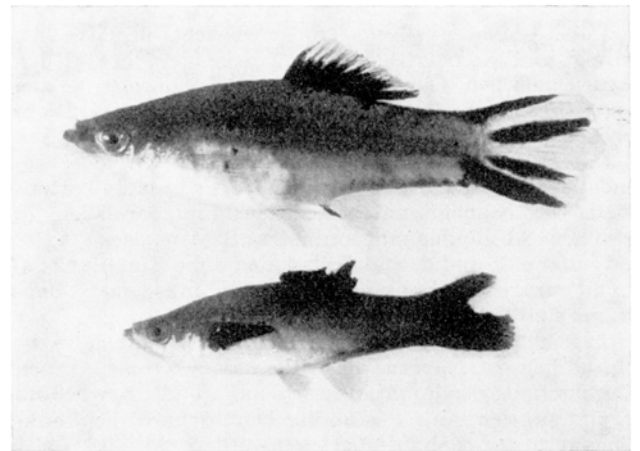


Fig. 1.  $F_2$ R-Geschwister folgenden Kreuzungsganges: *Platypleurodon maculatus* × *Xiphophorus helleri* (Stamm «Gordon») × denselben × denselben × *X. helleri* aus dem Rio Papaloapan × *X. helleri* aus dem Belize River. – Die Fleckenbildung der Tiere beruht auf dem Gen «Spot dorsal» von *P. maculatus* aus Mexiko, bei dem es im allgemeinen lediglich einen schwarzen Fleck an der Dorsalflosse verursacht; nach Einkreuzung desselben Gens in *X. helleri* wird die Fleckenbildung verstärkt und greift auf die Schwanzflosse über. – Oben: 7 Monate altes Kontrolltier. Unten: 3,5 Monate altes Versuchstier, das geboren wurde, nachdem die Mutter desselben vorübergehend in verdünntem Meerwasser von 0,25% bzw. 0,50% Salzkonzentration gehalten wurde. Die Versuchstiere haben Melanome gebildet; ausserdem sind sie stärker pigmentiert als die Kontrollen. Einzelheiten im Text.

<sup>10</sup> D. KOSTOFF, *Cytogenetics in the Genus Nicotiana* (Sofia 1943).

<sup>11</sup> C. KOSWIG, Z. ind. Abst.- u. Vererbungsl. 44, 253 (1927); Biol. Zbl. 78, 711 (1959).

<sup>12</sup> M. GORDON, Genetics 12, 253 (1927); Pigment Cell Biology (New York 1959).

<sup>13</sup> W. J. BURDETTE, Cancer Res. 10, 209 (1950).

<sup>14</sup> Auch die allmähliche Überführung in kühlere Zuchttemperaturen fördert die Tumorbildung, was mit den Ergebnissen von H. VOLLMAR, Z. Krebsforsch. 51, 71 (1941); H. LETTRÉ, A. MAYER und A. SCHLEICH, Z. Krebsforsch. 57, 665 (1951); H. FROBERG und D. GRIEBNER, Z. Krebsforsch. 62, 270 (1958) u. a. in gutem Einklang steht. – Einen entsprechenden, wenn auch wesentlich schwächeren Effekt hat schwache UV-Bestrahlung.

<sup>15</sup> K. H. BAUER, Das Krebsproblem (Berlin, Göttingen, Heidelberg 1949).

<sup>16</sup> F. M. BURNET, Fed. Proc. 17, 687 (1958).

<sup>17</sup> Diese sind grundsätzlich nicht zur Melanombildung fähig, weil ihnen der hierfür notwendige Zelltyp fehlt.

<sup>18</sup> Auch der Aminosäurespiegel der Ovarien wird hierbei angehoben, wie spezielle Untersuchungen hierüber zeigten.

Zuwachsgeschwindigkeit der Makromelanophoren wieder auf den Kontrollwert ab. – Im zweiten Teil des Versuches wurde dasselbe Muttertier länger und stärker gereizt, indem es von Januar bis April abwechselnd in verdünntes Meerwasser von 0,25 und 0,5% Salzgehalt gesetzt wurde. Das Ergebnis dieses zweiten Versuchsteils, das in den Kurvenbildern des 7. bis 9. Wurfes dargestellt ist, zeigt eine dem stärkeren Reiz entsprechende Wirkungssteigerung, und zwar in zweifacher Hinsicht: Als erstes ist die Zuwachsgeschwindigkeit der Makromelanophoren bei den Jungtieren jetzt noch mehr als nach der früheren gelinderen Salzbehandlung der Mutter beschleunigt; am deutlichsten ist dies beim 7. Wurf zu beobachten, der offensichtlich am stärksten von der Salzbehandlung der Mutter betroffen wurde und deshalb schon nach 3 Lebensmonaten Melanome bildete. Darüberhinaus ist als zweites die Wirkung auf nachfolgende Würfe, die schon im ersten Versuchsteil auftrat, jetzt noch nachhaltiger als zuvor und erstreckt sich über mehr als ein Jahr, wie die Tumorbildung bei den 6 Monate alten Jungtieren des 9. Wurfes, der fast ein halbes Jahr nach der Salzeinwirkung auf die Mutter geboren wurde, beweist. Allerdings ist hier ebenso wie im ersten Versuchsteil ein Abklingen der Nachwirkung zu verzeichnen, und nach den Erfahrungen an modifizierten Parallelversuchen müssen wir annehmen, dass die nächsten Würfe, die infolge vorzeitigen Abgangs des Vätertieres nicht mehr zustande kamen, wieder tumorfrei geblieben wären wie die Kontrollwürfe. Vier weitere Versuche, die ähnlich angelegt waren und mehr als ein Jahr dauerten, sind grundsätzlich genau so verlaufen. Stets hat sich gezeigt, dass die Behandlung der Muttertiere bei den Nachkommen Tumorbildung auslöst und dieselbe fördert, wobei die Information hierzu schon in einem frühen Oogenesestadium gesetzt werden kann. Dabei rufen stärkere und länger andauernde Reize auch stärkere und nachhaltigere Wirkungen hervor, die sich bei den Jungen manifestieren.

Diese Tatsachen lassen sich nun nicht mehr mit der Vorstellung von Eigenschaftsänderungen im Sinne von somatischen Mutationen in Einklang bringen, wie dies bei dem eingangs geschilderten Versuch noch möglich war. Darüberhinaus wird die Annahme somatischer Mutationen bei den letzten Würfen des Versuchs geradezu absurd, denn das fleckenbedingende Gen, an dem die Mutation erfolgt sein müsste, wurde erst nach der Behandlung der Mutter durch das väterliche X-Spermium in die spätere Zygote eingeführt. Es besteht kein Zweifel, dass hier und wahrscheinlich<sup>19</sup> auch im eingangs beschriebenen Versuch ein von der Reizstärke abhängiger Dauermodifikations- bzw. Prädeterminationseffekt vorliegt, der zwar durch hohe meerwasserbedingte Aminosäurenkonzentrationen angeregt, aber nicht realisiert wird. Hier muss neben den Aminosäuren, die nach unseren früheren Untersuchungen eine Schlüsselposition bei der Tumorbildung einnehmen, ein anderes stoffliches System am Werke sein, das von frühen Oogenesestadien bis zum erwachsenen Tier durch eine vorübergehende Erhöhung des Aminosäurepiegels aktiviert oder verstärkt wird und später gleichsam aus eigener Schwungkraft, also autonom, weiterwirkt und Tumoren produziert. Dabei muss diesem System auch die Fähigkeit zur Autoreproduktion und die Fähigkeit, ein durch Anstoss erhöhtes Tempo derselben für lange – wenn auch grundsätzlich begrenzte – Zeit einzuhalten, zugesprochen werden. Es liegt auf der Hand, dass dieses System nicht erst während der Tumorbildung aufgebaut wird, sondern auch normalerweise vorhanden ist und durch das normale Tempo seiner Reproduktion für die normal begrenzte Farbzellbildung sorgt.

Nachdem nun in den letzten Jahren erkannt wurde, dass die Biosynthese der Proteine durch Ribonucleinsäuren gesteuert wird<sup>20–23</sup>, liegt die Vermutung nahe, dass das im Prädeterminationsversuch aufgedeckte Glied im Ursacheengefüge der Neoplasmenbildung unserer Versuchsobjekte mit diesen Substanzen identisch ist. Die Synthese der Ribonucleinsäuren (RNS) müsste dann – von Desoxyribonucleinsäuren (DNS) kontrolliert – in hohem Masse vom Angebot freier Aminosäuren abhängen, wobei das Tempo derselben durch die jeweils höchsten Aminosäurenkonzentrationen, die der Pegelstand des Aminosäurenpools zuvor erreicht hat, für längere Zeit vorgeschrieben wird.

RNS in Neoplasmen sind schon oft untersucht worden, wobei fast immer relativ grosse Gesamtmengen, insbesondere in der Kernfraktion, gefunden wurden<sup>4,6,24–27</sup>. Auch die Fischtumoren dürften mehr RNS enthalten als gesunde Gewebe, wie orientierende cytologische Versuche nahelegen. Um jedoch diese Substanzen und deren vermutliche Abhängigkeit vom Angebot freier Aminosäuren besser erfassen zu können, als dies bei der Untersuchung von Zahnkarpentumoren möglich ist, wählten wir für die weiteren Versuche Neoplasmen ganz anderer Art, nämlich *Pflanzengallen*. Diese Neoplasmen sind unseres Erachtens wegen ihrer übersichtlichen Entstehungsursachen und der Möglichkeit, Ort und Zeit der Induktion genau festzulegen, ein äusserst günstiges Objekt der Tumorforschung, obwohl sie auf den ersten Blick nur wenig Beziehungen zum Tumorproblem erkennen lassen. Es handelt sich bei diesen Gallen insbesondere um krebsartige Gewebswucherungen, die die Reblaus (*Viteus vitifolii* SHIMER = *Phylloxera vastatrix*) am Blatt gewisser Genotypen der Rebe (*Vitis*) verursacht.

Diese Neoplasmen werden durch ein hochkonzentriertes Gemisch mehrerer freier Aminosäuren induziert, welches vom Gallentier in meristematisches Wirtsgewebe periodisch injiziert wird; hier verdünnt es sich auf die optimal wirksame Konzentration<sup>28</sup>. 24 bis 48 h später sind die ersten Neubildungen bereits makroskopisch wahrnehmbar, nach 4 bis 6 Tagen haben sie schon etwa Stecknadelkopfgrosse überschritten ( $\sigma \sim 1,5$  mm) und in 12 Tagen sind sie – gute Wachstumsbedingungen vorausgesetzt – etwa so gross wie ein Pfefferkorn ( $\sigma \sim 3$  mm); sie wachsen weiter solange der Parasit lebt und Aminosäuren injiziert und erreichen dabei etwa die Grösse einer frischen Erbse. Wenn man nun das Gallentier nach Beginn der Gallenbildung entfernt oder die experimentelle Zufuhr der Aminosäuren, die ebenfalls Neubildungen verursacht, unterbricht, dann wächst die Galle – was unseres Wissens bisher immer übersehen wurde – wenigstens noch etwa 14 Tage lang in einem immer langsamer werdenden Tempo

<sup>19</sup> Der sichere Nachweis lässt sich aus methodischen Gründen zur Zeit nicht führen.

<sup>20</sup> J. BRACHET, *The Biological Role of Ribonucleic Acids* (Amsterdam, London, New York, Princeton 1960).

<sup>21</sup> R. J. C. HARRIS, *Protein Biosynthesis* (London and New York 1961), siehe dort insbesondere die Beiträge von P. SIEKEVITZ, V. G. ALLFREY und A. E. MIRSKY, G. SCHRAMM.

<sup>22</sup> M. W. NIRENBERG und J. H. MATTHAEI, *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 47, 1588 (1961).

<sup>23</sup> H. G. WITTMANN, *Naturwiss.* 48, 729 (1961).

<sup>24</sup> S. ALBERT und R. M. JOHNSON, *Cancer Res.* 14, 271 (1954).

<sup>25</sup> G. KLEIN und A. FORSSBERG, *Exp. Cell Res.* 6, 211 (1954).

<sup>26</sup> A. K. LAIRD, *Exp. Cell Res.* 6, 30 (1954).

<sup>27</sup> I. LESLIE, in CHARGAFF-DAVIDSON, *Nucleic Acids* (New York, London 1960), vol. 2, p. 15.

<sup>28</sup> F. ANDERS, *Verhandl. Deutsch. Zool. Ges. Erlangen 1955*, 421; *Exper.* 14, 62 (1958); *Biol. Zbl.* 79, 47, 679 (1960); *Biol. Zbl.* 80, 199 (1961). – O. HENKE, *Phytopathol. Z.* 41, 387 (1961).

weiter; erst dann stellt sie ihr Wachstum ein. Auch ein einmaliger Gallenbildungsreiz genügt, um einen Mechanismus in Gang zu setzen, der mehr als 12 Tage hindurch funktioniert und dabei kleinere Neubildungen einschliesslich der dazugehörigen Emergenzen produziert. Es liegt also auch hier eine Nachwirkung vor, wenngleich diese nicht so nachhaltig ist wie bei den Zahnkarpentumoren. Auch diese Nachwirkung beruht unseres Erachtens auf einer – wenn auch nur relativ kurze Zeit währenden – Dauermodifikation und muss eine selbständige stoffliche Grundlage haben. – Der Unterschied zwischen den hier untersuchten Gallen und Tumoren besteht also offensichtlich nur darin, dass die Aminosäuren im ersten Falle exogen und im letzteren endogen bereitgestellt werden. Ausserdem verlaufen Induktion und Wachstum bei den Gallen wesentlich schneller als bei Tumoren, so dass sich erstere für die Untersuchung der vermuteten aminosäurenabhängigen RNS-Bildung gut eignen.

Wir haben nun die erste Phase der Galleninduktion, die mit der Aminosäureninjektion durch das Insekt oder den Experimentator beginnt und bis zum ersten Auftreten der ersten morphologischen Anzeichen einer Gewebswucherung (nach etwa 24 h) dauert, cytologisch untersucht (je Reizfeld etwa 2000 Zellen). Dabei haben wir als erstes festgestellt, dass die Nucleolen im Reizfeld der Aminosäuren schon nach 4 bis 6 h abnorm vergrössert sind und auf den RNS-Nachweis mit Methylgrünpyronin stark reagieren. Später blähen sie sich gewaltig auf und geben fortgesetzt zu Tröpfchen geformte Nucleolarsubstanz an den Kern ab, wie schon früher an wachsenden Gallen beobachtet wurde<sup>28,29</sup>. Es besteht kein Zweifel, dass das vom Normalen abweichende Verhalten der Nucleolen der Ausdruck einer durch die Aminosäureninjektion ausserordentlich verstärkten RNS- und – davon abhängig – Proteinsynthese ist<sup>30,31</sup>. Auch das Verhalten der Metaphasechromosomen spricht für eine verstärkte Syntheseaktivität, denn sie schwellen bereits während der ersten Stunden der Induktionsphase an, wobei sie gleichsam ein etwas glasiges Aussehen annehmen. Erst 6 bis 12 h nach Induktionsbeginn setzen dann – als Sekundärvorgänge – modifizierte Mitoseabläufe ein, die später u.a. zu hochgradiger Endopolyploidie führen können<sup>28</sup>. In die gleiche Richtung weist auch das frühe Auftreten einer verstärkten Granulierung des Cytoplasmas, die im Verlaufe der beginnenden Gallenbildung so gesteigert werden kann, dass manche Zellen dicht mit im einzelnen undeutlichen

Granulen angefüllt sind und später zu Riesenzellen anschwellen können. – Etwa 14 Tage nach Reizende hat sich die abnorm intensive cytologische Aktivität wieder normalisiert.

Da die uns zur Verfügung stehenden cytologischen Methoden nicht dazu geeignet sind, das Ausmass der zu beobachten RNS-Produktionssteigerung auch nur annähernd genau abzuschätzen, haben wir den RNS-Gehalt von Teilen schnellwüchsiger 4 bis 14 Tage alter Gallen, die unmittelbar im Reizfeld der Aminosäuren standen, nach MARKHAM<sup>32</sup> (Kochsalz-Extraktion) bestimmt. Als Bezugsgrössen dienten RNS-Bestimmungen des gesunden Nachbargewebes ausserhalb des Reizfeldes des Gallentiers und anderer gallenfreier, schnellwüchsiger Blätter. Bei diesen Analysen (Tabelle) hat es sich herausgestellt, dass die RNS-Konzentration im Reizfeld der Aminosäuren einer jungen Galle etwa 10mal höher ist als im angrenzenden gesunden Gewebe desselben Blattes und wenigstens 3mal höher als in vergleichbaren gallenfreien Blättern. – Es sei noch erwähnt, dass die gefundenen und in der Tabelle angegebenen Absolutwerte wahrscheinlich zu niedrig liegen, weil auch der Überstand der RNS-Fällungen noch RNS enthielt (Bestimmung nach CERIOTTI<sup>33</sup>; freie Ribose, die durch diese Methode ebenfalls erfasst wird, konnte papierchromatographisch nicht nachgewiesen werden). Die angegebenen Verhältniszahlen werden hierdurch allerdings nicht oder doch nur unwesentlich verschoben. – Am Ende der Vegetationsperiode haben wir in den Gallen nicht mehr so hohe RNS-Werte gefunden<sup>34</sup>.

Der relative RNS-Gehalt der jungen Gallen ist ausserordentlich hoch und übersteigt denjenigen der meisten anderen Neoplasmen<sup>4,6,24–27</sup>. Wenn man aber bedenkt, dass Induktion und Wachstum der Neubildungen bei Gallen we-

<sup>29</sup> Entsprechende Beobachtungen machte auch E. WOLL, *Planta* **47**, 299 (1956).

<sup>30</sup> T. O. CASPERSSON, *Cell Growth and Cell Function* (New York 1950).

<sup>31</sup> J. L. SIRLIN, *Endeavour* **20**, 146 (1961).

<sup>32</sup> R. MARKHAM, in PAECH-TRACY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* (Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955), Bd. 4, p. 299; HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, 10. Aufl. (Berlin, Göttingen, Heidelberg 1960), Bd. 4/2.

<sup>33</sup> G. CERIOTTI, *J. biol. Chem.* **214**, 59 (1955).

<sup>34</sup> Eine ausführliche Publikation ist in Vorbereitung.

	Unvergalte Blätter	Gesunder Anteil vergallter Blätter	Gallen (Alter 4–14 Tage)
Trockengewicht (g je 100 g Frischmaterial)	31,75	33,05	19,80
Gewicht der RNS-Fällungen nach MARKHAM (mg je 100 g Frischmaterial)	29,70	10,70	145,60
Verhältniszahlen: bezogen auf Frischgewicht	2,8	1,0	13,6
bezogen auf Trockengewicht	2,9	1,0	22,7
Anteil an RNS in den Fällungen nach MARKHAM (mg je 100 g Frischmaterial)	12,65	4,78	49,30
Verhältniszahlen: bezogen auf Frischgewicht	2,6	1,0	10,3
bezogen auf Trockengewicht	2,7	1,0	17,2
Freie Ribose im Überstand (papierchromatographischer Nachweis)	—	—	—
RNS im Überstand der Fällungen nach MARKHAM (Bestimmung nach CERIOTTI)	+	+	++++
Cytologischer Nachweis von RNS	+	+	++++

sentlich schneller verlaufen als bei Tumoren, dann werden die hier gefundenen hohen RNS-Werte verständlich. Auffallend ist noch, dass der RNS-Gehalt in der Spreite vergallter Blätter niedriger ist als in vergleichbaren unvergallten Blättern. Wir möchten diese Erscheinung mit der immer zu beobachtenden Wachstumsdepression vergallter Bätter in Zusammenhang bringen. – Gleichzeitig zeigt sich, dass die ausserordentlich schnelle Substanzzunahme der Gallen offenbar auf Kosten der gesunden Umgebung erfolgt, was wir ausserdem auch bei der Tumorbildung unserer Fische nachweisen konnten.

Der hohe RNS-Gehalt in Gewebearealen junger Gallenstadien, die hohen Aminosäurenkonzentrationen ausgesetzt sind, sagt natürlich nichts über die RNS-Konzentration aus, die wenige Stunden nach der ersten Aminosäureninjektion herrscht. Wenn man aber die gefundenen Werte als Maßstab für die zuvor geschilderten cytologischen Befunde heranzieht, dann ergibt sich, dass gleich nach der ersten Aminosäureninjektion, also während der Induktionsphase der Galle, eine RNS-Produktionssteigerung einsetzt und dass die RNS-Konzentration schon nach 4 bis 6 h ungewöhnlich hoch ist.

Ein erhöhtes Angebot freier Aminosäuren hat demnach eine gesteigerte RNS-Synthese zur Folge, wodurch Auslösung und Förderung der Neoplasmenbildung unter dem Einfluss exo- oder endogen zugeführter Aminosäuren erklärt werden können. Durch diese Versuchsergebnisse und durch die Tatsache, dass die RNS als Hauptakteure der Proteinsynthese ein relative stabiles Stoffsystem darstellen, das selbst<sup>35,36</sup> oder/und über DNS<sup>37,38</sup> zur Reproduktion fähig ist, fühlen wir uns ausserdem in der Ansicht sehr bestärkt, dass das im biologischen Prädeter-

minations- bzw. Dauermodifikationsversuch aufgedeckte Glied im Ursachengefüge der Neoplasmenbildung unserer Versuchsobjekte mit RNS identisch ist.

Über den Wirkungsmechanismus der Aminosäuren lassen sich vorerst nur Vermutungen anstellen. Diese basieren darauf, dass zum Beispiel Glutaminsäure und Asparaginsäure, die bei der Transaminierung und gegenseitigen Umwandlung von Aminosäuren eine Schlüsselposition<sup>39,40</sup> und nach unseren früheren Untersuchungen bei der Tumorbildung eine Vorrangstellung einnehmen<sup>8</sup>, an der Biosynthese der Nucleotide beteiligt sind. Der Prädeterminationseffekt spricht allerdings mehr für eine «katalytische» Wirkung der Aminosäuren.

Die vorgelegten Ergebnisse, die an Zahnkarpfentumoren und Pflanzengallen gewonnen wurden und die noch durch Befunde an Tabak- und Drosophilatumoren erweitert werden könnten, führen zu einer überraschend einfachen Konzeption der Cancerogenese unserer Versuchsobjekte. Im Mittelpunkt dieser Konzeption stehen neben einem primär wachstumsaktiven Gewebe<sup>8,9</sup> Nu-

<sup>35</sup> J. HÄMMERLING, Int. Rev. Cytol. 2, 478 (1953); Biol. Zbl. 78, 703 (1959).

<sup>36</sup> H. HARRIS und J. W. WATTS, Proc. Royal Soc. Ser. B 156, 109 (1962).

<sup>37</sup> R. P. PERRY, A. HELL und M. ERRARA, Proc. 10th Int. Congress Cell Biol. (Paris 1960), p. 110.

<sup>38</sup> M. ZALOKAR, Nature 183, 1330 (1959).

<sup>39</sup> D. RITTENBERG, Harvey Lectures 44, 200 (1948/49).

<sup>40</sup> R. SCHOENHEIMER, The Dynamic State of Body Constituents (Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass., 1947).

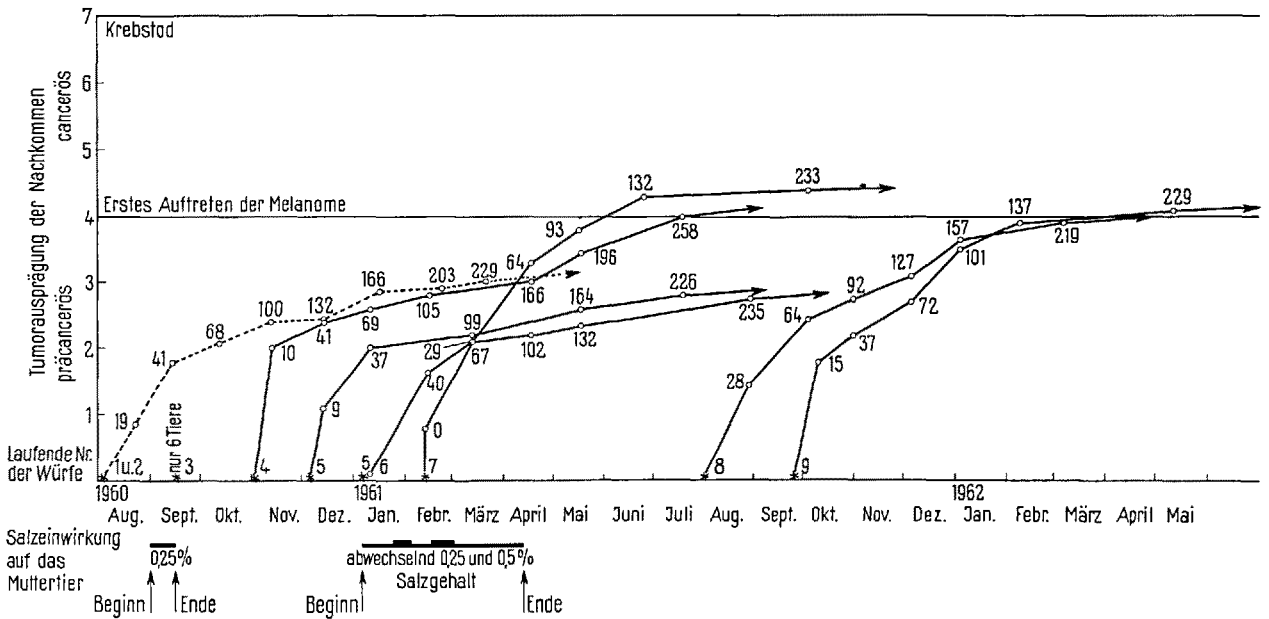


Fig. 2. Zuwachsgeschwindigkeit der Makromelanophoren (= prospektive Tumorzellen) bei 147 Geschwistertieren aus 9 Würfen, deren Mutter vorübergehend in verdünntem Meerwasser gehalten wurde. Die dicke waagrechte Linie unter dem Diagramm gibt den Aufenthalt des Muttertieres in Meerwasser an (einfache dicke Linie = 0,25% Salzkonzentration; doppelte Dicke = 0,5%). Das Muttertier stammte aus einer *X. helleri*-Inzucht aus dem Belize River. Es wurde von einem  $F_3R$ -♂, das aus der Kreuzung und Rückkreuzung eines *P. maculatus*(Mexiko)-♀ mit *X. helleri* (Stamm «Gordon») hervorgegangen war und ein Gen für Makromelanophorenbildung (*Spot dorsal*) von *P. maculatus* besass, besamt. – Jede Kurve stellt die durchschnittliche Zuwachsgeschwindigkeit der Makromelanophoren eines Wurfs dar. Sie ergibt sich aus der Einordnung der Fleckengrösse bzw. Tumorausprägung in einer auf Erfahrung beruhenden Klasseneinteilung (Ordinate) während des Individuallebens (Abszisse) von 1 (kleiner Fleck) über 4 (Beginn der Entartung des Fleckes zum Melanom) bis 7 (Krebstod). Die Zahlen an den Kurven geben jeweils das Alter der Tiere in Tagen und die Sternchen am Anfang der Kurven den Zeitpunkt der Geburt an. – Punktierte Kurve = Kontrollwürfe vor der Salzbehandlung der Mutter. Ausgezogene Kurven = Versuchstiere, die während und nach der Salzeinwirkung auf das Muttertier geboren wurden. – Steigerung des Tumorstadiums bis zum Krebstod ist möglich, wurde jedoch hier nicht untersucht. – Die Ermittlung der Zuwachsgeschwindigkeit der Makromelanophoren wurde bereits ausführlich dargestellt<sup>8</sup>. Einzelheiten im Text.

cleinsäuren als Hauptakteure der Protein-Biosynthese und der inter- und intrazelluläre Aminosäurenpool, der – als eine ausserordentlich erb- und umweltvariable Grösse<sup>9,41</sup> – in einer Art Rückkopplungsverhältnis zu den ihm bei der Proteinsynthese übergeordneten Nucleinsäuren steht: Ein allgemein oder örtlich erhöhtes Angebot freier Aminosäuren, das zum Beispiel durch erhöhte Salzkonzentration im Kulturmedium<sup>8</sup>, niedrige Zuchttemperaturen<sup>9,14</sup>, schwache UV-Strahlung<sup>9,14</sup> und vermutlich viele andere Faktoren, wie chemische, mechanische, radiologische, hormonelle, ernährungsphysiologische, bakterielle, viröse und sonstige Reize bedingt sein kann, würde demnach eine allgemeine oder örtliche Steigerung der RNS-Produktion bewirken, so dass alle verfügbaren und brauchbaren Aminosäuren in abnorm gesteigertem Masse zum Protein verknüpft werden können; letzteres steht mit dem auffallenden Schwund freier Aminosäuren in schnell wachsenden Tumoren und deren Nachbargewebe in gutem Einklang. Solange Bausteine für den Tumor vorhanden sind bzw. herbeigeschafft werden können, wird auch deren Konzentration in der wachsenden Zelle zeitweilig immer wieder relativ hoch sein, so dass die RNS-Produktion immer wieder aufs neue angeregt und damit die abnorm gesteigerte Proteinsynthese in Gang gehalten wird. – Die abnormen chromosomalen, atmungsphysiologischen und sonstigen Vorgänge, die für Tumoren charakteristisch sind, nehmen unseres Erachtens sekundäre Positionen im Ursachegefüge der Cancerogenese ein, die von der amino- und nucleinsäurebedingten übersteigerten Proteinsynthese abhängig sind.

Es besteht kein Zweifel, dass ein solches vornehmlich aus Amino- und Nucleinsäuren bestehendes System, das möglicherweise universell ist und auch bei anderen normalen biologischen Wachstumserscheinungen in einer ähnlichen Form vorhanden ist, in mannigfacher Weise und an vielen Stellen seines Gefüges durch Erb- und Umweltfaktoren beeinflusst werden kann. Es bleibt zu prüfen, ob sich auch andere als die hier untersuchten

Objekte dem dargelegten Konzept der Neoplasmenbildung einordnen lassen.

**Summary.** If certain hybrids of *Platypharodon maculatus* and *Xiphophorus helleri* (viviparous platyfish and swordtails) are cultivated in diluted sea-water (0.25 or 0.5% salt concentration), the amount of free amino acids increases and the growth of macromelanophores, which normally only form certain black spots at the dorsal fin, is accelerated. Therefore melanomas arise. After changing salt water for fresh water, growth of macromelanophores remains accelerated. The same effect is seen in progenies which have been in an oocytic or embryonic state, when their mother was cultivated for some weeks in diluted sea-water (Figures 1 and 2). A similar effect has been observed in plant galls produced by *Phylloxera* (*Viteus vitifolii*) in the genus *Vitis*. When the parasite, which injects amino acids into the tissue of the host in order to produce galls, is removed, gall formation goes on slowly for some days. It is shown that a few hours after injection of amino acids—before formation of neoplasms begins—the concentration of ribonucleic acids is increased. RNS- (and therefore protein-) biosynthesis in neoplasms may be dependent on concentration of free amino acids. A simple concept for the formation of neoplasms in hybrids of platyfish and galls of *Phylloxera* is discussed.

F. ANDERS, F. DRAWERT,  
K. KLINKE, und K. H. REUTHER

Zoologisches Institut der Universität des Saarlandes, Saarbrücken und Forschungsinstitut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Abteilung Biochemie und Physiologie, Siebelingen (Pfalz, Deutschland), 30. November 1962.

<sup>41</sup> Vgl. dazu M. FLORKIN, 6. Colloquium d. Ges. f. physiol. Chemie in Mosbach/Baden (Berlin, Göttingen, Heidelberg 1956).

## CONGRESSUS

### Czechoslovakia

#### Third European Regional Conference on Electron Microscopy

Prague, August 26–September 3, 1964

The Conference on Electron Microscopy in Prague will deal, as usual, with physics and construction of electron microscopes, as well as biological, medical, chemical, metallurgical and technological subjects connected with electron microscopy, related fields such as electron diffusion and interferometry, ion emission and x-ray microscopy will also be welcome. Exhibits of electron micrographs as well as commercially available equipment for use in electron microscopy and related fields are planned.

Persons interested in participating are kindly requested to apply not later than June 30, 1963, to the following

address: The Organizing Committee, 3rd European Regional Conference on Electron Microscopy, Prague 1964, Albertov 4, Prague 2 (Czechoslovakia).

### Schweiz

#### Symposion über die vaskuläre Dissemination bösartiger Geschwülste

Genf, 27.–29. Juni 1963

Schweiz. Nationalliga zur Krebsbekämpfung und Krebsforschung, Schweizerische Akademie der medizinischen Wissenschaften, Schweizerische hämatologische Gesellschaft.

Auskunft: Prof. Dr. A. GIGON, Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften, Basel (Schweiz), Petersplatz 13.