

Summary

(-)-Emetine, as prepared by total synthesis, has the same antiamoebic activity and toxicity as the natural alkaloid. On the contrary its antipode and rac. isoemetine are not active and practically non-toxic. A relationship between configuration and antiamoebic activity has thus been demonstrated for various representatives of the emetine series.

Genetisch bedingte Tumoren und der Gehalt an freien Aminosäuren bei *Nicotiana*¹

Seit den Untersuchungen von KOSTOFF² kennen wir viele Artbastarde von *Nicotiana*, die «spontan», das heißt ohne nachweisbare äußere Reize, allein auf Grund der genetischen Konstitution Tumoren bilden^{2–5}. Die stofflichen Ursachen dieser Tumorbildung sind noch unbekannt⁵.

Frühere Untersuchungen über cecidogene Agenzien lenken nun unsere Aufmerksamkeit auf die Stoffgruppe der Aminosäuren, weil mehrere dieser Substanzen in hoher Konzentration und in bestimmten, aber sehr mannigfaltigen Kombinationen am Pflanzenkörper Gewebswucherungen verursachen können. Voraussetzung hierfür ist, dass das Pflanzengewebe eine hohe Mitoseaktivität besitzt. Die Wirkung dieser Substanzen ist unspezifisch⁶.

Um zu prüfen, ob womöglich auch die genetisch bedingten Tumoren beim Tabak durch solche Substanzen, die in diesem Falle vom Genotyp der Pflanze bereitgestellt werden müssten, induziert werden, haben wir als erstes den Gehalt an freien Aminosäuren bei jungen, physiologisch vergleichbaren und gesunden Pflanzen bzw. Pflanzenorganen von *Nicotiana glauca* und *N. langsdorffii*,

die stets tumorfrei sind, und einem amphidiploiden Bastard dieser beiden Arten, der zur Blütezeit spontan Tumoren bildet, bestimmt und verglichen⁷. Die hier vorliegenden Untersuchungen unterscheiden sich von fast allen uns bisher bekanntgewordenen entsprechenden Arbeiten zum Tumorproblem dadurch, dass wir nicht den Tumor selbst, sondern das noch gesunde, aber durch die Bastardierung zur Tumorbildung erblich disponierte Gewebe analysieren und mit demjenigen der stets tumorfreien Ausgangsgenotypen vergleichen.

In Abbildung 1 ist das Summenergebnis der Extinktion (Zeiss, Spektralphotometer mit Chromatogrammansatz; 450 m μ) aller proteinfreien ninhydrinpositiven Substanzen aus Blatt- und Sprossgewebe dargestellt. Danach verhalten sich die Extinktionswerte von *N. glauca*: *N. langsdorffii*: Bastard *N. glauca/langsdorffii* wie 1:1,24:1,62. Der Gehalt an proteinfreien ninhydrinpositiven Körpern ist also beim Artbastard wesentlich höher als bei den Ausgangsformen.

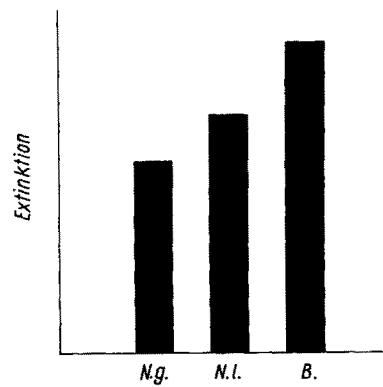


Abb. 1. Summenergebnis der Extinktion (*N. g.* = *Nicotiana glauca*; *N. l.* = *N. langsdorffii*; *B.* = amphidiploider Bastard *N. glauca/langsdorffii*). Einzelheiten im Text

Die weitere Analyse des Gehalts an freien Aminosäuren erbrachte das in Abbildung 2 dargestellte Ergebnis. Hier

⁷ Wir danken Herrn Prof. Dr. A. C. BRAUN, Rockefeller Institute for Medical Research, New York, und Herrn Prof. Dr. K. SCHMID, Bundesanstalt für Tabakforschung, Forchheim bei Karlsruhe, für die bereitwillige Überlassung von Tabaksamen.

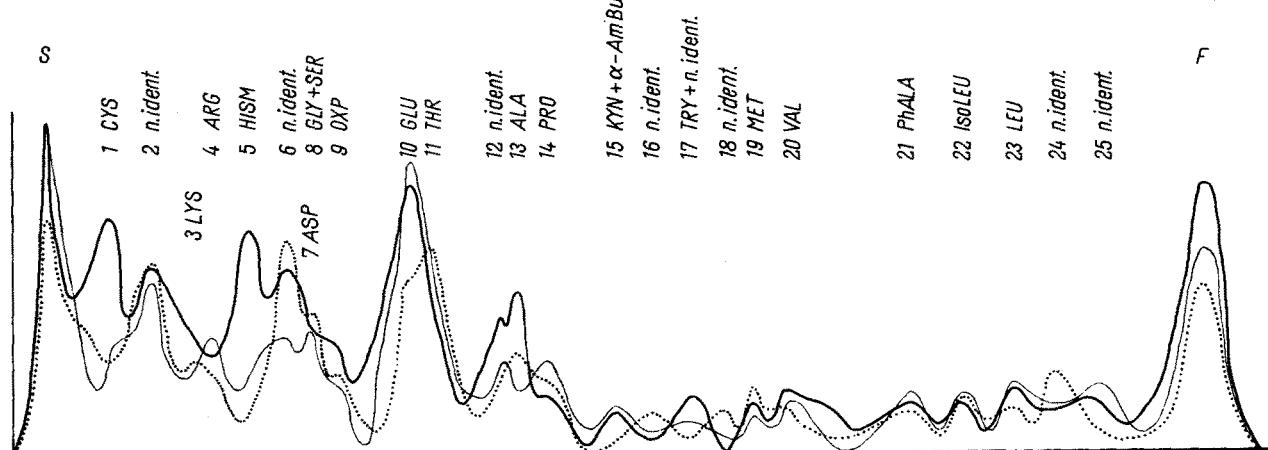


Abb. 2. Extinktionskurven von Papierchromatogrammen von *N. glauca* (punktiert), *N. langsdorffii* (dünn ausgezogen) und dem amphidiploiden Bastard *N. glauca/langsdorffii* (dick ausgezogen). *S* = Startpunkt; *F* = Steigfront. Einzelheiten im Text

sind die Extinktionskurven von je drei Papierchromatogrammen von Aminosäureextrakten dargestellt (Extrakte aus je 500 mg Tabak mit H_2O und $n/100 HCl$; Abtrennung der Proteine mit Trichloressigsäure; schonendes Einengen auf 0,5 ml; Auftragen aliquoter Mengen und ausgewählter Testgemische auf S. u. S. 2043 b mgl; entwickelt wurde aufsteigend mit Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1). Die im Kurvenbild zu erkennenden 25 Maxima entsprechen den in der Tabelle aufgeführten 28 Substanzen, von denen bisher 20 identifiziert werden konnten. Es zeigt sich, dass der Bastard wesentlich mehr freies Cystin (Nr. 1), Histamin (Nr. 5), Oxyprolin (Nr. 9), eine bisher nicht identifizierte ninhydrinpositive Verbindung (Nr. 12), Alanin (Nr. 13), Kynurenin (Nr. 15) und Tryptophan (Nr. 17)⁸ enthält als die Ausgangsarten. Die übrigen Substanzkonzentrationen schliessen sich zumeist denjenigen von *N. glauca* oder *N. langsdorffii* an oder liegen zwischen beiden; nur in Ausnahmefällen – wie bei Substanz Nr. 18 – liegen sie tiefer. Der Summenvergleich der addierten γ -Werte in der Tabelle schliesst sich mit 1:1,07:1,48 zwangslässig dem Summenergebnis der Extinktion (Abb. 1) an.

Es hat sich also gezeigt, dass die Menge aller ninhydrinpositiven Substanzen beim Bastard wesentlich höher ist

Tabelle

Gehalt an freien Aminosäuren in 45 mg Tabak
(γ -Werte, berechnet aus der Extinktion)

Laufende Nr. der Maxima	Aminosäure	<i>N. glauca</i>	<i>N. langsdorffii</i>	Bastard
1	Cystin	(3,8)*	(4,5)*	9,0
2	nicht identifiziert	5,0 **	4,5 **	4,5 **
3	Lysin	3,0	(3,0)*	(3,8)*
4	Arginin	(2,5)*	4,0	—
5	Histamin	—	—	8,0
6	nicht identifiziert	9,5 ***	5,3 ***	8,1 ***
7	Asparaginsäure	(3,4)*	3,0	(3,8)*
8	Glycin	4,5	—	3,7
	Serin	(4,5)*	(3,0)*	(3,17)*
9	Oxyprolin	2,5	(2,0)*	4,0
10	Glutaminsäure	6,0	10,5	10,5
11	Threonin	6,5	—	—
12	nicht identifiziert	—	2,3 **	3,3 **
13	Alanin	2,5	(1,5)*	4,0
14	Prolin	(6,0)*	10,0	6,0
15	Kynurenin	—	—	1,8
	α -Aminobutters.	—	2,0	—
16	nicht identifiziert	1,0 **	—	—
17	Tryptophan	—	—	4,0
	nicht identifiziert	—	2,0 **	—
18	nicht identifiziert	1,0 **	—	—
19	Methionin	3,0	2,0	2,5
20	Valin	1,5	2,0	2,5
21	Phenylalanin	2,0	3,0	2,5
22	Isoleucin	1,8	2,0	1,7
23	Leucin	1,5	2,5	2,2
24	nicht identifiziert	2,5 **	—	—
	nicht identifiziert	—	2,3 **	1,5 **
Summenvergleich		53,8 = 1,00	57,4 1,07	79,8 1,48

als bei den Ausgangsarten und dass der Bastard wenigstens 6 dieser Stoffe in einer auffallend hohen Konzentration enthält. Dieses Ergebnis mag zunächst überraschen; es stellt jedoch keine Besonderheit dar, wenn man die starke Anreicherung von freien Aminosäuren im Bastard als Heterosiseffekt auffasst. In welchem Masse die besonderen chromosomalen Verhältnisse der Amphidiploidie an der Erhöhung des Aminosäurespiegels beteiligt sind, bedarf der weiteren Nachprüfung.

Es liegt nun nahe, das vorliegende Ergebnis mit denjenigen der eingangs erwähnten Analysen cecidogener Substanzen⁶ zu vergleichen. Bei der Untersuchung des Sekrets bzw. Exkrets, mit dessen Hilfe die Reblaus (*Phylloxera*) an der Rebe (*Vitis*) einfach gebaute Beutel- und Krebsgallen induziert, hatte es sich ergeben, dass die wirksamen Bestandteile im wesentlichen mit einem konzentrierten Gemisch aus den Aminosäuren Histidin, Lysin, Tryptophan, Glutaminsäure und Valin (die Identifizierung der beiden zuletzt genannten Substanzen war damals nicht ganz sicher) identisch sind. Diese Substanzen wirken synergistisch, wobei Tryptophan die weitaus stärkste Wirkungskomponente darstellt; die Wirkung der übrigen Substanzen beruht im wesentlichen nur auf einer Verstärkung des cecidogenen Tryptophaneffektes. Bei dem an *Nicotiana* gewonnenen Ergebnis ist nun auffällig, dass Tryptophan nur beim tumordisponierten Bastard in hoher Konzentration vorkommt. Bei *N. glauca* und *N. langsdorffii* konnte diese Aminosäure bisher nicht nachgewiesen werden. Zwar findet sich bei *N. langsdorffii* eine Verbindung, deren R_f -Wert mit demjenigen von Tryptophan übereinstimmt; doch zeigt diese Substanz nicht die für Tryptophan charakteristische Färbung. Außerdem verlief der Tryptophannachweis nach WINKLER und PETERSEN⁸ nur beim Bastard eindeutig positiv. (Im Kurvenbild kommt der hohe Tryptophangehalt nicht genügend deutlich zum Ausdruck, weil der entsprechende Ninhydrinkomplex nur schwach absorbiert.) Auch die beiden cecidogenen Aminosäuren Valin und Glutaminsäure sind in diesem Zusammenhang zu nennen; erstere Substanz tritt nur beim Bastard in relativ hoher Konzentration auf, letztere allerdings auch bei *N. langsdorffii*.

Es ist also unverkennbar, dass in der Stoffzusammensetzung der früher analysierten cecidogenen Agenzien eines Galleninseks und den beim tumordisponierten Tabakbastard in hoher Konzentration vorliegenden Aminosäuren gewisse Parallelen vorhanden sind. Wir fühlen uns deshalb in der Vermutung sehr bestärkt, dass auch die erblich bedingten Tumoren bei *Nicotiana* im wesentlichen durch Aminosäuren induziert werden.

Möglicherweise liegt hier ein allgemeineres Prinzip einer endogenen, das heisst vom Genotyp selbst verursachten Tumorinduktion vor; denn nach Untersuchungen über die erbliche Tumordisposition bei Art- bzw. Gattungsbastarden von gewissen Zahnkarpfen (Poeciliidae), die bei uns zur Zeit im Gange sind, ist das Auftreten von Tumoren offenbar ebenfalls mit einem unterschiedlichen Vorkommen bestimmter Aminosäuren korreliert.

Eine ausführliche Publikation folgt a. a. O.¹⁰.

F. ANDERS und F. VESTER

Zoologisches Institut und Institut für Organische Chemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 12. Oktober 1959.

* Hypothetische Werte, da keine Maxima ausgeprägt.
** Berechnet auf Basis der Lysinabsorption.
*** Berechnet auf Basis der Asparaginsäureabsorption.

⁸ Der erhöhte Gehalt an freiem Tryptophan wurde schon von J. H. M. HENDERSON in Zusammenarbeit mit A. E. KEHR und H. H. SMITH in Gewebekulturen beobachtet (zit. nach ⁴).

⁹ S. WINKLER und S. PETERSEN, Hoppe-Seylers Z. 231, 210 (1935). – S. WINKLER, Z. anal. Chem. 105, 303 (1936).

¹⁰ F. VESTER und F. ANDERS, Z. Biochem., im Druck.

Summary

The amphidiploid hybrid of *Nicotiana glauca* × *N. langsdorffii*, producing tumors spontaneously, contains essentially more of the following free amino acids than the initial species: cystine, histamine, oxyproline, alanine, kynurenine, tryptophane, and a non-identified ninhydrine positive substance. It is supposed that the abnormally high content of free amino acids is connected with the spontaneous formation of tumors.

Genetic and Autoradiographic Studies of Tritiated Thymidine in Testes of *Drosophila melanogaster*¹

A study on the influence of mating intensity and rate of sperm utilization upon the rate of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* is presently under way. Tritiated thymidine ($T-H^3$), a specific label for DNA in most biological systems studied (BRACHET²), is being used in conjunction with autoradiography to label those premeiotic cells which are synthesizing DNA and to follow the development of these cells to mature sperm. In addition, it is planned to use the incorporability of $T-H^3$ as an indication of the rate of entrance of cells into the premeiotic DNA synthesizing stages. This preliminary report contains information obtained in the earliest of these experiments.

Additionally, in order to gain some insight into the degree of genetic damage caused by the amounts of isotope which must be incorporated to give satisfactory autoradiographs of testicular cells, studies on the rate of production of sex-linked recessive mutations by this compound have been initiated and preliminary data on this subject, also, are herein reported.

To decrease the amount of non-radioactive nucleic acid precursors ingested so that strong autoradiographs could be obtained after a minimum feeding time, application of the isotope was not carried out in the standard fly culture medium which is rich in yeast. Instead, the isotope-containing medium was made up as follows: 0.1 ml $T-H^3$ solution (Schwarz Laboratories, Sp. Act. 1.9 c/mM) with a total activity of 100 microcuries, 0.5 ml of a 1% agar solution and 0.5 ml of a modified Eagle's tissue culture medium.

Twenty-five 16-h Canton-S larvae not identified as to sex were placed upon the above medium for a period of 4 h and then removed to standard corn meal, yeast, and sugar food. Eight of the 25 larvae died during these 4 h, while only two of 25 control larvae died. Two larval males were fixed immediately after the feeding period; three males were fixed 19 h later (39-h larvae) and the remaining four males were fixed 56 h after removal from the radioactive food (76-h larvae). All larvae were fixed in hot 45% acetic acid and imbedded in parlodion and paraffin according to the Peterfis double imbedding technique. Sections were cut at 6 μ and mounted serially. After dissolution of the paraffin and parlodion, and hydration of the sections by means of a graded ethanol series, the slides were treated with 5% trichloroacetic acid at 3–5°C for

5 min to remove any acid soluble isotope. From this point on, autoradiographs were prepared according to the stripping film technique as published by TAYLOR³.

At 16 h, the larval testes are composed entirely of spermatogonia with no evidence of any anterior-posterior developmental gradient, except for the difference in size between the apical cells and those slightly larger spermatogonia that have been proliferated from them. The testes of male larvae that were fixed immediately after the 4-h period show activity over the apical region where mitotic proliferation occurs. Also, there are some radioactive nuclei located posteriorly, indicating that very early in spermatocyte development, before the long growth stage, during which the volumes of the nucleus and cytoplasm of primary spermatocytes increase so markedly, the chromosomes are reduplicated in preparation for the meiotic divisions.

19 h following feeding (39-h larvae), there is still some activity present anteriorly but many labeled cells have moved posteriorly (Fig. 1). All nuclei of a cyst are either entirely radioactive, or completely lacking in activity, indicating that the cells of any one cyst are physiologically synchronized, at least in terms of incorporation into DNA.

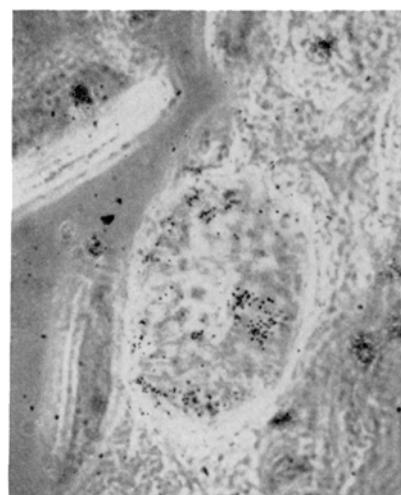


Fig. 1.—39 h larva, 19 h after removal from labeled food. $\times 850$.

56 h after removal from radioactive food (76-h larvae), radioactive primary spermatocytes may be observed in the posterior third of the gonad (Fig. 2 and 3). The radioactivity observed anteriorly derives from interstitial cells located throughout the testis.

While additional work must be carried out to establish the developmental pattern of the testis in relation to the time of DNA synthesis, it may be seen from our preliminary data that spermatocytes reduplicate their chromosomes very early during their life history and move posteriorly as additional cells are proliferated from the apical spermatogonia.

For the measurement of the mutagenic effect of $T-H^3$, the same sample of food used in the previous experiment was mixed with 1.1 ml of the standard fruit fly medium: agar, 0.8%; sugar, 5%; corn meal, 6%; yeast, 1.5%; water, 86%.

¹ Supported in part by Grant G-6097 of the National Science Foundation.

² J. H. TAYLOR in *Physical Techniques in Biological Research*, Vol. 3 (Ed. G. Oster and A. W. POLLISTER, Academic Press, N. Y. 1956), p. 545.

³ J. BRACHET, *Exp. Cell Res. Suppl.* 6, 78 (1959).