

twenty days subsequent to having received 800 r total body dose of X-irradiation. Another mass, Figure 6, appeared after fifteen days of daily applications with a saturated acetone solution of methylcholanthrene on an induced burn area. It is comprised of chlorogogen-like cells, which can be seen as a dorsal protruding mass, Figure 4. Several intracoelomic masses which resemble adenocarcinoma tissue were found after four weeks of daily methylcholanthrene applications, Figure 2. One mass in an untreated specimen, Figure 7, was discovered, upon Periodic-Acid-Schiff staining, to have mycelia, from an unidentified mycotic organism envolved throughout the tissue.

### Genetisch bedingte Tumoren und der Gehalt an freien Aminosäuren bei lebendgebärenden Zahnkarpfen (*Poeciliidae*)<sup>1</sup>

Durch die genetischen Untersuchungen von KOSSWIG (seit 1927<sup>2</sup>), GORDON (1927–1959<sup>3</sup>), HÄUSSLER (1928, 1931, 1934<sup>4</sup>) und BREIDER (seit 1936<sup>5</sup>) an lebendgebärenden Zahnkarpfen sind eine ganze Reihe von Art- und Gattungsbastarden in dieser Fischfamilie bekannt geworden, die auf Grund ihrer genetischen Konstitution Melanome bilden. Diese entstehen dadurch, dass die Makromelanophoren, die bei der reinen Species arttypische Zeichnungsflecken bilden, im Bastard abnorm wuchern. Über die endogenen stofflichen Faktoren im Bastard, die diesen Zelltyp zum Wuchern veranlassen, ist ebenso wenig bekannt wie über diejenigen, die ihn in der reinen Elternspecies am Wuchern hindern.

Nachdem nun in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass Gewebswucherungen, die gewissen Pflanzengallen zugrunde liegen, durch mehrere freie Aminosäuren verursacht werden<sup>6</sup> und dass spontan tumorbildende Artbastarde der Gattung *Nicotiana* wesentlich mehr freie Aminosäuren enthalten als die stets tumorfreien Elternarten<sup>7</sup>, lag es nahe, den Aminosäurehaushalt bei reinen Zahnkarpfenarten und deren tumorbildenden Bastarden zu untersuchen.

Wir verwendeten für diesen Zweck *Platy-poecilus maculatus*, *Xiphophorus helleri* und deren F<sub>1</sub>-Bastard, der in späteren Lebensabschnitten oft Melanome bildet, sowie drei F<sub>n</sub>R-Genotypen mit jeweils schwacher, mittlerer und starker Disposition zur Tumorbildung; ersterer F<sub>n</sub>R-Bastard bleibt normalerweise stets tumorfrei, der zweite bildet normalerweise stets mittelgrosse und der dritte starke Tumoren aus.

In Figur 1 ist der Gehalt an freien ninhydrinpositiven Verbindungen der Dorsal- und Kaudalteile dieser Fische dargestellt. Die Tiere standen mit Ausnahme der 7 Monate alten Individuen mit starker Tumordisposition (f), von denen nur gesunde Anteile verwendet wurden, noch vor der Tumorbildung.

Ein Vergleich der gefundenen Werte zeigt, dass *P. maculatus* (a) im Verlaufe der postembryonalen Entwicklung einen ziemlich konstanten Aminosäurespiegel hat, während bei *X. helleri* (b) grosse altersbedingte Unterschiede auftreten. Dabei ist die Aminosäurenkonzentration beim jungen *X. helleri* sehr hoch und fällt mit zunehmendem Alter auf einen Wert ab, der etwa demjenigen von *P. maculatus* entspricht. Ähnliche Unterschiede finden sich bei allen Bastarden. Dabei zeichnet sich die F<sub>1</sub> (c) im 2. und 3. Lebensmonat durch besonders hohe Werte aus, die jedoch im 7. Monat auf den Wert von *P. maculatus* absinken. Die Rückkreuzungsbastarde (d, e, f) haben im 2. und 3. Lebensmonat fast dieselben Aminosäurenkonzentrationen wie *X. helleri*, wobei allerdings mit der zunehmenden Tumordisposition (d < e < f) ein geringfügiger Anstieg einhergeht. Bei älteren Tieren (schwarze Säulen) ist dieser Anstieg sehr deutlich. Es zeigt sich also, dass gerade diejenigen Genotypen, die zur mittleren (e) und starken (f) Tumorbildung befähigt sind, das ganze Individualleben hindurch unter dem Einfluss ungewöhnlich hoher Aminosäurenkonzentrationen stehen.

Ramifications of the variables in irradiation produced lesions are being explored to ascertain a consistent method of inducement. Transplantability will also be sought<sup>3</sup>.

**Zusammenfassung.** Cancerogene Chemikalien oder Röntgenstrahlen verursachten am Regenwurm (*Lumbricus terrestris*) verschiedene neoplastisch aussehende Beschädigungen.

R. L. HANCOCK

Department of Biochemistry, University of Chicago (Illinois), August 22, 1961.

<sup>3</sup> The writer wishes to thank Dr. W. H. KIRSTEN for his review and impressions of the slide material.

trationen wie *X. helleri*, wobei allerdings mit der zunehmenden Tumordisposition (d < e < f) ein geringfügiger Anstieg einhergeht. Bei älteren Tieren (schwarze Säulen) ist dieser Anstieg sehr deutlich. Es zeigt sich also, dass gerade diejenigen Genotypen, die zur mittleren (e) und starken (f) Tumorbildung befähigt sind, das ganze Individualleben hindurch unter dem Einfluss ungewöhnlich hoher Aminosäurenkonzentrationen stehen.

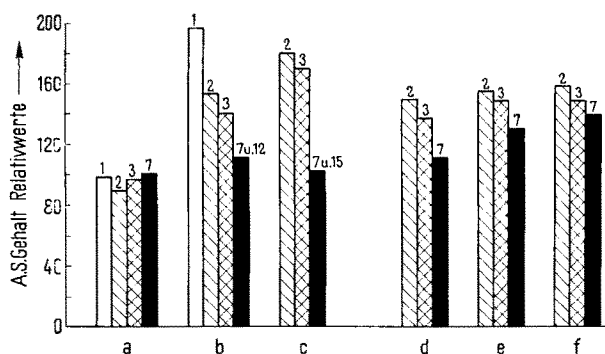


Fig. 1. Aminosäuregehalt von *P. maculatus* (a), *X. helleri* (b), deren F<sub>1</sub>-Bastard (c) und F<sub>n</sub>R-Bastarde, die keine (d), mittlere (e) und starke (f) Melanome zu bilden vermögen. – Die Zahlen über den Säulen geben das Alter der Fische in Monaten an. – 560 Messungen an 115 Tieren. Durchschnittswerte aus Extrakten mit n/100 HCl von je 0,4 mg Frischgewicht vom Dorsal- und Kaudalteil. – Abtrennen der Proteine mit Trichloressigsäure. – Ausschütteln mit Äther. – Auftragen auf S.u.S. 2043b mgl. – Beidseitiges Besprühen mit Ninhydrin. – Messen der Extinktion nach 24 h bei 578 mμ. – Umrechnen der Extinktionswerte auf Glycinbasis. – Einzelbestimmungen von a, b, d und f sind in der Tabelle aufgeführt.

<sup>1</sup> Den Herren Prof. Dr. G. DE LATTIN (Zoologisches Institut Saarbrücken) und Prof. Dr. B. EISTERT (Institut für organische Chemie Saarbrücken) sind wir für die stete Förderung dieser Arbeit zu grösstem Dank verpflichtet. Den Herren Prof. Dr. C. KOSSWIG (Hamburg), Prof. Dr. M. GORDON † (New York) und Dr. H. BREIDER (Würzburg) sind wir für viele Anregungen und die freundliche Überlassung von Zuchtstämmen sehr dankbar. – Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

<sup>2</sup> C. KOSSWIG, Z. ind. Abst.- u. Vererbungslehre 44, 253 (1927); 59, 61 (1931); Biol. Zbl. 78, 711 (1959).

<sup>3</sup> M. GORDON, Genetics 12, 253 (1927); Pigment Cell Biology (New York 1959).

<sup>4</sup> G. HÄUSSLER, Klin. Wschr. 7, 1561 (1928); Med. Klin. 27, 36 (1931); Z. f. Krebsforschung 40, 280 (1934).

<sup>5</sup> H. BREIDER, Verhandl. Deutsch. Zool. Ges. 1936, 112; Z. Zellf. mikr. Anatomie 28, 784 (1938); Strahlentherapie 88, 619 (1952).

<sup>6</sup> F. ANDERS, Exper. 14, 62 (1958); Biol. Zbl. 80, 199 (1961).

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

Im folgenden sollte geprüft werden, ob der unterschiedliche Gehalt an freien Aminosäuren auf einzelnen, mehreren oder auf der Gesamtheit dieser Verbindungen beruht. Einige Ergebnisse dieser Analysen<sup>8</sup>, die an den reinen Arten und den Rückkreuzungsgenotypen mit mangelnder (vgl. Figur 1d) und stark ausgeprägter (vgl. Figur 1f) Fähigkeit zur Tumorbildung gewonnen wurden, sind in der Tabelle aufgeführt. Alle untersuchten Tiere waren tumorfrei. Sie waren 2,5 Monate alt und befanden sich also in einem Stadium, in dem die Gesamtkonzentration der Aminosäuren bei *X. helleri* und den Bastarden noch relativ stark von derjenigen von *P. maculatus* abweicht. Dementsprechend hat *P. maculatus* (1. Spalte) ein niedriges (0,147) und *X. helleri* (2. Spalte) ein hohes Summenergebnis (0,195). Die Rückkreuzungsbastarde haben Werte, die sich demjenigen von *X. helleri* anschließen, wobei der Genotyp, der im Verlaufe der Individualentwicklung starke Tumoren bildet (4. Spalte), gleichzeitig auch das höchste Summenergebnis (0,254) zeigt. Die Summenergebnisse dieser Tabelle stimmen also in ihren Relationen gut mit denjenigen aus Figur 1 überein.

Bei einem Vergleich der Einzelwerte von *P. maculatus* (1. Spalte) und *X. helleri* (2. Spalte) fällt zunächst auf, dass das unterschiedliche Summenergebnis im wesentlichen dadurch zustande kommt, dass letzterer mehr Glycin, Histidin, Lysin, Arginin und Tryptophan enthält; letztere Substanz liess sich bei *P. maculatus* nicht nachweisen. Es handelt sich hierbei zumeist um solche Verbindungen, die bei beiden Arten in relativ hoher Konzentration vorliegen. Die übrigen Aminosäuren, die in der Mehrzahl in relativ niedriger Konzentration vorhanden sind, haben bei beiden Genotypen entweder gut übereinstimmende Werte oder das Verhältnis ist zugunsten von *P. maculatus* verschoben.

Die Werte, die an Rückkreuzungsbastarden, die nicht zur Tumorbildung fähig sind (3. Spalte), gewonnen wurden, schliessen sich teils mehr an diejenigen von *X. helleri*

teils mehr an diejenigen von *P. maculatus* an. Auffallend ist der sehr hohe Glycin-Wert, der nur noch von Fischen mit einer sehr starken Tumorbildungspotenz übertroffen wird. Die Konzentrationen von Histidin und Lysin nehmen eine Mittelstellung ein. Der Argininwert ist auffallend niedrig.

Die Aminosäurenkonzentrationen der Rückkreuzungsbastarde, die zur Ausbildung starker Melanome disponiert sind (4. Spalte), sind im Durchschnitt sehr hoch. Dabei sind oft gerade diejenigen Substanzen stark erhöht, die durchwegs in relativ geringer Konzentration vorliegen (zum Beispiel Threonin, Alanin, Valin, Leucin). Die beiden stets stark vertretenen Verbindungen Glycin und Histidin haben ebenfalls relativ sehr hohe Werte; doch schliesst sich der Glycinwert demjenigen des stets tumorfreien Rückkreuzungsbastards an, und der Wert von Histidin liegt mit 0,060 noch unter demjenigen der reinen Art *X. helleri*, der mit 0,068 gemessen wurde. Auch der Arginin-Wert (0,008) liegt noch unter demjenigen von *X. helleri* (0,015). Das hohe Summenergebnis von 0,254 beruht also auf durchschnittlich sehr hohen Werten, wobei hier – abweichend von den anderen Genotypen – vor allen Dingen Substanzen mit an sich geringer Konzentration relativ stark erhöht sind.

Das Analysenergebnis von Tumoren, die wir vergleichsweise untersucht haben (Tabelle, letzte Spalte), weicht von demjenigen der gesunden Fische stark ab, und selbst diejenigen Rückkreuzungsbastarde, die diese Tumoren in späteren Stadien erzeugen (Tabelle, vorletzte Spalte),

<sup>8</sup> Bei der Bestimmung der Aminosäuren hat uns die Firma ETO-Karlsruhe in dankenswerter Weise unterstützt.  
<sup>9</sup> D. H. SPACKMANN, W. H. STEIN und ST. MOORE, Fed. Proc. 15, 358 (1956).  
<sup>10</sup> K. HANNIG, Clin. chim. Acta 4, 51 (1959).  
<sup>11</sup> S. WINKLER und S. PETERSEN, Hoppe-Seylers Z. 231, 210 (1935).

Freie Aminosäuren in Fischen (Einzelheiten im Text)

A. S.*	<i>P. maculatus</i>	<i>X. helleri</i>	R-Bastarde aus Figur 1d stets tumorfrei	R-Bastarde aus Figur 1f noch tumorfrei	Tumoren von älteren R- Bastarden aus Figur 1f
Asparaginsäure	0,006	0,002	0,002	0,005	0,014
Threonin	0,006	0,003	0,004	0,008	0,006
Serin	0,011	0,010	0,010	0,013	0,010
Glutaminsäure	0,010	0,011	0,010	0,013	0,034
Prolin	0,010	0,006	0,012	0,008	Spur
Glycin	0,023	0,032	0,056	0,058	0,024
Alanin	0,010	0,013	0,014	0,025	0,022
Cystin	0,003	0,001	0,001	0,001	0,003
Valin	0,004	0,003	0,003	0,009	0,005
Methionin	0,002	—	—	—	Spur
Isoleucin	0,002	0,002	0,002	0,004	0,004
Leucin	0,004	0,004	0,002	0,008	0,006
Tyrosin	0,003	0,002	0,002	0,005	Spur
Phenylalanin	0,003	0,002	0,002	0,004	Spur
Dopa	—	—	—	—	—
Histidin	0,036	0,068	0,049	0,060	0,020
Lysin	0,007	0,014	0,009	0,017	0,014
Histamin	—	—	—	—	0,004
Oxylysin	Spur	—	—	—	0,004
Arginin	0,007	0,015	0,002	0,008	0,009
Tryptophan <sup>b</sup>	—	0,007	0,003	0,008	0,009
	0,147	0,195	0,183	0,254	0,188

\* Prozentuale Anteile von Frischgewicht; Präparation der Extrakte wie bei den Gesamtbestimmungen (Figur 1); Einzelbestimmung erfolgte nach SPACKMANN, STEIN und MOORE<sup>9</sup> in einer Apparatur, wie sie HANNIG<sup>10</sup> angibt. — <sup>b</sup> Bestimmung nach WINKLER und PETERSEN<sup>11</sup> mit anschliessender spektralphotometrischer Auswertung.

haben ein ganz anderes Aminosäurenmuster. Das Summenergebnis (0,188) ist sehr niedrig. Auffallend sind die hohen Werte von Asparaginsäure (0,014) und Glutaminsäure (0,034). Ferner ist bemerkenswert, dass Histamin und Oxylysin nur beim Tumor in messbaren Mengen auftreten, während sie im gesunden Fisch zumeist nicht einmal nachweisbar sind. Ebenso auffallend ist aber auch, dass Glykokoll und Histidin sowie Prolin, Tyrosin und Phenylalanin stark vermindert sind bzw. nur in Spuren auftreten. Da Tyrosin und Phenylalanin (ebenso wie Dopa) wahrscheinlich mit der Melaninbildung, die im Tumor extrem gesteigert ist, zusammenhängen, wird deren fast vollständiger Schwund möglicherweise dadurch verursacht, dass diese Verbindungen sogleich nach ihrem Auftreten im Aminosäurenpool in Melanin umgesetzt werden. Der Schwund von Prolin, Glycin und Histidin lässt sich hingegen nicht leicht mit der Melaninbildung in Zusammenhang bringen. Hier muss bei späteren Untersuchungen geprüft werden, ob diese drei Substanzen in einem grösseren Ausmass als die übrigen an der Proteinbildung des Tumors beteiligt sind.

Im ganzen hat sich also gezeigt, dass die unverkennbare Korrelation, die zwischen der Disposition zur Tumorbildung und dem Aminosäuregehalt besteht, im wesentlichen nicht auf der Konzentration einzelner, sondern vieler Verbindungen beruht.

Im folgenden sollte nun geprüft werden, ob diese Korrelation zufällig ist und lediglich auf verschiedenen und voneinander unabhängigen Phänomenen des Bastard-Genoms beruht, oder ob hier ursächliche Zusammenhänge vorliegen.

Wir haben deshalb die Versuchstiere auf Grund osmoregulatorischer Erwägungen, wie sie von KAVANAU<sup>12</sup> und FLORKIN<sup>13</sup> in einem anderen Zusammenhang angestellt wurden, in verdünntes Meerwasser von 0,25 bzw. 0,50% Salzgehalt überführt. Hierdurch erhöht sich der Aminosäurespiegel der Tiere bereits nach wenigen Stunden, erreicht nach 7 Tagen ein Maximum und stellt sich dann auf eine konstante Höhe ein. Später wurde geprüft, ob die genetisch bedingte Tumorbildung hierdurch beeinflusst wird. Dabei ergab sich das folgende Bild:

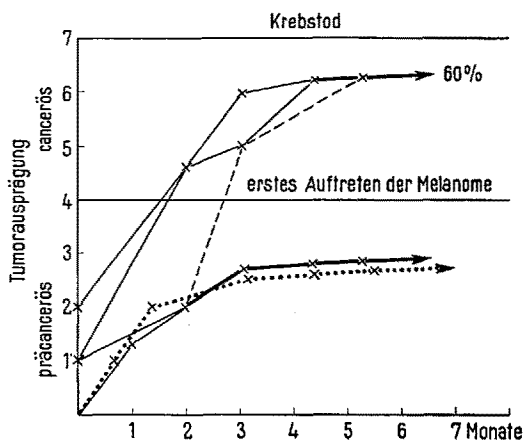


Fig. 2. Auslösung und Förderung der Tumorgenese bei Jungfischen, deren Aminosäuregehalt im Ei- und Embryonalstadium durch Meerwassereinwirkung auf das Muttertier (38.-19. Tag: 0,25% Salzgehalt; 19.-8. Tag: 0,5%; 8.-1. Tag vor der Geburt: 0,25%) erhöht war ( $n = 25$ ). - Abszisse: Alter der Tiere; Ordinate: Klassen der Tumorausprägung während der präcancerösen (1-4) und cancerösen (4-7) Phase. Die Dicke der Linien gibt die prozentualen Anteile der Tiere an: — = ca. 50%; --- = ca. 25%; ---- = Ausnahmen; ..... = Kontrollen (ältere Geschwister,  $n = 56$ ). - Diese Fische sind genetisch identisch mit den in Figur 1d und in der Tabelle, 3. Spalte, aufgeführten.

Bei den reinen Arten kann weder bei 0,25% noch bei 0,50% Salzgehalt des Kulturwassers eine Tumorbildung ausgelöst werden. Demgegenüber wurde bei den Rückkreuzungsbastarden schon nach einem ca. 3monatigen Aufenthalt in Meerwasser von 0,25% Salzgehalt eine vorzeitige und gesteigerte Tumorbildung beobachtet, wobei bemerkenswert ist, dass auch diejenigen Rückkreuzungsbastarde, die bei der normalen Kultur in Süßwasser stets tumorfrei bleiben, starke Melanome auszubilden vermögen. Das verdünnte Meerwasser vermag also die Aminosäurenkonzentration zu erhöhen und dadurch offenbar die Tumorbildung auszulösen und zu steigern.

Um den möglichen Einwand, dass der Einfluss des verdünnten Meerwassers auf die Tumorbildung nicht auf dem veränderten Aminosäurehaushalt, sondern auf direkter Ätzwirkung beruhe, zu entkräften, haben wir ältere trüchtige ♀♀ von *X. helleri*, die Nachkommen mit jeweils mangelnder, schwacher und starker Disposition zur Tumorbildung gebären sollten, vorübergehend in verdünntes Meerwasser gesetzt, bei einem Teil der Tiere den Aminosäuregehalt des Ovars und der Embryonen gemessen und beim Rest die Tumorbildung der Würfe, die vor und nach der Salzbehandlung der Muttertiere im Süßwasser geboren und dort gezüchtet wurden, miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Salzeinwirkung nicht nur den Aminosäurespiegel des Kaudal- und Dorsalteiles der Muttertiere, sondern auch denjenigen des Ovars und der Embryonen erhöht. Gleichzeitig werden die Nachkommen, die zur Zeit der Salzeinwirkung auf das Muttertier im Ei- und Embryonalstadium vorliegen, so für die Tumorbildung vorbereitet, dass sie oft schon mit relativ grossen Melaninflecken geboren werden und in den ersten drei Lebensmonaten durch eine wesentlich verstärkte Tumorgenese auffallen.

In Figur 2 ist ein Beispiel von 16 grundsätzlich übereinstimmend verlaufenen Versuchen dargestellt, wobei hier besonders instruktiv ist, dass 60% der Versuchstiere Tumoren ausbildeten, wozu diese Fische normalerweise überhaupt nicht in der Lage sind.

Es hat sich also gezeigt, dass eine Erhöhung des Aminosäurespiegels mit einer Förderung der Tumorgenese positiv korreliert ist, und es bestehen unseres Erachtens keine Bedenken, bei unserem Versuchsobjekt ein ursächliches Abhängigkeitsverhältnis zwischen der genetischen Disposition zur Tumorbildung und dem Gehalt an freien Aminosäuren anzunehmen.

Eine ausführliche Publikation ist im Druck<sup>14</sup>.

**Summary.** The  $F_1$ - and  $F_{2R}$ -hybrids of *Platypleurodon maculatus* and *Xiphophorus helleri* (Poeciliidae), producing melanomata spontaneously, contain essentially more free amino acids than the initial species. Further experiments show that the abnormally high content of free amino acids is connected with the spontaneous formation of tumors.

F. ANDERS, F. VESTER,  
K. KLINKE und H. SCHUMACHER

Zoologisches Institut und Institut für organische Chemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken (Deutschland), 5. September 1961.

<sup>12</sup> J. L. KAVANAU, J. exp. Zool. 122, 285 (1953).

<sup>13</sup> M. FLORKIN, 6. Colloquium d. Ges. f. physiol. Chemie (Mosbach, Baden, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1956).

<sup>14</sup> F. ANDERS, F. VESTER, K. KLINKE und H. SCHUMACHER, Biol. Zbl., im Druck.