

resulted when acetone was painted for 10 weeks followed by the carcinogen. The number of tumour-bearing mice after 12 weeks' hydrocarbon application was 18 out of 35 (copper pretreatment) and 8 out of 30 (acetone pretreatment). The  $\chi^2$  test showed significance at the 5% level. When the copper pretreatment was followed by 5 weeks' acetone treatment before the hydrocarbon was applied, there was no such enhancement of tumour yield (13 out of 35 after 12 weeks' DMBA treatment, not significant at the 5% level). Assays showed that the decrease in protein bound copper in the skin after the initial CuAc treatment was independent of subsequent treatment, whether with DMBA directly or by DMBA after an intervening period of acetone. Hydrocarbon binding occurred more readily after the intervening acetone treatment than it did when DMBA applications followed directly after the copper treatment (Figure 2). It will be seen from this Figure that in experiment 6, a single application of DMBA sufficed to give a virtually identical value to that resulting from three applications under the conditions of experiment 5.

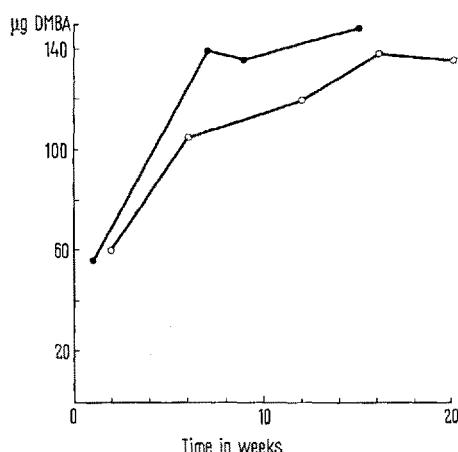


Fig. 2. Skin protein bound hydrocarbon, expressed as  $\mu\text{g}$  DMBA per 100 mg nitrogen, resulting from treatment with DMBA following treatment for 10 weeks with CuAc (○) and 10 weeks CuAc then 5 weeks acetone (●). Abscissa zero is the start of DMBA applications.

**Conclusions.** Copper acetate in acetone solution is not carcinogenic under the test conditions, nor is it a potentiating or an initiating agent. It only gives increased tumour yields when it is applied at the same time as the carcinogen (FARE<sup>1</sup>) or when the two chemicals are present in the skin at the same time as in experiment 5.

When the hydrocarbon was given first (experiment 2) there was no potentiation although these conditions were met. This may be explained by suggesting that there may have been an insufficiency of hydrocarbon present during the copper applications or that there was a sufficient amount that did not persist for a sufficient time.

SALAMAN<sup>4</sup> advocated the use of croton oil for detecting the action of substances weakly carcinogenic or non-carcinogenic for the skin. In an attempt to confirm the findings that copper acetate was not carcinogenic, and to check that the enhanced tumour production in experiment 5 was not due to a slight carcinogenicity of CuAc, 20 mice were treated with CuAc solution for 10 weeks and then with croton oil solution for 60 weeks. Three tumours appeared in two animals whilst three mice from a control group of 20 treated with croton oil throughout developed tumours. This experiment therefore confirmed the non-carcinogenicity of copper acetate<sup>5</sup>.

**Résumé.** Une solution de l'oxyacétate de cuivre n'est pas cancérogène pour la peau de la souris blanche. L'acétate n'est ni un 'initiator' ni un 'promoter' pour la cancérisation par 9,10-diméthyl-1,2-benzanthracène. Cependant, le traitement des animaux avec l'acétate pendant 10 semaines puis avec l'hydrocarbure augmente la production des tumeurs.

G. FARE

Cancer Research Laboratories, Department of Pathology, Medical School, Birmingham (England), March 19, 1965.

<sup>4</sup> M. H. SALAMAN, Ciba Foundation Symposium on Carcinogenesis (1959), p. 70.

<sup>5</sup> These investigations were carried out with the support of the Birmingham branch of the British Empire Cancer Campaign.

#### PRO EXPERIMENTIS

#### Purification chromatographique d'une préparation de thymus douée d'activité hormonale

En son temps une méthode d'extraction a été décrite qui permet d'obtenir du thymus de veau une préparation<sup>1,2</sup> capable de supprimer les conséquences de la thymectomie chez le cobaye et le rat. On décrira ici une méthode de purification chromatographique de cette préparation.

L'activité biologique a été estimée à l'aide d'une méthode<sup>3,4</sup> basée sur la propriété de l'extrait de thymus de supprimer la stimulation de la créatinurie par la thyroxine chez les cobayes thymi-thyropédrives castrés. Ceux-ci

éliminent spontanément 0,5-0,7 mg de créatine/100 g/24 h; 24 h après une injection de 10  $\mu\text{g}$  de thyroxine par 100 g de poids vif de l'animal, le taux d'excrétion s'élève à 2,0-3,5 mg/100 g/24 h. On considère que l'effet de la thyroxine est supprimé par l'injection simultanée d'extrait de thymus si le taux moyen d'excrétion correspond à celui des castrats thymi-thyropédrives non traités chez

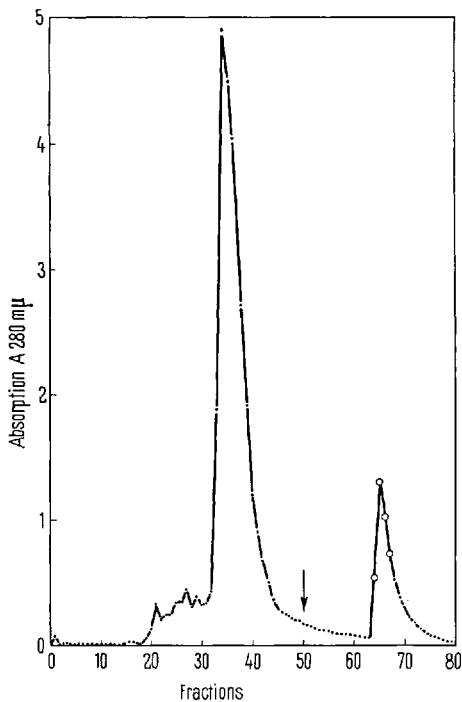
<sup>1</sup> N. A. BEZSONOFF et J. COMSA, Ann. Endocrinol. 19, 222 (1958).

<sup>2</sup> J. COMSA, *Physiologie et physiopathologie du thymus* (Paris 1959).

<sup>3</sup> J. COMSA, Bull. Soc. Chim. biol. 31, 1035 (1949).

<sup>4</sup> J. COMSA, Am. J. Physiol. 166, 550 (1951).

quatre animaux sur quatre, et si aucun taux individuel de créatinurie n'atteint 1 mg/100 g/24 h. On définit comme une unité cobaye (uc.) la quantité d'extrait qui dans cette épreuve suffit pour supprimer l'effet de 1  $\mu$ g de thyroxine. Pour la justification de ces conditions voir <sup>3</sup>.



Chromatographic sur colonne d'hydroxyapatite (2  $\times$  25 cm) d'un extrait de thymus<sup>1,2</sup>. L'expérience a été faite à 22° et des fractions de 4,8 ml ont été collectées. Le produit a été chargé sur la colonne équilibrée avec du tampon phosphate pH 6,8, 0,001 M. Du tampon phosphate pH 6,8 0,5 M a été chargé sur la colonne en correspondance de la fraction zéro. La flèche indique la fraction en correspondance de laquelle le gradient linéaire de molarité de tampon phosphate pH 6,8 (0,5-1,5 M; 250 + 250 ml) a été mis en œuvre. Les fractions centrales du deuxième pic (points encerclés) ont été utilisées pour les mesures d'activité biologique.

Après de nombreux essais préliminaires, on a adopté pour la purification chromatographique de l'extrait de thymus le procédé suivant. (1) L'extrait de départ (1 g) dont l'activité est égale à 190 uc./mg est dissous à 10% dans l'eau distillée et passé sur une colonne de Séphadex G 25 équilibrée avec du tampon phosphate 0,001 M pH 6,8. On sépare une fraction principale qui a une activité supérieure d'environ 10% à celle du produit de départ, d'une petite fraction retardée par la colonne, biologiquement inactive, et dont l'absorption à 260 mμ est plus élevée que celle à 280 mμ. (2) La fraction principale est chargée sur une colonne d'hydroxyapatite équilibrée avec du tampon phosphate 0,001 M, pH 6,8. Une certaine quantité de produit n'est pas retenue sur la colonne dans ces conditions. Une grande quantité de matériel inactif est élueée ensuite par le tampon phosphate 0,5 M, pH 6,8. Enfin on élue une fraction active avec un gradient de molarité (0,5 à 1,5 M) de tampon phosphate, pH 6,8 (Figure). Les fractions centrales du pic sont passées séparément sur Séphadex G 25 équilibré avec tampon phosphate 0,001 M pH 6,8 et lyophilisées. Le rapport activité biologique/densité optique à 280 mμ est le même pour les quatre fractions. L'activité biologique est de 926 uc./mg. Des résultats préliminaires obtenus avec ce produit purifié indiquent qu'il s'agirait d'un glycopeptide.

Il est important de signaler que le produit purifié montre toutes les propriétés substitutives du thymus qui sont possédées par l'extrait de départ<sup>6</sup>.

**Summary.** A chromatographic purification procedure is described for a biologically active thymus extract. The purified product shows all the thymus-substituting properties of the initial extract.

G. BERNARDI et J. COMSA

Centre de Recherches sur les Macromolécules, Strasbourg (France) et Faculté de Médecine, Université de la Sarre, Homburg (Allemagne), le 2 février 1965.

<sup>5</sup> J. COMSA, en préparation.

## Eine einfache Methode zur Abtrennung von Nucleotiden aus salzreichen Lösungen

Die chromatographische Trennung von Nucleotiden an Ionenaustauschern<sup>1</sup> ist oft nur dann erfolgreich, wenn der pH des Gradienten in den pK<sub>B</sub>-Bereich der Amino-gruppen der Nucleobasen fällt und das Salz des Gradienten möglichst dissoziiert ist. Gute Resultate wurden mit LiCl/HCl-Gradienten an Dowex-2 bei der Trennung von AMP<sup>2</sup>, ADP und ATP<sup>3</sup> und mit LiCl/Li-acetat-Gradienten bei der Trennung der Desoxyribooligoadenylsäuren an DEAE-Cellulose (in der Chloridform) erhalten<sup>4</sup>.

Die Wirksamkeit dieser Methode war bislang dadurch eingeschränkt, dass das Nucleotidmaterial von den gleichzeitig anfallenden erheblichen Mengen an anorganischem Salz nur zeitraubend und oft unter grossen Verlusten mit Hilfe der Absorption an Aktivkohle<sup>5</sup> oder Umfällen der

Nucleotid-Lithiumsalze aus Methanol mit Aceton<sup>3</sup> getrennt werden konnte.

<sup>1</sup> W. E. COHN, *The Nucleic Acids*, vol. I, Kapitel 6.

<sup>2</sup> Abkürzungen: AMP = Adenosin-5'-phosphat; ADP = Adenosin-5'-diphosphat; ATP = Adenosin-5'-triphosphat; TpT = Thymidylyl-(3'-5')-thymidin; (pT)<sub>5</sub> = 5'-O-Phosphoryl-thymidylyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-thymidylyl-(3'-5')-thymidin etc. – Näheres über das System der abgekürzten Formelwiedergabe siehe H. G. KHORANA, *Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate of Biological Interest* (John Wiley & Sons Inc., New York 1961), Kapitel 5.

<sup>3</sup> M. SMITH und H. G. KHORANA, *J. Am. chem. Soc.* 80, 1141 (1958).

<sup>4</sup> R. K. RALPH und H. G. KHORANA, *J. Am. chem. Soc.* 83, 2926 (1961).

<sup>5</sup> D. LIPKIN, P. T. TALBERT und M. COHN, *J. Am. chem. Soc.* 76, 2871 (1954).