

# Die Beeinflussung des Wachstums des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus durch native und mit ultraviolettem Licht bestrahlte heterologe Desoxyribonucleinsäure

VON RUDOLF K. ZAHN und EKKEHARD TIESLER \*

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. 18 b, 523—525 [1963]; eingegangen am 8. November 1962)

1. Deoxyribonuclease activity has been determined by viscosimetry in the serum of the Ehrlich Ascites in the mouse to be equivalent to  $2,3 \pm 0,7 \cdot 10^{-6}$  g/ml of crystalline beef pancreas DNase.
2. Injections of heterologous deoxyribonucleic acid into the Ehrlich Ascites tumor under specified conditions does not alter tumor development.
3. The same DNA however becomes strongly inhibitory for tumor growth after UV irradiation.
4. Possible implications are discussed.

Desoxyribonucleinsäuren (DNA) besitzen neben ihren speziellen erbbiologischen Aktivitäten<sup>1-4</sup>, die mit ihrem besonderen Informationsinhalt zusammenhängen, noch andere, allgemein biologische<sup>5-8</sup>. Zu diesen sind offenbar auch die von H. v. EULER<sup>1, 10</sup> beschriebenen zu zählen. Dieser Autor fand eine Hemmung des Jensen-Sarkoms der Ratte nach Applikation von heterologer DNA.

Dabei könnte der DNA-Zusatz eine Hemmung des durch Desoxyribonuclease (DNase) bedingten Wachstums bewirken. Solche Effekte lassen sich am Seeigel- und Froschei nachweisen, wo DNase-Zusatz eine Steigerung der Zellteilungsrate erzeugt, die durch DNA-Zusatz aufzuheben ist<sup>11</sup>.

In dieser Arbeit berichten wir über die Bestimmung der DNase-Aktivität im Überstand des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus, die Wirkungen von DNA-Injektionen und über die Wirkung von DNA, die durch UV-Bestrahlung verändert wurde.

## Methodik und Ergebnisse

### A) Bestimmung der DNase-Aktivität in der Ascitesflüssigkeit

Diese wurde viscosimetrisch vorgenommen.

1. *Die Viscosimeter*: Es handelte sich um modifizierte Ostwald-Typen: Erforderliche Flüssigkeitsmenge

\* Ein Teil dieses Beitrages stammt aus einer Dissertation (E. T.).

<sup>1</sup> W. D. Mc ELROY u. B. GLASS, The Chemical Basis of Heredity, Johns Hopkins Press, Baltimore [1957].

<sup>2</sup> E. RIES u. M. GERSCH, Biologie der Zelle, Teubner, Leipzig [1953].

<sup>3</sup> D. MAZIA, Growth 13 Suppl. 6 [1949].

<sup>4</sup> R. BRIGGS u. T. J. KING, J. exp. Zoology 122, 485 [1953].

<sup>5</sup> The viruses, Academic Press, Inc. New York [1959].

<sup>6</sup> J. LEDERBERG, E. LEDERBERG, N. D. ZINDER u. E. R. LIVELY, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. 16, 413 [1951].

<sup>7</sup> A. WACKER, 9. Colloq. Ges. f. Physiolog. Chemie, Chemie

1,5 ml, Wasserauslaufzeiten 100 sec, Kapillarlängen 300 mm, Druckhöhe 150 mm Wassersäule. Der Höhenunterschied zwischen den Eichmarken betrug 10 mm (dies entspricht einer Änderung des treibenden Druckes von ca. 7%).

2. *Der Testansatz*: Es wurde eine hochmolekulare Forellen-DNA<sup>12</sup> verwendet, die in Trispuffer 0,02-m. pH 7,4 zu 0,1% gelöst war. Die DNase-Aktivitäten wurden mit kristalliner DNase I aus Rinderpankreas\* verglichen und als Gewichtsäquivalent hierauf bezogen.

Testansatz zur DNase-Bestimmung:

Trispuffer 0,02-m., pH 7,4; Mg<sup>2+</sup> (als MgCl<sub>2</sub>) 0,05-m.; Ca<sup>2+</sup> (als CaCl<sub>2</sub>) 0,005-m.; DNA 0,25 mg/ml.

Die spezifische Viskosität liegt in diesem Ansatz bei 1.

Die DNase-Aktivität wurde in 5 Proben einer Mischung von 72 Ascitesseren — 14 Stdn. nach der Punktion — bestimmt und gefunden, daß sie der Aktivität einer Lösung kristalliner DNase I von einer Konzentration von  $2,3 \pm 0,7 \cdot 10^{-6}$  g/ml entspricht.

Bei der Bestimmung war der Ascites mindestens auf das 50-fache verdünnt worden. Dies ist im Hinblick auf mögliche Inhibitorwirkung in konzentrierten Lösungen zu berücksichtigen<sup>13</sup>.

### B) Die Wirkung von DNA-Injektionen auf den Ascites-Tumor

20 männliche NMRI-Mäuse\*\* mit einem Gewicht von  $24,0 \pm 1,5$  g erhielten nach einer Eingewöhnungszeit von 6 Tagen je 0,2 ml Ascites einer seit 10 Tagen den Tumor tragenden Maus, entsprechend einer Zellzahl

der Genetik. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg [1959].

<sup>8</sup> G. D. GUTHRIE u. R. SINSHEIMER, J. molecular Biol. 2, 297 [1960].

<sup>9</sup> H. v. EULER, Dtsch. med. Wschr. 85, 1911 [1960].

<sup>10</sup> H. v. EULER, Der Krebsarzt 15, 97 [1960].

<sup>11</sup> G. KIEFER, R. KIEFER, G. ZAHN u. R. K. ZAHN, Biochem. Z. 334, 49 [1961].

<sup>12</sup> D. LANG, A. KLEINSCHMIDT u. R. K. ZAHN, Proc. Eur. Reg. Conf. on Electr. Microsc. Delft 1960, Vol. II.

\* Fa. Worthington, Biochemical Corp., Freehold, N.J., USA.

<sup>13</sup> H. H. HENSTELL u. R. J. FREEDMAN, Cancer Res. 12, 341 [1952].

\*\* Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover-Linden.

von  $3 \cdot 10^7$  Tumorzellen, ohne Zusätze. Bei einer Standarddiät\* und optimal vitaminisiertem Trinkwasser wurden die Tiere auf Torf in einem Makrolonkäfig gehalten, der alle 2 Tage gewechselt wurde. Die Mäuse waren insbesondere frei von Ektromelie\*\*.

Am 2. Tag wurden die Tiere statistisch gegriffen und in zwei Gruppen zu je 10 sortiert. Eine Gruppe (Kontrollen) erhielt je Maus 1 ml einer physiologischen sterilen Kochsalzlösung, die andere (Testtiere) je einen ml einer Lösung von 3 mg DNA in 0,9-proz. NaCl.

Die Tiere wurden doppelt gezeichnet.

Am 4., 6. und 8. Tag nach Versuchsbeginn wurden die Injektionen wie oben wiederholt.

Abb. 1 gibt den Verlauf der Kurven des gemittelten Körpergewichtes der Tiere eines solchen Versuches wieder.

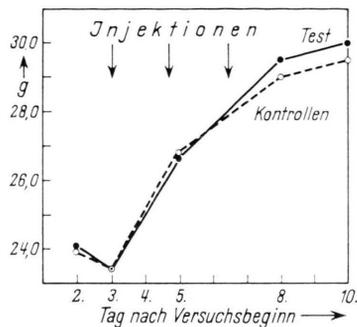


Abb. 1. Gewichtskurven der Test- und Kontrolltiere nach 4-maliger Injektion von 1 ml einer Lösung von 3 mg nativer DNA pro ml, bzw. 1 ml steriler phys. NaCl-Lösung. Impfung mit  $3 \cdot 10^7$  Tumorzellen am 1. Tag.

Nach Abstoppen des Versuches am 10. Tag des Versuchsablaufs wurden die Ascitesmengen von Test- und Kontrolltieren ermittelt und jeweils das Zellsedimentvolumen bestimmt. Das Zellsedimentvolumen wurde mit einer Mikrohämatokrit-Zentrifuge\*\*\* bestimmt.

In Tab. 1 sind Ascites- und Zellsedimentvolumina aufgeführt. Wir fanden bei der Injektion von nativer DNA, selbst bei mehrfacher Wiederholung des Versuches keine Wachstumshemmung des Ascites-Tumors.

### C) Die Wirkung von Injektionen von uv-bestrahlter DNA auf den Ascites-Tumor

1. *Bestrahlung nativer DNA mit UV-Licht*: Eine Lösung von 3 mg/ml Forellen-DNA wurde im Abstand von 60 mm 6 min lang mit einer Quecksilber-Niederdrucklampe vom Typ NN 30/89\*\*\*\* bestrahlt. Die Schichtdicke der DNA-Lösung wurde bei der Bestrahlung bei 2,5 mm gehalten.

\* Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover-Linden.  
\*\* Hier haben wir dem Institut für Zoonosenforschung Frankfurt, Herrn Prof. Dr. SCHOOP und Herrn Dr. WACHENDÖRFER

2. *Wirkung der uv-bestrahlten DNA auf den Ascites-Tumor*: Bei den unter B genannten Versuchsbedingungen, hier aber bei einer Gesamtanzahl von 30, erhielten die Testtiere am 2., 4., 6. und 8. Tag nach Versuchsbeginn je 1 ml der uv-bestrahlten DNA-Lösung i.p. injiziert, die Kontrollen das Äquivalent physiologischer steriler NaCl-Lösung.

	Testtiere			Kontrolltiere			
	AV	ZSV	AV × ZSV	AV	ZSV	AV × ZSV	
1	10,5	16,0	168,0	1	7,8	17,0	132,6
2	8,1	3,0	24,3	2	4,6	19,0	87,4
3	3,8	13,0	49,4	3	4,8	22,0	105,6
4	7,0	7,0	49,0	4	1,2	3,0	3,6
5	3,9	13,0	50,7	5	9,5	8,0	76,0
6	4,5	9,0	40,0	6	8,2	8,0	65,6
7	6,7	8,0	53,6	7	2,3	38,0	87,4
8	3,0	8,0	24,0	8	—	—	—
9	5,2	8,0	41,6	9	—	—	—
10	—	—	—	10	—	—	—

Tab. 1. Ascitesvolumen und Zellsedimentvolumen von Test- und Kontrolltieren. AV bedeutet das Ascitesvolumen in ml. ZSV bedeutet Zellsedimentvolumen in % des Ascitesvolumens. — bedeutet, daß kein Ascites nachweisbar war.

Die Gewichtskurven sind in Abb. 2 wiedergegeben. In Tab. 2 werden Ascitesvolumina und die jeweiligen Zellsedimentvolumina aufgeführt. Es zeigt sich also in diesem Falle eine hochsignifikante Hem-

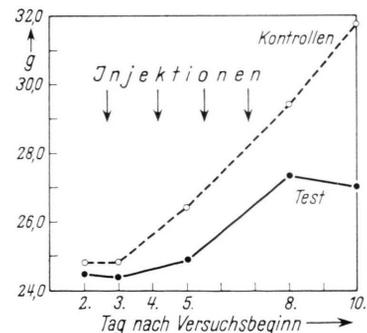


Abb. 2. Gewichtskurven von Test- und Kontrolltieren entsprechend Abb. 1. Hier erhielten die Testtiere bei 4-maliger Injektion 1 ml der uv-bestrahlten DNA.

mung der Tumorentwicklung bei den Tieren, die mit UV-Licht bestrahlte DNA erhalten haben.

Die statistische Sicherung des Gewichtsunterschiedes zwischen K und T mittels *t*-Test:

Ablehnung der Nullhypothese mit  $t = 3,69$   
für  $p = 0,001$ .

für die Kontrollen der von uns verwendeten Tiere zu danken.

\*\*\* Fa. Hawksley a. son, London.  
\*\*\*\* Quarzlampengesellschaft, Hanau.

	Testtiere				Kontrolltiere		
	AV	ZSV	AV × ZSV		AV	ZSV	AV × ZSV
1	2,8	34,0	95,2	1	1,0	56,0	56,0
2	4,6	6,5	29,9	2	6,4	24,5	156,8
3	6,1	3,0	18,3	3	8,4	22,0	191,4
4	3,6	24,0	86,4	4	8,1	14,0	113,4
5	3,9	12,0	46,8	5	7,0	18,0	126,0
6	4,0	3,0	12,0	6	3,9	22,5	87,8
7	2,4	7,5	18,0	7	5,3	18,5	98,1
8	3,3	6,5	21,5	8	6,0	21,0	126,0
9	—	—	—	9	4,9	33,5	164,2
10	—	—	—	10	4,2	30,0	126,0
11	—	—	—	11	4,9	33,0	161,7
12	—	—	—	12	3,6	27,0	97,2
13	—	—	—	13	—	—	—
14	—	—	—	14	—	—	—
15	—	—	—	15	+	+	+

Tab. 2. Ascites- und Zellsedimentvolumen von Test- und Kontrolltieren. Bedeutung der Spalten wie Tab. 1. — bedeutet, daß kein Ascites nachweisbar war. + bedeutet, daß die Maus vor Versuchsabschluß starb.

### Diskussion

Wir halten es für möglich, daß alle mitotisch aktiven Gewebe gegenüber den nicht aktiven einen erhöhten DNase-Spiegel haben und benötigen. Eine biologische Wirkung des Enzyms könnte darin gesehen werden, unter geeigneten Umständen Mitosen hervorzurufen.

Wir wollen mit den vorstehenden Versuchen prüfen, ob Hemmung solcher biologischer DNase-Aktivität dann auch Hemmung der Teilungsrates erzeugt.

Aber schon bei der Beurteilung der DNase-Aktivität von Geweben können sich Schwierigkeiten ergeben. Einmal könnten bei der Bestimmung dieser Aktivitäten in Gewebshomogenaten Aktivitäten meßbar werden, die sonst gar nicht frei sind. Zum anderen können Aktivitäten, die in vivo frei sind, nicht mehr meßbar werden, dadurch, daß Inhibitoren frei gesetzt werden. Schließlich könnten in vivo Aktivitäten infolge der Ungleichverteilung bei der Gewinnung des Homogenates gleich verteilt und somit verdünnt werden. Endlich ist es fraglich, ob gerade die in vitro gemessene DNase-Aktivität repräsentativ ist für diejenige in vivo. Diese Überlagerungen führen dazu, ein Objekt wie den Ascites-Tumor zu wählen. Es handelt sich hier um ein Gewebe mit häufigen Mitosen. Eine DNase-Aktivität ist bereits frei im

Serum meßbar. Die von uns gefundene von  $2,3 \cdot 10^{-6}$  g/ml DNase-Äquivalenten halten wir für hoch. Vergleichsweise entspricht die Aktivität im Serum der Katze als eine der höchsten in der Tierreihe einem DNase-Äquivalent von  $3 \cdot 10^{-6}$  g/ml. Im Serum der Maus und im menschlichen Serum ist nur 1/40 dieser DNase-Aktivität nachweisbar bei einer Verdünnung auf das annähernd 20-fache<sup>16</sup>.

Bei früheren Versuchen an Seeigeleiern hatten wir beobachtet, daß man durch DNase-Zusatz zu befruchteten Seeigeleiern deren Teilungsrates steigern kann. Diese Steigerung ist hemmbar durch Zusatz von heterologer oder homologer DNA.

Der Ascites-Tumor ließ sich jedoch durch Zusatz von nativer DNA unter unseren Versuchsbedingungen nicht beeinflussen. Dies kann vielerlei Gründe haben, u. a. kann die DNase-Aktivität so hoch sein, daß die applizierte DNA-Menge nicht ausreichte. Da eine solche DNA ein relativ wertvolles Material darstellt, ist von einer Dosiserhöhung abgesehen worden. Es könnte aber auch die Ascites-DNase in ihrer biologischen Wirksamkeit durch die von uns verwendete DNA nicht hemmbar sein. Und schließlich könnte durch die DNA-Spaltung unter der hohen DNase-Aktivität der Hemmeffekt hochmolekularer DNA verhindert werden. Eine der DNase-Aktivitäten scheint nach unserer Meinung darin zu bestehen, aus nativer DNA den Primer (Starter) für die DNA-Synthese durch die Polymerase zu machen. Es ist nun möglich, eine DNA herzustellen, die als ungeeignetes Substrat für diese Primerbildung der DNase wirkt, nämlich, wenn sie z. B. infolge innermolekularer Strangverklebung<sup>14, 15</sup> nicht in die sonst durch die DNase gebildeten Produkte übergeführt werden kann. Die so modifizierte DNA würde als falsches Substrat in Kompetenz zum typischen treten.

Das Zustandekommen solcher Strangverklebungen ist u. a. durch Bestrahlung mit UV-Licht beschrieben worden<sup>14, 15</sup>.

Ob es sich bei dem Effekt der uv-bestrahlten DNA um eine Potenzierung der durch von v. EULER beschriebenen Tumorphemmung von nativer DNA handelt, oder ob hier ein anderer Mechanismus zur Wirkung kommt, muß zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch offen gelassen werden.

<sup>16</sup> N. B. KURNICK, Arch. Biochem. Biophysics **43**, 97 [1953].

<sup>14</sup> R. BEUKERS u. W. BERENDS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **49**, 181 [1961].

<sup>15</sup> A. WACKER, H. DELLWEG u. D. WEINBLUM, Naturwissenschaften **47**, 477 [1960].