Androstadien-3-on (IV), das nach chromatographischer Reinigung an SiO_2 und Umkristallisieren aus n-Hexan konstant bei $80-81^\circ$ schmolz (λ_{max} : $245 \text{ m}\mu$).

In Analogie zur photochemischen Umlagerung des O-Acetyl-1-dehydro-testosterons⁴ wurde durch 20-stdg. Bestrahlen des $\Delta^{1,4}$ -Androstadien-3-ons mit UV-Licht der Wellenlänge $254 \text{ m}\mu$ das ungesättigte Keton V vom Schmelzpunkt 78° in 55-proz. Ausbeute erhalten, das bei der Hydrierung quantitativ in das gesättigte Keton VI vom Schmelzpunkt 75° überging. Durch 2-stdg. Erwärmen in Eisessig-konz. Schwefelsäure⁵ auf 95° ent-

steht aus VI in 95-proz. Ausbeute das Δ^5 - 10α -Androsten-2-on (VII) als farbloses Öl, das trotz chromatographischer Reinheit nicht kristallisierte. Bei seiner Hydrierung wird in quantitativer Ausbeute das 5β , 10α -Androstan-2-on (VIII) als Öl erhalten, das wiederum nicht zur Kristallisation zu bringen war; es ist durch das in quantitativer Ausbeute erhältliche, kristallisierte Semicarbazon vom Schmelzpunkt 233° charakterisiert.

Die Strukturen sämtlicher angegebenen Verbindungen sind durch Elementaranalysen, UV-, IR- und NMR-Spektren sowie durch ORD- bzw. CD-Kurven bewiesen.

⁴ H. DUTLER, C. GANTER, H. RYF, E. C. UTZINGER, K. WEINBERG, K. SCHAFFNER, D. ARIGONI u. O. JEGGER, *Helv. chim. Acta* **45**, 2346 [1962].

⁵ C. GANTER, E. C. UTZINGER, K. SCHAFFNER, D. ARIGONI u. O. JEGGER, *Helv. chim. Acta* **45**, 2403 [1962].

DNS-Synthese und Cytoplasma-Veränderungen bei der Leberregeneration nach Hypophysektomie

H. RABES, H. WRBA, M. EDER und H. BRÄNDLE

Pathologisches Institut der Universität München

(Z. Naturforsch. **20 b**, 607—608 [1965]; eingegangen am 11. März 1965)

Die Leberregeneration nach Teilhepatektomie, die von zahlreichen Autoren untersucht wurde, verläuft weitgehend konstant, unter der Voraussetzung, daß Versuchstiere gleichen Lebensalters verwandt und gleich große Leberanteile operativ entfernt werden¹. Nach Frühveränderungen innerhalb der ersten 6 Stdn. setzt eine gesteigerte Aktivität der für die Nucleinsäure-Synthese verantwortlichen Fermentsysteme ein². Zwischen 15 und 20 Stdn. nach Hepatektomie setzt eine starke Zunahme der DNS-Synthese ein³, der eine Zellteilungswelle folgt. Die auch autoradiographisch nachweisbare Steigerung der DNS-Synthese zeigt eine topographische Verteilung in der Form, daß DNS synthetisierende Zellen zuerst nur in der Lappchenperipherie auftreten, erst in der Folgezeit erreicht diese DNS-Synthese-Welle über die Intermediärzone die zentralen Lappchenteile. Der dabei gleichzeitig und topographisch ebenso verteilten Vakuolisierung des Cytoplasmas mit Basophilieschwund, die in eigenen Untersuchungen bestätigt werden können, wurde besondere Bedeutung für die Auslösung der Leberregeneration beigemessen⁴. Deshalb erscheint es von besonderem Interesse, daß nach Hepatektomie am hypophysektomierten Tier die DNS-Synthese und die Cytoplasma-Veränderungen anders ablaufen.

An 49 180 g schweren männlichen Ratten (Sprague-Dawley) wurde 3—5 Wochen nach Hypophysektomie (Methode nach REISS, DRUCKREY und HOCHWALD⁵) eine

$2/3$ -Resektion der Leber durchgeführt. Der Eintritt und Ablauf der DNS-Synthese in der Leber wurde durch Autoradiographie⁶ und durch Bestimmung der Veränderungen in der spezifischen Aktivität der DNS⁷ mit Hilfe von ^3H -Thymidin untersucht. Zur Bestimmung der Cytoplasma-Veränderungen wurden parallel hierzu Färbungen mit Hämalaun-Eosin und Kresylviolett durchgeführt.

Während nach Teilhepatektomie unbehandelter Ratten in der Lappchenperipherie ein autoradiographisch nachweisbarer Thymidin-Einbau zwischen 15 und 20 Stdn. eintritt, findet sich nach Teilhepatektomie in der Leber hypophysektomierter Tiere ein Thymidin-Einbau erst nach 27 bis 34 Stunden. Dieser ist ebenso wie bei der Leberregeneration nach Hepatektomie unbehandelter Tiere zuerst nur in der Lappchenperipherie nachweisbar, schreitet dann zum Zentrum fort, das nach etwa 56 Stdn. von der DNS-Synthese-Welle erreicht ist. Auch die Veränderungen im Cytoplasma der Leberzellen weisen merkbare Unterschiede gegenüber den Veränderungen bei der Leberregeneration nicht hypophysektomierter Tiere auf. 27 Stdn. nach Hepatektomie hypophysektomierter Tiere, bevor also die verzögerte DNS-Synthese-Welle einsetzt, fehlen basophile Schollen im Leberparenchym fast völlig. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß nach Hypophysektomie die Leberzellen an RNS stark verarmen⁸. Eine Cytoplasma-Vakuolisierung ist zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar. Der Mangel an basophilen Substanzen im Cytoplasma der Leberzellen bleibt auch in der Folgezeit erhalten, wenn eine autoradiographisch und biochemisch nachweisbare DNS-Synthese-Welle als Ausdruck der Leberregeneration einsetzt. Eine vergleichbare Vakuolisierung des Cytoplasmas mit topographischer Korrelation zur DNS-Synthese, wie sie in Lebern nicht hypophysektomierter Tiere eintritt, kommt hierbei nicht zustande.

¹ E. H. LEDUC, in: *The liver*, Herg. CH. ROUILLER, Academic Press, New York und London 1964.

² F. J. BOLLUM u. V. R. POTTER, *Cancer Res.* **19**, 561 [1959].

³ L. I. HECHT u. V. R. POTTER, *Cancer Res.* **16**, 988 [1956].

⁴ W. OEHLERT, W. HÄMMERLING u. F. BÜCHNER, *Beitr. pathol. Anat. allg. Pathol.* **126**, 91 [1962].

⁵ M. REISS, H. DRUCKREY u. A. HOCHWALD, *Endokrinologie* **12**, 243 [1933].

⁶ H. WRBA, H. RABES u. H. BRÄNDLE, *Naturwissenschaften* **51**, 42 [1964].

⁷ H. RABES, H. WRBA u. H. BRÄNDLE, in Vorbereitung.

⁸ H. S. DI STEFANO u. H. F. DIERMEIER, *Endocrinology* **64**, 448 [1959].

Somit zeigt sich, daß der Verlust an RNS in den Leberzellen, wie er nach Hypophysektomie eintritt, nicht automatisch eine gesteigerte DNS-Synthese bewirkt, diese tritt im Gegenteil sogar bei dem starken Reiz zur Leberregeneration durch die Hepatektomie verzögert ein. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit den Befunden von Stöcker⁹, der nach langdauernder, niedrig dosierter Thioacetamid-Zufuhr einen Abbau cytoplasmatischer Substanzen, jedoch keine gleichzeitige DNS-Synthese-Steigerung feststellte. Die bei hochdosierter Thioacetamid-Zufuhr eintretenden zentralen Leber-

nekrosen bedingen zwar eine zeitlich und topographisch gleichartige Leberregeneration wie bei der Hepatektomie, jedoch einen zeitlich verzögerten Eintritt der Cytoplasma-Veränderungen¹⁰. Eine noch weitergehende Aufhebung in der Korrelation von DNS-Synthese und Cytoplasma-Veränderung, wie sie bei der Leberregeneration nach Hepatektomie unbehandelter Tiere auftritt, findet sich unter den geänderten Ausgangsbedingungen bei der Hypophysektomie. Hier wird eine vergleichbare Cytoplasma-Vakuolisierung bei der verzögert einsetzenden DNS-Synthese fast vollkommen vermißt.

⁹ E. Stöcker, Beitr. pathol. Anatom. allg. Pathol. **129**, 247 [1963].

¹⁰ M. Eder, R. Josten u. H. Wrba, Naturwissenschaften **52**, 211 [1965].

Anreicherung des mesodermalen Induktionsfaktors durch Elektrophorese in Dextrangelen

H. TIEDEMANN, J. BORN, U. KOCHER-BECKER und
H. TIEDEMANN

Heiligenberg-Institut (Heiligenberg, Baden)

(Z. Naturforschg. **20 b**, 608—609 [1965]; eingeg. am 12. Dezember 1964)

In der Embryogenese der Wirbeltiere wird die Entwicklung des Achsensystems durch chemische Faktoren determiniert. Der mesodermale Faktor setzt die Ausbildung von Myomeren, Chorda und Pronephros in Gang. Für die Isolierung dieses Faktors, der in seiner Wirkung nicht artspezifisch ist, sind ältere (7—9 Tage) Hühnerembryonen besonders geeignet¹. Aus diesem Ausgangsmaterial sowie aus Meerschweinchen-Knochenmark² konnten mesodermal induzierende Proteinfaktionen gewonnen werden. Die Wirkung dieser Fraktionen kann am Ectoderm der Amphibiengastrula getestet werden. Das Gastrulaectoderm ist in seiner Entwicklungsrichtung noch nicht festgelegt und kann durch den mesodermalen Faktor zur Entwicklung von Muskel, Chorda und Niere veranlaßt werden³.

Aus Hühnerembryo-Extrakten erfolgte die Anreicherung auf zwei verschiedenen Wegen. Bei dem einen Verfahren werden nicht mesodermal induzierende Nucleinsäuren und Ribonucleoproteide mit Protaminsulfat abgetrennt. Bei dem zweiten Verfahren wird der Faktor mit Phenol extrahiert und aus der Phenolphase durch Fällung mit Alkohol wiedergewonnen. Die weitere Anreicherung erfolgte bei beiden Verfahren durch

Chromatographie an CM-Cellulose. Chromatographie an DEAE-Cellulose ist weniger geeignet, wie frühere Untersuchungen aus unserem Laboratorium gezeigt haben. Eine aus ganzen Hühnerembryonen oder deren „Microsomen“ gewonnene Fraktion, die durch Chromatographie an DEAE-Cellulose unter variierenden Versuchsbedingungen nicht weiter aufgetrennt werden konnte, ließ sich an CM-Cellulose in mindestens 5 Fraktionen trennen. Von diesen besaß nur eine kleine Proteinfaktion mesodermale Induktionswirkung^{4,5}.

Eine weitere Auftrennung der an CM-Cellulose chromatographisch gereinigten Fraktion konnten wir durch Elektrophorese in Dextrangelen mit niedrigem Vernetzungsgrad (Sephadex G-100) erreichen. Die Fraktion (44,4 mg in 4,4 ml) wurde auf eine Sephadex G-100-Säule (2,3·77 cm) gegeben und zunächst elektrophoretisch getrennt (23 Stdn.; 60—80 mA; 500 V; +1 °C). Als Puffer wurde 0,05-m. Phosphat pH 7,5 in 6-m. Harnstoff verwendet. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde die Säule mit dem Elektrophoresepuffer eluiert. Wie aus dem Elutionsdiagramm (Abb. 1 und Tab. 1) hervorgeht, ist die Hauptfraktion praktisch inaktiv. Fast die gesamte Aktivität wird erst nach der Hauptfraktion eluiert. Weitere Filtrationsversuche an Dextrangelen von verschiedenem Vernetzungsgrad und Elektrophoreseversuche zeigten, daß der Trenneffekt auf einer Kombination des Elektrophorese- und des Gelfiltrationseffektes beruht. Die Fraktionen II—IV wurden durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat gefällt (0,7 S; 36 Stdn.; −25 °C). Die Fällung wurde durch Dialyse gegen den Elektrophoresepuffer wieder

¹ H. Tiedemann u. H. Tiedemann, Naturwissenschaften **42**, 560 [1955].

² T. Yamada u. K. Takata, Develop. Biol. **3**, 411 [1961].

³ Die Fraktionen können an ganzen Gastrulen durch Implantation ins Blastocoel (Einsteckmethode; O. Mangold, Arch. mikroskop. Anat. u. Entwicklungsmech. **100**, 198 [1923]), oder am isolierten Ectoderm in der Gewebekultur (U. Becker, H. Tiedemann u. H. Tiedemann, Z. Naturforschg. **14 b**, 608 [1959]) getestet werden. Bei der Einsteckmethode wird das Implantat durch die Gastrulationsbewegungen gegen das ventrale Ectoderm gedrückt, in dem es Induktionen hervorrufen kann.

⁴ H. Tiedemann u. H. Tiedemann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **314**, 156 [1959]; H. Tiedemann, K. Kesselring, U. Becker u. H. Tiedemann, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **49**, 603 [1961]; H. Tiedemann, in: Biological Organization at the Cellular and Supercellular Level, S. 183, Academic Press, London-New York 1963.

⁵ Eine von Kawakami u. Jyeiri (Exp. Cell Res. **33**, 516 [1964]) kürzlich aus Hühnerembryonen durch Chromatographie an DEAE-Cellulose erhaltene und als elektrophoretisch einheitlich angesehene Fraktion stellt nach dem Ergebnis unserer früheren, oben erwähnten Versuche also nicht den reinen mesodermalen Faktor dar.