

Institut für Krebsforschung der Universität Wien
(Direktor: Prof. Dr. Dr. H. WRBA)

Stoffwechselregulatoren der Plazenta und ihre Wirkung in Normal- und Tumorzellen

VON KARL LETNANSKY

Mit 7 Abbildungen

Eingegangen am 6. Dezember 1972)

Placental regulators of cell metabolism and their effects in normal and cancer cells

Key-words: regulation of cell metabolism; separation of placental factors; cell-free protein synthesis; polyacrylamide gel electrophoresis; rat; mouse

Abstract

Problemacy: The occurrence of metabolic regulators in the placenta has been described. It was of interest to separate these regulators into individual components and to characterize these fractions further.

Material and methods: The influence of solutions from lyophilized fetal or maternal placenta on the respiration and the amino acid incorporation was investigated in Ehrlich ascites tumor cells or rat liver slices and in rat liver cell-free systems, respectively.

Fractionation of placental extracts on Sephadex G-100: Homogenate supernatant or solutions of lyophilized placental preparations were separated on Sephadex G-100 columns (45 cm × 1 cm or 45 cm × 2.5 cm) by elution with TMK-buffer (10⁻²M tris-HCL, pH 7.4, 10⁻²M KCL, 1.5 × 10⁻³M MgCl₂). The effect of individual fractions on the amino acid incorporating activity was tested in a rat liver cell-free system.

Cell-free system: The cell-free system was composed as follows: ATP 1 mM, GTP 0.15 mM, 3-phosphoglycerate (sodium salt) 10 mM, MgCl₂ 7.2 mM, KCl 100 mM, tris-HCl pH 7.2, 65 mM, 120,000 g liver supernatant 200 μl/ml, liver microsomes (4 mg/ml) 200 μl/ml, ¹⁴C(U)-protein hydrolysate (specific activity 54 mCi/matom carbon) 5 μCi/ml, eluate after gel filtration 10 μl/ml. Incubation volume: 0.5 ml, incubation temperature: 37 °C. Samples (50 μl) were taken in 15 or 20 min. intervals and incorporation of radioactivity into proteins was determined according to MANS and NOVELLI (8).

SDS polyacrylamide gel electrophoresis: We incubated eluates after the gel filtration with 1% sodium dodecylsulfate — 1% mercaptoethanol during 3 h at 37 °C and separated the components on 15% polyacrylamide gels as described by WEBER and OSBORN (16). After the run (4 h at 8 mA/gel) gels were stained in 0.1% amido black.

Results: 1. Extracts from bovine decidua stimulate the oxygen consumption of Ehrlich ascites tumor cells but inhibit the oxygen consumption of rat liver slices (about 30 and 23% or more, respectively). 2. Decidua inhibits the incorporation of amino acids into proteins in cell-free preparations from rat liver and Ehrlich ascites tumor, chorion inhibits only tumor preparations but stimulates the liver system. 3. The placental extracts contain a series of stimulators and inhibitors (decidua) of protein biosynthesis, which can be separated by gel filtration. 4. Stimulators are found in the fractions after gel filtration, containing proteins of molecular weight ≤ 10,000 to 60,000 daltons, one of the two inhibitors is in the fraction containing proteins of molecular weight about 10,000 and 17,000 daltons.

Zusammenfassung

1. Extrakte aus Rinderdezidua stimulieren den Sauerstoffverbrauch von Ehrlich-Ascites-tumorzellen bis zu 30%, sie hemmen jedoch den Sauerstoffverbrauch von Rattenleberschnitten um mindestens 23%.

2. Dezidua hemmt den Aminosäureeinbau im zellfreien System aus Rattenleber und Ehrlich-Ascitestumor, Chorion hingegen hemmt nur beim Tumorsystem und stimuliert beim Lebersystem.

3. Die Plazentaextrakte beinhalten eine Reihe von Stimulatoren und Hemmern (Dezidua) der Proteinbiosynthese, die durch Gelfiltration getrennt werden können.

4. Stimulatoren werden in jenen Fraktionen nach der Gelfiltration gefunden, die Proteine vom Molekulargewicht ≤ 10000 bis ≤ 60000 Dalton enthalten; einer der beiden Inhibitoren ist in jener Fraktion, die Proteine mit dem Molekulargewicht etwa 10000 und 17000 Dalton enthält.

Plazentaextrakte können *in vivo* das Wachstum bösartiger Tumoren [Walker-Carcinom der Ratte, Brown-Pearce-Carcinom des Kaninchens (13) und Ehrlich-Ascitescarcinom der Maus (11, 13)] hemmen. Auch *in vitro* zeigten sich Präparationen aus diesem Organ gegenüber verschiedenen Stoffwechselreaktionen von Tumor- und Normalzellen wirksam. Dabei wurde vielfach ein Unterschied in den Wirkungen des maternen bzw. fetalen Plazentaanteils gegenüber dem Testsystem festgestellt. Die Stimulierung des Phosphateinbaues in Rattenleberexplantate durch Ratten- oder Humanplazenta (18) ist beispielsweise vor allem auf Faktoren in der Dezidua zurückzuführen (3). Beim Yoshida-Tumor der Ratte hingegen verminderte Dezidua den Phosphateinbau, während Chorion eine Erhöhung dieses Stoffwechselfparameters bewirkte. In ähnlicher Weise führte Chorion in einem zellfreien System aus HeLa-Zellen zu einer Erhöhung des Phenylalanineinbaues in Trichloressigsäure-fällbares Protein, wogegen Dezidua wirkungslos blieb (4). Im nachfolgenden wird über eine weitere Charakterisierung und Trennung dieser Plazentainhaltsstoffe berichtet.

Material und Methoden

Fraktionierung von Plazentaextrakten durch Gelfiltration über Sephadex G-100: Extrakte aus frischen Plazenten wurden bereitet durch Homogenisieren des Ausgangsmaterials mit dem 3fachen Volumen TKM-Puffer (10^{-2} M Tris-HCl, pH 7,4, 10^{-2} M KCl, $1,5 \cdot 10^{-3}$ M $MgCl_2$) in einem Ultraturax-Homogenisator (2×25 Sek.) und nachfolgendes Klarzentrifugieren (45 Min. bei 15000 g und 90 Min. bei 120000 g). Lyophilisate wurden in einer Konzentration von 10 mg/ml in TKM gelöst, den unlöslichen Anteil zentrifugierten wir während 15 Min. bei 1000 g ab. Die Trennung erfolgte an Sephadex G-100-Säulen (45×1 cm) mit 1 oder 2 ml Extrakt obiger Konzentration, wobei zur Elution des Materials ebenfalls TKM-Puffer diente. In einer Fraktion sammelten wir jeweils 30 Tropfen. Durchschnittlich jede zweite Fraktion testeten wir im zellfreien Ansatz auf ihre stimulierende oder hemmende Wirkung gegenüber dem Einbau von radioaktiven Aminosäuren in Polypeptide.

Zellfreies System aus Rattenleber: Die Konzentration der einzelnen Komponenten des zellfreien Systems war: ATP 1 mM, GTP 0,15 mM, 3-Phosphoglycerat (Na-Salz) 10 mM, $MgCl_2$ 7,2 mM, KCl 100 mM, Tris-HCl pH 7,2, 65 mM, 120000 g Leberüberstand 200 μ l/ml, Lebermicosomen (4 mg/ml) 200 μ l/ml, Proteinhydrolysat- $^{14}C(U)$ (spezifische Aktivität 54 mCi/mAtom Kohlenstoff) 5 μ Ci/ml. Außerdem enthielten die Ansätze je 10 μ l/ml von den durch Gelfiltration gewonnenen Fraktionen. Das Volumen eines Ansatzes war 0,5 ml. Der während der Inkubation bei 37 °C erfolgte Einbau von Aminosäuren in Trichloressigsäure-fällbare Polypeptide wurde bis zu einer Dauer von 45 Min. nach der Methode von MANS und NOVELLI (8) bestimmt. Dazu wurden in bestimmten Zeitabständen den Inkubationsansätzen Proben entnommen, auf Filterpapierplättchen aufgebracht und für die Messung der Radioaktivität im liquid scintillation counter (Tricarb der Fa. Packard) aufbereitet.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese: Klarzentrifugierte Organlyophilisatlösungen oder Eluate nach der Sephadexfiltration wurden mit 1% Merkaptoäthanol und 1% Natriumdodecylsulfat versetzt und 3 Std. bei 37 °C inkubiert. Eluate mit geringem Proteingehalt lyophilisierten wir zunächst und nahmen sie dann in 300 μ l einer 1%-Na-Dodecylsulfat-1% Merkaptoäthanol-lösung auf, um sie dann ebenso zu behandeln. Das Gelsystem war analog dem von WEBER und OSBORN (16) beschriebenen, jedoch erhöhten wir die Pufferkonzentration um 30% und die Acrylamid-Bis-Konzentration auf 15 bzw. 0,27%. Nach einem 2stündigen Vorlauf bei 8 mA/Gel erfolgte die eigentliche Trennung, bei gleicher Stromstärke in einem 4stündigen Lauf. Die Färbung nahmen wir in der üblichen Weise mit 0,1% Amidoschwarz vor.

Die Bestimmung des RNS-, DNS- und Proteingehaltes von Extraktlösungen erfolgte nach MEJBAUM (10), SHATKIN (14) bzw. LOWRY et al. (7).

Ergebnisse und Diskussion

In Ergänzung zu den in der Literatur beschriebenen Einflüssen von Deziduaextrakten auf den Phosphat- und Aminosäureeinbau in Tumorzellen (3, 4) beobachteten wir eine Steigerung des Sauerstoffverbrauches von Ehrlich-Ascitestumorzellen (Abb. 1). Dieser Effekt trat sowohl mit Homogenatüberständen aus frischen Rinderplazenten ein als auch mit Lösungen von Lyophilisaten¹). Aus diesem Grunde verwendeten wir künftig Trockenpräparate, was den Vorteil stets konstanten Untersuchungsmaterials bot. Das Verhältnis der Konzentration an Protein:DNS:RNS in einer wäßrigen Lösung solch eines Lyophilisates war 2700 : 250 : 36 $\mu\text{g/ml}$. Eine ähnliche Zusammensetzung wies die Lösung eines Chorionlyophilisates auf, nämlich 2400 : 165 : 58 $\mu\text{g/ml}$.

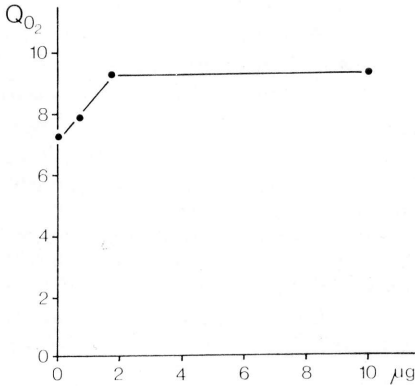


Abb. 1

Fig. 1

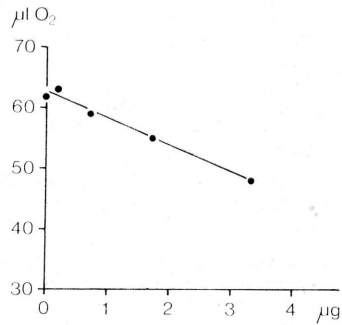


Abb. 2

Fig. 2

Abb. 1. Stimulierung des Sauerstoffverbrauches von Ascitestumorzellen durch Extrakte aus dem mütterlichen Teil der Rinderplazenta. Abscisse: μg Dezidua (trocken)/ml Ansatz, Ordinate: Q_{O_2} .
Abb. 2. Hemmung des Sauerstoffverbrauches von Leberschnitten durch Extrakte aus dem mütterlichen Teil der Rinderplazenta. Abscisse: μg Dezidua (trocken)/ml Ansatz, Ordinate: $\mu\text{l O}_2/100$ mg Leber (feucht).

Fig. 1. Stimulation of oxygen consumption of ascites tumor cells by extracts of the maternal part of bovine placenta. Abscissa: μg decidua (dry)/ml. Ordinate: Q_{O_2} .

Fig. 2. Inhibition of oxygen consumption of liver slices by bovine decidua extracts. Abscissa: μg decidua (dry)/ml. Ordinate: $\mu\text{l O}_2/100$ mg liver (wet weight).

Bei Normalgewebe, wie etwa Rattenleber, hatte die Dezidualösung die umgekehrte Wirkung im Vergleich zum Tumor: sie hemmte die Atmung proportional zur zugesetzten Menge (Abb. 2). Da der Sauerstoffverbrauch als Maß für das Abfließen oxydativer Prozesse dienen kann, würden diese Befunde, gemeinsam mit den früher erhobenen Befunden über die Beeinflussung des Phosphateinbaues, bedeuten, daß im mütterlichen Anteil der Plazenta Effektoren vorhanden sind, welche den Stoffwechsel von Tumorzellen nach der katabolen Seite verschieben (Erhöhung der gestörten Atmung und Verminderung der mit der erhöhten Proliferationsrate zusammenhängenden überschießenden Syntheserate), während in der Normalzelle eine Verschiebung in anaboler Richtung erfolgt. Bemerkenswerterweise wird der Aminosäureeinbau im zellfreien System sowohl aus Rattenleber als auch aus Ehrlich-Ascitestumor durch Rinderdeziduaextrakte gehemmt, während

1) Die nach einem von K. Theurer entwickelten, schonenden Verfahren (K. Theurer, DBP. 1 090 821, DBP. 1 033 374) erhaltenen Lyophilisate wurden uns in dankenswerter Weise von der Fa. Vitorgan, Stuttgart, zur Verfügung gestellt.

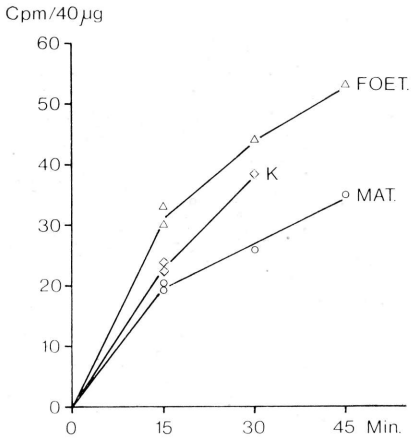


Abb. 3 Fig. 3

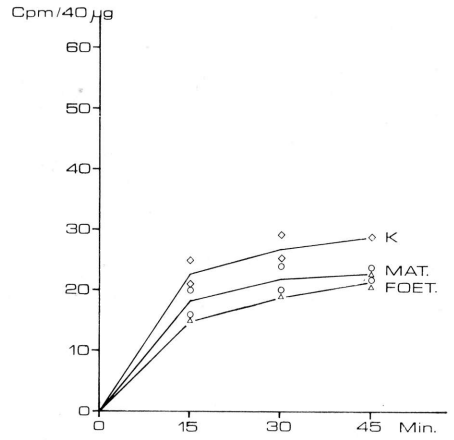


Abb. 4 Fig. 4

Abb. 3. Einfluß von Extrakten aus Rinderplazenta (fötaler und mäterner Anteil, 1 µg Trocken-substanz/ml Test) auf den Einbau von Aminosäuren (¹⁴C-Phenylalanin + Aminosäuregemisch) in Polypeptide durch ein zellfreies System aus Rattenleber (microsomale Fraktion).

Abb. 4. Einfluß von Extrakten aus Rinderplazenta (fötaler und mäterner Anteil, 1 µg Trocken-substanz/ml Test) auf den Einbau von Aminosäuren (¹⁴C-Phenylalanin + Aminosäuregemisch) in Polypeptide durch ein zellfreies System aus Ehrlich-Ascitestumor (microsomale Fraktion).

Fig. 3. Influence of bovine placental extracts (fetal and maternal, 1 µg dry substance/ml test) on the incorporation of amino acids (¹⁴C-phenylalanine + amino acid mixture) into polypeptides by a cell-free system from rat liver (microsomal fraction).

Fig. 4. Influence of bovine placental extracts (fetal and maternal, 1 µg dry substance/ml test) on the incorporation of amino acids (¹⁴C-phenylalanine + amino acid mixture) into polypeptides by a cell-free system from Ehrlich ascites tumor (microsomal fraction).

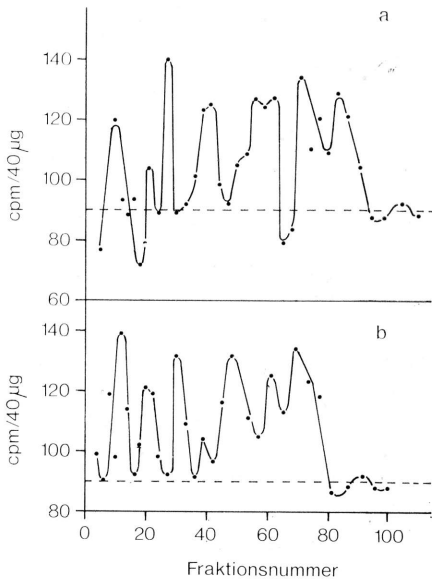


Abb. 5 Fig. 5

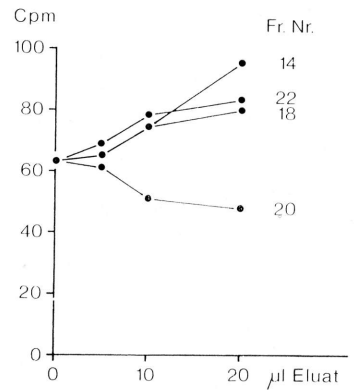


Abb. 6 Fig. 6

Chorionextrakte nur im Tumorsystem hemmen, im Lebersystem hingegen stimulieren (Abb. 3, 4). Dadurch wurde die Vermutung nahegelegt, daß die Organextrakte ein Gemisch verschiedener Stimulatoren und Hemmer enthalten könnten, deren Wirksamkeit von äußeren Bedingungen abhängig ist. Die Tatsache, daß verschiedene, früher beschriebene Stoffwechselreaktionen hinsichtlich Stimulierbarkeit oder Hemmbarkeit weitgehend von der Konzentration dieser Effektoren abhängig war, würde ebenfalls für eine Heterogenität der Effektoren sprechen (3, 4, 12).

Die Auftrennung der Dezidua- bzw. Chorionextrakte mittels Gelfiltration auf Sephadex G-100 ergibt das in Abb. 5 wiedergegebene Profil. Man kann eindeutig erkennen, daß der Chorionextrakt aus mindestens 7 verschiedenen Stimulatoren gegenüber dem als Testobjekt verwendeten zellfreien System aus Rattenleber besteht. Der Deziduaextrakt hatte wohl hinsichtlich der Stimulatoren eine sehr ähnliche Zusammensetzung, wies jedoch darüber hinaus mindestens 2 Komponenten mit hemmender Wirkung auf den Aminosäureeinbau auf. Die Wirkung der untersuchten Stimulatoren (Fraktion 14, 18, 22) und Hemmer (Fraktion 20) war ihrer, dem Testsystem zugesetzten Menge proportional (Abb. 6).

Die weitere Untersuchung der einzelnen Fraktionen mittels SDS-Polyacrylamidgellelektrophorese ergab die Anreicherung einzelner Komponenten in bestimmten Fraktionen (Abb. 7). Die Hauptmenge des Proteins ist in den Fraktionen bis 37 enthalten. Diese Fraktionen entsprechen dem ersten Gipfel mit stimulierender Wirkung aus Abb. 5. Wie orientierende Untersuchungen über das Molekulargewicht der einzelnen Komponenten durch Vergleich ihrer Mobilität im SDS-Gel mit den Mobilitäten der Eichproteine Katalase, Trypsin und Lysozym ergaben, haben die beiden langsamsten Komponenten der Fraktion 15 ein Molekulargewicht von mehr als 60000 Dalton, entsprechen also etwa den durch Sephadex G-100 ausgeschlossenen Substanzen. Die 3 Hauptkomponenten der Fraktion 27 haben Molekulargewichte von etwa 39, 30 und 17×10^3 Dalton. Da die Fraktionen 22–27 die höchste Stimulierung im zellfreien System ergeben, entspricht möglicherweise eine der beiden langsamer wandernden Komponenten dem Stimulator. Fraktion 41 schließlich ist dem Bereich des ersten Hemmers entnommen. Die Hauptmenge des Proteins wird durch die Komponente mit annähernden MG von 17×10^3 Dalton repräsentiert; daneben gibt es aber noch eine geringe Menge einer Substanz mit einem $MG \leq 10^4$ Dalton.

Über anscheinend ähnliche Regulatoren in der Rattenleber wurde in letzter Zeit mehrfach berichtet. In Übereinstimmung mit den grundlegenden Arbeiten von RABES et

Abb. 5. Einfluß einzelner Fraktionen von Extrakten aus Rinderplazenta nach Fraktionierung über Sephadex G-100 auf den Einbau von ^{14}C -Aminosäuren (Proteinhydrolysat) in Polypeptide durch ein zellfreies System aus Rattenleber. Inkubationszeit: 30 Min.; Kontrolle: 90 cpm/40 μg microsomale RNS. a) Dezidua, b) Chorion.

Abb. 6. Abhängigkeit der Einbaurate von ^{14}C -Aminosäuregemischen in TCA-fällbare Polypeptide eines zellfreien Systems aus Rattenleber von der Menge an zugesetzten gereinigten Fraktionen aus Rinderplazenta (materner Anteil). Proteingehalt der Fraktion 20: 65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Eluat.

Fig. 5. Influence of different fractions of bovine placental extracts following fractionation on Sephadex G-100 on the amino acids (^{14}C -protein hydrolysate) incorporating activity of a cell-free system from rat liver. Incubation period: 30 min; control: 90 cpm/40 μg microsomal RNA). a) decidua, b) chorion.

Fig. 6. Dependence of the incorporation of ^{14}C -amino acid mixtures into TCA-precipitable polypeptides of a cell-free system from rat liver on the quantity of added purified fractions of bovine maternal placenta. Protein content of fraction 20: 65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eluate.

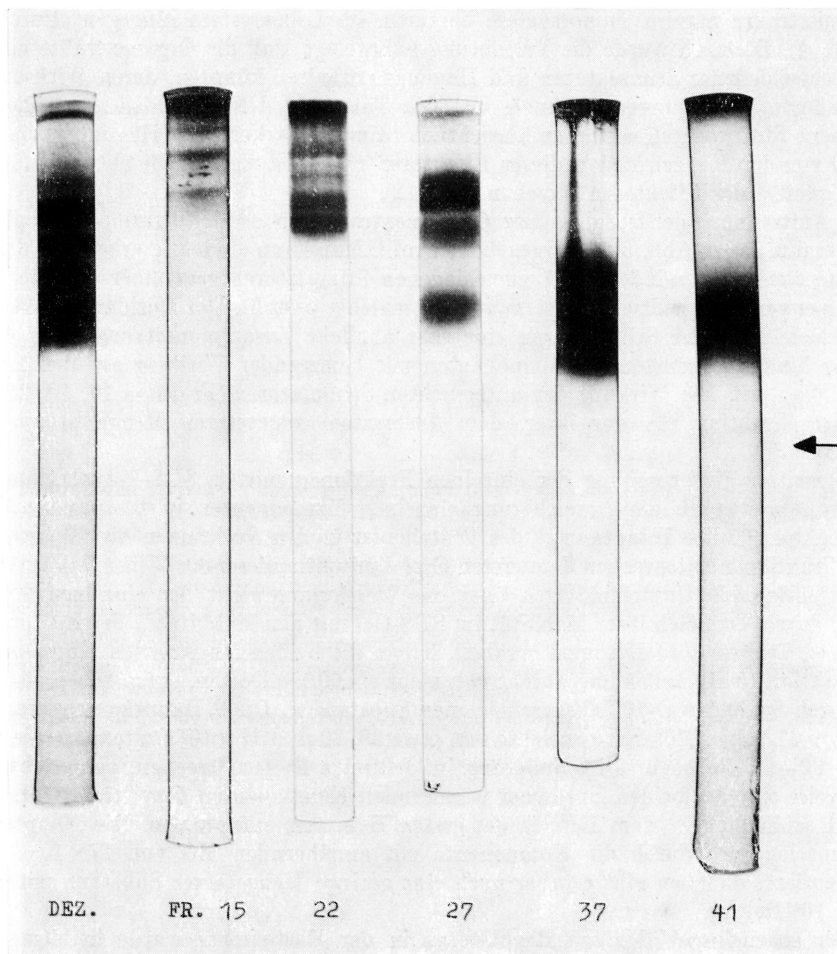


Abb. 7. Untersuchung einzelner Deziduafraktionen nach Trennung auf Sephadex G-100 durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. In Abweichung zu den unter „Methoden“ gemachten Angaben war die Säulendimension bei der Gelfiltration $45 \times 2,5$ cm, die aufgetragene Substanzmenge war 100 mg Lyophilisat, gelöst in 10 ml TMK-Puffer. Der in Abb. 5 bei Fraktion 20 dargestellte Hemmstoff war unter diesen Bedingungen erst in Fraktion 41.

Fig. 7. Further separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of individual decidua fractions obtained by passage through Sephadex G-100. As a modification of the data given in "methods" the dimensions of the column used for gel filtration were $45 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$, the separated material amounted to 100 mg lyophilized placental preparation dissolved in 10 ml of TKM-buffer. Under these conditions the inhibitor, demonstrated in fraction 20 of the pattern shown in figure 5, was eluted from the column not before fraction 41.

al. (12) fanden beispielsweise VOLM und WAYSS (15) im Serum teilhepatektomierter Ratten einen Faktor, der eine Reihe von Stoffwechselreaktionen in der Leberzelle stimulierte, in Tumoren jedoch hemmte.

Aber auch in der normalen Rattenleber sind analoge Faktoren vorhanden. Nach den Befunden von DER DECKENS (1) existieren in diesem Organ mehrere Regulatoren der

Proteinsynthese, sowohl hemmende als auch stimulierende. Ihr Molekulargewicht ist meist unter 5000 Dalton, mitunter jedoch auch darüber. Einer dieser höhermolekularen Faktoren, ein Inhibitor des Aminosäureeinbaues, wurde näher untersucht (2). Dieser Faktor ist vermutlich ein Protein und hemmt in einer Konzentration von $90 \mu\text{g}/120 \mu\text{l}$ die zellfreie Proteinsynthese in einem Rattenlebersystem zu 30%. Einen Effekt in gleicher Höhe können wir auch mit unseren Deziduaextrakten bzw. der Fraktion 20 nach Gelfiltration erhalten, unser Faktor ist jedoch schon bei etwa $1/300$ obiger Konzentration, nämlich bei $1,3 \mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ Ansatz wirksam (Abb. 6). Stimulierende Faktoren des Serums wurden in letzter Zeit im Zusammenhang mit dem Wachstum in vitro von Ehrlich-Ascitestumorzellen untersucht (5).

Wenngleich nähere Angaben über die Struktur sowohl der Hemmer als auch der Stimulatoren von den beiden vorgenannten Autoren noch nicht gemacht werden können, glauben sie doch genügend Hinweise in der Hand zu haben, um eine Wirkung auf der Stufe der Initiation für sehr wahrscheinlich zu halten. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei den aus der Plazenta isolierten Fraktionen vorliegen. Der Hauptteil des Effektor-moleküls ist vermutlich ein Peptid. Wieweit diese Peptide selbst wirksam sind [wie etwa Peptidhormone, welche die Translation stimulieren können (6, 9, 17)] oder nur als Träger für die eigentliche Wirkkomponente (z. B. Steroid, Nucleotid) dienen, ist noch unbekannt. Es ist nicht unbedingt notwendig, daß die große Zahl der bei der Gelfiltration erhaltenen Stimulatoren voneinander völlig verschiedene Komponenten darstellen. Es wäre vielmehr denkbar, daß es sich um verschieden große Untereinheiten oder metabolisch aktive Bruchstücke weniger Grundkomponenten handelt bzw. eine oder wenige Wirkkomponenten an verschieden große Peptidträger assoziiert sind.

Literatur

1. VON DER DECKEN, A., Modification of the in vitro amino acid incorporation capacity of rat liver after in vivo and in vitro treatments. *Europ. J. Biochem.* **4**, 87–94 (1968).
2. — Intracellular inhibitors of polypeptide formation in liver of normal rats. *Z. Physiol. Chem.* **353**, 1405–1414 (1972).
8. GEIPEL, A., Unterschiedliche biologische Wirkung des fetalen und mäternen Anteils der Plazenta. *Z. Gynäkol.* **87**, 1433–1436 (1965).
4. JACHERTS, D., B. JACHERTS und G. MAY, Prüfung der Wirksamkeit von Organextrakten an einem zellfreien System aus Hela-Zellen. *Mediz. Klin.* **58**, 752–754 (1963).
5. KAMINSKAS, E., Serum-mediated stimulation of protein synthesis in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Biol. Chem.* **247**, 5470–5476 (1972).
6. KORNER, A., The effect of growth hormone on protein synthesis in the absence of peptide chain initiation. *Biochim. Biophys. Acta* **174**, 351–358 (1969).
7. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, R. J. FARR and R. J. RANDALL, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
8. MANS, R. J., and NOVELLI G. D., Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disc method. *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 48–53 (1961).
9. MEANS, A. R., and P. F. HALL, Protein biosynthesis in testis. V. Concerning the mechanism of stimulation by follicle-stimulating hormone. *Biochem.* **8**, 4293–4298 (1969).
10. MEJBAUM, W., Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. *Z. Physiol. Chem.* **258**, 117–120 (1939).
11. PROFITLICH, H., E. RESCH und W. WULF, Über die Wirkung von Plazentainhaltsstoffen auf den Ascitestumor der Maus. *Z. Krebsforsch.* **60**, 390–398 (1955).
12. RABES, H., A. GEIPEL und H. WRBA, Zur Frage der Objektivierung humoraler Wirkungen in vitro. *Z. ges. exper. Med.* **136**, 156–161 (1962).
13. RAUCH, S., R. ZENDER und A. KÖSTLIN, Zur Biochemie der Plazentaextrakte. *Helv. med. Acta* **23/A**, 75–109 (1956).
14. SHATKIN A. J., Colorimetric reactions for DNA, RNA and protein determinations. In: *Fundamental techniques in virology*. Hrsg. v. K. HABEL und N. P. SALZMAN. Academic Press, New York und London 1969, S. 231–237.

5. VOLM, M., und K. WAYSS, Fehlende Wirkung einer Teilhepatektomie auf die Überlebenszeit von Ratten mit Walker Carcinosarkom. *Z. Naturforsch.* **26b**, 1199—1200 (1972).
6. WEBER, K., und M. OSBORN, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406—4412 (1969).
7. WOOL, I. G., and K. KURIHARA, Determination of the number of active muscle ribosomes: Effect of diabetes and insulin. *Proc. Ntl. Acad. Sci.* **58**, 2401—2407 (1967).
8. WRBA, H., und H. W. KALB, Die spezifische Stoffwechselwirkung eines in der Plazenta enthaltenen Faktors in vitro. *Naturwiss.* **47**, 85—86 (1960).

Anschrift des Verfassers:

Dr. KARL LETNANSKY, Institut für Krebsforschung der Universität Wien, A — 1090 Wien (Österreich), Borschkegasse 8a.