

Untersuchungen zur Synchronisation *in vivo*: Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystemen***

M. F. RAJEWSKY, D. F. HÜLSER und E. FABRICIUS

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung Physikalische Biologie, Tübingen

Eingegangen am 29. Juli 1971

Studies on Synchronisation *in vivo*: Temporary Inhibition of DNA Synthesis in Normal and Malignant Mammalian Cell Systems with Hydroxyurea

Summary. The synchronous passage of proliferating cells through defined phases of the cell cycle is a prerequisite for the study of a number of problems associated with carcinogenesis and cancer therapy. It is particularly required for investigations of the differential sensitivity of mammalian cells in specific phases of the cell cycle to agents capable of initiating the process of malignant transformation, or causing cell death.

The present study is concerned with the *in vivo* synchronisation of different rat tissues (embryo; liver; spleen; transplantable BICR/MIR tumor) by temporary specific inhibition of DNA synthesis with hydroxyurea (HU). In the cell systems investigated, HU inhibited DNA synthesis rapidly and almost completely. On the other hand, the short half-life ($t_{1/2}$) of the inhibitor in the organism permitted a termination of blocking periods without delay, as required for effective synchronisation. Following single or multiple doses of HU, the $t_{1/2}$ values for the HU concentration in BICR/MIR tumor tissue and rat blood were nearly identical. $t_{1/2}$ in rat and human blood exceeded the corresponding value for the mouse (13 min) by factors of about 2 and 8, respectively. In the rat cell systems investigated, DNA synthesis resumed when the HU concentration decreased below a level of $1-5 \times 10^{-5}$ moles/10³ g (exception: rat embryo; $\sim 2 \times 10^4$ moles/10³ g). The inhibitory effect of a specific blood concentration of HU on cellular DNA synthesis after *in vivo* administration of the inhibitor can be measured by the reduction of ³H-thymidine incorporation in reference cells exposed to the respective blood plasma samples *in vitro*. Cytotoxic effects of HU, which are often confined to cells blocked in S, were particularly evident in cells of the lymphatic type. The BICR/MIR tumor served as a model cell system for the analysis of the kinetics of cell proliferation after single and multiple blocks of varying duration. The results show that partial synchronisation of proliferating cells *in vivo* can be obtained by temporary inhibition of DNA synthesis under controlled conditions.

Zusammenfassung. Die Bearbeitung einer Reihe von Problemstellungen der experimentellen und klinischen Krebsforschung setzt die Möglichkeit einer Synchronisation proliferierender Zellsysteme *in vivo* voraus. Dies gilt z. B. für die Frage, ob bei Säugerzellen als Funktion ihrer Position im Zellcyclus Empfindlichkeitsunterschiede vorhanden sind, und zwar sowohl hinsichtlich der Auslösbarkeit des Prozesses der malignen Transformation durch Cancerogene, als auch in bezug auf die Inaktivierbarkeit maligner Zellen durch cytoceide Agentien oder ionisierende Strahlung.

In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen zur *in vivo*-Synchronisation verschiedener Gewebe (Embryo; Leber; Milz; transplantabler BICR/MIR-Tumor) der Ratte durch temporäre Blockade der DNA-Synthese mit Hydroxyharnstoff (HU) berichtet. HU inhibiert die DNA-Synthese *in vivo* spezifisch, rasch und nahezu vollständig. Das rasche

* Herrn Professor P. Dembowski (†) gewidmet.

** Die Arbeit wurde mit dem Gerhard-Domagk-Preis 1970 ausgezeichnet.

Absinken der HU-Konzentration im Organismus unter den zur Hemmung der DNA-Synthese erforderlichen Schwellenwert gestattet eine hinreichend verzögerungsfreie Beendigung von DNA-Syntheseblocks, wie sie für eine effektive Synchronisation erforderlich ist. Nach ein- oder mehrmaliger Pulsapplikation von HU sind die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) für die HU-Konzentration in BICR/MIR-Tumorgewebe und Blut annähernd gleich. Die $t_{1/2}$ -Werte im Blut von Maus (13 min), Ratte und Mensch verhalten sich wie etwa 1:2:8. In den gemessenen Zellsystemen der Ratte erfolgte die Aufhebung der DNA-Syntheseblocks bei Unterschreiten einer HU-Konzentration von $1-5 \times 10^{-5}$ Mol/10³ g (Ausnahme: Rattenembryo, $\sim 2 \times 10^{-4}$ Mol/10³ g). Die Inhibitorwirkung einer bestimmten, im Blut gemessenen HU-Konzentration kann mit Hilfe des ³H-Thymidineinbaus durch Inkubation entsprechender Blutplasmaprobe mit Referenzzellen *in vitro* bestimmt werden. Cytotoxische Effekte von HU, die wahrscheinlich vorwiegend auf blockierte S-Zellen beschränkt sind, waren besonders deutlich bei Zellen vom lymphatischen Typ. Als Modellsystem für die Analyse der Proliferationskinetik nach ein- und mehrmaligen DNA-Syntheseblocks von verschiedener Dauer diente der BICR/MIR-Tumor. Die Ergebnisse zeigen, daß durch Anwendung eines Inhibitors der DNA-Synthese vom Typ des HU unter kontrollierten Bedingungen eine partielle Synchronisation proliferierender Zellen *in vivo* erreicht werden kann.

Abkürzungen und Definitionen

HU	= Hydroxyharnstoff
PCA	= Perchlorsäure
t_0	= mittlere (mediane) Zellzyklusdauer
t_{G_1}	= mittlere Dauer der G ₁ -Periode des Zellzyklus
t_S	= mittlere Dauer der S-Periode des Zellzyklus
t_{G_2}	= mittlere Dauer der G ₂ -Periode des Zellzyklus
t_M	= mittlere Dauer der Mitose
n	= Gesamtzahl der Zellen einer Zellpopulation
n_p	= Anzahl der proliferierenden Zellen einer Zellpopulation
n_p/n	= Proliferative Fraktion einer Zellpopulation
n_S	= Anzahl der in der S-Periode des Zellzyklus befindlichen Zellen einer Zellpopulation (S-Zellen)
n_{S^*}	= Anzahl der ³ H-Thymidin einbauenden S-Zellen einer Zellpopulation
n_{S^*}/n	= ³ H-Thymidin-Markierungsindex
n_M	= Anzahl der in Mitose befindlichen Zellen einer Zellpopulation
n_{M^*}	= Anzahl der in der Mitose befindlichen, ³ H-Thymidin-markierten Zellen einer Zellpopulation
n_{M^-}	= Anzahl der in Mitose befindlichen, nicht ³ H-Thymidin-markierten Zellen einer Zellpopulation
n_M/n	= Mitoseindex
n_{M^*}/n_M	= Anteil ³ H-Thymidin-markierter Zellen in Mitose an der Gesamtzahl der Zellen in Mitose.

Für die Bearbeitung zell- und molekularbiologischer Problemstellungen ist es häufig eine Vorbedingung, daß die Zellen einer proliferierenden Zellpopulation definierte Abschnitte des Zellzyklus synchron durchlaufen. So ist auf dem Gebiet der Krebsforschung beispielsweise die Frage zu prüfen, ob bei Säugerzellen als Funktion ihrer Position im Zellzyklus Empfindlichkeitsunterschiede vorhanden sind, und zwar sowohl für die Auslösbarkeit des Prozesses der malignen Transformation durch cancerogene Faktoren (Rajewsky, 1970 [2]) als auch für die Inaktivierbarkeit maligner Zellen durch cytocide Agentien (Mauro u. Madoc-Jones, 1970) oder ionisierende Strahlung (Sinclair, 1968).

Während zur Synchronisation permanenter Zellstämme in Gewebekultur experimentelle Verfahren zur Verfügung stehen (Sinclair, 1969; Stubblefield, 1968), sind Möglichkeiten zur *in vivo* Synchronisation proliferierender Säugerzellsysteme

bisher nicht systematisch untersucht worden. Die Ausarbeitung entsprechender Methoden ist jedoch von Interesse, da es oft nicht zulässig ist, Schlußfolgerungen für das Verhalten von Zellen im intakten Gewebe alleine aus Befunden an Zellkulturen zu ziehen, die vielen der im Organismus wirksamen Kontrollmechanismen nicht unterliegen. Hinzu kommt, daß eine Synchronisation maligner Zellen *in vivo* unter Umständen im Rahmen der Krebstherapie nicht ohne Bedeutung ist (Mauro u. Madoc-Jones, 1970; Rajewsky, 1970 (2)).

Die Ausnutzung der *in vivo* auf Grund biologischer Regulationsmechanismen auftretenden Synchronie [z. B. diurnale Schwankungen der Mitoseaktivität in bestimmten Geweben (Pilgrim u. Mitarb., 1965) oder Auslösung von DNA-Synthese- und Mitosemaxima in regenerationsfähigen (Bucher, 1963) oder hormonell stimulierbaren (Bresciani, 1965) Zellsystemen] ist nur selten möglich.

Grundsätzlich können synchrone Zellpopulationen entweder dadurch gewonnen werden, daß man aus einer asynchronen Population eine Subpopulation abtrennt, die sich in einem kurzen Abschnitt des Zellcyclus befindet (z. B. in der Mitose), oder daß man das Durchlaufen bestimmter Abschnitte des Zellcyclus zeitweise blockiert (z. B. DNA-Synthese oder Mitose). Während die erstgenannte Möglichkeit unter *in vivo* Bedingungen mit Ausnahme spezieller Fälle (z. B. selektive Markierung der Zellen in der S-Periode des Zellcyclus mit radioaktivem Thymidin) praktisch ausscheidet, bietet sich für den letzteren Fall die Anwendung spezifischer chemischer Inhibitoren für makromolekulare Synthesen an, die auf definierte Abschnitte des Zellcyclus beschränkt sind. So kann eine temporäre, spezifische Inhibition der DNA-Synthese (mit oder ohne Abtötung der arretierten S-Zellen) zu einer partiellen Synchronie führen, und zwar dadurch, daß während des Blocks G_2 - und G_1 -Zellen der asynchronen Population im G_1 -S-Übergangsbereich auflaufen, und nach Aufheben des Blocks dann synchron die S-Periode des Zellcyclus passieren (s. auch Abb. 7 u. 8). Voraussetzung für die Anwendbarkeit eines chemischen Inhibitors zur Synchronisation unter *in vivo*-Bedingungen ist jedoch, daß nicht nur die Etablierung des Blocks, sondern auch seine Aufhebung rasch und in reproduzierbarer Weise möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit Hilfe von Hydroxyharnstoff, einem spezifischen und hochwirksamen Inhibitor der DNA-Synthese, eine Synchronisation verschiedener normaler und maligner Säugergewebe zu erreichen. Über erste, an einem malignen Zellsystem der Ratte durchgeführte Messungen ist bereits berichtet worden (Rajewsky, 1968; Rajewsky, 1970 (1)). Die bisher erzielten Ergebnisse sollen nunmehr im Zusammenhang dargestellt werden.

Material und Methoden

Tiermaterial

Es wurden weibliche Ratten der Stämme Marshall¹ und BD IX (Druckrey, 1971) sowie männliche Mäuse des Stammes Balb/c² aus eigener Zucht verwendet.

Untersuchte Zellsysteme

- a) BICR/MIR-Tumor (adulte Marshall-Ratte (♀)),
- b) Leber (adulte Marshall-Ratte (♀)),

¹ Institute of Cancer Research, London.

² R. B. Jackson Memorial Laboratory, Bar Harbor, Maine.

- c) Milz (adulte Marshall-Ratte (♀)),
- d) Rattenembryo (BD IX-Ratte, 18. Tag der Gravidität).

Der BICR/MIR-Tumor der weiblichen Marshall-Ratte ist ein solider, subcutan transplantabler Mammatumor, der 1955 bei einem weiblichen Tier des gleichen Stammes spontan entstand (ursprüngliche Bezeichnung: BICR/MI (Steel u. Mitarb., 1966)) und seither auf weiblichen Marshall-Ratten passagiert wurde. Die seit 1965 in unserem Laboratorium gehaltene Linie trägt die Bezeichnung BICR/MIR. Alle Versuche wurden an BICR/MIR-Tumoren von 0,5—1,0 g Frischgewicht durchgeführt, die auf 200—250 g schweren Tieren gehalten wurden.

Die proliferativen Eigenschaften des BICR/MIR-Tumors wurden autoradiographisch analysiert. Dabei ließen Dauermarkierungsversuche (Injektion von ³H-Thymidin in Abständen von 6 Std für die Dauer von 48 Std) auf eine Proliferative Fraktion (n_p/n) von 0,9 bis 1,0 schließen. Die mittlere Dauer der einzelnen Zellcyclusperioden wurde mit Hilfe der „Markierte-Mitosen-Methode“ (Quastler u. Sherman, 1959) autoradiographisch bestimmt (Abb. 1).

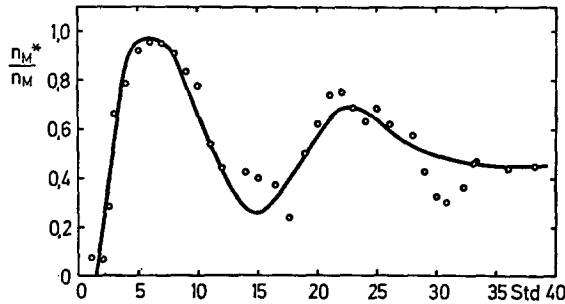


Abb. 1. Zellcyclusanalyse für die proliferierenden Zellen des BICR/MIR-Tumors der Marshall-Ratte mit Hilfe der Markierte-Mitosen-Methode. Die Meßpunkte sind Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen für jeweils einen Tumor. Die gezeichnete Kurve wurde mit Hilfe eines optimierenden Computerprogramms (Barrett, 1966; Steel u. Hanes, 1971) berechnet. Ordinate: Verhältnis der ³H-markierten Mitosen (n_M^*) zur Gesamtzahl der Mitosen (n_M). Abszisse: Zeit nach ³H-Thymidin-Puls (Std). (Nach Rajewsky [1970, (1)] mit Genehmigung von Academic Press, Inc., New York-London)

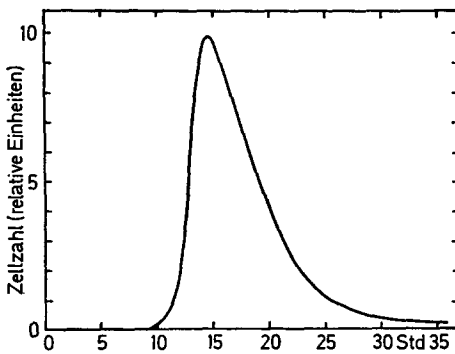


Abb. 2

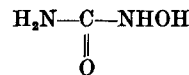


Abb. 3

Abb. 2. Mit Hilfe eines Computerprogramms (Barrett, 1966; Steel u. Hanes, 1971) berechnete Verteilung der Zellcyclusdauern (t_0) für die proliferierenden Zellen des BICR/MIR-Tumors der Marshall-Ratte. (Nach Rajewsky [1970, (1)] mit Genehmigung von Academic Press, Inc., New York-London)

Abb. 3. Hydroxyharnstoff. (Dresler u. Stein, 1869)

Tabelle 1. Zellcyclusparameter der transplantablen BICR/M1R- und BICR/M1-Tumoren der Marshall-Ratte

Zellcyclusparameter	BICR/M1R	BICR/M1
t_{G_1} (\pm Standardabweichung)	5,6 \pm 0,6 Std	8,3 \pm 3,6 Std (Steel, 1969)
t_S (\pm Standardabweichung)	10,2 \pm 5,1 Std	7,9 \pm 2,4 Std (Steel, 1969)
t_{G_2} (\pm Standardabweichung)	3,0 \pm 0,9 Std	3,0 \pm 1,3 Std (Steel, 1969)
t_G (Medianwert)	17,7 Std	17,6 Std (Steel, 1969)
Proliferative Fraktion (n_p/n) in Tumoren von 0,5—1,0 g Frischgewicht	\sim 0,9	\sim 0,9 (Steel u. Mitarb., 1966)
^3H -Thymidin-Markierungsindex (n_s^*/n) (\pm Standardabweichung)	0,356 \pm 0,053	0,342 \pm 0,044 (Steel u. Mitarb., 1966)
Mitoseindex (n_M/n) (\pm Standardabweichung)	0,019 \pm 0,004	nicht angegeben

Dabei wurden die Meßdaten mit einer von Barrett (1966) angegebenen und von Steel u. Hanes (1971) weiterentwickelten optimierenden Computermethode analysiert. Abb. 2 zeigt die mit Hilfe dieser Methode berechnete Verteilung der Zellcyclusdauer (t_G) für eine BICR/M1R-Zellpopulation. In Tab. 1 sind die Zellcyclusparameter des BICR/M1R-Tumors sowie die entsprechenden, für die Original-Tumorlinie BICR/M1 gemessenen Werte (Steel, 1969) wiedergegeben.

Hydroxyharnstoff

Hydroxyharnstoff (HU) (Abb. 3) wurde 1869 von Dresler u. Stein erstmalig synthetisiert; seine inhibitorische Wirkung auf die DNA-Synthese wurde 1964 von Young u. Hodas an HeLa-Zellen erstmalig beobachtet. Seither hat sich die Substanz als einer der wirksamsten spezifischen Inhibitoren der DNA-Synthese von Säugerzellen erwiesen (Farber u. Baserga, 1969; Kim u. Mitarb., 1967; Pfeiffer u. Tolmach, 1967; Philips u. Mitarb., 1967; Rajewsky, 1968; Rajewsky, 1970 (1); Rosenkranz u. Mitarb., 1969; Schwartz u. Mitarb., 1965; Sinclair, 1965; Süss u. Maurer, 1968; Young u. Hodas, 1964). Im Vergleich zur DNA-Synthese des Zellkerns ist die Synthese cytoplasmatischer DNA durch HU weniger leicht hemmbar (Vesco u. Penman, 1969). HU-Konzentrationen, welche die DNA-Synthese inhibieren, scheinen die RNA- und Proteinsynthese nicht zu beeinflussen (Pollak u. Rosenkranz, 1967; Young u. Hodas, 1964). Dagegen hemmt HU bei HeLa-Zellen auch die Histonsynthese (Mueller, 1969).

Die molekularen Mechanismen, welche der Hemmung der zellulären DNA-Synthese durch HU sowie seiner offenbar weitgehend auf Zellen in der S-Periode des Zellcyclus beschränkten cytotoxischen Wirkung zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Autoren haben Hinweise dafür gefunden, daß HU die Umwandlung von Cytidylsäure zu Desoxycytidylsäure blockiert (Adams u. Lindsay, 1967; Gale, 1968; Young u. Hodas, 1964; Young u. Mitarb., 1967 (1); Young u. Mitarb., 1967 (2); aber siehe auch Pollak u. Rosenkranz, 1967; Rosenkranz u. Carr, 1970; Yarbrow, 1968), und zwar durch Inhibition des Enzyms B 2 des Ribonucleotid-Reduktase-Systems (Krakoff u. Mitarb., 1968; s. Abb. 4). Andererseits können aber direkte Wirkungen auf die DNA (Rosenkranz, 1970; Rosenkranz u. Jacobs, 1968; Rosenkranz u. Mitarb., 1968; Rosenkranz u. Mitarb., 1969), oder die Beeinflussung anderer, die DNA-Synthese regulierender Enzyme (Jacobs, 1968; Rosenkranz u. Jacobs, 1968) nicht ausgeschlossen werden. Es muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß aus HU unter *in vivo*-Bedingungen ein oder mehrere aktive Metabolite entstehen, und die Substanz auf diesem Wege mit mehreren cellulären Stoffwechselprozessen interferiert. So haben Rosenkranz u. Mitarb. (Rosenkranz, 1970; Rosenkranz u. Mitarb., 1969) gefunden, daß gealterte HU-Lösungen die Substanzen Isohydroxyharnstoff, N,O-Di-carbamoylhydroxylamin sowie eine noch unidentifizierte Nitrosoharnstoffverbindung enthalten. Die biologischen Wirkungen dieser Verbindungen werden gegenwärtig analysiert;

Hydroxyharnstoff-Nachweis

Bei den vorliegenden Untersuchungen war es notwendig, die HU-Konzentration in verschiedenen Säugergeweben und Blut zu bestimmen. Hierfür war eine Nachweismethode zu wählen, die für Harnstoff, das Hauptabbauprodukt des HU, keine positive Reaktion ergibt. Als geeignet erschienen Methoden zur Bestimmung von Hydroxamaten (Bergmann u. Segal, 1956; Nery, 1966; Philips u. Mitarb., 1967), die entsprechend modifiziert und den gegebenen experimentellen Erfordernissen angepaßt wurden (Fabricius u. Rajewsky, 1971).

Bei der Jodoxydation von Hydroxamaten entsteht Nitrit, das Sulfanilsäure diazotiert. Nach Reduktion des überschüssigen Jods mit Natriumthiosulfat und Zugabe von α -Naphthyläthylendiamindihydrochlorid, kuppelt dieses mit der diazotierten Sulfanilsäure zu einem roten Farbstoff. Die Absorption dieses Farbstoffs wird bei 540 nm im Spektralphotometer gemessen. Wie aus der in Abb. 5 gezeigten Standard-Kurve hervorgeht, kann auf diesem

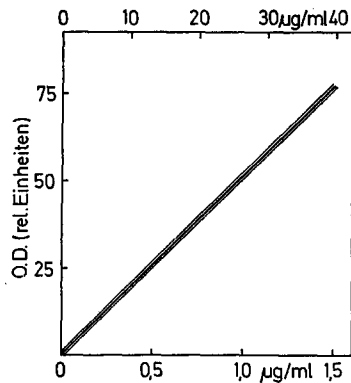


Abb. 5. Standardkurve für die Hydroxyharnstoffbestimmung. Bestimmungsmethode siehe „Material und Methoden“. *Ordinate*: Optische Dichte bei $\lambda = 540$ nm (relative Einh.). *Abszissen*, unten: HU-Endkonzentration der Meßprobe ($\mu\text{g/ml}$), oben: HU-Konzentration der Ausgangsprobe ($\mu\text{g/ml}$). 95% der Mittelwerte aus 8 unabhängigen Meßreihen liegen innerhalb des zusammen mit der Standardkurve angegebenen Streubandes

Wege bei einer optischen Dichte von 0,05 noch eine HU-Konzentration von 0,094 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden. Da die Herstellung der endgültigen Meßproben eine Verdünnung der ursprünglichen Blut- oder Gewebeprouen um den Faktor 26,5 erforderte, lagen die entsprechenden Nachweisgrenzen für Blut und Gewebe bei 2,5 $\mu\text{g HU/ml}$, bzw. 2,5 $\mu\text{g HU/g}$.

Im einzelnen wurden die Blut- und Gewebeprouen wie folgt zur HU-Analyse aufgearbeitet:

a) *Blut*: 1 ml Blut wurde mit 4 ml H_2O und nach 1 min mit 5 ml 1 m PCA gemischt und nach 10 min bei 4° C und 30000 xg für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch mit PCA (0,5 m) gewaschene Selecta (Nr. 595 1/2)-Filter filtriert und bei -20° C aufbewahrt.

b) *Gewebe*: 1 g Gewebe wurde mit 4 ml H_2O versetzt und bei mittlerer Umdrehungszahl und Eiskühlung für 20 sec mit einem Ultraturrax (Fa. Janke und Kunkel KG, Staufen) homogenisiert. Dem Homogenat wurden 5 ml 1 m PCA zugesetzt. Weitere Behandlung der Proben siehe unter a (Blut).

c) *Analyse der Filtrate*: Zu 2 ml-Aliquoten der Filtrate sowie der in 0,5 m PCA hergestellten Standards wurden nacheinander 1 ml Puffer (96,6 ml 0,5 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 17,8$ ml 1,5 m $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 85,6$ ml H_2O), 0,1 ml 41% NaOH und 1 ml 1% Sulfanilsäure zugegeben. Der pH-Wert dieses Gemisches muß zwischen 6,9 und 7,3 liegen. Nach Zugabe von 0,1 ml 0,1 n I_2 in 2,5% KI und einem anschließenden Zeitintervall von 3 min wurden 0,1 ml 0,1 m frisch angesetztes Natriumthiosulfat und, sofort nach Mischen, 1 ml einer frischen α -Naph-

thyläthylendiamin-dihydrochlorid-Lösung (100 mg α -Naphthyläthylendiamin-dihydrochlorid + 17,5 ml 12 n HCl + H₂O ad 100 ml) zugesetzt. Um eine maximale Farbentwicklung zu gewährleisten, wurde das Gemisch vor der Absorptionsmessung 20 min stehengelassen.

Bestimmung der Halbwertszeiten für den Abfall der HU-Konzentration in Geweben und Blut

Die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von HU mit der oben beschriebenen Nachweismethode gemessenen HU-Konzentrationen wurden als Funktion der Zeit im halb-logarithmischen Maßstab aufgetragen. Mit den Meßwerten wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt und die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) aus den ermittelten Geradengleichungen berechnet.

Messung der ³H-Aktivität und Autoradiographie nach ³H-Thymidin-Markierung

Die Pulsmarkierung DNA-synthetisierender Zellen erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Thymidin-methyl-³H (Radiochemical Centre, Amersham, England, bzw. Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/M.) einer spezifischen Aktivität von 15 Ci/mM, in einer Verdünnung von 200 μ Ci/ml in steriler, pyrogenfreier 0,9% NaCl-Lösung. Während für die autoradiographische Bestimmung des Prozentsatzes markierter Mitosen beim BICR/MIR-Tumor eine Dosis von 1 μ Ci/g Körpergewicht verwendet wurde, betrug die Dosis bei allen übrigen Versuchen 0,5 μ Ci/g Körpergewicht.

In allen Versuchen (mit Ausnahme der Markierte-Mitosen-Bestimmungen) wurden die zu untersuchenden Gewebe 30 min nach ³H-Thymidin-Pulsmarkierung entnommen und bei 4° C im 10fachen Volumen Äthanol-Eisessig (3:1) fixiert. Die Fixationslösung wurde zweimal in Abständen von 24 Std erneuert, bevor die Präparate in 4% gepufferte Formaldehydlösung überführt wurden. Von den zur autoradiographischen Auswertung vorgesehenen Präparaten wurden nach Einbettung in Paraplast (Shandon Scientific Co.) 4 μ -Mikrotomschnitte angefertigt, die Feulgen-gefärbt und nach der Dipping-Methode mit Ilford K5-Kernemulsion beschichtet wurden. Die Expositionszeit betrug 4–6 Wochen bei 4° C. Anschließend wurden die Autoradiogramme in Kodak D19b-Entwickler entwickelt und in Kodak Unifix fixiert. Die Anzahl von Silberkörnern/Kern, von der an ein Zellkern als markiert gewertet wurde, betrug entsprechend den jeweiligen Backgroundbestimmungen 3–6. Die Meßpunkte bei den Markierte-Mitosen-Versuchen basieren auf der Auswertung von ≥ 150 Mitosen je Meßpunkt. Bei den Synchronisationsexperimenten wurden etwa 200 markierte Zellkerne je Meßpunkt ausgezählt.

In einigen Versuchen wurde anstelle der autoradiographischen Auswertung eine Direktmessung der gebundenen ³H-Aktivität mit Hilfe des Flüssigkeitsszintillations-Spektrometers durchgeführt. Hierzu wurden entweder 10 μ -Mikrotomschnitte gleicher Flächengröße auf Millipore-Filter aufgebracht, entparaffiniert und in Toluol-Szintillatorlösung (5 g PPO + 0,3 g POPOP + 1 l Toluol) gemessen, oder Gewebeproben nach Vakuumtrocknung bis zur Gewichtskonstanz mit Hilfe einer nach Kalberer u. Rutschmann (1961) modifizierten Methode der trockenen Oxydation im geschlossenen Kolben verbrannt. Das bei der Verbrennung gebildete HTO wurde in Methanol absorbiert und die ³H-Aktivität eines Aliquots nach Mischung mit Szintillatorlösung bestimmt. Alle Proben wurden bis zum Auflaufen von 10⁴ Impulsen gemessen und die Zählausbeute mit Hilfe der Kanalverhältnismethode (Bush, 1963) bestimmt.

Untersuchungen an Zellkulturen

In einigen Versuchen wurden HU-haltige Blutplasmaproben zur Messung ihrer Hemmwirkung auf die DNA-Synthese mit permanenten Zellstämmen (z. B. HeLa-Zellen) in Monolayerkultur inkubiert. Zum Zeitpunkt der Messung (48 Std nach Aussaat einer Startzellzahl von $4 \times 10^4/35$ mm-Falcon-Plastikkulturschale) befanden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase. Bei den mit gleicher Zellzahl/Kulturschale in einer Atmosphäre von 5% CO₂ in Luft bei 37° C gezüchteten Kulturen wurde das Medium (2 ml Eagle's Medium, Dulbecco Modifikation, mit 10% Kälberserum) gegen 1 ml Blutplasma ausgetauscht und für 30 min inkubiert. Anschließend wurde ³H-Thymidin (1 μ Ci/Kulturschale in 10 μ l 0,9% NaCl-Lösung; spez. Aktivität = 15 Ci/mM) zugesetzt und für weitere 30 min inkubiert. Das Blutplasma wurde dann abgesaugt, die Kulturen 2 mal mit Hanks-Lösung (+10 mg Thymidin/l; 4° C) gewaschen, die Zellen mit 0,25% Trypsinlösung (+10 mg Thymidin/l; 37° C; 10 min) abgelöst und die Lösung durch Milliporefilter (Porenweite 0,45 μ m; Millipore Filter GmbH, Neu-Isenburg) gesaugt. Zur Entfernung der säurelöslichen Fraktion wurden

die auf den Milliporefiltern abgelagerten Zellen 2 mal mit 5% Trichloressigsäure (4° C) nachgewaschen. Nach Trocknung der Filter wurde ihre ^3H -Aktivität im Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer gemessen.

Partielle Hepatektomie

Einige Messungen wurden an weiblichen Ratten des Marshall-Stamms durchgeführt, die zuvor teilhepatektomiert (68%) worden waren. Die Operation erfolgte in Äthernarkose nach der von Higgins u. Anderson (1931) angegebenen Methode.

Ergebnisse

Die Anwendung von HU zur *in vivo*-Synchronisation durch temporäre Inhibition der DNA-Synthese (vgl. Abb. 6 u. 7) macht eine genaue Bestimmung der

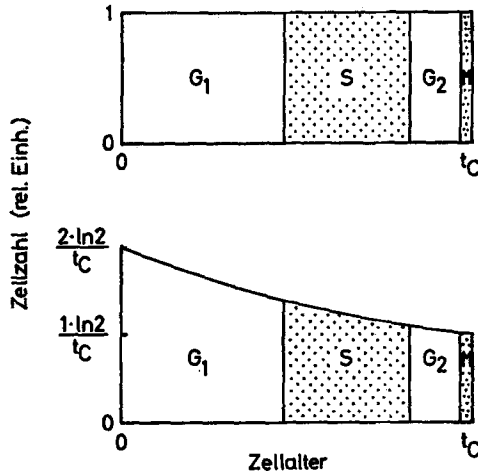


Abb. 6. Diagrammatische Darstellung der Zellaltersverteilung für proliferierende Zellpopulationen im Steady-State (oben) und im exponentiellen Wachstum (unten). Ordinate: Zellzahl (relative Einh.). Abszisse: Zellalter

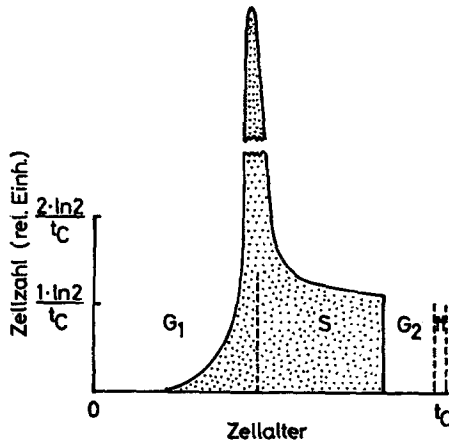


Abb. 7. Diagrammatische Darstellung der Zellaltersverteilung einer exponentiell proliferierenden Zellpopulation nach temporärer Blockade der DNA-Synthese. Ordinate: Zellzahl (relative Einh.). Abszisse: Zellalter

in vivo-Abfallkinetik der Substanz notwendig. Diese ist erforderlich, um die zeitliche Änderung der HU-Konzentration in bestimmten Zellsystemen mit Ausmaß und Dauer der DNA-Synthesehemmung korrelieren zu können. Nur eine hinreichend kurze *in vivo*-Halbwertszeit ($t_{1/2}$) und das damit verbundene rasche Unterschreiten einer kritischen unteren Hemmkonzentration ist mit der zur Synchronisation erforderlichen verzögerungslosen Beendigung eines Blocks vereinbar. $t_{1/2}$ wurde daher in verschiedenen Zellsystemen und im peripheren Blut nach ein- und mehrmaligen Puls-Dosen von HU bestimmt. Der größte Teil dieser Messungen wurde an Ratten der Stämme Marshall und BD IX durchgeführt, jedoch wurden wegen der Möglichkeit einer späteren Anwendung auch andere Säugerspecies zum Vergleich herangezogen. In den Abb. 8, 10 u. 12 sowie in Tab. 2 sind einige der gemessenen HU-Abfall-Kinetiken, bzw. die entsprechenden Werte für $t_{1/2}$ wiedergegeben.

Die Meßergebnisse zeigen zunächst, daß $t_{1/2}$ in den gemessenen Systemen mit der verwendeten HU-Nachweismethode exakt bestimmt werden kann und in einer Größenordnung liegt, welche der Forderung nach einer verzögerungslosen Beendigung eines DNA-Syntheseblocks in den meisten Fällen genügen sollte. So wird der Konzentrationsbereich zwischen 10^{-4} m und 10^{-5} m im Blut der Ratte in 1,5 Std durchlaufen (s. Abb. 8 u. 12), einer Zeit, die im Vergleich zu den bekannten t_C -Werten von Säugerzellen sehr kurz ist. $t_{1/2}$ zeigt bei verschiedenen Species charakteristische Unterschiede (Fabricius u. Rajewsky, 1971). Die $t_{1/2}$ -Werte im Blut von Maus, Ratte und Mensch verhalten sich wie 1:1,7:7,6. Dagegen weichen die bei einer gegebenen Species (Marshall-Ratte) gemessenen $t_{1/2}$ -Werte für Blut und Tumorgewebe (BICR-MIR-Tumor) nur um etwa $\pm 12\%$ von einem gemeinsamen Mittelwert ab, so daß hier die im Blut gemessenen Konzentrationswerte auch für das Tumorgewebe als repräsentativ angesehen werden können.

Beim *in vivo*-Abbau von HU scheint der Leber eine zentrale Rolle zuzukommen. Dies wird aus den Ergebnissen von Experimenten deutlich, in denen der *in vitro*-Abbau von HU durch Leberhomogenat (Marshall-Ratte) bei 37° C mit Hilfe der HU-Nachweisreaktion verfolgt wurde (Fabricius u. Rajewsky, 1971). Der Abbau erfolgt hier mit einer $t_{1/2}$ von 30 min und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die entsprechenden unter *in vivo*-Bedingungen in Blut und Tumorgewebe gemessenen Werte (s. Tab. 2). Es war daher zu erwarten, daß nach 2/3-Hepatektomie eine Verlängerung der Halbwertszeiten auftreten würde. In der Tat ergab sich unter diesen Bedingungen für Blut und Tumorgewebe eine Erhöhung von $t_{1/2}$ um den Faktor 2,8 bzw. 2,5 (s. Tab. 2). In der intakten Leber der Ratte gelingt ein Nachweis von HU bereits 1 Std nach einer Dosis von 0,5 mg HU/g Körpergewicht nicht mehr, in der Restleber 2/3-hepatektomierter Tiere ist nach der gleichen Dosis HU nach 3 Std nicht mehr nachweisbar (s. Tab. 2).

Eine Ausnahme bildet der für den Embryo der BD IX-Ratte am 18. Tag der Gravidität gemessene Wert für $t_{1/2}$. Legt man die für den BICR-MIR-Tumor der Marshall-Ratte ermittelte Halbwertszeit zugrunde, so liegt der entsprechende Wert für den Embryo um einen Faktor 1,6 höher. Möglicherweise bietet der komplizierte Stoffaustausch zwischen maternem Kreislaufsystem und Foet eine Erklärung für diesen Befund.

Tabelle 2. Halbwertszeit ($t_{1/2}$) der HU-Konzentration in verschiedenen Geweben und Blut nach *in vivo*-Applikation von HU

Spezies (Stamm)	Gewebe/Blut	HU-Dosis (mg/g Körpergewicht)	$t_{1/2}$ (min)
Ratte (Marshall; ♀)	BICR/MIR-Tumor	0,25	29
Ratte (Marshall; ♀)	BICR/MIR-Tumor	0,50	28
Ratte (Marshall; ♀)	BICR/MIR-Tumor	$2 \times 0,50^a$	29
Ratte (Marshall; ♀; 3 Std nach $\frac{2}{3}$ Hepatektomie)	BICR/MIR-Tumor	0,50	72
Ratte (Marshall; ♀)	Leber	0,50	^b
Ratte (Marshall; ♀; 3 Std nach $\frac{2}{3}$ Hepatektomie)	Leber	0,50	^c
Ratte (BD IX; Embryo am 18. Tag der Gravidität)	Embryo	0,25	45
Maus (Balb/c; ♂)	Blut	0,25	13
Ratte (Marshall; ♀)	Blut	0,25	21
Ratte (Marshall; ♀)	Blut	0,50	25
Ratte (Marshall; ♀)	Blut	$2 \times 0,50^a$	23
Ratte (BD IX; ♀; 18. Tag der Gravidität)	Blut	0,25	20
Ratte (Marshall; ♀; 3 Std nach $\frac{2}{3}$ Hepatektomie)	Blut	0,50	61
Mensch (♀) ^d	Blut	0,10 ^e	100

^a Im Abstand von 5 Std.

^b Nicht meßbar, da HU bereits 1 Std nach HU-Puls nicht mehr nachweisbar.

^c Nicht gemessen, da HU nur bis zu 2 Std nach HU-Puls nachweisbar.

^d Untersuchung in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Klinik d. Universität Tübingen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Wilmanns).

^e Oral; in Form des Präparats Litalir® (Hydroxyharnstoff Squibb), v. Heyden AG, München.

Es war nunmehr die Abhängigkeit der Inhibition der DNA-Synthese und der Blockdauer von der initialen HU-Konzentration und ihrer Abfall-Kinetik zu analysieren. Die Abb. 8, 9 u. 10 zeigen Ergebnisse entsprechender Experimente. Nach einem HU-Puls von 0,5 mg HU/g Körpergewicht sinkt, wie in Abb. 8 aufgrund autoradiographischer Messungen dargestellt, der Anteil DNA-synthetisierender Zellen des BICR-MIR-Tumors scharf ab und beginnt nach Unterschreiten einer HU-Konzentration von etwa 2×10^{-5} Mol/10³ g, d. h. nach etwa 5 Std, wieder anzusteigen. Ebenso wie sein Beginn erfolgt auch die Beendigung des Blocks zeitlich scharf definiert. Die gleiche Abbildung zeigt, daß die Blockdauer durch einen nach einem Zeitintervall von 5 Std gegebenen zweiten HU-Puls (0,5 mg/g Körpergewicht) auf etwa 10 Std verlängert werden kann. Auch hier ist die Beendigung des Blocks mit dem Unterschreiten der gleichen HU-Konzentration im Tumorgewebe ($\sim 2 \times 10^{-5}$ Mol/10³ g) korreliert.

Für die foetale Ratte (Abb. 9) beträgt die Blockdauer nach Injektion von 0,5 bzw. 0,25 mg HU/g Körpergewicht bei graviden BD IX-Ratten ebenfalls etwa 5 bzw. 2,5 Std, jedoch ist hier der Zeitpunkt der Beendigung des Blocks mit dem Unterschreiten einer HU-Konzentration von etwa 2×10^{-4} Mol/10³g Foetalgewebe

(HU-Konzentration im Blut des Muttertieres zum gleichen Zeitpunkt etwa 2×10^{-5} m!) korreliert (Abb. 10).

Da eine autoradiographische Auswertung allein aus methodischen Gründen keine quantitative Aussage bezüglich der während eines DNA-Syntheseblocks noch bestehenden Restsynthese gestattet, wurden beim Rattenembryo nach

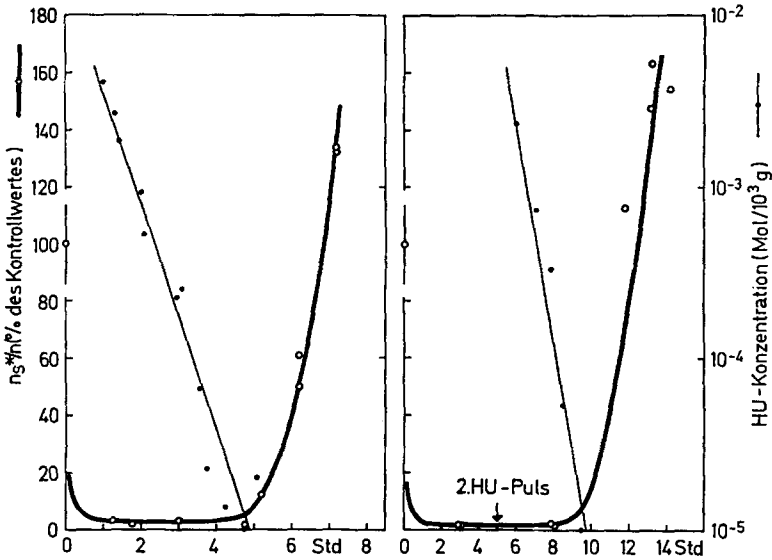


Abb. 8. Anteil DNA-synthetisierender Zellen (n_s^*/n) des BICR/M1R-Tumors der Marshall-Ratte als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von 0,5 mg HU/g Körpergewicht (linke Grafik), und nach zweimaliger Injektion von 0,5 mg HU/g Körpergewicht im Abstand von 5 Std (rechte Grafik). Zusätzlich ist die HU-Konzentration im Tumorgewebe als Funktion der Zeit angegeben. Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert für einen Tumor; der Kontrollwert (\pm Standardabweichung) ist ein Mittelwert für 8 Tumoren. Ordinatens, links: n_s^*/n (% des Kontrollwertes), —○—, rechts: HU-Konzentration (Mol/10³ g), —●—. Abszissen, linke Grafik: Zeit nach HU-Puls (Std), rechte Grafik: Zeit nach dem ersten HU-Puls (Std)

gründlicher Extraktion der säurelöslichen Fraktion Direktmessungen der eingebauten ³H-Aktivität im Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer durchgeführt. Es ergaben sich 1 Std nach Injektion von 0,25 bzw. 0,5 mg HU/g Körpergewicht bei jeweils 8 unabhängigen Bestimmungen Mittelwerte von 1,8% bzw. 0,9% der ³H-Aktivität der Kontrollwerte. Durch Langzeitexposition der entsprechenden Autoradiogramme konnte ferner gezeigt werden, daß die Restsynthese offenbar nicht einzelnen, gegenüber der inhibitorischen Wirkung des HU resistenten Zellen, sondern allen S-Zellen zuzuschreiben ist.

Es war weiter zu prüfen, ob die Hemmwirkung bei einer bestimmten, nach HU-Puls im Blut gemessenen HU-Konzentration derjenigen eines *in vitro*-Ansatzes mit gleicher HU-Konzentration entspricht. Durch Vergleichsmessungen an HeLa-Zellen in Monolayerkultur konnte gezeigt werden, daß dies in der Tat der Fall ist: Bei Inkubation der Referenzzellen mit Blutplasmaproben, die zu ver-

schiedenen Zeiten nach *in vivo*-Applikation von HU gewonnen worden waren, entsprach die Abhängigkeit der ^3H -Thymidin-Einbauhemmung von der HU-Konzentration derjenigen von Kulturen, denen entsprechende HU-Mengen im Kulturmedium zugesetzt worden waren (Abb. 11). Dieser Befund war insofern

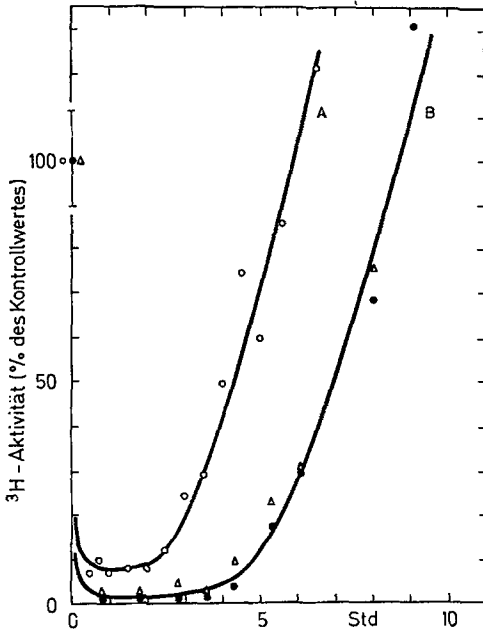


Abb. 9

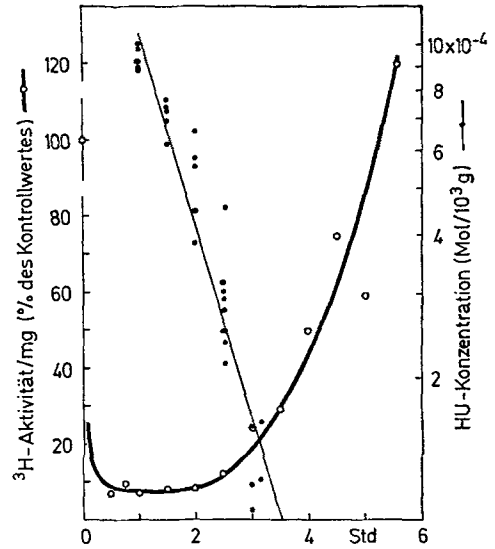


Abb. 10

Abb. 9. DNA-Synthese der fetalen Ratte als Funktion der Zeit nach Injektion von 0,25 mg HU/g Körpergewicht (O, Kurve A) bzw. 0,5 mg HU/g Körpergewicht (Δ , \bullet , Kurve B) bei BD IX-Ratten am 18. Tag der Gravidität. Jeder Meßpunkt entspricht einem Mittelwert für 2—8 Embryonen. Kontrollwert \pm Standardabweichung. Ordinate: ^3H -Aktivität/mg Trockengewicht (% des Kontrollwertes) (\bullet , O); bzw. ^3H -Aktivität/ 10 μ Mikrotomschnitt (% des Kontrollwertes) (Δ) Abszisse: Zeit nach HU-Puls (Std)

Abb. 10. DNA-Synthese der fetalen Ratte als Funktion der Zeit nach Injektion von 0,25 mg HU/g Körpergewicht bei BD IX-Ratten am 18. Tag der Gravidität. Zusätzlich ist die HU-Konzentration im Embryo als Funktion der Zeit angegeben. Die mit (O) bezeichneten Meßpunkte sind Mittelwerte für 3—8 Embryonen, die mit (\bullet) bezeichneten Meßpunkte entsprechen jeweils einem Embryo. Ordinate, links: ^3H -Aktivität/mg Trockengewicht (% des Kontrollwertes), —O—, rechts: HU-Konzentration (Mol/10³ g), — \bullet —. Abszisse: Zeit nach HU-Puls (Std)

von Bedeutung, als in Anbetracht des noch ungeklärten Mechanismus der DNA-Synthesehemmung durch HU nicht von vornherein unterstellt werden durfte, daß die gemessenen HU-Konzentrationskinetiken mit denjenigen des eigentlichen Inhibitors (falls es sich um ein Derivat von HU handeln sollte) parallel verlaufen würden.

Als Modellsystem für die Analyse der Kurz- und Langzeiteffekte einer temporären Blockade der DNA-Synthese auf die Kinetik proliferierender Zellpopula-

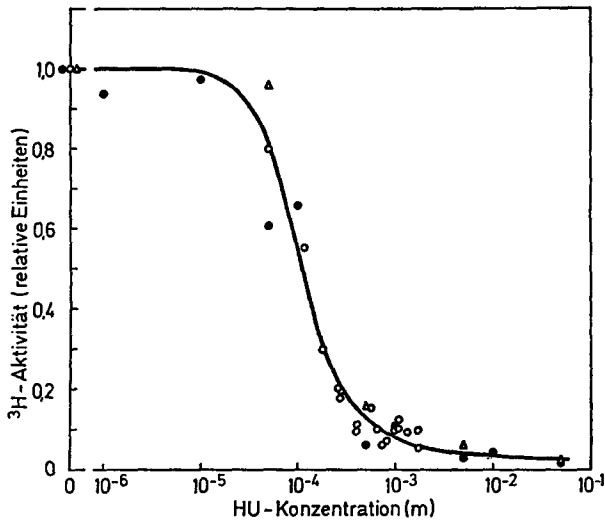


Abb. 11. Inhibition der DNA- Synthese in Hela-Zellen in Abhängigkeit von der HU-Konzentration des Kulturmediums. Messungen unter Standardbedingungen. Meßpunkte: Mittelwerte für ≥ 3 Bestimmungen, ●: Kulturmedium + HU, Δ : Humanblutplasma + HU, ○: Humanblutplasma nach *in vivo*-Applikation von HU (kolorimetrische Bestimmung der HU-Plasmakonzentration). Ordinate: ^3H -Thymidineinbau/Standardzellzahl (relative Einh.). Abszisse: HU-Konzentration des Kulturmediums bzw. Humanblutplasmas (m)

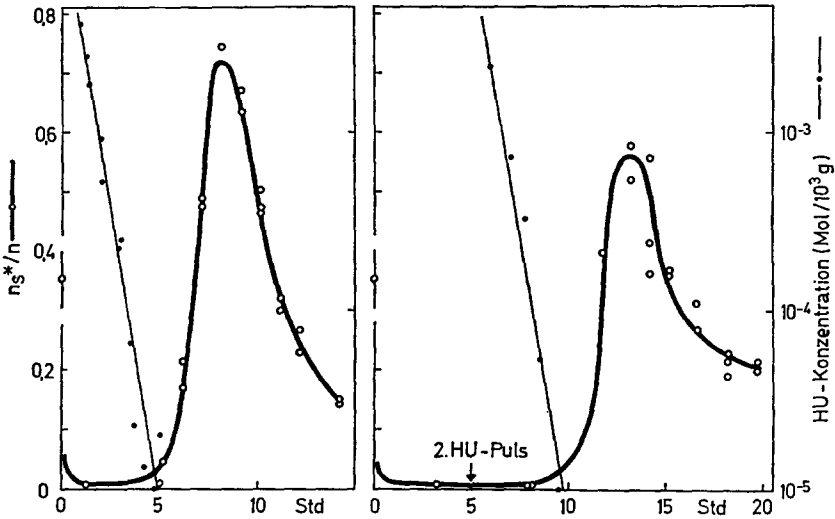


Abb. 12. Anteil DNA-synthetisierender Zellen (n_s^*/n) des BICR/MIR-Tumors der Marshall-Ratte als Funktion der Zeit nach einmaliger Injektion von 0,5 mg HU/g Körpergewicht (linke Grafik), und nach zweimaliger Injektion von 0,5 mg HU/g Körpergewicht im Abstand von 5 Std (rechte Grafik). Zusätzlich ist die HU-Konzentration im Tumor als Funktion der Zeit angegeben. Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert für einen Tumor. Der Kontrollwert (\pm Standardweichung) ist ein Mittelwert für 8 Tumoren. Ordinate, links: n_s^*/n , —○—, rechts: HU-Konzentration (Mol/ 10^3 g), —●—. Abszissen: linke Grafik: Zeit nach HU-Puls (Std), rechte Grafik: Zeit nach dem ersten HU-Puls (Std)

tionen *in vivo* wurde der BICR-MIR-Tumor der Marshall-Ratte verwendet. Das BICR-MIR-System erschien für diese Untersuchungen besonders geeignet, da seine Zellcyclusparameter zuvor bestimmt worden waren (s. Tab. 1). Bei den zellkinetischen Messungen wurde der Anteil DNA-synthetisierender Zellen (n_S^*/n), bzw. der Anteil von Zellen in Mitose (n_M/n) als Funktion der Zeit nach Blockade der DNA-Synthese bestimmt.

In Abb. 12 ist die Kurzzeitkinetik des BICR/MIR-Systems nach Inhibition der DNA-Synthese für 5 Std bzw. 10 Std dargestellt. Der scharfe Anstieg von n_S^*/n nach Beendigung des Blocks und das Durchlaufen eines Peaks etwa 3 Std nach Beendigung des Blocks zeigt, daß eine partielle Synchronisation der Population erreicht wurde. Die Peaks für n_S^*/n werden in beiden Fällen etwa 4 Std später von Peaks für n_M/n gefolgt (in Abb. 12 nicht dargestellt), die den Kontrollwert für n_M/n um etwa einen Faktor 3,5 bzw. 2,5 übersteigen (Rajewsky, 1970(1); (s. auch Abb. 13). Während der Peakwert für n_S^*/n nach einem 5 Std-Block gut mit dem aufgrund der Zellaltersverteilung der asynchronen Population berechneten theoretischen Wert übereinstimmt, ist der Peakwert für n_S^*/n nach einem 10 Std-Block deutlich niedriger als der theoretisch erwartete Wert. Dies muß dahingehend interpretiert werden, daß während des Blocks ein Teil der blockierten S-Zellen inaktiviert wurde, und zwar wahrscheinlich infolge einer für dieses Zellsystem zu extensiven Blockadedauer ("unbalanced growth"; Cole u. Strauss, 1970; Eidinoff u. Rich, 1959; Kim u. Mitarb., 1967; Rueckert u. Mueller, 1960). In Anbetracht

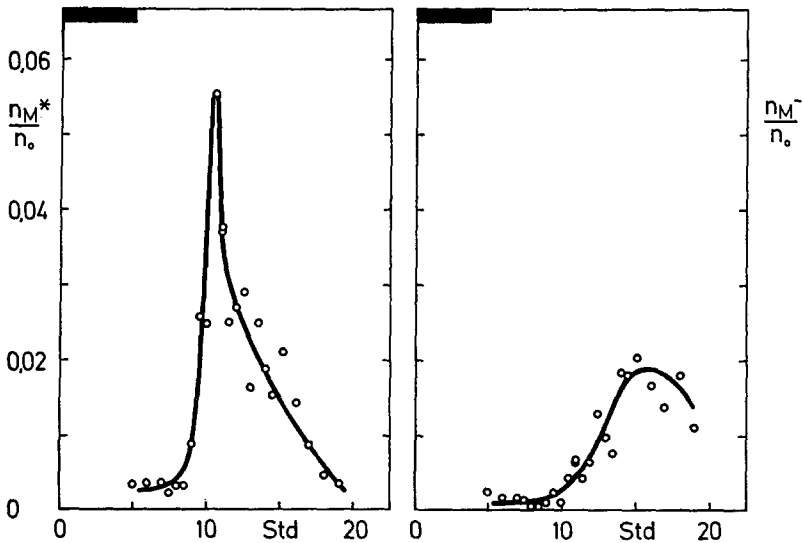


Abb. 13. Anteil von BICR/MIR-Zellen in Mitose als Funktion der Zeit nach Injektion von 0,5 mg HU/g Körpergewicht. 30 min vor dem HU-Puls wurden die zu diesem Zeitpunkt in der S-Periode des Zellcyclus befindlichen Zellen mit ^3H -Thymidin markiert. Die Meßwerte sind Mittelwerte für je 2 Tumoren. Die schwarzen Balken in den linken oberen Ecken der Grafiken geben die Dauer des DNA-Syntheseblocks an. Die Gesamtzahl der Zellen (n) wurde jeweils auf die Ausgangszellzahl (n_0) der Population vor der Mitose korrigiert. *Linke Grafik:* Anteil markierter BICR/MIR-Zellen in Mitose (n_M^*/n_0); linke Ordinate. *Rechte Grafik:* Anteil unmarkierter BICR/MIR-Zellen in Mitose (n_M/n_0); rechte Ordinate. *Abszissen:* Zeit nach HU-Puls (Std)

der zur Verlängerung der Blockadedauer verwendeten Technik (2 Pulsinjektionen von je 0,5 mg HU/g Körpergewicht im Abstand von 5 Std) könnte ein cytotoxischer Effekt jedoch auch darauf zurückzuführen sein, daß die blockierten Zellen ein weiteres Mal der hohen HU-Ausgangskonzentration von etwa 5×10^{-3} Mol/ 10^{-3} g ausgesetzt wurden. Andererseits zeigt aber das Auftreten eines Mitosepeaks 4–5 Std nach dem Peak für n_S^*/n , daß auch bei einer Blockdauer von 10 Std ein Teil der blockierten S-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur DNA-Synthese und Mitose intakt geblieben sein muß.

Obwohl im Falle des 5 Std-Blocks bereits die Höhe des erreichten Peaks für n_S^*/n eine akute Inaktivierung von S-Zellen unwahrscheinlich macht, wurde zusätzlich die Passage der zuvor in S geblockten Zellen durch die erste auf den Block folgende Mitose verfolgt. Dazu wurden die S-Zellen der asynchronen BICR/MIR-Population 30 min vor Beginn eines 5 Std-Blocks mit ^3H -Thymidin vor-markiert, und nach Beendigung des Blocks die Passage markierter und unmarkierter Zellen durch die Mitose registriert. Die Abb. 13 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs. Man erkennt deutlich, daß zunächst ausschließlich markierte Zellen (n_M^*/n_0) die Mitose durchlaufen (Maximum etwa 6 Std nach Beendigung des Blocks). Erst etwa 10 Std nach Beendigung des Blocks findet sich ein Maximum für den Mitoseindex unmarkierter Zellen (n_M/n_0), welches den während des Blocks im G_1 -S-Übergangsbereich aufgelaufenen Zellen zuzuschreiben ist.

In Abb. 14 ist die Langzeitkinetik des BICR/MIR-Systems nach einer Blockdauer von 10 Std dargestellt. Zusätzlich zu dem in Abb. 12 gezeigten ersten Peak für n_S^*/n bei etwa 13 Std tritt hier ein zweiter Peak bei etwa 26 Std (s. auch Abb. 15) auf, welcher dem Anteil der nach dem Block intakt gebliebenen S-Zellen zugeschrieben werden muß. Diese Zellen haben etwa 7–8 Std nach Beendigung des Blocks die Mitose passiert und durchlaufen nun nach einer G_1 -Periode von normaler Dauer ihre nächste S-Periode. Der dritte, größere Peak, dessen Anstieg bei etwa 31 Std beginnt, wird durch die während des Blocks im G_1 -S-Übergangsbereich akkumulierten Zellen verursacht.

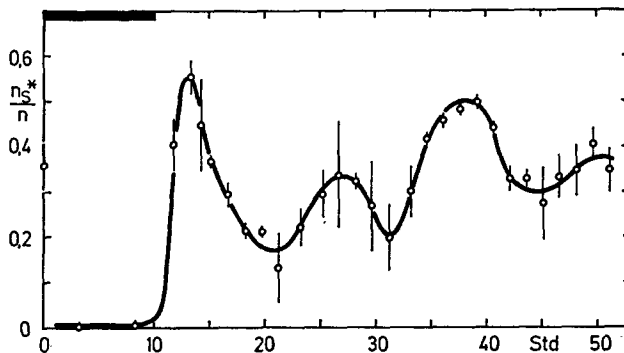


Abb. 14. Anteil DNA-synthetisierender BICR/MIR-Zellen (n_S^*/n) als Funktion der Zeit nach zweimaliger Injektion von 0,5 mg HU/g Körpergewicht im Abstand von 5 Std. Die Meßpunkte entsprechen Mittelwerten für 2–3 Tumoren. Die jeweiligen Standardabweichungen sind angegeben. Der schwarze Balken in der linken oberen Ecke der Grafik gibt die Dauer des DNA-Syntheseblocks an. Ordinate: n_S^*/n . Abszisse: Zeit nach dem ersten HU-Puls (Std). (Nach Rajewsky [1970 (1)] mit Genehmigung von Academic Press Inc., New York-London)

Abb. 15 zeigt das Ergebnis eines Experiments, in dem beim BICR/MIR-Tumor nach einem initialen Block von 5 Std nach 30 Std, also zu Beginn des in Abb. 14 gezeigten dritten Peaks für n_s^*/n , eine zweite Blockade (0,4 mg HU/g Körpergewicht) durchgeführt wurde. Dieser zweite Block hat einen neuen „Initial-peak“ mit einer gegenüber dem normalerweise nach einem 5 Std-Block auftretenden ersten Peak gesteigerten Höhe und Amplitude zur Folge. Daraus kann geschlossen werden, daß der Synchroniegrad durch ein an den Zellcyclusparametern orientiertes „timing“ mehrfacher Blocks gesteigert werden kann.

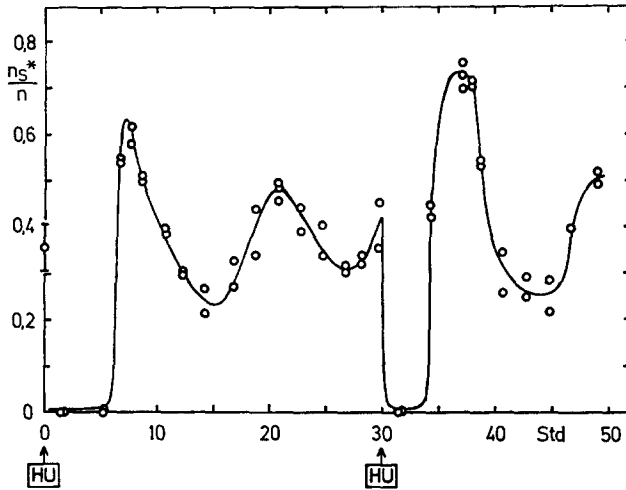


Abb. 15. Anteil DNA-synthetisierender BICR/MIR-Zellen (n_s^*/n) als Funktion der Zeit nach Injektion von 0,5 und 0,4 mg HU/g Körpergewicht im Abstand von 30 Std. Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert für einen Tumor. Der Kontrollwert (\pm Standardabweichung) ist ein Mittelwert für 8 Tumoren. Ordinate: n_s^*/n . Abszisse: Zeit nach dem ersten HU-Puls (Std). (Nach Rajewsky [1970 (1)] mit Genehmigung von Academic Press Inc., New York-London)

In den Abb. 16, 17 u. 18 sind Ergebnisse proliferationskinetischer Messungen an der fetalen BD IX-Ratte (18. Tag der Gravidität) sowie an Milz und Leber der adulten Marshall-Ratte dargestellt. Dabei handelt es sich im Falle der fetalen Ratte um Messungen der ^3H -Aktivität/mg Gewebe nach in vivo-Pulsmarkierung mit ^3H -Thymidin, also nicht um die in allen anderen Fällen durchgeführte autoradiographische Bestimmung von n_s^*/n .

Abb. 16 zeigt das Verhalten der DNA-Synthese bei fetalen Ratten nach Injektion einer Pulsdosis von 0,25 mg HU/g Körpergewicht bei graviden BD IX-Ratten. In Analogie zu den Beobachtungen am BICR/MIR-Tumor führt dies zu einer etwa 2,5 Std dauernden Blockade der DNA-Synthese, die von einem raschen Anstieg, und nach Erreichen eines Peaks bei etwa 7–8 Std von einem erneuten Absinken gefolgt ist. Die Position eines offenbar vorhandenen zweiten Peaks kann wegen der Streuung der Meßwerte nicht sicher festgelegt werden. Die fetale Ratte enthält eine Kombination meist sehr rasch proliferierender Zellpopulationen. Bei

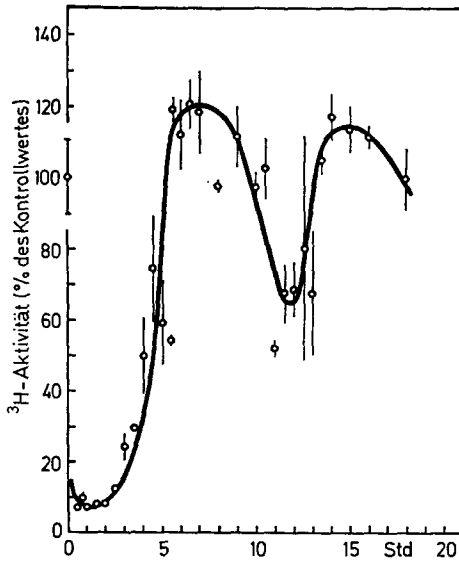


Abb. 16. DNA-Synthese der fetalen Ratte als Funktion der Zeit nach Injektion von 0,25 mg HU/g Körpergewicht bei BD IX-Ratten am 18. Tag der Gravidität. Die Meßpunkte (\pm Standardabweichung) sind Mittelwerte für 3—8 Embryonen. Ordinate: ³H-Aktivität/mg Trockengewicht (% des Kontrollwertes). Abszisse: Zeit nach HU-Puls (Std) — (Nach Rajewsky u. Mitarb. (1971) mit Genehmigung von Academic Press Inc., New York-London)

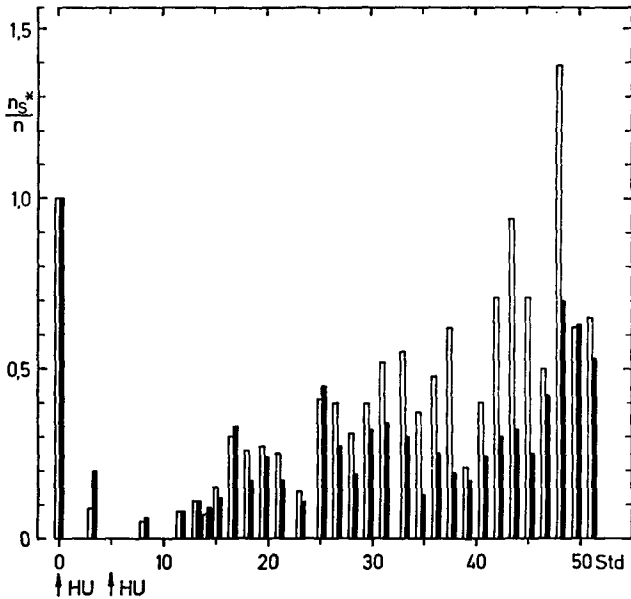


Abb. 17. Anteil DNA-synthetisierender Milzzellen (n_s^*/n) der adulten Marshall-Ratte (\varnothing) als Funktion der Zeit nach zweimaliger Injektion von 0,5 mg HU/g Körpergewicht im Abstand von 5 Std. ■ Kleine Lymphocyten, □ Alle Milzzellen. Die Kontrollwerte wurden auf den Wert 1,0 normiert. Ordinate: n_s^*/n (relative Einheiten). Abszisse: Zeit nach dem ersten HU-Puls (Std)

proliferierenden fetalen Zellsystemen ist der Anteil von t_S an t_G meist sehr hoch, d. h. t_{G1} und t_{G2} sind vergleichsweise von geringer Dauer (s. Pilgrim u. Mitarb., 1965). Daher kann als Folge der temporären Blockade der DNA-Synthese ein den Kontrollwert erheblich übersteigender Peakwert in diesem Falle nicht erwartet

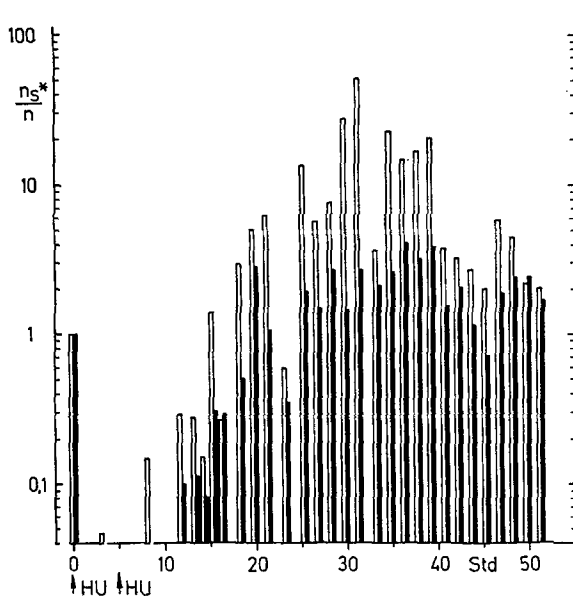


Abb. 18. Anteil DNA-synthetisierender Leberzellen (n_s^*/n) der adulten Marshall-Ratte (♀) als Funktion der Zeit nach zweimaliger Injektion von 0,5 mg HU/g Körpergewicht im Abstand von 5 Std. □ Leberparenchymzellen, ■ Nichtparenchymale Leberzellen. Die Kontrollwerte wurden auf den Wert 1,0 normiert. Ordinate: n_s^*/n (relative Einheiten). Abszisse: Zeit nach dem ersten HU-Puls (Std)

werden. Es besteht dementsprechend kein Grund zu der Annahme, daß eine höhergradige Inaktivierung von Zellen eingetreten ist. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß Aufzuchtstrate und Lebenserwartung der Feten durch ein Blockexperiment des beschriebenen Typs nicht beeinflußt werden.

Die Proliferationskinetik der verschiedenen Zellpopulationen von Milz und Leber der adulten Ratte nach temporärer Blockade der DNA-Synthese läßt eine vom Verhalten des BICR-MIR-Tumors bzw. der embryonalen Ratte abweichende Reaktion dieser Zellsysteme erkennen.

In Abb. 17 ist das Verhalten von n_s^*/n in der Milz als Funktion der Zeit nach einem HU-Block durch zweimalige Injektion von 0,5 mg HU/g Körpergewicht im Abstand von 5 Std dargestellt. Hier ergibt sich sowohl für die gesamten Zellen der Milz als auch für die kleinen Milzlymphocyten alleine ein stark verzögerter Wiederanstieg dieses Parameters. Zu einem Zeitpunkt von 50 Std nach Blockbeginn hat n_s^*/n nur bei Bezug auf die Gesamtpopulation den Bereich des Kontrollwerts erreicht. Der im Vergleich zur Gesamtpopulation langsamere Anstieg von n_s^*/n für die Population der kleinen Lymphocyten weist auf eine hochgradige Schädigung besonders dieses Zelltyps hin.

Die Parenchymzellpopulation der adulten Leber ist bekanntlich gekennzeichnet durch einen extrem niedrigen Anteil von Zellen in DNA-Synthese und Mitose, bzw. durch einen sehr hohen Anteil anscheinend nicht im Zellcyclus befindlicher („G₀“-) Zellen, welche die Fähigkeit besitzen, nach chemischer Schädigung oder teilweiser Entfernung der Leber wieder in den Zellcyclus einzutreten (Leberregeneration; s. Bucher, 1963). Der nach zweimaliger Injektion von 0,5 mg HU/g Körpergewicht im Abstand von 5 Std für diese Zellpopulation beobachtete Anstieg von n_s^*/n auf etwa das 30–50fache des Kontrollwerts (s. Abb. 18) stellt ohne Zweifel eine „regenerative“ Reaktion dar, d. h. sie wird im wesentlichen durch Stimulation zuvor nicht im Zellcyclus befindlicher Zellen verursacht. In Analogie zu der Situation nach partieller Hepatektomie beginnt n_s^*/n etwa 15 Std nach dem ersten HU-Puls über den Kontrollwert anzusteigen. Dies läßt vermuten, daß bereits dem ersten HU-Puls ein „toxischer“ Effekt auf die Parenchymzellpopulation zuzuschreiben ist. Im Gegensatz zur Parenchymzellpopulation steigt der n_s^*/n -Wert für die nicht-parenchymalen Zellen nur auf das maximal 2–4fache des Kontrollwertes an. Bei beiden Zellpopulationen beginnt der Wiederanstieg von n_s^*/n , entsprechend den Verhältnissen beim BICR/MIR-Tumor und bei der fetalen Ratte, etwa 5 Std nach dem zweiten HU-Puls.

Diskussion

Das in den vorliegenden Experimenten zur *in vivo*-Synchronisation proliferierender Zellpopulationen verwendete Verfahren basiert auf der Vorstellung, daß eine temporäre spezifische Blockade der DNA-Synthese die in der S-Periode des Zellcyclus befindlichen Zellen daran hindert, ihre DNA-Synthese zuendenzuführen, während die z. Z. des Blocks in G₂, M oder G₁ befindlichen Zellen ihren Weg durch den Zellcyclus ungehindert fortsetzen und sich schließlich im G₁-S-Übergangsbereich aufstauen. Nach Beendigung des Blocks liegt dann eine teilsynchronisierte Zellpopulation vor. Die temporäre Blockade der DNA-Synthese führt dabei zu einer charakteristischen Veränderung des normalen Zellaltersverteilungsdigramms der asynchronen Population (vgl. Abb. 6 u. 7). Der Grad der durch einen Block der DNA-Synthese erreichbaren Synchronie hängt ab von der Blockdauer, von der relativen Dauer von t_s im Vergleich zu t_c sowie von der Verteilung von t_c bei der gegebenen Zellpopulation. Mit anderen Worten, um je weniger t_c die Dauer der S-Periode (t_s) übersteigt, je kürzer die Blockdauer im Vergleich zu $t_c - t_s$, und je größer die Streuung von t_c (und der Dauer der einzelnen Zellcyclusperioden) (vgl. Abb. 2), desto geringer der Grad der erreichbaren Synchronie. Eine zusätzliche Verbesserung des Synchroniegrades kann grundsätzlich auf zwei Wegen erzielt werden:

a) Die blockierten Zellen können für die Dauer des Blocks nicht nur in S arretiert, sondern infolge cytotoxischer Effekte des Inhibitors auch abgetötet, d. h. aus der proliferativen Fraktion der Population eliminiert werden. Die synchronisierte Population besteht dann nur noch aus den im G₁-S-Übergangsbereich aufgestauten Zellen, d. h. ihre Zellaltersverteilung ist wesentlich enger und ihr Synchroniegrad damit entsprechend höher geworden. Dieser Effekt tritt bei der temporären Blockade der DNA-Synthese häufig in mehr oder weniger ausgeprägter Weise auf. Die gezielte Anwendung hoher Inhibitorkonzentrationen, bzw. excessi-

ver Blockzeiten zur Ausschaltung der blockierten S-Zellen wird jedoch unter *in vivo*-Bedingungen naturgemäß auf spezielle Fälle beschränkt bleiben müssen.

b) Es können mehrfache Blocks nach einem an den Zellcyclusparametern der Population orientierten zeitlichen Schema angewendet werden. So wird ein zweiter Block, der zeitlich so angesetzt ist, daß er die aus dem ersten Block entlassenen S-Zellen im G_1 -S-Übergangsbereich vor ihrer nächstfolgenden S-Periode abfängt, den Grad der Synchronie wesentlich erhöhen (vgl. Abb. 15).

Unsere Untersuchungen zeigen, daß eine *in vivo*-Synchronisation proliferierender Säugergewebe durch temporäre Inhibition der DNA-Synthese unter geeigneten Bedingungen erreicht werden kann. Dabei hat sich Hydroxyharnstoff (HU) wegen seiner hohen Spezifität und Wirksamkeit als besonders geeignet erwiesen. Die Substanz ist in den letzten Jahren mit unterschiedlichen Erfolgen auch in der Tumorthherapie verwendet worden (Literatur s. Ariel, 1970). Sie bietet neben einer geringen allgemeinen Toxizität außerdem den für eine Anwendung zur Synchronisation entscheidenden Vorzug, daß ihr Abbau im Säugerorganismus sehr rasch erfolgt, und damit eine nahezu verzögerungsfreie Beendigung von DNA-Syntheseblocks ermöglicht.

Der Mechanismus der DNA-Synthesehemmung durch HU ist noch nicht vollständig geklärt. Neben einer Inhibition des Ribonucleotid-Reduktase-Systems (Adams u. Lindsay, 1967; Gale, 1968; Krakoff u. Mitarb., 1968; Young u. Hodas, 1964; Young u. Mitarb., 1967 (2)) werden auch direkte Wirkungen auf die DNA (Rosenkranz, 1970; Rosenkranz u. Jacobs, 1968; Rosenkranz u. Mitarb., 1968; Rosenkranz u. Mitarb., 1969) sowie die Entstehung aktiver Metabolite unter *in vivo*-Bedingungen (Rosenkranz, 1970; Rosenkranz u. Mitarb., 1969) diskutiert. HU wird *in vivo* in der Hauptsache zu Harnstoff abgebaut (Adamson u. Mitarb., 1965 (1); Colvin u. Bono, 1970). Das für den Abbau der Substanz entscheidende Organ ist die Leber. Nach *in vivo*-Applikation von HU bestimmt die Abbaurrate in der Leber die Abfallkinetik des Inhibitors in Blut und Geweben (Fabricius u. Rajewsky, 1971; vgl. Tab. 2). Mit Hilfe eines modifizierten Hydroxamatnachweises (s. Fabricius u. Rajewsky, 1971) kann die HU-Konzentration in Blut und Geweben exakt gemessen werden. Die HU-Konzentrationswerte für Blut und Tumorgewebe (BICR/MIR-Tumor) bei der Ratte unterscheiden sich nur unwesentlich. Dagegen läßt sich die für eine bestimmte Säugerspecies gemessene Halbwertszeit ($t_{1/2}$) des HU-Abbaus nicht direkt auf andere Species übertragen. Während beispielsweise $t_{1/2}$ für das Blut der Maus etwa 13 min beträgt, liegen die entsprechenden Werte für die Ratte bzw. den Menschen um einen Faktor 1,7 bzw. 7,6 höher. In den untersuchten Geweben der Ratte stieg die nach Injektion von 0,25 bzw. 0,5 mg HU/g Körpergewicht nahezu vollständig blockierte DNA-Synthese im allgemeinen nach Unterschreiten einer HU-Konzentration von etwa 2×10^{-5} Mol/ 10^3 wieder an. Dagegen trat bei der fetalen Ratte die Beendigung des Blocks bereits bei Unterschreiten einer HU-Konzentration von etwa 2×10^{-4} Mol/ 10^3 g ein. Ein ähnlicher Schwellenwert ($\sim 1,5 \times 10^{-4}$ Mol/ 10^3 g) ergab sich für menschliche Leukämiezellen (Rajewsky u. Grüneisen, in Vorbereitung).

Während der Synchronisationseffekt nach Blockdauern von 2,5 Std bzw. 5 Std beim BICR/MIR-Tumor der Ratte, und mit großer Wahrscheinlichkeit auch bei

der fetalen Ratte, den auf der Zellaltersverteilung basierenden theoretischen Erwartungen entsprach, traten nach einer Blockdauer von 10 Std durch zweimalige Injektion von 0,5 mg HU/g Körpergewicht im Abstand von 5 Std Anzeichen für cytotoxische Effekte auf. Diese schienen beim BICR/M1R-Tumor auf einen Teil der blockierten S-Zellen beschränkt zu sein. Dagegen muß im Falle der Milz- und Leberparenchymzellen damit gerechnet werden, daß auch solche Zellen inaktiviert wurden, die sich während des Blocks nicht in der S-Periode des Zellcyclus befanden. Es konnte zwar für den Fall eines 5 Std-Blocks beim BICR-M1R-Tumor gezeigt werden, daß die in S blockierten Zellen nach Beendigung des Blocks die nächstfolgende Mitose offenbar intakt passieren; jedoch kann aus methodischen Gründen die Überlebenswahrscheinlichkeit bzw. Proliferationsfähigkeit dieser Zellen *in vivo* nicht über mehrere Cyclen hin verfolgt werden. Aussagen über die langfristige Überlebenswahrscheinlichkeit von Zellen, deren DNA-Synthese *in vivo* temporär blockiert wurde, sind daher vorläufig nicht möglich.

Cytotoxische Wirkungen großer HU-Dosen auf Zellsysteme mit hohen Proliferationsraten (Kryptenepithelien des Dünndarms, Knochenmark, Thymus, Milz und Lymphknoten) sind von verschiedenen Autoren beschrieben worden (Farber u. Baserga, 1969; Philips u. Mitarb., 1967). Auch bei der nach unserer Methode durchgeführten Synchronisation der Kryptenepithelien im Dünndarm der Maus ist auf eine Inaktivierung von S-Zellen geschlossen worden (Gillette u. Mitarb., 1970). Auffällig ist die außerordentlich hohe Empfindlichkeit lymphatischer Zellen, die anscheinend bereits durch kurzzeitige HU-Blocks irreversibel geschädigt werden können (vgl. Abb. 17). Die damit gegebene Möglichkeit, eine Zellpopulation vom lymphatischen Typ durch eine temporäre Blockade der DNA-Synthese mit zusätzlicher Elimination der blockierten S-Zellen zu synchronisieren, ist kürzlich an Zellen eines transplantablen Mäuselymphoms der AKR/J-Maus ausgenutzt worden (Madoc-Jones u. Mauro, 1970; Mauro u. Madoc-Jones, 1969). Allerdings wurde hier nicht die proliferationskinetische Reaktion der Population nach Beendigung des Blocks analysiert, sondern eine bei diesem System mögliche Messung der Fähigkeit der Zellen zur Koloniebildung in der Milz durchgeführt. Eine proliferationskinetische Analyse wäre insofern notwendig gewesen, als Hinweise dafür vorliegen, daß die toxische Wirkung von HU bei lymphatischen Zellen nicht auf S-Zellen beschränkt sein muß. So sind cytotoxische Effekte von HU auch bei der „ruhenden“ Population der kleinen Knochenmarkslymphocyten beobachtet worden (Bohne u. Mitarb., 1970). In diesem Zusammenhang ist die an der Parenchymzellpopulation der adulten Rattenleber nach einem 10 Std-Block beobachtete „regenerative“ Reaktion von n_s^*/n (vgl. Abb. 18) von Interesse, die auch auf eine Schädigung nicht im Zellcyclus befindlicher, sog. „G₀“-Zellen hinweist. Dagegen konnte bei den DNA-synthetisierenden Zellen der regenerierenden Leber (sowie anderer normalerweise ruhender Zellsysteme nach Stimulation der DNA-Synthese) eine Inaktivierung durch HU nicht nachgewiesen werden (Farber u. Baserga, 1969; Schwartz u. Mitarb., 1965).

Als „Index“ für den Grad der bezüglich des Durchlaufens der DNA-Synthese erreichten Synchronie kann die Differenz zwischen dem auf die Blockade folgenden Peak und dem anschließenden Minimum für n_s^*/n verwendet werden (Sinclair, 1969). Für den BICR/M1R-Tumor der Ratte würde dieser Index nach einem 5 Std-

Block bei 0,5–0,6 liegen. Dieser Wert erscheint relativ niedrig, wenn man ihn mit in Zellkultorexperimenten gemessenen Indices von etwa 0,8 (Sinclair, 1969) vergleicht. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß Zellkulturen im allgemeinen eine weit geringere Streuung von t_G aufweisen als sie für Zellpopulationen unter *in vivo*-Bedingungen meist gefunden wird (Steel u. Mitarb., 1966; Steel u. Hanes, 1971). Im übrigen wird der wirkliche Synchroniegrad immer dann höher sein als durch diesen Index angegeben, wenn die Anzahl der unmarkierten Zellen bei der Bestimmung von n_S^*/n S-Zellen einschließt, die während des Blocks abgetötet, aber aus dem entsprechenden Zellsystem noch nicht eliminiert wurden.

Die proliferationskinetischen Befunde am BICR/M1R-Tumor enthalten Hinweise dafür, daß Zellen, die in der S-Periode blockiert worden waren, nach Beendigung des Blocks die DNA-Synthese schneller durchlaufen als unter normalen Bedingungen. Ein derartiger Effekt würde zu einer zeitweisen Erhöhung der Mitoserate führen. Dadurch würden die Mitosepeaks verständlich, die etwa 7 Std nach Beendigung der Blocks beobachtet werden und die aufgrund der Zellaltersverteilung zu diesem Zeitpunkt theoretisch zu erwartenden Werte für n_M/n erheblich übersteigen. Der gleiche Effekt könnte auch für die Trennung zweier Subpopulationen [a) Zellen, die während des Blocks in S arretiert wurden; b) Zellen, die während des Blocks im G_1 -S-Übergangsbereich angestaut wurden] verantwortlich sein, die sich im Auftreten zweier getrennter Peaks für n_S^*/n nach der ersten auf den Block folgenden Mitose ausdrückt (s. Abb. 14 u. 15). Eine Verkürzung von t_S nach temporärer Hemmung der DNA-Synthese ist für einige Zellstämme in Kultur beschrieben worden (Pfeiffer u. Tolmach, 1967; Rueckert u. Mueller, 1960; Till u. Mitarb., 1963). Für die vermutete Beschleunigung der DNA-Synthese kann eine befriedigende Deutung derzeit nicht gegeben werden. Es ist unwahrscheinlich, daß die während des DNA-Syntheseblocks beobachtete Restsynthese, die wohl auf eine Nucleotidpool-Reserve der Zellen zurückzuführen ist, einen solchen Effekt hervorrufen kann. Da HU die RNA- und Proteinsynthese nicht wesentlich beeinflußt (Pollack u. Rosenkranz, 1967; Young u. Hodas, 1964) wäre es auch denkbar, daß während eines HU-Blocks eine Anreicherung von „Initiator-“Proteinen in den blockierten S-Zellen erfolgt, die nach Beendigung des Blocks eine „synchronisierende“ Wirkung auf die zeitliche Sequenz der Replikon-Initiation in den Chromosomen (Prescott, 1969; Rajewsky, 1970 (1)) bewirken und damit zu einer Verkürzung von t_S führen könnte.

Die dargestellten Untersuchungen zur *in vivo*-Synchronisation normaler und maligner Säugerzellen sind im Hinblick auf Problemstellungen der experimentellen und klinischen Krebsforschung durchgeführt worden. So ist die Verfügbarkeit *in vivo* vorsynchronisierter Targetzellsysteme z. B. eine wichtige Voraussetzung für die Prüfung der Frage nach dem Vorhandensein Zellcyclusphasen-spezifischer Empfindlichkeitsmaxima für die Initiation der malignen Transformation durch cancerogene Agentien. Für derartige Untersuchungen bieten sich chemische Cancerogene an, die *in vivo* mit sehr kurzer Halbwertszeit abgebaut werden („Puls-cancerogene“; Rajewsky, 1970 (2)), z. B. Verbindungen vom Typ des Äthylnitrosoharnstoffs (Druckrey u. Mitarb., 1967). Eine einzige Pulsdosis dieser Substanz, in einem bestimmten Stadium der Gravidität appliziert, erzeugt bei den Nachkommen gravider Ratten mit hoher Ausbeute maligne Tumoren (Druckrey u. Mitarb., 1967). Es war das Ziel der an fetalen BD IX-Ratten durch-

geführten Synchronisationsversuche, eine Grundlage für die Bearbeitung der obengenannten Fragen zu schaffen.

Die Bedeutung synchronisierter Zellsysteme für die Prüfung der Zellcyclusphasen-Spezifität der cytociden Wirkung chemischer Substanzen oder ionisierender Strahlung braucht nicht besonders betont zu werden. Für eine ganze Reihe chemischer Verbindungen (Mauro u. Madoc-Jones, 1970) sowohl als auch für Röntgenstrahlung (Sinclair, 1968) ist eine solche, zum Teil außerordentliche starke Phasenspezifität an Zellkulturen bereits gezeigt worden. Entsprechende Verhältnisse scheinen auch bezüglich der Immuncytolyse bei bestimmten Zellstämmen in Kultur (Cikes, 1970; Shipley, 1971) und experimentellen Tumoren *in vivo* (Rajewsky u. Grüneisen, in Vorbereitung) vorzuliegen. Die Relevanz dieser Befunde für die proliferierenden Zellen maligner Tumoren muß an geeigneten *in vivo*-Systemen nachgeprüft werden.

Grundsätzlich kann daran gedacht werden, der therapeutischen Anwendung eines phasenspezifischen Agens eine (Teil-)Synchronisation der proliferierenden Tumorzellen vorzuschalten, um einen größeren Anteil maligner Zellen während ihres Empfindlichkeitsmaximums zu treffen. Jedoch müßten dazu gleichzeitig Verfahren ausgearbeitet werden, die es gestatten, die infolge ihrer Mitsynchronisation ebenfalls erhöhte Schädigungsgefahr für normale Zellsysteme des Organismus auf ein tolerables Maß zu reduzieren. Hierzu könnte unter anderem die Tatsache ausgenutzt werden, daß sich die Zellcyclusparameter der meisten Zellsysteme in spezifischer Weise unterscheiden. Als Funktion der Zeit nach Synchronisation würde daher auch die Lage der Empfindlichkeitsmaxima einer Tumorzellpopulation mit großer Wahrscheinlichkeit zunehmend von denen der Normalpopulation abweichen. Andererseits sollte die „regenerative Reserve“ normaler Zellsysteme nicht unterschätzt werden. Eine wesentliche Schwierigkeit besteht zur Zeit noch darin, daß die Zellcyclusparameter vor der Therapie nur in den seltensten Fällen gemessen oder wenigstens abgeschätzt werden können. Ihre Kenntnis ist jedoch für eine effektive Synchronisation erforderlich. Inwieweit eine *in vivo*-Synchronisation tatsächlich als Teil eines an den Zellcyclusparametern der malignen Population orientierten Therapieschemas Verwendung finden kann, muß der weiteren Entwicklung auf diesem Gebiet überlassen bleiben. Über zur Zeit im Gange befindliche Untersuchungen zu diesem Fragenkomplex wird zu gegebener Zeit berichtet werden.

Zu besonderem Dank verpflichtet sind die Autoren Herrn Prof. Dr. H. Friedrich-Freksa für sein Interesse und die großzügige Unterstützung der Arbeit, Herrn Dr. G. G. Steel, Biophysics Department, Institute of Cancer Research, London, für die Computeranalyse der „Markierte-Mitosen“-Daten, sowie den Herren Dipl.-Biochem. J. Oberbarnscheidt, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, Dr. F. S. Philips, Sloan-Kettering-Institute for Cancer Research, New York, Prof. Dr. Z. Simon, Institut f. Organische Chemie, Universität Timisoara, und Prof. Dr. W. Wilmanns, Medizinische Klinik der Universität Tübingen, für wertvolle Hinweise und Diskussionen. Die HU-Konzentrationsmessungen wurden von E. Fabricius im Rahmen einer Dissertation an der Universität Tübingen durchgeführt.

Miss B. Stearns, Squibb Institute for Medical Research, New Brunswick, N. J., danken wir für die freundliche Überlassung einer Testmenge von HU.

Für ausgezeichnete technische Mitarbeit sind wir Frau I. Arndt, Frau O. Beck, Fräulein T. Müller und Frau H. Rajewsky verpflichtet.

Ein Teil der Untersuchungen wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Literatur

- Adams, R. L. P., Lindsay, J. G.: Hydroxyurea-reversal of inhibition and use as a cell-synchronizing agent. *J. Biol. Chem.*, **242**, 1314 (1967).
- Adamson, R. H., Ague, S. L., Hess, S. M., Davidson, J. D.: (1) The distribution, excretion and metabolism of hydroxyurea-¹⁴C. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **150**, 322 (1965).
- Yancey, S. T., Ben, M., Loo, T. L., Rall, D. P.: (2) Some aspects of the antitumor activity and pharmacology of hydroxyurea. *Arch. Intern. Pharmacodyn.* **153**, 87 (1965).
- Ariel, I. M.: Therapeutic effects of hydroxyurea. *Cancer*, **25**, 705 (1970).
- Barrett, J. C.: A mathematical model of the mitotic cycle and its application to the interpretation of percentage labeled mitoses data. *J. Natl. Cancer Inst.* **37**, 443 (1966).
- Bergmann, F., Segal, R.: The separation and determination of microquantities of lower aliphatic acids, including fluoroacetic acids. *Biochem. J.* **62**, 542 (1956).
- Bohne, F., Haas, R. J., Fliedner, T. M., Fache, I.: The role of slowly proliferating cells in rat bone marrow during regeneration following hydroxyurea. *Brit. J. Haematol.* **19**, 533 (1970).
- Bresciani, F.: A comparison of the cell generative cycle in normal, hyperplastic and neoplastic mammary gland of the C3H mouse. In: *Cellular radiation biology. 18th Annual Symposium on Fundamental Cancer Research*, p. 547. The University of Texas M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute. Baltimore: The Williams and Wilkins Company (1965).
- Bucher, N. L. R.: Regeneration of mammalian liver. *Intern. Rev. Cytol.* **15**, 245 (1963).
- Bush, E. T.: General applicability of the channels ratio method of measuring liquid scintillation counting efficiencies. *Analyt. Chem.*, **35**, 1024 (1963).
- Cikes, M.: Relationship between growth rate, cell volume, cell cycle kinetics, and antigenetic properties of cultured murine Lymphoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **45**, 979 (1970).
- Cleaver, J. E.: Thymidine metabolism and cell kinetics. North Holland Research Monograph, *Frontiers of Biology*, Vol. 6, Herausgegeben von A. Neuburger und E. L. Tatum. North Holland Publishing Co., Amsterdam (1967).
- Cole, M. B., Strauss, B.: Cell killing and the accumulation of breaks in the DNA of HEp-2 cells incubated in the presence of hydroxyurea. *Cancer Res.* **30**, 2314 (1970).
- Colvin, M., Bono, Jr., V. H.: The enzymatic reduction of hydroxyurea to urea by mouse liver. *Cancer Res.* **30**, 1516 (1970).
- Dresler, W. F. C., Stein, R.: Über den Hydroxylharnstoff. *Ann. Chim.* **150**, 242 (1869).
- Druckrey, H.: Genotypes and phenotypes of ten inbred strains of BD-rats. *Arzneimittel-Forsch.* **21**, 1274 (1971).
- Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmähl, D.: Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Z. Krebsforsch.* **69**, 103 (1967).
- Eidinoff, M. L., Rich, M. A. Growth inhibition of a human tumor cell strain by 5-fluoro-2'-deoxyuridine: Time parameters for subsequent reversal by thymidine. *Cancer Res.* **19**, 521 (1959).
- Fabricius, E., Rajewsky, M. F.: Determination of hydroxyurea in mammalian tissues and blood. *Europ. J. Clin. Biol. Res.* **16**, 679 (1971).
- Farber, E., Baserga, R.: Differential effects of hydroxyurea on survival of proliferating cells. *Cancer Res.* **29**, 136 (1969).
- Gale, G. R.: Antagonism by deoxyribosides of the inhibitory action of certain hydroxamic acids on deoxyribonucleic acid synthesis. *Experientia* **24**, 57 (1968).
- Gillette, E. L., Withers, H. R., Tannock, I. F.: The age sensitivity of epithelial cells of mouse small intestine. *Radiology* **96**, 639 (1970).
- Higgins, G. M., Anderson, R. M.: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Path.* **12**, 186 (1931).
- Jacobs, S. J.: Studies on the mode of action of hydroxyurea. Ph. D. Dissertation, Columbia University (1968).
- Kalberer, F., Rutschmann, J.: Eine Schnellmethode zur Bestimmung von Tritium, Radio-kohlenstoff und Radioschwefel in beliebigem organischem Probenmaterial mittels des Flüssigkeits-Szintillationszählers. *Helv. Chim. Acta* **242**, 1957 (1961).

- Kim, J. H., Gelbard, A. S., Perez, A. G.: Action of hydroxyurea on the nucleic acid metabolism and viability of HeLa cells. *Cancer Res.* **27**, 1301 (1967).
- Perez, A. G., Djordjevic, B.: Studies on unbalanced growth in synchronized HeLa cells. *Cancer Res.* **28**, 2443 (1968).
- Krakoff, I. H., Brown, N. C., Reichard, P.: Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res.* **28**, 1559 (1968).
- Madoc-Jones, H., Mauro, F.: Age-responses to X-rays, vinca alkaloids and hydroxyurea of murine lymphoma cells synchronized *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.* **45**, 1131—1143 (1970).
- Mauro, F., Madoc-Jones, H.: Age response to X-radiation of murine lymphoma cells synchronized *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci (US)* **63**, 686 (1969).
- — Age responses of cultured mammalian cells to cytotoxic drugs. *Cancer Res.* **30**, 1397 (1970).
- Mueller, G. C.: Biochemical events in the animal cell cycle. *Federat. Proc.* **28**, 1780 (1969).
- Nery, R.: The colorimetric determination of hydroxamic acids. *Analyst* **91**, 388 (1966).
- Pfeiffer, S. E., Tolmach, L. J.: Inhibition of DNA synthesis in HeLa cells by hydroxyurea. *Cancer Res.* **27**, 124 (1967).
- Philips, F. S., Sternberg, S. S., Schwartz, H. S., Cronin, A. P., Sodergren, J. E., Vidal, P. M.: Hydroxyurea. I. Acute cell death in proliferating tissues in rats. *Cancer Res.* **27**, 61 (1967).
- Pilgrim, C., Lennartz, K. J., Wegener, K., Hollweg, S., Maurer, W.: Autoradiographische Untersuchungen über tageszeitliche Schwankungen des H³-Index und des Mitose-Index bei Zellarten der ausgewachsenen Maus, des Ratten-Fetus sowie bei Aszites-Tumorzellen. *Z. Zellforsch.* **68**, 138 (1965).
- Pollak, R. D., Rosenkranz, H. S.: Metabolic effects of hydroxyurea on BHK 21 cells transformed with polyoma virus. *Cancer Res.* **27**, 1214 (1967).
- Prescott, D. M.: Composition of the cell life cycle. In: Normal and malignant cell growth. Fry, R. J. F., Griem, M. L., Kirsten, W. H. (Eds.). *Recent Res. in Cancer Res.* **17**. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 79 (1969).
- Quastler, H., Sherman, F. G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* **17**, 420 (1959).
- Rajewsky, M. F.: Synchronisation *in vivo*: Kinetics of mammalian cell populations following blockage of DNA synthesis with hydroxyurea. Abstr., IInd Meeting Europ. study group for cell proliferation (ESGCP), Schloß Reisenburg, Germany (1968).
- (1) Synchronisation *in vivo*: Kinetics of a malignant cell system following temporary inhibition of DNA synthesis with hydroxyurea. *Exptl. Cell Res.* **60**, 269 (1970).
- (2) Temporal and metabolic aspects of tumor cell cycles. *Proc. Xth Int. Cancer Congress, Houston (1970)*, Vol. I, p. 394. Year Book Med. Publ. Inc., Chicago.
- Fabricius, E., Hülser, D. F.: Synchronisation *in vivo*: Temporary inhibition of DNA synthesis in the rat embryo with hydroxyurea. *Exp. Cell Res.* **66**, 489 (1971).
- Grüneisen, A.: In Vorbereitung.
- Rosenkranz, H. S.: Some biological effects of carbamoyloxyurea, an oxidation product of hydroxyurea. *J. Bacteriol.* **102**, 20 (1970).
- Carr, H. S.: Hydroxyurea and escherichia coli nucleoside diphosphate reductase. *Cancer Res.* **30**, 1926 (1970).
- Jacobs, S. J.: Inhibition of DNA synthesis by hydroxyurea. *Gann Monograph* **6**, 15 (1968).
- — Carr, H. S.: Studies with hydroxyurea. VIII. The deoxyribonucleic acid of hydroxyurea-treated cells. *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 428 (1968).
- Pollak, R. D., Schmidt, R. M.: Biologic effects of isohydroxyurea. *Cancer Res.* **29**, 209 (1969).
- Rueckert, R. R., Mueller, G. C.: Studies on unbalanced growth in tissue culture. I. Induction and consequence of thymidine deficiency. *Cancer Res.* **20**, 1584 (1960).
- Schwartz, H. S., Garofalo, M., Sternberg, S. S., Philips, F. S.: Hydroxyurea: Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating liver of rats. *Cancer Res.* **25**, 1867 (1965).
- Shibley, W. U.: Immune cytolysis in relation to growth cycle of Chinese Hamster cells. *Cancer Res.* **31**, 925 (1971).
- Sinclair, W. K.: Hydroxyurea: Differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle. *Science* **150**, 1729 (1965).
- Cyclic X-ray responses in mammalian cells *in vitro*. *Radiation Res.* **33**, 620 (1968).

- Sinclair, W.K.: Methods and criteria of mammalian cell synchrony. In: Normal and malignant cell growth. Fry, R.J.M., Griem, M.L., Kirsten, W.H. (Eds.). Recent Results in Cancer Res. 17. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 90 (1969).
- Steel, G.G.: Unveröffentlichte Ergebnisse, persönliche Mitteilung (1969).
- Adams, K., Barrett, J.C.: Analysis of the cell population kinetics of transplanted tumors of widely-differing growth rate. Brit. J. Cancer 20, 784 (1966).
- Hanes, S.: The technique of labelled mitoses: Analysis by automatic curve fitting. Cell Tissue Kinet. 4, 93 (1971).
- Stubblefield, E.: Synchronisation methods for mammalian cell cultures. In: Methods in cell physiology, Vol. III (Ed.: D. M. Prescott). Academic Press New York-London, p. 25 (1968).
- Süss, R., Maurer, H.R.: Reduced binding of carcinogenic hydrocarbons to DNA of mouse skin during inhibition of DNA synthesis. Nature 217, 752 (1968).
- Till, J.E., Whitmore, G.F., Gulyas, S.: Deoxyribonucleic acid synthesis in individual L-strain mouse cells. II. Effects of thymidine starvation. Biochim. Biophys. Acta 72, 277 (1963).
- Thurman, W.G., Bloodow, C., Howe, C.D., Lewin, W.C., Davis, P., Lane, M., Sullivan, M.P., Griffith, K.M.A.: Phase I: Study of hydroxyurea. Cancer Chemotherap. Rpt. 29, 103 (1963).
- Vesco, C., Penman, S.: Purified cytoplasmic DNA from HeLa cells: Resistance to inhibition by hydroxyurea. Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, 249 (1969).
- Yarbro, J.W.: Further studies on the mechanism of action of hydroxyurea. Cancer Res. 28, 1082 (1968).
- Young, C.W., Hodas, S.: Hydroxyurea: Inhibitory effect on DNA metabolism. Science 146, 1172 (1964).
- Schochetman, G., Hodas, S., Balis, M.E.: (1) Inhibition of DNA synthesis by hydroxyurea: Structure-activity relationships. Cancer Res. 27, 535 (1967).
- — Karnofsky, D.: (2) Hydroxyurea-induced inhibition of deoxynucleotide synthesis: Studies in intact cells. Cancer Res. 27, 526 (1967).

Priv.-Doz. Dr. M. F. Rajewsky
Dr. D. F. Hülser
Cand. med. E. Fabricius
Max-Planck-Institut für Virusforschung
Abteilung Physikalische Biologie
D-7400 Tübingen, Spemannstr. 35
Deutschland