

## Fortschritte und Ergebnisse der Zellkulturmethode

Von R. SCHINDLER\*

Die Methode der Züchtung von Warmblütlerzellen *in vitro* ist heute beinahe 50 Jahre alt: 1912 konnte CARREL zeigen, dass es bei Verwendung einer geeigneten Nährösung und deren regelmässiger Erneuerung möglich ist, Kulturen von Bindegewebe aus Hühnerembryonen beliebig lange im Zustand aktiver Proliferation und Zellvermehrung zu erhalten<sup>1</sup>. Die von CARREL benutzte Technik ist während nahezu 40 Jahren ziemlich unverändert beibehalten worden. Erst um das Jahr 1950 ist es dann, vor allem dank den Anstrengungen von EARLES Arbeitsgruppe, gelungen, die experimentellen Möglichkeiten so weit zu vervollkommen, dass die bisher vorwiegend qualitativen Methoden der Zellkultur auch für quantitative Untersuchungen Verwendung finden konnten. Damit hat nun in den letzten 10 Jahren eine eindrucksvolle Entwicklung auf diesem Gebiet eingesetzt, sowohl in der Erweiterung der methodischen Grundlagen als auch in deren Anwendung auf eine ganze Reihe von Disziplinen der Medizin und Biologie, wie der Biochemie, Pharmakologie, Virologie, Genetik und Radiobiologie, welche zusammen mit den gegenwärtigen Entwicklungen und Bestrebungen den Gegenstand dieser Übersicht bilden soll.

Bereits CARRELS Arbeiten haben gezeigt, dass bei fortgesetzter Kultur *in vitro* der für den Gesamtorganismus typische Charakter der Gewebe und Organe als organisierte Zellverbände verloren geht und dass die Zelle unter diesen Bedingungen gewissermassen zum selbständigen Mikroorganismus mit unbeschränkter exponentieller Zellvermehrung ohne Alterserscheinungen wird<sup>2</sup>. Wie MURRAY in ihrer schönen Übersicht im vorletzten Jahrgang dieser Zeitschrift<sup>3</sup> dargestellt hat, haben jedoch auch die relativ kurzfristigen Kulturen von differenzierten Geweben ihre grosse Bedeutung für das Verständnis und die Analyse der Wechselwirkungen zwischen gleich- und verschiedenartigen Zellen. Das vorliegende Referat soll sich indessen beschränken auf die eigentlichen Zellkulturen, in welchen im allgemeinen eine zeitlich unbegrenzte exponentielle Zellvermehrung und eine möglichst einheitliche Zellpopulation angestrebt wird, und welche dadurch in hervorragender Weise für das Studium der Zelle als eines biologischen Individuums geeignet sind. Im weiteren soll

sich diese Übersicht auf Kulturen von Säugetierzellen (bzw. Warmblüterzellen) beschränken; denn obschon auch die Kultur von pflanzlichen Zellen und Geweben sehr eingehend bearbeitet worden ist, haben sich die beiden Methoden weitgehend unabhängig voneinander entwickelt. Zellkulturen von niederen Tieren und Insekten haben anderseits naturgemäß geringeres Interesse gefunden als solche von Warmblütern. Schliesslich ist zu sagen, dass dieses kurze Referat keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben kann, in Ergänzung zur kürzlichen Besprechung einzelner Aspekte durch MOSER<sup>4</sup> jedoch eine möglichst umfassende Übersicht besonders auch für Leser ohne eigene Erfahrung auf diesem Gebiet geben möchte. Für ausführliche Darstellungen sei im übrigen auf die Monographie von PAUL<sup>5</sup> und die Literaturübersicht von MURRAY<sup>6</sup> verwiesen.

CARREL<sup>1</sup> stellte seine Kulturen durch Einbettung eines kleinen Gewebsstückes in ein Gel aus Blutplasma und Embryoextrakt her. Darüber wurde als Nährösung eine Mischung von Serum, Embryoextrakt und physiologischer Salzlösung gegeben und in regelmässigen Zeitabständen erneuert. Aus dem Gewebsstück wanderten dann Zellen in das umgebende Gel aus, und die Kultur konnte nach einiger Zeit durch Einbettung eines Teils des durch Zellenvermehrung und -auswanderung grösser gewordenen Gewebsstückes in ein neues Plasma-Gel überpflanzt werden. Die Nachteile solcher Kulturen liegen auf der Hand und sind auch bereits von EARLES Gruppe formuliert worden<sup>7</sup>: die Herstellung des Plasma-Gels ist technisch schwierig; dazu wird häufig das Gel trübe oder verflüssigt sich im Laufe der Inkubation; die quantitative Erfassung des Wachstums der Kultur sowie die Unterscheidung zwischen

\* Pharmakologisches Institut der Universität Bern.

<sup>1</sup> A. CARREL, J. exp. Med. 15, 516 (1912).

<sup>2</sup> A. H. EBELING, J. exp. Med. 35, 755 (1922).

<sup>3</sup> M. R. MURRAY, Exper. 15, 289 (1959).

<sup>4</sup> H. MOSER, Exper. 16, 385 (1960).

<sup>5</sup> J. PAUL, *Cell and Tissue Culture* (E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1959).

<sup>6</sup> M. R. MURRAY und G. KOPECH, *A Bibliography of the Research in Tissue Culture* (Academic Press, New York 1953).

<sup>7</sup> V. J. EVANS und W. R. EARLE, J. nat. Cancer Inst. 8, 103 (1947).

Zellvermehrung und Zellwanderung ist nur bedingt möglich; außerdem können die Zellen von dem halbfesten Kulturmedium nicht abgetrennt werden, und da dieses Kulturmedium chemisch völlig undefiniert ist, ist die Brauchbarkeit der Kulturen für biochemische und pharmakologische Versuche ausserordentlich eingeschränkt. Anderseits ist anzuerkennen, dass diese Methodik für viele wertvolle morphologische Arbeiten Verwendung gefunden hat, und dass auf diese Weise eine ganze Anzahl von Zellstämmen gezüchtet worden ist, welche sich seither in vielen Untersuchungen als nützlich erwiesen haben und auch heute noch in sehr vielen Laboratorien verwendet werden: so EARLES L-stamm<sup>8</sup>, hervorgegangen aus Bindegewebe der Maus, und der HeLa-Zellstamm, entstanden aus einem menschlichen Cervical-Carcinom<sup>9-11</sup>.

Die Grundlage für die Ausarbeitung quantitativer Methoden ist mit der Einführung flüssiger Kulturmedien durch EARLE gelegt worden. Zuerst gelang es, mit Hilfe einer Cellophan-Matrix Kulturen herzustellen, in welchen sich die Zellen am Cellophan und an der Glasoberfläche des Kulturgefäßes ausbreiteten und sich dabei in direktem Kontakt mit der flüssigen Nährlösung befanden<sup>7</sup>. Bald darauf zeigte es sich dann, dass bei Verwendung von Suspensionen von Einzelzellen als Inoculum keine Cellophanmatrix nötig ist<sup>12</sup>. Auf diese Weise entstanden die sogenannten «Monolayer»-Kulturen, in welchen sämtliche Zellen, überdeckt von der Nährlösung, an der Glasoberfläche des Kulturgefäßes haften und sich durch Vermehrung auf der verfügbaren Fläche bis zur Bildung einer zusammenhängenden Zellschicht ausbreiten. Die Herstellung von Zellsuspensionen aus solchen Kulturen für die Übertragung in neue Kulturgefäße geschah zuerst durch mechanisches Ablösen, doch wurde dafür bald die Verwendung von Trypsin eingeführt, welches sich auch bei der Herstellung von Zellsuspensionen aus Geweben und Organen für Primärkulturen sehr gut bewährt hat<sup>13,14</sup>.

Eine weitere methodische Vereinfachung ergab sich durch die Entwicklung von Suspensionskulturen. Solche kommen dadurch zustande, dass das Kulturmedium entweder durch Rotation der Kulturgläser<sup>15,16</sup> oder durch eine Rührreinrichtung<sup>17-20</sup> dauernd in Bewegung gehalten wird. Daneben sind einige Zellstämme beschrieben worden, deren Zellen selbst in stationären Kulturen nicht an der Glasoberfläche festhaften<sup>21-24</sup>. Suspensionskulturen bieten die Möglichkeit, die Zellvermehrung durch Entnahme von Proben aus ein und derselben Kultur laufend zu verfolgen, und außerdem lässt sich bei der Übertragung in neue Kulturgefäße die Verwendung von Trypsin mit der damit verbundenen Zellschädigung vermeiden. Schliesslich ist die Entwicklung von Vorrichtungen zu nennen, welche die Kultur von Säugetierzellen unter «steady state»-Bedingungen ermöglichen. Dies ist beispielsweise dadurch erreicht worden, dass sich die Kultur als Zellsuspension innerhalb eines porösen Gefäßes befindet, welches mit

frischer Nährlösung durchströmt wird<sup>25,26</sup>. Dabei können recht hohe Zelldichten erhalten werden, jedoch ist die Dauer der Kultur nicht unbeschränkt, da die Zelldichte ständig ansteigt. Ein anderes Prinzip beruht darauf, dass zur Kultur kontinuierlich frische Nährlösung zufließt, so dass die Zellvermehrung durch die dauernde Verdünnung eben kompensiert wird; durch regelmässige Entnahmen von Proben der Zellsuspensionen oder durch einen Überlauf wird außerdem das Volumen der Kultur konstant gehalten. Auf diese Weise werden besonders günstige Kulturbedingungen und dadurch eine sehr rasche Zellvermehrung, mit Generationszeiten von nur 10 bis 12 h erreicht<sup>27,28</sup>.

Die Verwendung flüssiger Kulturmedien und die damit verbundene Möglichkeit der Herstellung homogener Zellsuspensionen hat rasch zum Ausbau von Methoden zur quantitativen Bestimmung der Zellvermehrung geführt. Mittels Zellsuspensionen ist es ohne weiteres möglich, für vergleichende Versuche beliebig viele Kulturen mit identischem Inoculum anzusetzen<sup>29</sup>. Die Zellvermehrung kann bei Suspensionskulturen besonders einfach gemessen werden durch Auszählen der Zellen in einer der für Leukocytenzählungen gebräuchlichen Zählkammern.

Für «Monolayer»-Kulturen kommt eine entsprechende Zählung der mit Hilfe von Zitronensäure in Suspension gebrachten Zellkerne<sup>30</sup> oder die Zählung der Zellen nach Behandlung mit Trypsin in Frage. Daneben ist eine ganze Reihe einfacher chemischer Be-

<sup>8</sup> W. R. EARLE, J. nat. Cancer Inst. 4, 165 (1943).

<sup>9</sup> G. O. GEY, W. D. COFFMAN und M. T. KUBICEK, Cancer Res. 12, 264 (1952).

<sup>10</sup> W. F. SCHERER, J. T. SYVERTON und G. O. GEY, J. exp. Med. 97, 695 (1953).

<sup>11</sup> G. O. GEY, F. B. BANG und M. K. GEY, Ann. N.Y. Acad. Sci. 58, 976 (1954).

<sup>12</sup> J. E. SHANNON und W. R. EARLE, J. nat. Cancer Inst. 12, 155 (1951).

<sup>13</sup> R. DULBECCO, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 38, 747 (1952).

<sup>14</sup> J. S. YOUNGNER, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 85, 202 (1954).

<sup>15</sup> W. R. EARLE, E. L. SHILLING, J. C. BRYANT und V. J. EVANS, J. nat. Cancer Inst. 14, 1159 (1954).

<sup>16</sup> A. F. GRAHAM und L. SIMINOVITCH, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. 89, 326 (1955).

<sup>17</sup> W. R. EARLE, J. C. BRYANT und E. L. SHILLING, Ann. N. Y. Acad. Sci. 58, 1000 (1954).

<sup>18</sup> W. R. EARLE, J. C. BRYANT, E. L. SHILLING und V. J. EVANS, Ann. N. Y. Acad. Sci. 63, 666 (1956).

<sup>19</sup> W. F. McLIMANS, E. V. DAVIS, F. L. GLOVER und G. W. RAKE, J. Immunol. 79, 428 (1957).

<sup>20</sup> B. S. DANES, Exp. Cell Res. 12, 169 (1957).

<sup>21</sup> G. A. FISCHER, Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 2, 201 (1957).

<sup>22</sup> G. A. FISCHER, Proc. N. Y. Acad. Sci. 76, 673 (1958).

<sup>23</sup> R. C. PARKER, L. N. CASTOR und E. A. McCULLOCH, N. Y. Acad. Sci. spec. Publ. 5, 303 (1957).

<sup>24</sup> R. SCHINDLER, M. DAY und G. A. FISCHER, Cancer Res. 19, 47 (1959).

<sup>25</sup> K. G. McCARTHY, Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 2, 230 (1957).

<sup>26</sup> S. GRAFF und K. S. McCARTHY, Exp. Cell Res. 13, 348 (1957).

<sup>27</sup> E. P. COHEN und H. EAGLE, Fed. Proc. 19, 385 (1960).

<sup>28</sup> R. SCHINDLER, Helv. physiol. Acta 18, C 60 (1960).

<sup>29</sup> V. J. EVANS, W. R. EARLE, K. K. SANFORD, J. E. SHANNON und H. K. WALTZ, J. nat. Cancer Inst. 11, 907 (1951).

<sup>30</sup> K. K. SANFORD, W. R. EARLE, V. J. EVANS, H. K. WALTZ und J. E. SHANNON, J. nat. Cancer Inst. 11, 773 (1951).

stimmungsmethoden beschrieben worden, vor allem für Zellprotein<sup>31</sup>, für Desoxyribonukleinsäure (DNS)<sup>32,33</sup> für DNS-Phosphor<sup>34</sup> und für Zell-Purine und -Pyrimidine<sup>35</sup>. In all diesen Fällen besteht eine befriedigende Proportionalität zwischen Zellzahl und Gehalt einer Kultur an diesen Zellkomponenten; für Kulturen in verschiedenen Wachstumsphasen ist diese Proportionalität allerdings nicht mehr streng erfüllt<sup>36,37</sup>. Schliesslich ergibt sich eine Möglichkeit zur quantitativen Erfassung ausschliesslich der vermehrungsfähigen Zellen dadurch, dass nach entsprechender Verdünnung einer Zellsuspension die Zahl der Kolonien bestimmt wird, welche sich aus den einzelnen, am Glas haftenden Zellen entwickeln. Diese Methode ist wohl die zuverlässigste, was die Unterscheidung zwischen «lebenden» und «toten» Zellen anbetrifft, und besonders wertvoll für die Analyse kurzfristiger cytotoxischer Effekte wie zum Beispiel der Röntgenstrahlen.

Die Züchtung von reinen Zellstämmen, das heisst von Zellpopulationen, welche von einer einzelnen Zelle abstammen, ist nun im Gegensatz zu der bakteriologischen Methodik bei Säugerzellkulturen nicht ohne weiteres möglich, indem isolierte Zellen ohne Anwendung besonderer Kunstgriffe im allgemeinen nicht zur Vermehrung befähigt sind. Der Grund für dieses Verhalten scheint darin zu liegen, dass Säugerzellen gewisse Metabolite in das umgebende Milieu abgeben und dadurch an diesen Stoffwechselprodukten verarmen, falls das Volumen des Kulturmediums im Vergleich zum Zellvolumen unverhältnismässig gross ist. Damit wird es verständlich, dass eine kritische minimale Populationsdichte eine Voraussetzung für eine fortgesetzte Zellvermehrung bildet<sup>38</sup>. Es besteht hier offenbar ein wesentlicher Unterschied zu den meisten Mikroorganismen, deren Zellmembranen eine bedeutend geringere Permeabilität beziehungsweise eine viel ausgeprägtere Befähigung zu aktiven Transportleistungen aufweisen dürften.

Eine erste Möglichkeit zur Züchtung isolierter Zellen ergab sich durch deren Kultur innerhalb einer Glaskapillare, wodurch das Volumen des umgebenden Mediums hinreichend klein gehalten wird<sup>39</sup>. Eine neuere, von PUCK entwickelte Methode besteht in der Verwendung eines sogenannten «feeder layer», das heisst einer Monolayer-Kultur von Zellen, welche durch Röntgenbestrahlung ihrer Vermehrungsfähigkeit beraubt, in ihren Stoffwechselfunktionen aber noch mehr oder weniger intakt geblieben sind<sup>40</sup>. Solche bestrahlte «feeder layers» vermögen nun die benötigten Metaboliten an das Nährmedium abzugeben, so dass in diesem Milieu isolierte Zellen mit sehr guter Ausbeute zu Kolonien auswachsen. PUCKS Gruppe konnte fernerhin zeigen, dass unter Umständen auf die Verwendung des «feeder layer» verzichtet werden kann: dazu ist eine besonders milde Trypsin-Behandlung bei der Herstellung der Zellsuspension erforderlich, und ein weiterer Kunstgriff besteht im Zusatz von Agar zur Nährösung; da-

durch wird die Konvektion des Mediums verhindert und damit der Verlust von Metaboliten aus den Zellen herabgesetzt<sup>41</sup>. Bei einzelnen Zellstämmen konnten so aus 100% der Einzelzellen Kolonien erhalten werden. Die Kolonieausbeute hängt jedoch außerdem sehr von der Zusammensetzung der verwendeten Nährösung ab<sup>42,43</sup>, was nicht verwunderlich ist, da ja ein Kulturmedium, in welchem die betreffenden, aus den Zellen austretenden Metabolite bereits vorhanden sind, einer Verarmung der Zellen an diesen Substanzen entgegenwirken muss. Auf die Natur dieser Stoffe wird bei der Besprechung der Nährbedürfnisse von Zellkulturen noch näher eingegangen werden.

Ein wertvoller methodischer Fortschritt ist durch die Technik der Aufbewahrung von Zellstämmen im tiefgefrorenen Zustand geschaffen worden. Da sich Zellstämmen bei fortgesetzter Kultur *in vitro* häufig langsam in ihren Charakteristiken verändern – das gleiche gilt übrigens auch bei fortgesetzter Transplantierung von Tumoren *in vivo* –, ist es wünschbar, auf eingefrorene Zellpopulationen zurückgreifen zu können, welche einer solchen allmählich stattfindenden Veränderung ihrer Eigenschaften nicht ausgesetzt sind. Es hat sich gezeigt, dass zwei Kunstgriffe für ein erfolgreiches Einfrieren wesentlich sind: einerseits der Zusatz von 10 bis 15% Glycerin zur Zellsuspension und anderseits ein sehr langsames Senken der Temperatur im Bereich von 0° bis –25° C. Auf diese Weise ist es gelungen, von 82 untersuchten Zellstämmen jeden einzelnen während ein bis zwei Jahren ohne Verlust der spezifischen Eigenschaften in gefrorenem Zustand lebensfähig zu erhalten<sup>44</sup>.

Schliesslich ist als bedeutende Neuerung der Zusatz von Antibiotica zu den Nährösungen<sup>45,46</sup> zu erwähnen.

- <sup>31</sup> V. J. OYAMA und H. EAGLE, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 91, 305 (1956).
- <sup>32</sup> J. PAUL, J. biophys. biochem. Cytol. 2, 797 (1956).
- <sup>33</sup> F. C. MCINTIRE, und M. F. SPROULL, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 95, 458 (1957).
- <sup>34</sup> G. M. HEALY, D. C. FISHER und R. C. PARKER, Can. J. Biochem. Physiol. 32, 319 (1954).
- <sup>35</sup> F. C. MCINTIRE und M. S. SMITH, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 98, 76 (1958).
- <sup>36</sup> N. P. SALZMAN, Biochim. biophys. Acta 31, 158 (1959).
- <sup>37</sup> M. N. SWAFFIELD und G. E. FOLEY, Arch. Biochem. Biophys. 86, 219 (1960).
- <sup>38</sup> W. R. EARLE, K. K. SANFORD, V. J. EVANS, H. K. WALTZ und J. E. SHANNON, J. nat. Cancer Inst. 12, 133 (1951).
- <sup>39</sup> K. K. SANFORD, W. R. EARLE und G. D. LIKELY, J. nat. Cancer Inst. 9, 229 (1948).
- <sup>40</sup> T. T. PUCK und P. I. MARCUS, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 41, 432 (1955).
- <sup>41</sup> T. T. PUCK, P. I. MARCUS und S. J. CIECIURA, J. exp. Med. 103, 273 (1956).
- <sup>42</sup> T. T. PUCK und H. W. FISHER, J. exp. Med. 104, 427 (1956).
- <sup>43</sup> P. I. MARCUS, S. J. CIECIURA und T. T. PUCK, J. exp. Med. 104, 615 (1956).
- <sup>44</sup> T. S. HAUSCHKA, J. T. MITCHELL und D. J. NIEDERPRUEN, Cancer Res. 19, 643 (1959).
- <sup>45</sup> J. F. ENDERS, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 82, 100 (1953).
- <sup>46</sup> J. F. METZGER, M. H. FUSILLO, J. CORNMAN und D. M. KULMS, Exp. Cell Res. 6, 337 (1954).

Dadurch ist die Gefahr und Häufigkeit mikrobieller Infektionen in den Kulturen ausserordentlich herabgesetzt worden, was die komplizierten, streng aseptischen Vorkehrungen und Laboreinrichtungen früherer Zeiten überflüssig gemacht hat.

Die Einführung flüssiger Nährmedien und quantitativer Methoden zur Bestimmung der Zellvermehrung hat die Grundlage geschaffen für Versuche, die aus Serum und Embryoextrakt bestehenden Nährösungen durch chemisch definierte zu ersetzen und damit die Nährbedürfnisse der Zellkulturen abzuklären. Es zeigte sich auf Grund von Dialyse-Versuchen, dass nur der niedermolekulare Anteil von Embryoextrakt, anderseits bei Zusatz einer synthetischen Mischung von Wuchsstoffen<sup>47</sup> nur der hochmolekulare Anteil von Serum für das Wachstum der Kulturen notwendig ist<sup>48, 49</sup>. EAGLE hat daraufhin eine Nährlösung entwickelt, welche, abgesehen von einer geringen Menge von dialysiertem Serum, chemisch definiert ist, und es ist sein Verdienst, für jede einzelne niedermolekulare Komponente deren Unentbehrlichkeit für die Zellvermehrung nachgewiesen zu haben<sup>50</sup>.

Überraschend war dabei der Befund, dass eine ganze Anzahl verschiedener Zellstämme qualitativ übereinstimmende Nährbedürfnisse aufweist. Diese sind in der Tabelle zusammengestellt und sollen hier kurz diskutiert werden. Bei den anorganischen Komponenten fällt auf, dass ein Bedürfnis für Eisen und andere Spurenelemente bisher nicht aufgezeigt werden konnte; offenbar sind diese Metallionen so fest an die Serumproteine gebunden, dass sie bei der Dialyse nicht entfernt werden. Von den Aminosäuren sind nicht nur diejenigen, welche für den Gesamtorganismus als essentiell erkannt werden<sup>sind</sup><sup>50</sup>, für die Ernährung von Zellkulturen unentbehrlich, sondern es kommen 5 weitere dazu, nämlich Arginin, Cystin, Glutamin, Histidin und Tyrosin. Die Gründe für diese Diskrepanz sind bisher nicht geklärt, man kann sich jedoch vorstellen, dass im Ganztier eine Synthese dieser Substanzen zum Beispiel nur in der Leber stattfindet. Bei den Vitaminen konnten bisher Biotin, Vitamin B<sub>12</sub> sowie die fettlöslichen Vitamine nicht als essentiell nachgewiesen werden. Dies dürfte ebenfalls darauf zurückzuführen sein, dass diese Vitamine so fest an die Serumproteine gebunden sind, dass sie durch die Dialyse nicht vollständig entfernt werden. Als energielieferndes Kohlehydrat dient im allgemeinen Glukose, welche aber auch durch Mannose, Galaktose, Fruktose und teilweise durch andere Kohlehydrate und deren Abbauprodukte ersetzt werden kann<sup>59</sup>. Überhaupt sind in mehreren Fällen die aufgeführten Wuchsstoffe durch nahe verwandte Substanzen ersetzbar, wie etwa Pyridoxal durch Pyridoxin oder Pyridoxamin.<sup>61</sup>

Die Funktion des dialysierten Serums im Nährmedium ist heute noch nicht vollständig geklärt. Einerseits dient es mit Sicherheit als Träger für gewisse weitere, an die Serumproteine gebundene Wuchsstoffe.

Dafür spricht unter anderem die Beobachtung, dass Zellkulturen in einem proteinfreien, chemisch definierter Medium gezüchtet werden können, falls dieses Medium über eine Dialysemembran in Kontakt mit einer Lösung steht, welche ihrerseits dialysiertes Serum sowie ein proteolytisches Fermentpräparat enthält<sup>62</sup>. Anderseits konnte jedoch bisher mit Ausnahme weniger Zellstämme das dialysierte Serum durch noch so reichhaltige Mischungen niedermolekularer Wuchsstoffe nicht ersetzt werden<sup>63</sup>. Fraktionierung der Serumproteine hat zu zwei aktiven Fraktionen geführt: einerseits das Albumin, welches vermutlich auf Grund adsorbiert Wuchsstoffe seine Wirkung ausübt und welches in neueren Versuchen durch Katalase, Insulin und Versen teilweise ersetzt werden konnte<sup>64</sup>; anderseits ein  $\alpha$ -Globulin, dessen augenfälligste Wirkung darin beruht, dass es die Zellen veranlasst, sich an der Glasoberfläche auszubreiten und daran festzuhalten, und dessen Konzentration in fötalem Serum besonders hoch ist<sup>65</sup>. Ob es auch für die Zellvermehrung in Sus-

#### Allgemeine Nährbedürfnisse von Säuger-Zellkulturen

a) <i>Anorganische Stoffe</i> <sup>51-53</sup>	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	c) <i>Vitamine</i> <sup>56-58</sup>
	K <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Cholin
	Mg <sup>++</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Folsäure
	Ca <sup>++</sup>		Inositol
b) <i>Aminosäuren</i> <sup>54, 55</sup>	Isoleucin	Arginin	Nicotinamid
	Leucin	Cystin	Pantothenäsäure
	Lysin	Glutamin	Pyridoxal
	Methionin	Histidin	Riboflavin
	Phenylalanin	Tyrosin	Thiamin
	Threonin		d) <i>Kohlehydrat</i> <sup>59</sup>
	Tryptophan		Glukose
			e) <i>Dialysiertes Serum</i>
			Valin

<sup>47</sup> J. F. MORGAN, N. J. MORTON und R. C. PARKER, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 73, 1 (1950).

<sup>48</sup> K. K. SANFORD, H. K. WALTZ, J. E. SHANNON, W. R. EARLE und V. J. EVANS, J. nat. Cancer Inst. 13, 121 (1952).

<sup>49</sup> K. K. SANFORD, P. A. LEADBETTER, J. C. BRYANT, W. P. BRAKER, V. J. EVANS und W. R. EARLE, J. nat. Cancer Inst. 14, 513 (1953).

<sup>50</sup> H. EAGLE, Science 122, 501 (1955).

<sup>51</sup> H. EAGLE, Arch. Biochem. Biophys. 61, 356 (1956).

<sup>52</sup> R. P. GEYER und R. S. CHANG, Arch. Biochem. Biophys. 73, 500 (1958).

<sup>53</sup> H. E. SWIM und R. F. PARKER, J. biophys. biochem. Cytol. 4, 525 (1958).

<sup>54</sup> H. EAGLE, J. exp. Med. 102, 37 (1955).

<sup>55</sup> H. EAGLE, J. biol. Chem. 214, 839 (1955).

<sup>56</sup> H. EAGLE, J. exp. Med. 102, 595 (1955).

<sup>57</sup> H. EAGLE, V. I. OYAMA, M. LEVY und A. E. FREEMAN, Science 123, 845 (1956).

<sup>58</sup> H. EAGLE, V. I. OYAMA, M. LEVY und A. E. FREEMAN, J. biol. Chem. 226, 191 (1957).

<sup>59</sup> H. EAGLE, S. BARBAN, M. LEVY und H. O. SCHULZE, J. biol. Chem. 233, 551 (1958).

<sup>60</sup> W. C. ROSE, R. L. WIXOM, H. B. LOCKHART und G. F. LAMBERT, J. biol. Chem. 127, 987 (1955).

<sup>61</sup> H. EAGLE, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. 91, 358 (1956).

<sup>62</sup> H. EAGLE, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 46, 427 (1960).

<sup>63</sup> G. M. HEALY, D. C. FISHER und R. C. PARKER, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 89, 71 (1955).

<sup>64</sup> I. LIEBERMAN und P. OVE, J. biol. Chem. 234, 2754 (1959).

<sup>65</sup> H. W. FISHER, T. T. PUCK und G. SATO, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 44, 4 (1958).

pensionskulturen unentbehrlich ist, kann angesichts von sich widersprechenden Befunden wohl noch nicht definitiv entschieden werden. Reinigung dieses Faktors hat zur Auffassung geführt, dass es sich sehr wahrscheinlich um ein Glycoproteid handelt<sup>66, 67</sup>.

Wohl das erstaunlichste Ergebnis aus all diesen Untersuchungen ist der Befund, dass die Nährbedürfnisse einer grossen Zahl verschiedener Zellstämme, herstammend von verschiedenen Species und sowohl normalen wie neoplastischen Ursprungs, im wesentlichen übereinstimmen<sup>58</sup>. Damit ist auch die Hoffnung, auf dieser Basis einen Unterschied zwischen normalen Zellen und Krebszellen zu finden, enttäuscht worden. Es ergibt sich hier somit eine völlig andere Situation als bei den Mikroorganismen, welche bekanntlich in ihren Wuchsstoffbedürfnissen in weitem Rahmen variieren, und wo oft noch innerhalb einer Species eine ganze Fülle von Mutanten bekannt geworden sind.

Anderseits sind nun doch für einige Zellstämme auch gewisse spezielle Wuchsstoffbedürfnisse beschrieben worden. Bei diesen zusätzlichen Wuchsstoffen handelt es sich um die Aminosäuren Asparagin, Serin und Glykokoll. Ferner zeigen einige Zellstämme einen stark erhöhten Bedarf für Folsäure. Diese speziellen Nährbedürfnisse treten bei den verschiedenen Zellstämmen zum Teil einzeln, zum Teil in Kombination auf<sup>24, 68-71</sup>.

Eine spezielle Frage stellen die Nährbedürfnisse isolierter Zellen dar; diese sind, wie bereits ausgeführt, grösser als diejenigen dichterer Zellpopulationen. Ob ein Nährmedium diesen weitergehenden Bedürfnissen genügt, lässt sich daran erkennen, ob eine gute Kolonieausbeute («cloning efficiency») erreicht wird, das heisst, ob ein hoher Prozentsatz der isolierten Zellen zu Kolonien auswächst. Bei Verwendung von dialysiertem Serum in der Nährlösung wurden so eine ganze Reihe zusätzlicher Nutrimente als unentbehrlich für die Vermehrung isolierter Zellen erkannt: einmal weitere Aminosäuren (zusätzlich zu den 13 in der Tabelle aufgeführten), so vor allem Serin<sup>4, 72</sup>, ferner Metaboliten des Zitronensäure-Zyklus, wie Pyruvat, Oxalacetat oder  $\alpha$ -Ketoglutarat<sup>4, 73</sup>, und ausserdem auch Cholesterin<sup>74</sup>. Weiterhin haben sich Purine als wachstumsstimulierend für isolierte Zellen des Walker-Carcinoms erwiesen<sup>75</sup>.

Schliesslich ist noch zu erwähnen, dass es in mehreren Fällen gelungen ist, Säuger-Zellstämme an ein chemisch definiertes Nährmedium (ohne Zusatz von Serum) zu adaptieren<sup>76-80</sup>. In diesen Fällen liegen allerdings gute Anhaltspunkte dafür vor, dass dabei eine intensive Selektion stattgefunden hat, und ausserdem ist bemerkenswert, dass die Zellvermehrung in solchen synthetischen Nährmedien meist wesentlich langsamer vor sich geht als bei Zusatz von Serum.

Im folgenden sollen nun einige besonders interessante Anwendungen der Zellkulturen und deren Ergebnisse besprochen werden.

**Biochemie.** Untersuchungen mit markierten Aminosäuren haben gezeigt, dass die Zellproteine nicht stabil sind, sondern in recht intensivem Austausch mit den freien Aminosäuren im Zellinnern (dem sogenannten Aminosäure-«Pool») stehen: selbst wenn keine Nettosynthese von Protein vor sich geht, findet ein ständiger Einbau von Aminosäuren statt in einem Ausmass, welches einer Neubildung von etwa 1% des Zellproteins/h entspricht<sup>81</sup>. Hinsichtlich der Nukleinsäuren liegen ähnliche Untersuchungen vor. Die Stabilität von mit P<sup>32</sup> wie auch mit Formiat-C<sup>14</sup> markierten Nukleinsäuren ist untersucht worden<sup>82-84</sup>. Für die Desoxyribonukleinsäure ist dabei eine bemerkenswerte, wenn auch offenbar nicht absolute Stabilität gefunden worden, indem deren spezifische Aktivität praktisch nur nach Massgabe der Zellvermehrung abnimmt. Im Gegensatz dazu ist die Ribonukleinsäure wesentlich weniger stabil, so dass hier die Verhältnisse den für die Proteine beschriebenen näher kommen.

Eine andere Anwendungsmöglichkeit für die Biochemie besteht in der Abklärung der biochemischen Funktionen von Vitaminen. So kann zum Beispiel Pyridoxal aus der Nährlösung weggelassen werden, wenn zusätzlich zu den 13 essentiellen Aminosäuren (Tabelle) weitere 8 «nichtessentielle» Aminosäuren in das Medium einbezogen werden<sup>85</sup>. Offenbar dient also unter diesen Bedingungen Pyridoxal nach Umwandlung in Pyridoxalphosphat ausschliesslich als Coenzym für Transaminierungen. Ähnlich kann Folsäure durch die Kombination von Glykokoll, Thymidin und einem Purin ersetzt werden<sup>86</sup>, so dass wir annehmen können, dass Folsäure hier nach Umwandlung in Coenzym F

- <sup>66</sup> I. LIEBERMAN und P. OVE, J. biol. Chem. **233**, 637 (1958).
- <sup>67</sup> I. LIEBERMAN, und P. OVE, Biochim. biophys. Acta **25**, 449 (1957).
- <sup>68</sup> R. E. NEUMANN und T. A. MCCOY, Science **124**, 124 (1956).
- <sup>69</sup> T. A. MCCOY, M. MAXWELL und R. E. NEUMANN, Cancer Res. **16**, 979 (1956).
- <sup>70</sup> G. A. FISCHER und A. D. WELCH, Science **126**, 1018 (1957).
- <sup>71</sup> T. A. MCCOY, M. MAXWELL und P. F. KRUSE, Cancer Res. **19**, 591 (1959).
- <sup>72</sup> R. Z. LOCKART und H. EAGLE, Science **129**, 252 (1959).
- <sup>73</sup> R. E. NEUMANN und T. A. MCCOY, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. **98**, 303 (1958).
- <sup>74</sup> G. SATO, H. W. FISHER und T. T. PUCK, Science **126**, 961 (1957).
- <sup>75</sup> R. E. NEUMANN, und A. A. TYTELL, Exp. Cell Res. **15**, 637 (1958).
- <sup>76</sup> V. J. EVANS, J. C. BRYANT, W. T. MCQUILKIN, M. G. FIORAMONTI, K. K. SANFORD, B. B. WESTFALL und W. R. EARLE, Cancer Res. **16**, 87 (1956).
- <sup>77</sup> W. T. MCQUILKIN, V. J. EVANS und W. R. EARLE, J. nat. Cancer Inst. **19**, 885 (1957).
- <sup>78</sup> V. J. EVANS, J. nat. Cancer Inst. **19**, 539 (1957).
- <sup>79</sup> R. W. PUMPER, Science **128**, 363 (1958).
- <sup>80</sup> C. WAYMOUTH, J. nat. Cancer Inst. **22**, 1003 (1959).
- <sup>81</sup> H. EAGLE, Science **130**, 432 (1959).
- <sup>82</sup> G. M. HEALY, L. SIMINOVITCH, R. C. PARKER und A. F. GRAHAM, Biochim. biophys. Acta **20**, 425 (1956).
- <sup>83</sup> A. F. GRAHAM und L. SIMINOVITCH, Biochim. biophys. Acta **26**, 427 (1957).
- <sup>84</sup> R. Y. THOMSON, J. PAUL und J. N. DAVIDSON, Biochem. J. **69**, 553 (1958).
- <sup>85</sup> R. F. HAFF und H. E. SWIM, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. **94**, 779 (1957).
- <sup>86</sup> M. T. HAKALA, Science **126**, 255 (1957).

einzig den Einbau von Ein-Kohlenstoff-Fragmenten in die Purine und in Thymin sowie die Umwandlung Serin-Glykokoll katalysiert.

Schliesslich ist die Verwendung von Zellstämmen mit spezifischen biochemischen Funktionen zu erwählen. So konnte an Kulturen eines Mäuse-Mastocytoms gezeigt werden, dass Serotonin ausschliesslich aus freiem Tryptophan gebildet wird. Weiterhin ermöglichte die Züchtung einer hinsichtlich dieser Synthese besonders leistungsfigen Zelllinie, die Umwandlung von Tryptophan in Serotonin auch in zellfreien Homogenaten nachzuweisen<sup>87</sup>.

**Pharmakologie.** Zellkulturen stellen naturgemäss ein sehr ansprechendes Modellsystem für maligne Tumoren dar, und so sind sie auch ausgiebig für das Studium der Wirkung von krebshemmenden Stoffen verwendet worden. Sehr uberraschend war dabei der Befund, dass Kulturen von normalen Zellen und von Krebszellen praktisch die gleiche Empfndlichkeit gegenuber Carcinostatica aufweisen<sup>88, 89</sup>. Eine befriedigende Erklärung dafür konnte bis jetzt nicht gegeben werden; zudem ist es schwer, abzuschätzen, ob *in vitro* eine geringere Empfndlichkeit der Krebszellen oder eine erhohte Empfndlichkeit normaler Zellen vorliegt. Es wurde auch die Ansicht geaussert, dass sich normale Zellen in der Kultur mit der Zeit in Zellen mit neoplastischen Eigenschaften umwandeln; anderseits liess sich jedoch zeigen, dass Kulturen normaler Zellen bereits in der ersten Generation *in vitro* sich in ihrer Empfndlichkeit gegenuber Carcinostatica von Krebszellkulturen nicht mehr unterscheiden<sup>90</sup>.

Eine vieldiskutierte Frage ist die der Eignung von Zellkulturen als Testobjekt für die Prüfung neuer potentieller Carcinostatica<sup>91</sup>. Dies ist von grosser praktischer Bedeutung, da die Prüfung solcher Substanzen an transplantierbaren Tumoren einen ausserordentlich grossen zeitlichen und finanziellen Aufwand mit sich bringt. Im allgemeinen hat es sich gezeigt, dass Substanzen mit carcinostatischer Wirkung *in vivo* auch an Zellkulturen eine hohe Toxizität aufweisen<sup>88, 89, 92</sup>. Jedoch besteht keinerlei quantitative Korrelation zwischen carcinostatischer Wirkung *in vivo* und Toxizität *in vitro*, mit Ausnahme eng begrenzter Stoffgruppen wie zum Beispiel der Folsäureantagonisten<sup>88</sup>. Da immerhin die meisten krebshemmenden Stoffe eine recht hohe Toxizität an Zellkulturen aufweisen, ist nun argumentiert worden, dass man Zellkulturen für eine erste Prüfung («Primary screen») von neuen Substanzen verwenden könnte, um dann diejenigen mit guter Hemmwirkung *in vitro* einer weiteren Prüfung an transplantierbaren Tumoren *in vivo* zu unterziehen. Dabei stellt sich allerdings die Frage, ob es auch Carcinostatica gibt, welche eine geringe oder gar keine Hemmwirkung auf Zellkulturen ausüben und welche dann durch eine solche vorläufige Prüfung nicht erfasst würden. In der Tat sind nun mehrere solche Stoffe bekannt geworden; als Beispiele seien 6-Azauracil<sup>93</sup> als Vertreter der Anti-

metaboliten und Endoxan<sup>94</sup> als Beispiel eines Radio-mimeticums erwähnt. Zusammenfassend kann somit wohl gesagt werden, dass Zellkulturen für eine Prüfung potentieller Carcinostatica von zweifelhaftem Wert sind, und tatsächlich wird die routinemässige Testung neuer Verbindungen immer noch sehr weitgehend an transplantierbaren Tumoren *in vivo* durchgeführt.

Anderseits sind nun aber Zellkulturen mit sehr gutem Erfolg zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von krebshemmenden Stoffen herangezogen worden. Eine wichtige Möglichkeit für solche Studien besteht in der Analyse von Antagonismen zwischen Antimetaboliten und normalen Stoffwechselsubstanzen. Damit lassen sich oft sehr wertvolle Erkenntnisse tber den biochemischen Angriffspunkt eines Hemmstoffes gewinnen. So wird zum Beispiel die Hemmwirkung von 6-Azauracil durch Uridin<sup>95</sup>, diejenige von 5-Fluorouracil-desoxyribosid durch Thymidin<sup>96</sup> aufgehoben. Die Hemmung durch 6-Mercaptopurin wird durch Hypoxanthin in kompetitiver Weise; durch Adenin dagegen in nicht kompetitiver Weise rückgängig gemacht, was darauf hindeutet, dass 6-Mercaptopurin die Umwandlung von Hypoxanthin in Adenin blockiert<sup>96</sup>. Ein weiteres interessantes Beispiel ist die Aufhebung der Wirkung des Folsäure-Antagonisten Amethopterin durch die Kombination von Thymidin, Glykokoll und einem Purin<sup>86, 97</sup>. Die Zugabe dieser drei Metaboliten, deren Synthese in der Zelle mit Hilfe von Coenzym F vor sich geht, macht den durch Amethopterin induzierten Mangel an Coenzym F wirkungslos.

Schliesslich sind diejenigen Fälle von besonderem Interesse, in welchen eine Substanz *in vivo* eine carcinostatische Wirkung ausübt, auf Zellkulturen dagegen keinerlei Hemmeffekt zeigt. Ein solcher Sachverhalt lässt im allgemeinen darauf schliessen, dass die Verbindung zwar selber unwirksam ist, jedoch *in vivo*, zum Beispiel in der Leber, in ein Produkt mit carcinostatischer Wirkung umgewandelt wird. Dies konnte für 6-Azauracil gezeigt werden; diese Verbindung ist *in vitro* unwirksam, wird aber *in vivo* teilweise in 6-Azauracil-Ribosid verwandelt, welches für die krebshemmende Wirkung verantwortlich ist und auch an Zellkulturen eine beträchtliche Toxizität aufweist<sup>98, 99</sup>.

<sup>87</sup> R. SCHINDLER, Biochem. Pharmacol. 1, 223 (1958).

<sup>88</sup> H. EAGLE und G. E. FOLEY, Amer. J. Med. 21, 739 (1956).

<sup>89</sup> H. EAGLE und G. E. FOLEY, Cancer Res. 18, 1017 (1958).

<sup>90</sup> G. E. FOLEY und H. EAGLE, Cancer Res. 18, 1012 (1958).

<sup>91</sup> E. HIRSCHBERG, Cancer Res. 18, 869 (1958).

<sup>92</sup> E. HIRSCHBERG, A. GELLHORN, M. R. MURRAY und E. F. ELSLAGER, J. nat. Cancer Inst. 22, 567 (1959).

<sup>93</sup> R. SCHINDLER und A. D. WELCH, Science 125, 548 (1957).

<sup>94</sup> G. E. FOLEY, O. M. FRIEDMAN und B. P. DROLET, Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3, 111 (1960).

<sup>95</sup> M. A. RICH, J. L. BOLAFFI, J. E. KNOLL, L. CHEONG und M. L. EIDINOFF, Cancer Res. 18, 730 (1958).

<sup>96</sup> M. T. HAKALA und C. A. NICHOL, J. biol. Chem. 234, 8224 (1959).

<sup>97</sup> M. T. HAKALA, J. biol. Chem. 234, 126 (1959).

<sup>98</sup> R. SCHINDLER und A. D. WELCH, Biochem. Pharmacol. 1, 132 (1958).

**Virologie.** Die Fortschritte in der Kultur von Säugерzellen haben auf die Virusforschung ausserordentlich befruchtend eingewirkt, und heute bildet die Zellkulturmethode vielleicht deren wichtigste experimentelle Grundlage und ist aus virologischen Laboratorien kaum mehr wegzudenken. Die hervorragende Eignung von Zellkulturen für virologische Untersuchungen wurde allgemein erkannt, als es gelang, das Poliomyelitis-Virus in Kulturen von extraneuralem Gewebe zu züchten<sup>99</sup>. Als besonders geeignetes Substrat für dieses Virus haben sich darauf Kulturen von Affennierenzellen erwiesen, in welchen eine bis 10fache Zunahme des Virustiters erreicht wird<sup>100</sup>. Dies eröffnete gegenüber dem Tierversuch ganz neue Möglichkeiten für das Studium der Virusproduktion und zur Gewinnung von Virusmaterial in grösseren Mengen und hat schliesslich unter anderem zu der von SALK entwickelten Poliomyelitis-Vaccine geführt. Ein wesentlicher Schritt in der Richtung auf quantitative Methoden wurde geleistet, als es gelang, an Monolayer-Kulturen die Viruspartikel sozusagen zu zählen, indem jedes einzelne Virus, in einer genügend verdünnten Lösung auf die Kultur gebracht, zu einer makroskopisch sichtbaren Zone abgestorbener Zellen, einer sogenannten «Plaque», führt<sup>13, 100</sup>. Da die Viren innerhalb einer Plaque alle von einem einzelnen Viruspartikel abstammen, ist es auf diese Weise zudem möglich, genetisch einheitliche Virusstämme zu züchten.

Mit Hilfe von Zellkulturen ist unter anderem auch der Frage nach den Wuchsstoffbedürfnissen für die Virussynthese nachgegangen worden, und es hat sich gezeigt, dass diese weniger umfangreich sind als diejenigen für die Zellvermehrung. So genügen im allgemeinen die üblichen Mineralien, Glukose und Glutamin<sup>101</sup>, während in sehr verdünnten Zellpopulationen noch die übrigen, neben Glutamin für die Zellen essentiellen Aminosäuren sowie Serumalbumin dazukommen<sup>102</sup>. Ähnlich wie im Falle des Tabakmosaikvirus konnte auch für das Poliovirus nachgewiesen werden, dass die Virus-Ribonukleinsäure nach Abtrennung des Virusproteins unter entsprechenden Bedingungen ihre Infektivität beibehält<sup>103</sup>. Der Proteinanteil scheint neben der Ausübung einer Schutzfunktion vor allem für die Wirtsspezifität des Virus verantwortlich zu sein, indem die freie Virus-Ribonukleinsäure imstande ist, auch in solche Zellen einzudringen und darin die Virussynthese auszulösen, welche gegenüber dem Gesamtvirus resistent sind<sup>104, 105</sup>.

Viele Untersuchungen haben sich auch mit den im Zusammenhang mit der Virusinfektion und -synthese in der Zelle ablaufenden biochemischen Vorgängen befasst. Sowohl die morphologischen wie die biochemischen Effekte hängen dabei sehr von der Art des Virus ab: Poliovirus zum Beispiel bewirkt viel tiefgreifende Veränderungen als etwa Herpes- oder Influenza-Virus<sup>106</sup>. Wohl die ausführlichsten Untersuchungen liegen heute über die Wirkungen der Poliovirus-Infektion auf Zellkulturen vor. Was die frühen Veränderun-

gen im Stoffwechsel der Proteine, Ribonukleinsäure und Desoxyribonukleinsäure nach Infektion mit diesem Virus anbetrifft, ist allerdings gegenwärtig die Situation noch recht verworren, indem durch Anwendung verschiedener Methoden zum Teil ziemlich widersprüchsvolle Resultate erhalten worden sind<sup>106-109</sup>. Immerhin ist der zeitliche Ablauf der Virusproduktion nach Infektion der Zellen gut bekannt, und auch über die Herkunft bestimmter chemischer Bestandteile der Viren liegt ein klares Bild vor. So konnte gezeigt werden, dass das Virus-Protein aus dem Aminosäure-«Pool» der Zelle aufgebaut wird und nicht durch Umbau von Zellproteinen entsteht<sup>110</sup>. Weiterhin ergab sich beim Desoxyribonukleinsäure-haltigen Vaccinia-Virus, dass für den Aufbau der Virus-Desoxyribonukleinsäure Thymin neu synthetisiert werden muss<sup>111</sup>. In der zentralen Frage, auf welche Weise nämlich die Gegenwart des Virus den normalen Zellstoffwechsel in so tiefgreifender Weise umzugestalten vermag, können allerdings heute leider erst Vermutungen aufgestellt werden.

**Radiobiologie.** Ähnlich wie im Falle der carcinostatischen Hemmstoffe hat sich auch für die Röntgenstrahlen gezeigt, dass die Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung für sehr viele Zellstämme, gleichgültig ob normalen oder neoplastischen Ursprungs, und gleichgültig ob mit diploider oder polyploider Chromosomenstruktur, nur in sehr engen Grenzen variiert, im Vergleich mit der Empfindlichkeit des Gesamtorganismus jedoch ausserordentlich hoch ist<sup>112</sup>. Die gleiche Empfindlichkeit findet sich auch gegenüber weichen Röntgenstrahlen<sup>113</sup>. Die Schädigung der Zellen bei niedriger Strahlendosisierung äussert sich in erster Linie im Verlust der Fähigkeit zu fortgesetzter Vermehrung, unter Ausbildung von Riesenzellformen, wobei jedoch meist noch einige Zellteilungen stattfinden können; die Analyse der Dosiswirkungskurve deutet dabei darauf hin,

- <sup>99</sup> J. F. ENDERS, T. H. WELLER und F. C. ROBBINS, *Science* **109**, 85 (1949).
- <sup>100</sup> R. DULBECCO und M. VOGT, *J. exp. Med.* **99**, 167 (1954).
- <sup>101</sup> H. EAGLE und K. HABEL, *J. exp. Med.* **104**, 271 (1956).
- <sup>102</sup> J. E. DARRELL, H. EAGLE und T. K. SAWYER, *J. exp. Med.* **110**, 445 (1959).
- <sup>103</sup> H. E. ALEXANDER, G. KOCH, I. M. MOUNTAIN und G. VAN DAMME, *J. exp. Med.* **108**, 493 (1958).
- <sup>104</sup> J. J. HOLLAND, L. C. McLAREN und J. T. SYVERTON, *J. exp. Med.* **110**, 65 (1959).
- <sup>105</sup> J. J. HOLLAND, L. C. McLAREN und J. T. SYVERTON, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y. **100**, 843 (1959).
- <sup>106</sup> H. F. MAASSAB, P. C. LOH und W. W. ACKERMANN, *J. exp. Med.* **106**, 641 (1957).
- <sup>107</sup> G. MIROFF, W. E. CORNATZER und R. G. FISCHER, *J. biol. Chem.* **228**, 255 (1957).
- <sup>108</sup> H. F. MAASSAB und W. W. ACKERMANN, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **81**, 29 (1959).
- <sup>109</sup> N. P. SALZMANN, R. Z. LOCKART und E. D. SEBRING, *Virology* **9**, 244 (1959).
- <sup>110</sup> J. E. DARRELL und L. LEVINTOW, *J. biol. Chem.* **235**, 74 (1960).
- <sup>111</sup> N. P. SALZMANN, *Virology* **10**, 150 (1960).
- <sup>112</sup> T. T. PUCK, D. MORKOVIN, P. I. MARCUS und S. J. CIECIURA, *J. exp. Med.* **106**, 485 (1957).
- <sup>113</sup> S. L. HOOD und G. NORRIS, *Biochim. biophys. Acta* **36**, 275 (1959).

dass zwei Treffer pro Zelle für eine solche irreversible Schädigung erforderlich sind<sup>114</sup>. Der primäre Schaden, welcher in den Zellen durch die Bestrahlung gesetzt wird, scheint dabei offenbar im genetischen Apparat zu liegen: eine Bestrahlung mit der mittleren letalen Dosis von etwa 50 r bewirkt im Durchschnitt ebenfalls eine morphologisch erkennbare Chromosomenschädigung pro Zelle. Durch solche Chromosomenschäden wird eine normale Mitose in Frage gestellt und auf diese Weise die fortgesetzte Vermehrung der Zellen verunmöglicht<sup>115</sup>. Nach Bestrahlung mit hohen Dosen treten im weiteren in den wenigen überlebenden Zellen auch relativ häufig Mutationen, erkennbar an Änderungen der Morphologie, Chromosomenstruktur oder der Wuchsstoffbedürfnisse, auf<sup>112</sup>.

**Genetik.** Die Möglichkeiten der Zellkulturtechnik liegen hier vor allem in Beiträgen an die Genetik der somatischen Zellen, ein Gebiet, in welchem heute noch sehr wenig bekannt ist, welches aber in Zukunft wesentliches zu den Fragen der embryologischen Differenzierung und der Carcinogenese beitragen dürfte. Bisher ist in erster Linie die Entwicklung von resistenten Zellstämmen untersucht worden. Ähnlich wie bei Mikroorganismen hat es sich gezeigt, dass je nach der Art des verwendeten Hemmstoffes die Resistenz durch eine einzelne Mutation, wie im Falle von 8-Azaguanin<sup>116, 117</sup>, oder aber durch eine Serie aufeinanderfolgender Mutationen, wie zum Beispiel unter dem Einfluss von Amethopterin<sup>118</sup> zustande kommt.

Von grossem Interesse ist auch die Beobachtung, dass sich in Zellkulturen keine<sup>119</sup>, beziehungsweise nur eine geringe<sup>120</sup> Resistenz gegenüber der Einwirkung ionisierender Strahlen entwickeln lässt.

Von hoher Aktualität ist schliesslich die Frage, ob es möglich ist, mittels Desoxyribonukleinsäure genetische Merkmale auf eine Sägerzelle zu übertragen, wie dies für Mikroorganismen mehrfach nachgewiesen worden ist. Dieses Problem ist für die gesamte Genetik somatischer Zellen, insbesondere auch im Hinblick auf den Mechanismus der virusbedingten Carcinogenese, von grösster Bedeutung. Desoxyribonukleinsäureinduzierte, genetische Transformationen an Sägerzellen sind jüngst beschrieben worden<sup>121, 122</sup>.

Was ist heute an neueren Arbeitsrichtungen auf dem Gebiet der Zellkulturen zu erkennen? Da erscheinen vor allem zweierlei Bestrebungen zu einer Erweiterung der bisherigen experimentellen Möglichkeiten erwähnenswert.

Die eine dieser neuen Entwicklungen betrifft das Studium des Zellteilungszyklus von Sägerzellen. Die im vorhergehenden beschriebenen Methoden gestatten zwar, durch Untersuchung des Wachstums grosser Zellpopulationen in mancher Hinsicht gute Rückschlüsse in bezug auf die Vermehrung der Einzelzelle zu ziehen; über den zeitlichen Ablauf der Prozesse in der einzelnen Zelle von Mitose zu Mitose vermögen sie

jedoch keine Auskunft zu geben. Hier setzt nun die Frage nach den Möglichkeiten einer Synchronisierung von Zellkulturen ein, wie sie für Kulturen von Bakterien und Protozoen bereits mehrfach beschrieben worden sind; denn in einer synchronisierten Kultur lassen sich Veränderungen im Laufe des Zellteilungszyklus an der gesamten Zellpopulation verfolgen, für welche beispielsweise eine biochemische Analyse viel leichter durchgeführt werden kann als für eine Einzelzelle. Eine recht befriedigende Synchronisierung von Zellkulturen ist bisher durch vorübergehende Senkung der Inkubationstemperatur<sup>123, 124</sup>, eine partielle Synchronisierung ausserdem durch die Verwendung von Hemmstoffen für die Thymin-Biosynthese und nachfolgende Zugabe von Thymidin<sup>125, 126</sup> erreicht worden. Bis heute liegen jedoch aus der Anwendung solcher synchronisierter Zellkulturen für das biochemische oder pharmakologische Studium des Zellteilungszyklus noch sehr wenige Ergebnisse vor.

Die zweite der erwähnten neueren Arbeitsrichtungen äussert sich im Bestreben, die Kulturbedingungen so zu vervollkommen, dass sich mit der Zeit sämtliche der im Gesamtorganismus vorkommenden Zelltypen, soweit sie zur Zellteilung überhaupt befähigt sind, in Kultur züchten lassen. Davon sind wir heute noch weit entfernt, und so besteht gegenwärtig eine erste, bescheidene Zielsetzung in der Kultur von Zellpopulationen, welche die *ex vivo* entnommene Zellpopulation möglichst repräsentieren. Auch dies ist bisher nur in wenigen Fällen gelungen, und eine ganze Reihe von Anhaltspunkten spricht dafür, dass im allgemeinen unter den Bedingungen *in vitro* nur ein geringer Teil der Zellen imstande ist, sich fortgesetzt zu vermehren, und dass deshalb von Anfang an eine intensive Selektion stattfindet<sup>4</sup>. Dies äussert sich einerseits darin, dass das exponentielle Wachstum erst nach Ablauf einer oft recht langen Latenzperiode nach Inkubation der Primärkultur einsetzt, wie beispielsweise im Falle des Mäuse-Sarkoms-180<sup>127</sup>. Anderseits führt die Selektion oft zu einer Änderung der Eigenschaften der Zellpopulation mit fortschreitender Kultur: so ist bei der Kultur eines Zellstammes mit neoplastischen Eigenschaften eine allmählich fortschreitende Abnahme der neopla-

<sup>114</sup> T. T. PUCK und P. I. MARCUS, J. exp. Med. 103, 653 (1956).

<sup>115</sup> T. T. PUCK, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 44, 772 (1958).

<sup>116</sup> W. SZYBALSKI und M. J. SMITH, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 101, 662 (1959).

<sup>117</sup> W. SZYBALSKI, Exp. Cell Res. 18, 588 (1960).

<sup>118</sup> G. A. FISCHER, Cancer Res. 19, 372 (1959).

<sup>119</sup> R. E. BASES, Cancer Res. 19, 311 (1959).

<sup>120</sup> J. F. WHITFIELD und R. H. RIXON, Exp. Cell Res. 19, 531 (1960).

<sup>121</sup> L. SACHS und D. MEDINA, Nature 189, 457 (1961).

<sup>122</sup> K. G. BEMCH und D. W. KING, Science 133, 381 (1961).

<sup>123</sup> P. WILDY, Biochem. J. 68, 14P (1958).

<sup>124</sup> A. A. NEWTON und P. WILDY, Exp. Cell Res. 16, 624 (1959).

<sup>125</sup> M. L. EIDINOFF und M. A. RICH, Cancer Res. 19, 521 (1959).

<sup>126</sup> R. SCHINDLER, Helv. physiol. Acta 18, C 93 (1960).

<sup>127</sup> G. E. FOLEY und B. P. DROLET, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 92, 347 (1956).

stischen Infektivität beobachtet worden<sup>128</sup>. Daneben kommt es oft in Kulturen normaler Zellen zum Auftreten von Zellen mit malignen Eigenschaften, welche sich dann *in vivo* wie Zellen eines transplantierbaren Tumors verhalten<sup>129, 130</sup>. Dies deutet darauf hin, dass in der Kultur offenbar auch Mutationen für eine Änderung der Zellcharakteristiken verantwortlich zu machen sind. Besonders augenfällig äussert sich dieser Sachverhalt im Auftreten von Zellen mit veränderter Chromosomenstruktur bei fortgesetzter Kultur *in vitro*, wie dies für viele Zellstämme beschrieben und zum Teil sehr eingehend untersucht worden ist<sup>128, 131-134</sup>.

Gegenwärtig setzt sich nun mehr und mehr die Ansicht durch, dass solche Veränderungen der Zellcharakteristiken nicht durch die Kultur *in vitro* an sich bedingt sind, sondern auf dem Fehlen optimaler Kulturbedingungen für die betreffende Zellpopulation beruhen, wobei das Problem der optimalen Bedingungen in erster Linie die Zusammensetzung der Nährösung betrifft. So ist kürzlich gezeigt worden, dass Fibroblastenkulturen über lange Zeit ihre Chromosomenstruktur unverändert beibehalten, wenn das Nährmedium unter Zusatz von Embryoextrakt oder fötalem Serum den Bedürfnissen der Zellen ausreichend angepasst wird<sup>136-138</sup>. Gleicherweise ist es in den letzten Jahren durch Anpassung der Nährösung an die speziellen Bedürfnisse des betreffenden Zellstammes möglich geworden, eine ganze Reihe von transplantierbaren Tumoren praktisch ohne Latenzzeit *in vitro* zu züchten<sup>21, 22, 24, 138</sup>.

Einen Schritt weiter in der Richtung der Kultur repräsentativer Zellpopulationen geht das Bestreben, Zellen mit spezifischen Funktionen *in vitro* zu züchten. Da die morphologischen Eigenschaften unter den Kulturbedingungen kaum als ausreichendes Kriterium für die Erhaltung von Zellfunktionen zu betrachten sind, kommen dafür in erster Linie biochemische Aktivitäten in Frage. Die neoplastische Infektivität, welche zwar in vielen Fällen unter den Kulturbedingungen erhalten bleibt, ist wohl nur mit Vorbehalten als «Zellfunktion» aufzufassen. In Kulturen, welche aus normalen Geweben hergestellt werden, wachsen nun ziemlich regelmässig Zellen mit epithelialer oder mit fibroblastähnlicher Morphologie aus, wobei die spezifischen biochemischen Aktivitäten, wie sie beispielsweise an der Leber besonders gut untersucht sind, bald nicht mehr nachgewiesen werden können. Ein solcher Zellstamm aus Leber wies zwar einen relativ hohen Glykogengehalt auf, hatte dagegen die wohl spezifischere Fähigkeit der Inaktivierung von Östradiol verloren<sup>140</sup>, und bei einem anderen, ebenfalls aus Lebergewebe entstandenen Zellstamm<sup>141</sup> waren mehrere für dieses Organ spezifische Enzyme in den Zellen in Kultur nicht mehr nachweisbar<sup>142, 143</sup>. An Kulturen von Leber aus Hühnerembryonen ist zudem gezeigt worden, dass das für Leber typische Bild des Kohlehydratstoff-

wechsels bereits während der ersten 24 h *in vitro* verloren geht<sup>144</sup>.

Es stellt sich die Frage, ob dieser Verlust spezifischer Zellfunktionen *in vitro* auf einer Entdifferenzierung der betreffenden Zellen beruht oder aber auf dem Überwuchern anderer, unter den Bedingungen *in vitro* besser zur Vermehrung befähigter Zelltypen, wie Bindegewebs- oder Epithelzellen. Für die zweite dieser Möglichkeiten spricht nun die Tatsache, dass es in zwei Fällen gelungen ist, Zellen mit spezifischen biochemischen Funktionen *in vitro* zu züchten, ohne dass mit fortschreitender Zellvermehrung diese Zellfunktionen verloren gegangen wären. Dies betrifft einerseits Zellen eines Mäuse-Mastocytoms, deren Synthese von Histamin und Serotonin in der Kultur quantitativ erhalten bleibt<sup>24</sup>, und anderseits Zellen des Hypophysenvorderlappens, welche ihre Produktion von Hormonen *in vitro* ebenfalls fortführen<sup>145</sup>. In beiden Fällen besteht ein wesentlicher methodischer Kunstgriff in der Abtrennung der funktionellen Zellen von andersartigen, in der ursprünglichen Population mit vorhandenen Zelltypen, wie Fibroblasten oder Histiocyten. Außerdem ist für die Kultur der neoplastischen Mastzellen eine an deren besondere Nährbedürfnisse angepasste Nährösung erforderlich. Die Kultur anderer Zelltypen mit spezifischen Funktionen liegt somit offenbar durchaus im Bereich der Möglichkeit, wenn diesen beiden Voraussetzungen, nämlich der Abtrennung von Begleitzellen und der Verwendung eines Nährmediums mit allen für die betreffende Zellart essentiellen Nutrirenten, Rechnung getragen wird. Wie weit dabei auch Hormone für die Erhaltung der Zellfunktion eine Rolle spielen, ist gegenwärtig noch kaum vorauszusehen.

- <sup>128</sup> K. K. SANFORD, G. L. HOBBS und W. R. EARLE, *Cancer Res.* **16**, 162 (1956).
- <sup>129</sup> A. LEVAN und J. J. BIESELE, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **71**, 1022 (1958).
- <sup>130</sup> K. K. SANFORD, *Cancer Res.* **18**, 747 (1958).
- <sup>131</sup> L. BERMAN, C. S. STULBERG und F. H. RUDDLE, *Cancer Res.* **17**, 668 (1957).
- <sup>132</sup> T. C. HSU und P. S. MOORHEAD, *J. nat. Cancer Inst.* **18**, 463 (1957).
- <sup>133</sup> D. K. FORD und G. YERGANIAN, *J. nat. Cancer Inst.* **21**, 393 (1958).
- <sup>134</sup> F. H. RUDDLE, L. BERMAN und C. S. STULBERG, *Cancer Res.* **18**, 1048 (1958).
- <sup>135</sup> E. H. Y. CHU und N. H. GILES, *J. nat. Cancer Inst.* **20**, 383 (1958).
- <sup>136</sup> T. T. PUCK, S. J. CIECIURA und H. W. FISHER, *J. exp. Med.* **106**, 145 (1957).
- <sup>137</sup> J. H. TIJO und T. T. PUCK, *J. exp. Med.* **108**, 259 (1958).
- <sup>138</sup> T. T. PUCK, S. J. CIECIURA und A. ROBINSON, *J. exp. Med.* **108**, 945 (1958).
- <sup>139</sup> T. A. MCCOY und R. E. NEUMANN, *J. nat. Cancer Inst.* **16**, 1221 (1956).
- <sup>140</sup> B. B. WESTFALL, V. J. EVANS, J. E. SHANNON und W. R. EARLE, *J. nat. Cancer Inst.* **14**, 655 (1953).
- <sup>141</sup> R. S. CHANG, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y. **87**, 440 (1954).
- <sup>142</sup> W. F. PERSKE, R. E. PARKS und D. L. WALKER, *Science* **125**, 1290 (1957).
- <sup>143</sup> V. H. AUERBACH und D. L. WALKER, *Biochim. biophys. Acta* **31**, 268 (1959).
- <sup>144</sup> J. PAUL und E. S. PEARSON, *Exp. Cell Res.* **12**, 223 (1957).
- <sup>145</sup> K. W. THOMPSON, M. M. VINCENT, F. C. JENSEN, R. T. PRICE und E. SHAPIRO, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y. **102**, 403 (1959).

Als noch weiter gestecktes Ziel ist schliesslich die Kultur von beliebigen Einzelzellen, soweit sie überhaupt zur Vermehrung befähigt sind, direkt anschliessend an deren Isolierung aus Geweben des Gesamtorganismus zu nennen. Zur Lösung dieser Aufgabe reichen allerdings unsere gegenwärtigen Kenntnisse über die Nährbedürfnisse isolierter Säugerzellen noch bei weitem nicht aus. Ein solches Kultursystem wird jedoch wiederum neue Möglichkeiten eröffnen für das Studium der Verwandtschaft und der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Zelltypen sowie für die Bearbeitung von Fragen der embryologischen Differenzierung.

Während sich somit die bisherige Entwicklung auf dem Gebiete der Zellkulturen vor allem mit Fragen des Wachstums und der Zellvermehrung befasst und dabei besonders die grosse Ähnlichkeit vieler verschiedener

Zelltypen *in vitro* hervorgehoben hat, scheinen die gegenwärtigen Bestrebungen die Grundlagen zu legen für eine Analyse der Zellfunktion, der Zelldifferenzierung und vermutlich auch der neoplastischen Entartung, wobei neben dem Gemeinsamen wohl auch immer mehr die Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen des Gesamtorganismus hervortreten werden.

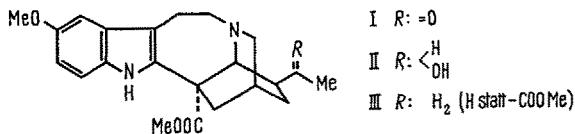
**Summary.** In this brief review, the development of modern quantitative methods for the cultivation of mammalian cells *in vitro* is described, and present knowledge of their nutritional requirements is presented. In addition, some applications of these techniques in biochemistry, pharmacology, virology, genetics, and radiobiology are discussed.

## Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions expérimentées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

### Voacanga-Alkaloide IV<sup>1</sup>. Struktur von Voacryptin und Voacristin

Für das aus Stammrinden von *Voacanga africana* Stapf isolierte Nebenalkaloid Voacryptin,  $C_{22}H_{26}N_2O_4$ , hatten wir auf Grund spektraler und analytischer Daten die Struktur eines Oxovoacangins vermutet<sup>2</sup>. Nachdem für Voacristin,  $C_{22}H_{28}N_2O_4$ , die Konstitution eines Hydroxyvoacangins abgeleitet worden ist<sup>3,4</sup>, lag es aus biogenetischen Gründen nahe, für beide Stoffe die gleiche Stellung des O-Atoms am Voacangingerüst anzunehmen. Diese Hypothese konnte durch direkte Überführung von Voacryptin in Voacristin experimentell gesichert und für Voacryptin die Struktur (I) des 20-Oxovoacangins bewiesen werden; Voacristin ist demnach 20-Hydroxyvoacangin (II)<sup>4</sup>.



*Voacryptin* besitzt eine Carbonylgruppe ( $5,83 \mu$  in  $CH_2Cl_2$ )<sup>2</sup>, die durch Darstellung eines *Oxims*, Smp. 114 bis 116°, chemisch gesichert ist. Die Lage der Carbonylabsorption lässt auf eine aliphatische oder alicyclische Ketogruppe schliessen. Einen indirekten Hinweis auf die Stellung dieser Oxofunktion liefert die Chromsäure-Oxydation des Voacryptins: unter den drastischen Bedingungen der Bestimmung nach Kuhn-Roth konnte eine C-Methylgruppe nahezu quantitativ erfasst werden<sup>2</sup>. Nach Oxydation unter milder Bedingungen<sup>6</sup> konnte papierchromatographisch nur Essigsäure und keine Propionsäure nachgewiesen werden, was gegen das Vorliegen einer C-Aethylgruppe, nicht aber gegen eine  $CH_2CO$ -Seitenkette<sup>7</sup> spricht. Die nach HUANG-MINLON<sup>8</sup> ausgeführte Wolff-Kishner-Reduktion lieferte unter gleichzeitiger Decarbomethoxylierung<sup>9</sup> direkt *Ibogain* (III)<sup>10</sup>, wodurch die 20-Stellung der Ketogruppe sowie das den Isochinuclidin-alkaloiden gemeinsame Grundgerüst<sup>11</sup> für Voacryptin bewiesen ist.

Die Reduktion des Voacryptins mit Kaliumborhydrid verläuft sterisch nicht einheitlich. Aus dem Gemisch diastereomerer Dihydrovoacryptine konnte nach Acetylierung als Hauptprodukt ein in allen Eigenschaften mit *Voacristin-acetat*<sup>1,10</sup> identisches O-Acetat erhalten werden. In den Mutterlaugen fand sich 20-*epi*-*Voacristin-O-acetat*, Smp. ca. 180°<sup>12</sup>.

**Summary.** Voacryptine is demonstrated to be 20-oxo-voacangine. On reduction, it furnishes voacristine (20-hydroxyvoacangine) and 20-*epi*-voacristine.

U. RENNER<sup>13</sup> und D. A. PRINS  
Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. Geigy AG., Basel,  
14. Dezember 1960.

<sup>1</sup> 3. Mitt. U. RENNER und D. A. PRINS, Exper. 15, 456 (1959).

<sup>2</sup> U. RENNER, Exper. 15, 185 (1959).

<sup>3</sup> D. STAUFFACHER und E. SEEBECK, Helv. chim. Acta 41, 169 (1958).

<sup>4</sup> Iboxygain<sup>5</sup> (= Decarbomethoxyvoacristin<sup>1</sup> = Decarbomethoxyvoacangarin<sup>3</sup>) ist somit 20-Hydroxyibogain. (Anmerkung bei der Korrektur, 16. Feb. 1961). Inzwischen ist die 20-Stellung der Hydroxylgruppe auch auf anderem Wege eindeutig gesichert worden: K. BIEMANN und M. FRIEDMANN-SPIETELER, Tetrahedron Letters 2, 1961, im Druck. Wir danken Herrn Prof. BIEMANN für die freundliche Überlassung seines Manuskriptes.

<sup>5</sup> R. GOUTAREL, F. PERCHERON und M. M. JANOT, C. R. Acad. Sci. Paris, 246, 279 (1958).

<sup>6</sup> H. BICKEL, H. SCHMID und P. KARRER, Helv. chim. Acta 38, 649 (1955).

<sup>7</sup> Auch der positive Ausfall der qualitativen Jodoformprobe spricht für das Vorliegen einer  $CH_2CO$ -Gruppierung.

<sup>8</sup> HUANG-MINLON, J. Amer. chem. Soc. 68, 2587 (1946).

<sup>9</sup> U. RENNER, D. A. PRINS und W. G. STOLL, Helv. chim. Acta 42, 1572 (1959).

<sup>10</sup> Vergleiche mit authentischen Präparaten, Misch-Smp., IR-Spektrum und spez. Drehung.

<sup>11</sup> M. F. BARTLETT, D. F. DICKEL und W. I. TAYLOR, J. Amer. chem. Soc. 80, 126 (1958).

<sup>12</sup> Vermutlich noch nicht ganz rein, Misch-Smp. mit Voacristinacetat zeigt Depression von rund 20°. Im IR-Spektrum fehlen die Banden der MeCO-Gruppe.

<sup>13</sup> Den HH. Dres. E. GIROD, H. WAGNER und ihren Mitarbeitern danken wir für Spektren und Mikroanalysen.