

shows that the yolk sac bound iron from serum nearly as well as from FeCl_3 . The bottom curve in the Figure shows that chorioallantoic tissue had low capacity to bind iron from serum. In 1 h yolk sac tissue had bound 0.90 ng/mg iron while chorioallantoic tissue had bound only 0.03 ng/mg. This discrimination did not appear between the 2 placental tissues when iron was taken up from FeCl_3 .

The effects of metabolic inhibitors on in vitro iron binding from rat serum by chorioallantoic and yolk sac tissues are shown in the Table. In one set of experiments FeCl_3 was substituted for serum. Yolk sac binding was reduced by sodium arsenite, rotenone and ethacrynic acid 95% ($P < 0.001$), 82% ($P < 0.001$) and 46% ($P < 0.001$) respectively. Rotenone and ethacrynic acid did not affect binding significantly in chorioallantoic tissue and sodium arsenite produced an unexpected 39% increase ($P < 0.01$). Ethacrynic acid and rotenone were dissolved in 0.4% ethyl alcohol. This concentration of alcohol did not significantly modify control values. Yolk sac iron binding from FeCl_3 decreased somewhat (19%) with sodium arsenite, but chorioallantoic binding was relatively unaffected.

The effects of proteolytic enzymes on in vitro iron binding from serum are shown also in the Table. Trypsin reduced binding in chorioallantoic and yolk sac tissues 39% ($P < 0.01$) and 65% ($P < 0.001$), and papain reduced binding 29% ($P < 0.025$) and 77% ($P < 0.001$), respectively. Chymotrypsin was the least effective, reducing binding in chorioallantoic and yolk sac tissues 23% ($P < 0.05$) and 29% ($P < 0.025$). It is not likely that the enzymes produced their effects through proteolysis of transferrin since AZARI and FEENEY¹⁰ have shown that transferrin is resistant to trypsin and chymotrypsin. Although iron and iron-transferrin have been reported to chelate with several compounds¹¹, no work has shown that iron-transferrin chelates with metabolic inhibiting or proteolytic agents. The responses to these agents by the yolk sac resembles the process which has been described for the reticulocyte by JANDL et al.¹². These have been used as arguments for cellular reception of iron from irontransferrin as being a process requiring metabolic energy and a protein receptor.

Previous in vivo experiments indicate that the rat yolk sac on days 14, 16, 18 and 20 has a relatively short-span capability of transmitting iron to the fetus (42% of intracardiac injected iron on day 16 only)⁶. There was no

appreciable storage of iron either in the yolk sac or chorioallantois on those days. The present in vitro experiments demonstrate that yolk sac tissue has a high binding affinity for iron on day 16. This may be related to the apparent ability of the organ to transfer iron to the fetus on that day. The binding seems to be metabolically sensitive and is decreased by proteolytic enzymes, indicating the possibility of a receptor relationship.

Chorioallantoic tissue on day 16 has a low binding affinity for iron from serum. The binding is metabolically insensitive and is only mildly affected by proteolytic enzymes. Nevertheless, the chorioallantois, as previously shown on day 16, still apparently conveys the major portion of iron to the fetus (58%). At this time the physical size or bulk of the chorioallantois is about 10 times greater than the yolk sac. These results are made more interesting in light of the recent suggestion of MANSOUR et al.¹³ that an iron transport system matures in the rat placental cell membrane between days 14 and 17 and becomes efficient by day 20.

Zusammenfassung. Nachweis, dass das Eisenbindungsvermögen der Dottersackplacenta bedeutend grösser ist als bei der chorioallantoiden Placenta und dass diese auch unter der Einwirkung von den Stoffwechsel beeinflussenden Stoffen ein verschiedenes Verhalten zeigt.

R. J. B. GARRETT¹⁴, N. E. GARRETT and
J. W. ARCHDEACON¹⁵

*Department of Physiology and Biophysics,
Medical Center, University of Kentucky,
Lexington, (Kentucky 40506, USA), 25 September 1972.*

¹⁰ P. R. AZARI and R. E. FEENEY, *J. biol. Chem.* 232, 293 (1958).

¹¹ G. BATES, C. BILLUPS and P. SALTMAN, *J. biol. Chem.* 242, 2816 (1967).

¹² J. H. JANDL, J. K. INMAN, R. I. SIMMONDS and D. W. ALLEN, *J. clin. Invest.* 38, 161 (1959).

¹³ M. M. MANSOUR, A. R. SCHULERT and S. R. GLASSER, *Am. J. Physiol.* 222, 1628 (1972).

¹⁴ Present address: College of Pharmacy, Medical Center, University of Kentucky, Lexington (Kentucky 40506, USA).

¹⁵ This work was supported by U.S. Public Health Service Grant No. HD05016 and Predoctoral Fellowship Grant No. FO1-DE41063 to R.J.B.G.

Änderungen der Zellzyklusparameter chinesischer Hamsterfibroblasten unter chronischer Hypoxie, gemessen am Impulszytrophotometer

Unter hypoxischen Bedingungen treten Änderungen im Proliferationsverhalten chinesischer Hamsterfibroblasten in vitro auf. Autoradiographische Untersuchungen der Flussraten von einer Zyklusphase zur anderen ergaben, dass auch die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zyklusphasen verschoben wird. Mit Hilfe der Impulszytrophotometrie kann die Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Zellzyklusphasen nach zunehmenden Zeiten der Hypoxie gemessen werden.

Material und Methode. Chinesische Hamsterzellen vom Stamm B-14 wurden als Monolayer in Glas-Vierkantflaschen (Schott) kultiviert. Das Nährmedium bestand aus Eagle's MEM und 10% Kälberserum.

Zur Herstellung der hypoxischen Bedingungen wurden die Zellkulturen kontinuierlich mit einem wasser dampfgesättigten Stickstoff-Kohlendioxid-Gasmisch begast.

Zur Messung des DNS-Gehaltes der Zellen im Impulszytrophotometer wurden die Zellen zunächst vom Boden der Kulturflaschen durch Trypsineinwirkung abgelöst, abzentrifugiert und mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen (Zentrifugation bei 200 g für 5 min). Ca 10^6 bis 10^8 Zellen wurden dann durch Eintropfen in 20 ml absoluten Alkohols fixiert. Dabei wurde die Probe zur Vermeidung von Zellverklumpungen apparativ geschüttelt. Nach 20 min wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Alkohol getrennt und wieder mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Anschliessend erfolgte eine Resuspension und 1stündige Inkubation der Zellen in 10 ml einer 0,1%igen RNase-Lösung (50 E/mg, DNasefrei) bei 37 °C im Wasserbad. Nach erneuter Waschung der Zellen mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Zellen in 10 ml einer 0,001%igen gepufferten Ethidiumbromidlösung gefärbt.

Frühestens 20 min nach der Fluorochromierung wurde der DNS-Gehalt der Zellen im Impulszytrophotometer (ICP) der Fa. Phywe¹, Göttingen, gemessen. Die Arbeitsweise dieses Fluoreszenz- und Durchfluszytrophotometers ist von DITTRICH und GÖHDE² beschrieben worden. Jede Kurve setzt sich aus 200 000–300 000 Einzelimpulsen zusammen.

Ergebnisse. Die Histogramme zeigen die Verteilung der Zellpopulationen nach ihrem DNS-Gehalt zu verschiedenen Zeiten chronischer Hypoxie. Die Kontrollkurve der Abbildung hat zwei ausgeprägte Maxima. Der linke Gipfel, der sich im wesentlichen aus $2n$, d.h. G_1 -Phasezellen, zusammensetzt, ist ca. doppelt so hoch, jedoch schmäler als der zweite Gipfel der Kurve, den Zellen mit dem doppelten DNS-Gehalt, also späte S- und G_2 -Phasezellen aufbauen. Die Zellen, die sich in der S-Phase befinden, weisen einen DNS-Gehalt zwischen $2n$ und $4n$ auf. Sie sind anteilmäßig in beiden Gipfeln enthalten und bilden die überwiegende Fraktion in der Senke zwischen den zwei Gipfeln.

Es existiert derzeit noch keine allgemein verwendbare Methode, aus dem Histogramm der Fluoreszenz die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen quantitativ zu erfassen. Schwierigkeiten bereitet insbesondere die Abtrennung der Zellen der G_2 -Phase von denen der späten S-Phase. Mit der Methode der markierten Mitosen nach Pulsmarkierung mit Tritium-Thymidin wurde die mittlere Dauer der Zellzyklusphasen der chinesischen Hamsterzellen unter Normalbedingungen bestimmt. Die G_1 -Phase dauert im Mittel 3 h, die S-Phase 7, 5 h, die G_2 -Phase 1, 5 h. Da die Kontrollpopulation sich zum Zeitpunkt der impulszytrophotometrischen Untersuchungen in logarithmischer Wachstumsphase befunden hat, lässt sich aus den mittleren Phasendauern folgende prozentuale Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zyklusphasen berechnen: 32% der Zellen befinden sich in G_1 -Phase, 58% in S-Phase und 10% in G_2 -Phase.

Es ist möglich, bei Kenntnis dieser Relation das Histogramm so in die 3 Phasen zu zerlegen, dass die Teilflächen dem berechneten Verhältnis weitgehend entsprechen. Dabei zeigt sich, dass im vorliegenden Fall der rechte Gipfel des Verteilungsdiagramms zum überwiegenden Teil Zellen der späten S-Phase enthält, und die Zellen der G_2 -Phase praktisch nur den über die mittlere Senke herausragenden zweiten Gipfel aufbauen. Der Anteil von Zellen der G_1 -Phase lässt sich durch spiegelbildliche Verdopplung der Anstiegsflanke des Verteilungsdiagramms bestimmen. Von dieser Deutung des normalen Verteilungs-

diagramms der Fluoreszenz ausgehend, können wir die Änderungen des Histogramms unter andauernder Hypoxie beschreiben. Schon nach 30stündiger Hypoxie ist der zweite Gipfel stark verkleinert, nach 6stündiger Hypoxie ist er bereits nicht mehr nachweisbar (Figur). Bei länger andauernder Hypoxie nimmt die rechte Flanke der Kurve, d.h. der Anteil von S-Phasezellen mit bereits höherem DNS-Gehalt, immer weiter ab. Dieser Effekt ist nach 6 und 9 h bereits zu erkennen, nach 12 h am ausgeprägtesten (Figur). Nach 30stündiger Hypoxie nimmt die Zahl der Zellen in der S-Phase wieder zu.

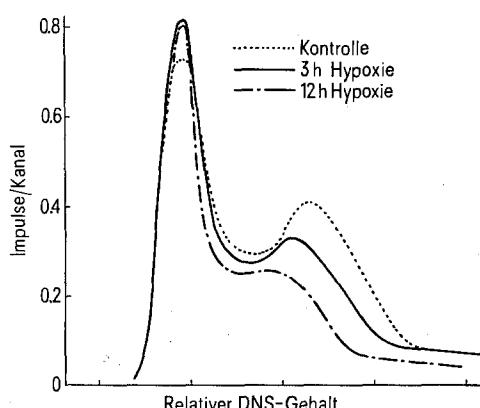
Diskussion. Unter dem Einfluss andauernder Hypoxie verändert sich die Verteilung der Zellen der Population auf die verschiedenen Zellzyklusphasen. Am frühesten und am stärksten ist der Anteil von Zellen der G_2 -Phase vermindert, später nimmt auch der Anteil von S-Phasezellen und dabei besonders von Zellen der späten S-Phase vorübergehend ab und steigt dann wieder an. Eine chronisch hypoxische Zellpopulation in vitro besteht somit zunehmend aus Zellen der G_1 - und der frühen S-Phase. Die Zahl der Zellen der G_2 -Phase ist schliesslich so gering, dass sie mit dem Impulszytrophotometer nicht mehr nachgewiesen werden können. Autoradiographische Untersuchungen der Proliferationskinetik hypoxischer Zellen in vitro haben eine Verlängerung der G_1 -Phasendauer sowie der DNS-Syntheselänge auf etwa das 6fache ergeben (BORN et al., in Vorbereitung). Die G_2 -Phaselänge verändert sich dagegen unter chronisch hypoxischen Bedingungen nur unwesentlich. Somit besteht ein stark verlangsamer Einstrom von G_1 -Phasezellen in die S-Phase und auch der S-Phasezellen in die G_2 -Phase, während der Einstrom von G_2 -Phasezellen in die G_1 -Phase normal schnell verläuft.

Die Verschiebungen innerhalb des DNS-Gehaltes von S-Phasezellen mit zunehmender Dauer der Hypoxie lassen vermuten, dass Zellen zu Beginn der DNS-Synthese stärker verlangsamt werden als Zellen der späten S-Phase. Die Impulszytrophotometrie erscheint somit geeignet, schnell ablaufende Verschiebungen in der Verteilung der Zellen einer Population auf verschiedene Zellzyklusphasen nachzuweisen. Es bedarf jedoch eingehender autoradiographischer Untersuchungen, um die Einzelheiten der Proliferationskinetik unter den dargestellten Bedingungen festzustellen.

Summary. By means of a pulse cytophotometer, changes in the distribution of chronically hypoxic Chinese hamster cells in vitro in the different phases of the cell cycle, were measured. Within a few hours, the fraction of cells in G_2 phase and late S phase decreases to a value which is no longer measurable, indicating a partial synchronization in G_1 and early S phase.

REINHOLD BORN, P. DAHR, P. DÖRMER und K.-R. TROTT³

Abteilung für Strahlenbiologie und Biophysik des Institutes für Biologie und Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Ingolstädter Landstrasse 1, D-Neuherberg, (Deutschland), 18. August 1972.



Verteilung des DNS-Gehaltes chinesischer Hamsterzellen in vitro unter normalen Wachstumsbedingungen, nach 3 h Hypoxie und nach 12 h Hypoxie.

¹ Wir danken der Firma für die zeitweilige Überlassung eines Photometers.

² W. DITTRICH und W. GÖHDE, Z. Naturforsch. 24b, 360 (1969).

³ Wir danken Herrn Dr. W. GÖHDE, Münster, für wertvolle Hinweise zur Interpretation der impulszytrophotometrischen Histogramme.