

Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse
Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft
Band: 73 (1963)

Artikel: Untersuchungen über die radiomimetische Wirkung von 2-Acetylaminofluoren auf die Wurzelspitzenchromosomen von *Vicia faba*
Autor: Keller, Rolf
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-51554>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 11.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Untersuchungen über die radiomimetische Wirkung von 2-Acetylaminofluoren auf die Wurzelspitzenchromosomen von *Vicia faba*

Von Rolf Keller

(Cytologisches Laboratorium, Institut für Allgemeine Botanik,
Universität Zürich)

Manuskript eingegangen am 17. Januar 1963

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Problemstellung	94
II. Material und Methode	96
1. Morphologie der Chromosomen von <i>Vicia faba</i> «Windsor»	98
2. Terminologie	102
III. Versuchsanlagen und Ergebnisse	104
1. Mitose- und Phasenindex AAF-behandelter Wurzeln	104
2. Die Zeit des Auftretens der Brüche	108
a) Post-split Subchromatidaberrationen	112
b) Pre-split Subchromatidaberrationen	113
c) Chromatid- bzw. Chromosomenaberrationen	115
3. Behandlung unter variablen Bedingungen	115
a) Abhängigkeit der Wirkung von AAF vom pH der Behandlungsflüssigkeit	115
b) Die Abhängigkeit der AAF-Wirkung vom Sauerstoffgehalt der Behandlungslösung	117
c) Die Abhängigkeit der Wirkung des AAF von der Konzentration	119
d) Die Abhängigkeit der AAF-Wirkung von der Temperatur	122
e) Der Einfluss von Mangan auf das Bruch- und Reunionsgeschehen	124
f) Der Einfluss von Peroxyd auf die Wirkung von AAF unter partieller Anaerobiose	126
4. Die Verteilung der Brüche über das Genom	129
a) Verteilung der Brüche auf einzelne Chromosomentypen	129
b) Lokalisierung der Brüche und Vergleich mit der Wirkung von Röntgenstrahlen	130
5. Die Wirkung von AAF in Abhängigkeit von der oxydativen Phosphorylierung und von der Atmung	132
a) Die Wirkung der AAF-Behandlung nach Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung von der Atmung	132
b) Die Aufhebung der Entkoppelungswirkung durch Zugabe von ATP	133
c) Der Einfluss von ATP auf die Bruchrate und die Reunionen	134

d) Der Einfluss von Cyanid und Azid auf die Bruchwirkung von AAF	136
1. Die Wirkung von Azidvorbehandlung auf die Aberrationsrate	136
2. Die Beeinflussung der Bruchwirkung von AAF durch Cyanid	136
IV. Diskussion	137
1. Die Sensibilität der Chromosomen während des Mitosezyklus gegenüber radiomimetischen Stoffen und Röntgenstrahlen	137
2. Lokalisierung der Brüche	140
3. Der Einfluss variabler Umweltsbedingungen auf die Wirkung von Röntgen- strahlen und Chemikalien	141
4. Allgemeine Betrachtungen über die mögliche Wirkungsweise von AAF	142
V. Zusammenfassung	143
Literaturverzeichnis	147

Verzeichnis der Akkürzungen

A	Anaphase	EZ	Erholungszeit
AAF	2-Acetylaminofluoren	HN 2	Stickstofflost
ATP	Adenosintriphosphat	M	Metaphase
BAL	British Anti-Lewisite	MH	Maleinhydrazid
DEPE	Diepoxypropyläther	P	Prophase
DNP	2,4-Dinitrophenol	SR	Sister reunion
DNS	Desoxyribonukleinsäure	T	Telophase
EOC	Äthoxycoffein		

I. Einleitung und Problemstellung

Es wurde in zahlreichen Arbeiten versucht, verschiedenartige chemische Agenzien auf ihre mutagene, cytotoxische und radiomimetische Wirkung hin zu untersuchen. Wiederholt wurde dabei festgestellt, dass zwischen der Wirkung ionisierender Strahlen und gewisser Chemikalien Parallelen bestehen. So können bestimmte Chemikalien die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Wurzelspitzenmitosen nachahmen (Auerbach, 1950; Avanzi, 1950; Battaglia, 1950; Rosen, 1954; Röhrborn, 1960, u. a.). Chemikalien, die diese Eigenschaft zeigen, werden als Radiomimetica zusammengefasst. Erweitern wir die Definition der Radiomimetica, um damit die Möglichkeit eines verschiedenen Wirkungsmechanismus zu unterstreichen, dann sind radiomimetische Stoffe solche Chemikalien, die durch bestimmte aktive Gruppen oder durch den ganzen Molekülverband Veränderungen in der chromosomalen Struktur bewirken und gelegentlich auch das Erbgut verändern (Auerbach, 1950, 1958; D'Amato, 1949; Demerec, 1948, 1949; Demerec und Hemmerley, 1955; Loveless, 1960, u. a.).

Obwohl nun aber eine beachtliche Liste solcher Agenzien zusammengestellt werden kann, so ist es doch kaum möglich, alle in bezug auf ihre Wirkung auf einen Nenner zu bringen. Die Unterschiede liegen vor allem in der Art der Wirkung, im Wirkungsort, im Zeitpunkt der optimalen Wirksamkeit und in der Beeinflussung durch verschiedene Stoffwechselvorgänge. Über den Mechanismus der Wirkkette ist nur sehr wenig bekannt. Die Kenntnisse beschränken sich auf eine Gruppe von Chemikalien, die alkylierenden Agenzien. Ausgehend von mutagenen Senfgasen, sind verschiedene Arbeiten über den Wirkungsmechanismus alkylierender Substanzen ausgeführt worden (Auerbach, 1958; Alexander, 1959; Ehrenberg, 1960; Goldacre et al., 1949; Koller, 1958; Ockey, 1960, u. a.). Die Wirkung besteht hier in einer Reaktion der alkylierenden Substanzen mit ionisierten Makromolekülen, wie DNS. Dabei wurde festgestellt, dass nichtelektrophile alkylierende Substanzen keine radiomimetische Wirkung zeigen (Price, 1958). Die Wirkung erfolgt im Mitosezyklus im allgemeinen früher als bei Röntgenstrahlen. Daraus wurde gefolgert, dass diese Chemikalien in Syntheseprozesse eingreifen, möglicherweise in den der Chromosomenverdoppelung.

Versuche in vitro haben gezeigt, dass DNS mit radiomimetischen Stoffen rascher reagiert, als dies Proteine tun. Die Viskosität des DNS-Moleküls wird dabei verringert (Alexander und Fox, 1952). Denselben Effekt konnte man allerdings auch nach Einwirkung ionisierender Strahlen feststellen. Ferner geht aus Versuchen mit Viren hervor, dass diese zum Beispiel durch Senfgase rascher inaktiviert werden als Enzyme; dies spricht wiederum für eine raschere Reaktion mit DNS.

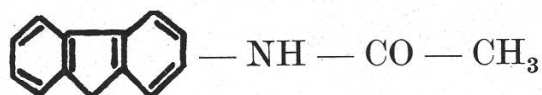
Die Wirkungskette dieser alkylierenden Agenzien lässt sich aber nicht auf andere Radiomimetica übertragen. Eine ganze Reihe nichtalkylierender Substanzen wird auch als radiomimetisch bezeichnet, obwohl sie nur in einigen Merkmalen Parallelen zur Wirkung ionisierender Strahlen aufweisen, zum Beispiel Äthylalkohol, Purinderivate u. a.

In der vorliegenden Arbeit habe ich eine als carcinogen bekannte und beschriebene, aber nicht alkylierende Substanz, 2-Acetylaminofluoren, auf die chromosomenbrechende Wirkung hin bei *Vicia faba* untersucht.

Die Arbeit umfasst die folgenden Problemkreise:

1. Bruchwirkung auf die Chromosomen
2. Zeitpunkt der Wirkung und Einfluss auf den Mitoseablauf
3. Spezifität der Wirkung auf verschiedene Chromosomenloci
4. Beeinflussung der Wirkung durch verschiedene Stoffwechsellinhibitoren
5. Untersuchung der Rekombinationsbedingungen

2-Acetylaminofluoren induziert bei Ratten nach Fütterung Mammacarcinome, Leber-, Gehörgangs- und Darmtumoren (Wilson, 1946; Bielschowsky, 1944; Allison, 1952, u. a.). Cytologisch sind bis dahin noch keine Untersuchungen weder an Tieren noch an Pflanzen durchgeführt worden.



Die vorliegende Arbeit entstand im cytologischen Laboratorium des Institutes für Allgemeine Botanik der Universität Zürich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Rutishauser. Meinem verehrten Lehrer bin ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die Anteilnahme, mit welcher er den Verlauf dieser Untersuchungen verfolgte, zu herzlichem Dank verpflichtet.

II. Material und Methode

Als Objekt für alle Versuche diente *Vicia faba* «Windsor», die weisse Puffbohne mit der Chromosomenzahl $2n = 12$. Die Bohnen wurden in Seifenwasser gewaschen und in grossen Petrischalen während zweier Tage angekeimt. Nach dem Erscheinen der Primärwurzeln wurden sie in 50-ml-Kolben gebracht, bis die Länge der Hauptwurzeln etwa 4 cm betrug. Anschliessend wurden die Keimlinge in einen verdunkelten Kulturtank versetzt, dessen Wasser mittels eines Rührwerkes bewegt wurde. Sämtliche Kulturen wurden bei Zimmertemperatur (18 °C) gehalten. Zur Behandlung verwendete ich ausschliesslich Sekundärwurzeln von nicht mehr als 1 cm Länge.

Während der Erholungszeiten (EZ) waren die Pflanzen den gleichen Bedingungen ausgesetzt, die während der Aufzucht herrschten. Nährlösungen habe ich in keinem Falle verwendet. Die Aufzucht der Wurzeln in Nährlösungen nach vorherigem Ankeimen in Sägespänen ergab leichte Schädigungen der Wurzeln vom Charakter der Röntgenprimäreffekte (Bauer, 1949).

Die mit Röntgenstrahlen behandelten Wurzeln wurden vor der Fixierung während 2 h mit 0,05prozentiger Colchicininlösung behandelt, für die übrigen Versuche erfolgte die Nachbehandlung mit 0,002 M Oxychinolinlösung.

Alle behandelten Wurzeln wurden in La Cour 2 BD fixiert, darauf mit Ammonoxalat und Wasserstoffperoxyd (6 %) zu gleichen Teilen gebleicht und nach zwölf Minuten Hydrolyse in n HCl bei 60 °C während zweier Stunden mit Feulgen gefärbt. Nach der Trockeneis-Euparal-Methode wurden Dauerpräparate hergestellt.

Die fotografischen Aufnahmen habe ich mit einem Zeiss-Fotomikroskop gemacht.

Die Behandlung in N_2 -Atmosphäre erfolgte mit der in Abbildung 1 dargestellten Apparatur.

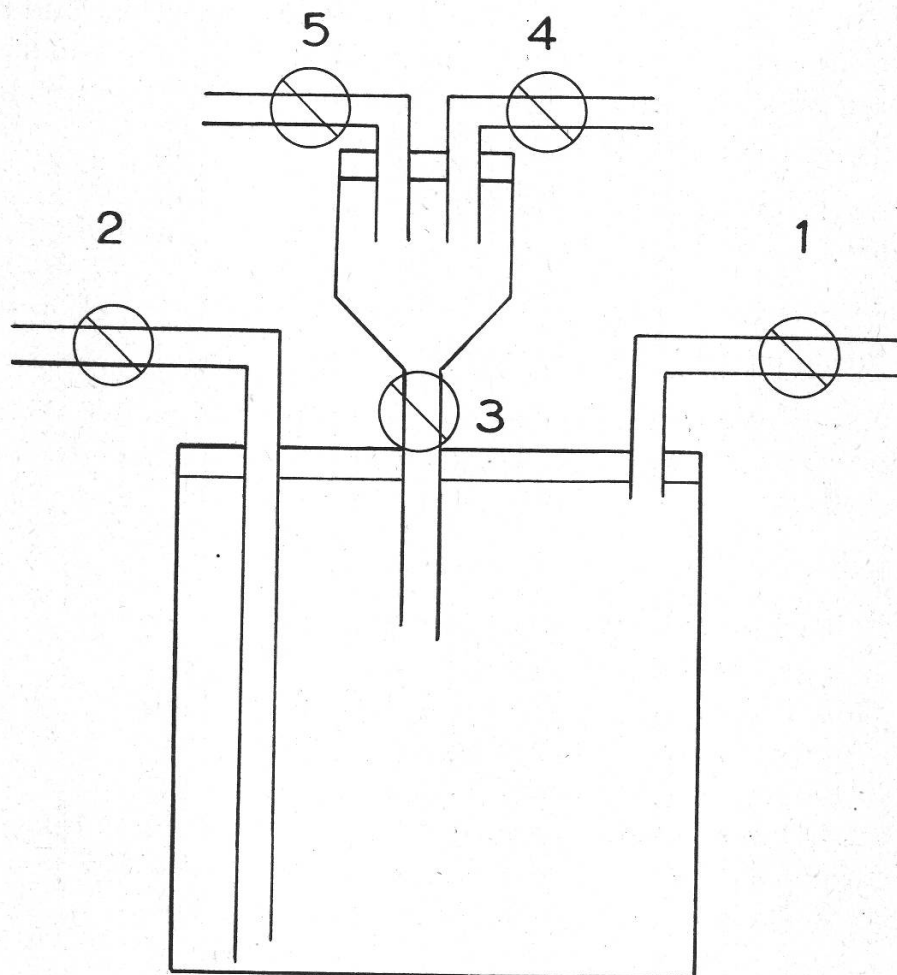


Abbildung 1

Apparatur für die AAF-Behandlung der Wurzeln in Stickstoffatmosphäre

Der Apparat besteht aus einem Glaszylinder und einem Trichter. Der Zylinder wird mit einem Gummistopfen verschlossen, durch den die Zu- und Ableitungsrohre (1 und 2) und der Trichter (3) führen. Der Trichter ist ebenfalls mit einem Gummistopfen verschlossen, die beiden Zuleitungsrohre 4 und 5 dienen dem Einleiten von Stickstoff. Alle Glasrohre und Trichter sind mit Glashähnen versehen, so dass der Zu- bzw. Abfluss von Gas und Flüssigkeit reguliert werden kann. Die Keimlinge werden zu Beginn des Versuches in den Zylinder gebracht, der ganz mit Wasser gefüllt wird, wobei die Hähne 3 und 2 geschlossen bleiben. Anschliessend wird ein N_2 -Strom von rechts (1) in das Gefäss geleitet, womit das Wasser durch das linke Abflussrohr (2) hinausgepresst wird. Sobald das Wasser durch Stickstoff ersetzt ist, wird das Ableitungsrohr 2 geschlossen und bei geöffnetem Hahn 1 durch den Trichter (3) unter Stickstoffdruck (4 und 5) die Behandlungslösung in den Zylinder gepresst. Darauf lasse ich durch das bis auf den Boden des Zylinders reichende Rohr 2 einen regen N_2 -Strom durch die Behandlungslösung strömen, der Trichter wird durch den Hahn 3 geschlossen, und der Stickstoff entweicht durch das Rohr 1.

Sofern bei den einzelnen Versuchen nichts weiter vermerkt ist, beziehen sich die Erholungszeiten auf den Beginn der Behandlung bis zur Fixierung in Stunden.

Konzentration und Coffeingehalt: Wegen der begrenzten Löslichkeit wurden nur die Konzentrationen 10 mg und 18 mg Acetylaminofluoren (AAF) auf 100 ml geprüft. AAF wurde in 1 ml alc. abs. gelöst und mit einer 0,06 M Coffeinelösung in wässrige Lösung gebracht. Testversuche mit der Coffeinelösung ergaben keine Chromosomenaberrationen, es wurden lediglich vereinzelte verklebte Metaphaseplatten festgestellt.

Temperatur: Die Versuche wurden im Klimaraum bei 10 °C und 20 °C durchgeführt.

Azidität: Zur Erreichung der verschiedenen pH-Werte verwendete ich für pH 4 Phthalatpuffer, für pH 5 und 6 Trispuffer.

Stickstoffatmosphäre: Die Behandlungen unter partieller Anaerobiose erfolgten im obenbeschriebenen Apparat. Es wurde technisch reiner Stickstoff verwendet.

Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen

DNP	2,4-Dinitrophenol : 10^{-4} M Lösung
H ₂ O ₂	Analysenreines Perhydrol · 10^{-4} M Lösung
ATP	Adenosintriphosphat · 10^{-3} M Lösung (Fluka)
KCN	Analysenrein. 10^{-3} M Lösung
MnCl ₂	Analysenrein. 1prozentige Lösung
BAL	2,3-Dimercaptopropanol · 2×10^{-3} M Lösung (Fluka)
NaN ₃	Analysenrein. 10^{-3} M Lösung
AAF	2-Acetylaminofluoren (Hoffmann-La Roche)

1. Morphologie der Chromosomen von *Vicia faba* «Windsor»

Für diese Untersuchungen habe ich die Wurzeln zum Teil mit 0,002 M Oxychinolinlösung, zum Teil mit Kälte vorbehandelt. Oxychinolin erwies sich dabei als vorteilhafter, weil es die Chromosomenoberfläche nicht verändert und weil das Zentromer gegenüber dem Chromosomenkörper deutlich abgegrenzt erscheint.

Das Chromosomenkomplement von *Vicia faba* lässt sich in drei eindeutig voneinander verschiedene Gruppen einteilen:

- 1 Paar L_n Lange Chromosomen mit metazentrischer SFA und sekundären Einschnürungen
- 4 Paare M₁ Akrozentrische Chromosomen. Der kurze Arm ist länger als bei M₂

1 Paar M_2 Akrozentrische Chromosomen mit sehr kleinem kurzem Arm

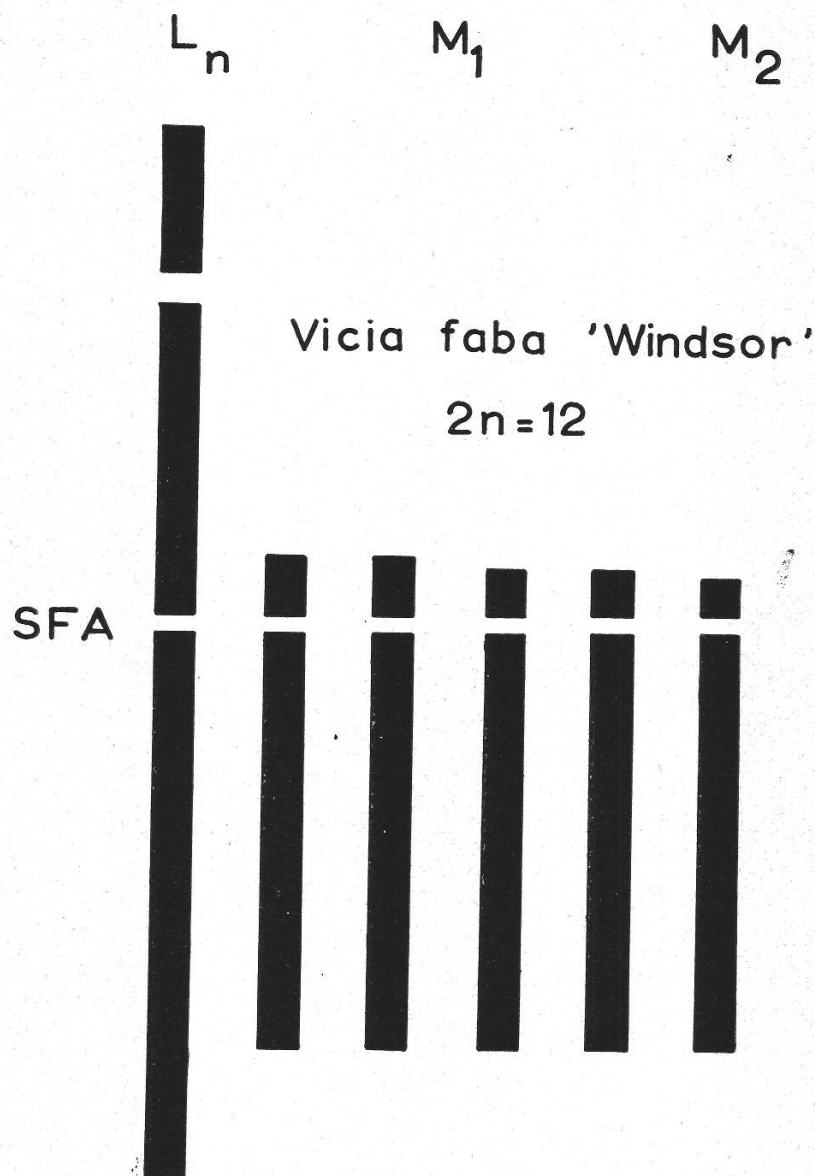


Abbildung 2

Schematische Darstellung des Chromosomensatzes von *Vicia faba* «Windsor»

In der obigen Darstellung ist die Länge des Zentromers und der sekundären Einschnürung nicht naturgetreu wiedergegeben. Die SAT des L_n können sich je nach Präparation und Behandlung weiter vom kurzen Arm entfernen, ohne dass der Kontakt mit dem Chromosom verlorengeht (Sharma und Sharma, 1958)

Die M_1 und M_2 lassen sich durch Ausmessen und Bestimmen des Armindex deutlich voneinander unterscheiden. Aus zahlreichen Messungen habe ich folgende Verhältnisse ermitteln können:

Kurzer Arm: langer Arm $> 0,1$ für M_1

Kurzer Arm: langer Arm $< 0,1$ für M_2

Die Gruppe M_1 kann, allerdings nicht durchwegs, in zwei weitere Gruppen unterteilt werden:

1. Der kurze Arm enthält eine sekundäre Einschnürung. Es ist nicht klar, ob es sich dabei um eine heterochromatische Zone handelt.
2. Der kurze Arm ist nicht zweigeteilt.

Die sekundäre Einschnürung bei der ersten Gruppe wurde vor allem nach längerer Oxychinolinbehandlung festgestellt.

Für die folgenden Beschreibungen verwende ich nur die Bezeichnungen: L_n , M_1 , M_2 .

Tabelle 1

Relative Länge der einzelnen Chromosomen, bezogen auf den haploiden Satz ($n = 6$)

Eigene Werte				Vergleichswerte nach Rieger (1959)		
L_n	9,2	16,2	4,3	8,2	13,2	4,4
M_1	1,8	12,4		1,9	13,2	
	1,8	12,4		1,9	13,2	
	1,4	12,5		1,3	13,2	
	1,4	12,5		1,3	13,2	
M_2	1,1	12,5		0,9	13,2	

Das Längenverhältnis der L_n : M ist nach Rieger (1959) und Deufel (1952) annähernd 2:5, nach eigenen Messungen 2:4,7.

Die heterochromatischen Segmente und ihre Lokalisation

Das Auftreten von Chromozentren im Interphasekern von *Vicia faba* beweist die Anwesenheit von Heterochromatin. Man stösst aber beim Auszählen dieser Stellen auf Schwierigkeiten, da ihre Zahl mit den heterochromatischen Segmenten nicht übereinstimmt.

Um die heterochromatischen Stellen sichtbar zu machen, wurden die Wurzeln sechs Tage bei 3 °C im Thermostaten gehalten und nach einer Erholungszeit von einer Stunde fixiert und präpariert. Es ist allerdings sehr schwierig, die heterochromatischen Stellen zu identifizieren. Nach McLeish (1952) lassen sich acht Segmente erkennen, die vor allem um die SFA lokalisiert sind. Es gelang mir in meinen Untersuchungen ebenfalls, eine Anzahl «achromatischer» Stellen zu lokalisieren. Diese lassen sich der

Lage nach mit den Resultaten von McLeish vergleichen. Es ist jedoch auffallend, dass diese H-Zonen auch nach zwei- bis vierstündiger Oxychinolinbehandlung als lokale Achromasien hervortreten.

Ausser einem breiteren Segment im proximalen kurzen Abschnitt des L_n sind alle Zonen sehr schmal (Abb. 3). Die M_2 weisen in der Mitte des langen Armes zwei schmale H-Zonen auf, während die zentromernahen Stellen frei von Heterochromatin sind. In den kurzen Armen, sowohl bei den M_1 wie bei den M_2 , und im SAT des L_n konnte ich in keinem Falle Heterochromatin nachweisen.

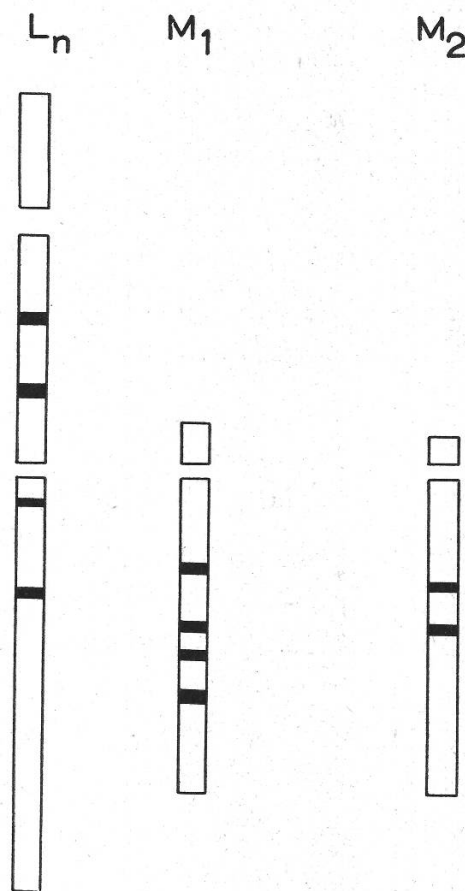


Abbildung 3







Lokalisierung der heterochromatischen Zonen bei *Vicia faba* «Windsor»
Das Heterochromatin ist als schwarzes Band eingezeichnet

In der Abbildung 3 sind die H-Zonen den drei Chromosomentypen zugeordnet. Die M_1 sind dabei in eine Gruppe zusammengezogen worden. Aus dieser Darstellung lässt sich nicht ersehen, zu welchem der vier M_1 die einzelnen H-Segmente gehören. Es ist also zu berücksichtigen, dass die eingezeichneten H-Zonen zwei M_1 -Typen angehören.

2. Terminologie

Die folgende Tabelle gibt die Symbole der am häufigsten vorkommenden Aberrationstypen wieder. Ich schliesse mich damit an die Klassifizierung von Darlington und La Cour (1945) an.

Tabelle 2
Klassifizierung der Aberrationstypen

Struktur in der Metaphase	Bruch (Beschreibung)	Symbol
	Chromatidbruch	B'
	Chromosomenbruch	B''
	Dizentrisches Chromatid	$2 B' + R'$
	Dizentrisches Chromosom	$2 B'' + R''$ oder $4 B' + 2 R'$
	Azentrisches Fragment (minute)	m
	Subchromatidbruch	—

* Subchromatidbrüche können nur in der Anaphase nachgewiesen werden (Pseudochiasmata)

In allen Experimenten wurden ausschliesslich Metaphasen analysiert, ausgenommen bei der Beurteilung der Pseudochiasmata, die nur als Brücken in der Anaphase erfasst werden können. In den Zusammenstellungen der Versuchsergebnisse sind grosse acentrische Chromosomenfragmente mit C_0 bezeichnet, mono- bzw. dizentrische Chromosomenfragmente mit C_1 bzw. C_2 . Vielfach ist es der Willkür des Beobachters überlassen, was als Bruch zu bewerten ist. In dieser Arbeit bezeichne ich nur solche Strukturveränderungen als echte Brüche, die den Chromosomenkörper in der Längsrichtung in seiner Kontinuität unterbrechen: keilförmig für B' und durchgehend für B''. Achromasien (gaps) wurden nie als echte Brüche mitberücksichtigt. Die Interpretation der «gaps» als potentielle Brüche oder als restituierte Brüche (Revell, 1958) entbehren vorderhand experimenteller Bestätigung.

Die Chromosomenbrüche werden als B'' angeführt, wenn das zugehörige azentrische Fragment vorhanden ist, als C_1 , wenn das azentrische Fragment fehlt. Konnte in der Analyse keine Zuordnung der C_0 zu den entsprechenden C_1 gemacht werden, wurden die beiden Fragmente in den Zusammenstellungen getrennt aufgeführt. Für die Beurteilung der Chromosomenbrüche war aber immer das C_1 massgebend, alleinstehende azentrische Fragmente wurden nie als Chromosomenbrüche taxiert. Damit soll eine doppelte Berechnung der B'' vermieden werden.

Reunionen zwischen Schwesterchromatiden werden als SR (sister reunion) bezeichnet, ungeachtet, ob die Reunion proximal oder distal erfolgte. Ein Chromatidaustausch zwischen zwei Chromosomen wird mit R' und eine Reunion zwischen zwei Chromosomen mit R'' bezeichnet. Triradiale resultieren aus einem B'' und einem B' eines zweiten Chromosoms, wobei die Bruchenden von Nicht-Schwester-Chromatiden Reunionen eingehen ($2 R'$). Dabei entsteht ferner ein azentrisches Chromosomenfragment (C_0).

In der Folge werden alle Bezeichnungen nur beschreibend angewendet, ohne dass damit eine Aussage über die Bruchentstehung gemacht wird.

In verschiedenen Arbeiten werden andere Bruchbezeichnungen verwendet. So beschreibt Thoday (1952) *Isolocusbrüche* und benennt sie je nach der Zeit des Auftretens verschieden:

- a) NU_{pd} = non union proximal distal. Diese Gruppe bildet keine sister union (SU), und
- b) NU_p oder NU_d , deren Enden SU proximal (p) oder distal (d) enthalten.

Nach Bestrahlung erscheinen die Isolocusbrüche mit SU zur gleichen Zeit wie die B' , im Gegensatz zu den NU_{pd} , die erst nach längeren Erholungszeiten auftreten. Daraus wurde geschlossen, dass NU_{pd} durch Röntgenstrahlen in ungeteilten Chromosomen induziert werden und dass deshalb die Enden keine SU eingehen (pre-split Aberrationen). Isolocusbrüche mit SU erfolgten demnach in geteilten Chromosomen (post-split), wobei die Brüche an mehr oder weniger homologen Loci erfolgten. Da zur Erzeugung einer signifikanten Menge SU-Isolocusbrüche zwei Quanten Röntgenstrahlen nötig waren, zur Bildung von NU_{pd} aber nur ein Quantum, wurde angenommen, dass SU aus *Isochromatidbrüchen* entstehen. Die beiden Chromatiden würden also unabhängig voneinander gebrochen. NU_{pd} -Isolocusbrüche können aber nicht von den B'' unterschieden werden, deshalb sollten die beiden Bezeichnungen nicht in beschreibendem Sinne nebeneinander verwendet werden (Thoday, 1952).

Revell (1959) gibt in seiner Exchange-Hypothese eine neue Interpretation der Chromatidaberrationen. Er stellte fest, dass ein grosser Teil der abnormalen Metaphasen normale Anaphasen bildet. Die in der Ana-

phase gefundenen Fragmente waren weniger zahlreich als die konventionellen B' in der Metaphase. Daraus resultierten auch weniger Mikronuklei. Es müssen also Zellen mit B' zwischen Metaphase und Anaphase degenerieren oder verschwinden. Gleichzeitig fand Revell, dass die «gaps» auch in der Anaphase erschienen und dass sie proportional zu den konventionellen Brüchen in der Metaphase auftraten. Somit würden also die B' nicht vollständig getrennt, das heisst, die distalen Fragmente verkleben mit den zentrischen und können damit in der Anaphase zu den Polen gelangen. Revell nimmt an, dass die Chromosomen im Zeitpunkt der Bruchinduktion in Schleifen liegen, so dass verschiedene Teile miteinander in Berührung kommen. Damit erfolgt ein cross-over-ähnlicher Vorgang an den Kontaktpunkten. Nach Revell ist der unvollständige Austausch die einzige Quelle der Chromatidbrüche. Die Brüche, die aus einem Intrachange resultieren, sind qualitativ von den konventionellen Brüchen verschieden, weil die Brüche immer an einem Ende der Schleife entstehen, so dass an den Enden kleine Deletionen, Inversionen oder Additionen erfolgen.

Der Durchgang ionisierender Strahlen bewirkt nach Revell keinen Bruch, sondern eine unspezifische lokale Schädigung. Der Chromatidaustausch kann innerhalb eines Chromosoms oder zwischen verschiedenen Chromosomen erfolgen, entsprechend werden sie als Intra- bzw. Interchanges bezeichnet.

Evans (1961) beschreibt verschiedene Interchangetypen, die nach der gegenseitigen Lage der Zentromere und nach der Form benannt werden. Die Reunionen können zwischen polarisierten (P) oder nichtpolarisierten (N) Chromosomen stattfinden und dem U-Typ oder dem X-Typ angehören. Der U-Typ entspricht Revells asymmetrischem Interchange, der X-Typ dem symmetrischen. Beide Typen können vollständig (C) oder unvollständig (I) sein. Liegt proximal ein unvollständiger Austausch vor, wird er mit I_p bezeichnet, bei unvollständigem Austausch distal mit I_d . Somit bedeutet PUI_d : Chromatidaustausch zwischen polarisierten Chromosomen, wobei der Austausch vom U-Typ distal unvollständig ist.

III. Versuchsanlagen und Ergebnisse

1. Mitose- und Phasenindex AAF-behandelter Wurzeln

Hauptwurzeln von 8 cm Länge wurden während 3 h mit AAF behandelt (Konzentration 10 mg/100 ml, ohne Puffer) und nach 3, 4 bzw. 5, 6 und 7 h in La Cour fixiert. Von jeder Wurzelspitze habe ich nach Entfernen der Wurzelhaube die folgenden 1 1/2 mm zu einem Quetschpräparat verarbeitet.

Der Mitoseindex unbehandelter Wurzeln beträgt mehr oder weniger konstant $8,9 \pm 0,6$. Dieses Ergebnis stimmt mit Resultaten von Deufel

Tabelle 3

Mitose- und Phasenindices nach dreistündiger AAF-Behandlung (Prozentwerte)

EZ/h	P	M	A/T	M _J
3	74,0 ± 5,4	19,7 ± 4,5	6,2 ± 0,7	7,8 ± 0,1
4	66,8 ± 4,0	18,6 ± 3,5	14,1 ± 0,6	6,6 ± 0,5
5	62,0 ± 4,7	17,6 ± 1,9	20,4 ± 6,5	4,3 ± 1,2
6	48,5 ± 3,4	31,3 ± 4,7	19,8 ± 1,2	3,0 ± 0,4
7	49,7 ± 1,3	23,9 ± 0,7	26,1 ± 2,1	3,1 ± 0,1

(1951), Gray und Scholes (1951) und Brauer (1949) sehr gut überein. Diese Autoren haben am gleichen Material einen Mitoseindex von 8,7 bzw. 10,5 bzw 8,4 erhalten. Die einzelnen Messungen des Mitoseindex zeigen relativ grosse Schwankungen zwischen verschiedenen Wurzeln. Dies ist auf Inhomogenität des Versuchsmaterials zurückzuführen und lässt sich auch bei sorgfältigster Auslese der Samen nicht vermeiden.

Es scheint mir daher angebracht, den Phasenindex als Grundlage zu Vergleichen zu verwenden. Die Phasenindices unbehandelter Wurzeln ergaben die folgenden Prozentwerte:

Prophasen	55,1 ± 3,2	(54,1 ± 6,1)
Metaphasen	26,7 ± 2,6	(24,7 ± 3,8)
Ana-/Telophasen	18,2 ± 0,9	(21,6 ± 2,4)

Die in Klammern angegebenen Werte stammen von Wolff (unveröffentlicht, entnommen aus Read, 1959). Um einer Ungenauigkeit in der Beurteilung der Anaphaseplatten auszuweichen, wurden die Ana- und Telophasen als eine Phase zusammengefasst.

AAF scheint vorerst vor allem einen Einfluss auf die Mitoseaktivität der behandelten Wurzeln auszuüben. Unmittelbar nach der Behandlung liegt der Index mit 7,8 noch innerhalb der 2- σ -Grenze der Kontrolle. Dann erfolgt ein starkes Absinken bis 6 h nach der Behandlung, um dann wieder leicht anzusteigen (Tab. 3).

Nach 3 h ist eine relativ starke Anhäufung an Prophasen festzustellen. Bis 6 h nach der Behandlung nimmt die Zahl der Prophasen ab und steigt gegen 7 h wieder leicht an. Die Werte bewegen sich zum Teil noch innerhalb der 3- σ -Grenze der Kontrolle unbehandelter Wurzeln. Die Metaphasen sinken bis 5 h ab und liegen unter den Kontrollwerten, nach 5 h erfolgt wieder ein Anstieg. Entgegengesetzt verlaufen die A/T-Werte. Hier erfolgt von 3 bis 7 h ein kontinuierlicher Anstieg. Nach 6 h nähern

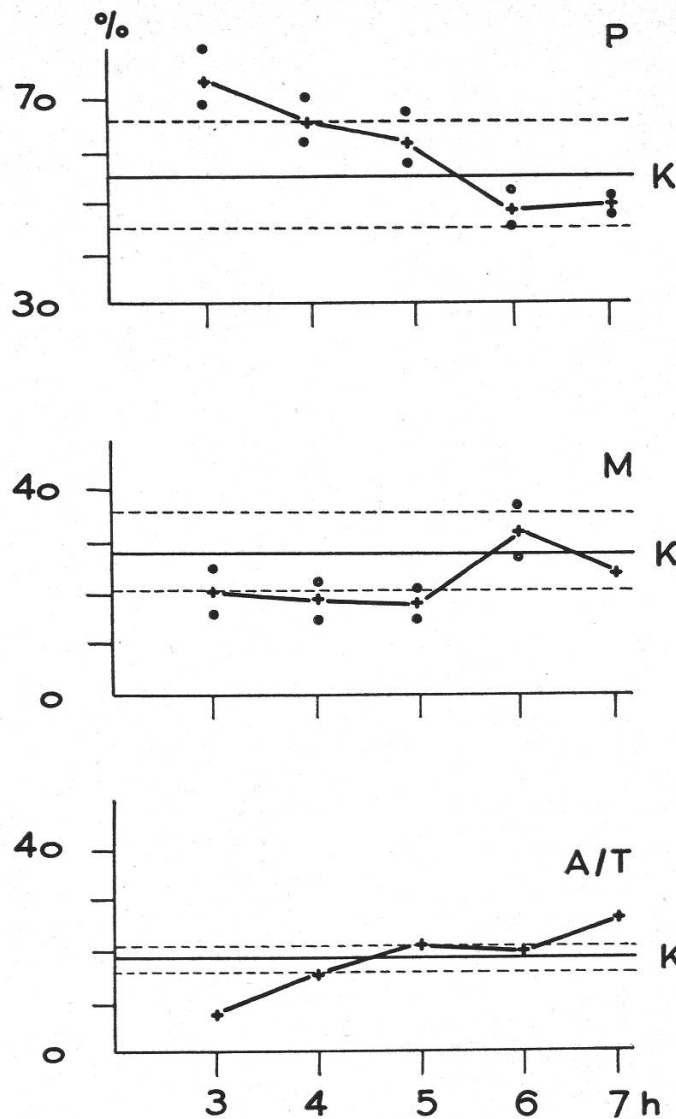


Abbildung 4

Phasenindices AAF-behandelter und Kontrollwerte unbehandelter Hauptwurzeln

Die horizontale Gerade gibt die Kontrollwerte unbehandelter Wurzeln an. Die gestrichelte Linie gibt die 3σ -Grenze der Kontrollwerte wieder. Den einzelnen Werten behandelter Wurzeln sind die Standardabweichungen durch Kreise beigelegt

P = Prophasen M = Metaphasen A/T = Telophasen K = Kontrolle

sich die einzelnen Werte wieder den Werten unbehandelter Wurzeln, was auf eine zunehmende Normalisierung der Mitoseaktivität hinweist.

Das Absinken des Mitoseindex nach der Behandlung bedeutet, dass der absolute Prophasenanteil gegenüber der Kontrolle verändert wurde (Abb. 5). Die absolute Zahl der Prophasen ist kleiner, aber die relative steigt. Folglich wird die Prophase nach der Einwirkung von AAF blockiert. Dafür sprechen das Absinken der Metaphasenanteile bis 5 h nach der

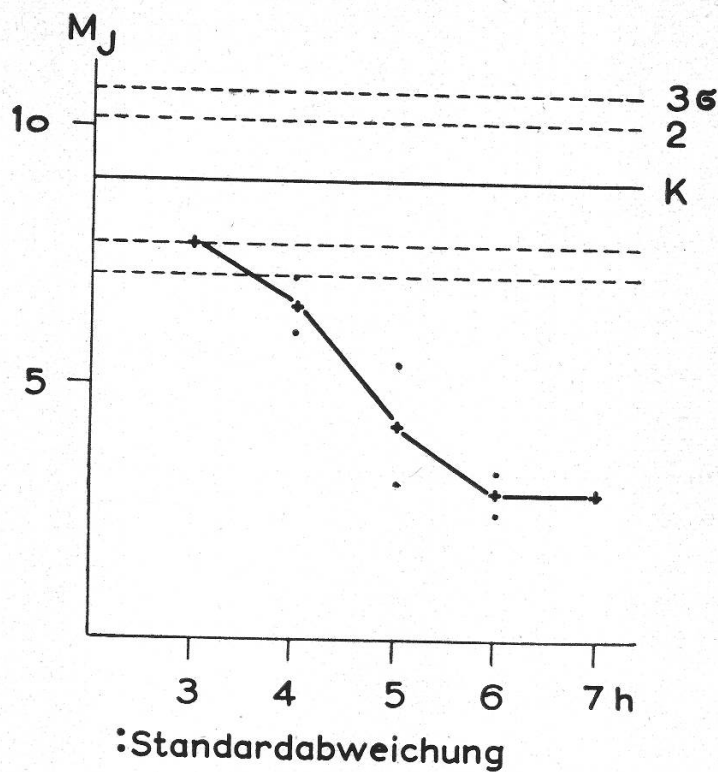


Abbildung 5

Mitoseindices AAF-behandelter und unbehandelter Hauptwurzeln

Die Werte unbehandelter Wurzeln sind mit einer horizontalen Geraden dargestellt, der die 2- bzw. 3- σ -Grenze beigelegt wurde

K = Kontrolle

Behandlung und gleichzeitig der tiefe A/T-Wert im gleichen Zeitabschnitt. Das Ansteigen der Metaphasen nach 5 h zeigt die Aufhebung der Blockierung an.

Vergleiche mit der Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Mitose zeigen zum Teil ähnliche Erscheinungen. So ist nach Deufel (1951) der Pro-

Tabelle 4

Stadienverteilung nach Bestrahlung mit 150 r (nach Deufel, 1951)

EZ/h	P	M	A/T	Mittelwerte der Kontrolle		
				P	M	A/T
1	61,4	16,9	22,1	64,0	18,3	17,7
2	62,6	14,9	22,5			
4	41,7	34,0	24,3			
6	42,3	27,1	31,2			

phasewert während der ersten 12 h durchwegs kleiner als in unbehandelten Wurzeln (Tab. 4). Die Prophasenanteile sinken bis 4 h ab und steigen nach 6 h wieder leicht an. Bei AAF erfolgt der Anstieg erst nach 7 h. Entsprechend verlaufen die A/T-Indices. Auch hier ist aber bei AAF eine kleine zeitliche Verschiebung festzustellen. Diese Abweichung dürfte aber auf die Art der EZ zurückzuführen sein. Meine Zeiten beziehen sich auf den Beginn der Behandlung bis zur Fixierung. Die Behandlungszeit fällt bei Bestrahlung kaum ins Gewicht, während sie bei AAF 3 h beträgt. Diese Unterschiede im Wirkungsmodus sind bei der Interpretation solcher Vergleichswerte zu berücksichtigen.

Der Vergleich der Mitoseindices AAF-behandelter Wurzelspitzen mit röntgenbestrahlten zeigt ebenfalls Unterschiede. Der Mitoseindex röntgenbestrahlter Wurzeln steigt bis 6 h nach der Behandlung an und fällt anschliessend bis 12 h sehr stark ab (Deufel, 1951; Hohl, 1947). Für AAF habe ich kurze Zeit nach der Behandlung keinen Anstieg des M_T feststellen können, der Index fällt von 3 bis 6 h kontinuierlich ab.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass AAF die Zellen im Verlaufe der Prophase blockiert. Zellen, die diesen Block bereits durchschritten haben, teilen sich mehr oder weniger normal weiter. In der allgemeinen Wirkung auf die Mitose ist aber die Wirkung von AAF mit der von Röntgenstrahlen vergleichbar. In bezug auf die Primärwirkung kann also AAF mit Recht als radiomimetisches Agens bezeichnet werden.

2. Die Zeit des Auftretens der Brüche

Die folgenden Resultate sind nach dreistündiger Behandlung der Seitenwurzeln mit 18 mg AAF/100 ml erhalten worden. Die Behandlungsflüssigkeit wurde belüftet, der pH betrug etwa 5 (kein Puffer), die Temperatur 18 °C.

Betrachten wir das Auftreten der Brüche (B') bis 41 h nach der Behandlung, so heben sich deutlich zwei Maxima ab (Abb. 6, Tab. 5). Das erste tritt zwischen 11 und 15 h auf, das zweite zwischen 33 und 39 h. Analog dazu verläuft die Kurve der Zellen mit Aberrationen (Tab. 5). Eine Interpretation dieser Resultate ist nur möglich, wenn die Dauer eines Mitosezyklus bekannt ist. Nach Neary, Evans und Tonkinson (1959) dauert ein Mitosezyklus bei *Vicia faba* 23 bis 24 h. Der Mitoseablauf nimmt eine Zeit von ungefähr 2,5 h in Anspruch. Metaphasezellen, die nach 11 und 15 h ein Maximum an B' zeigen, befanden sich also zur Zeit der Behandlung in mittlerer Interphase. Mit zunehmender EZ sinkt die Zahl der Zellen mit B' und erreicht zwischen 19 und 23 h das Minimum. Diese Zellen waren während des Teilungsablaufs der AAF-Wirkung ausgesetzt.

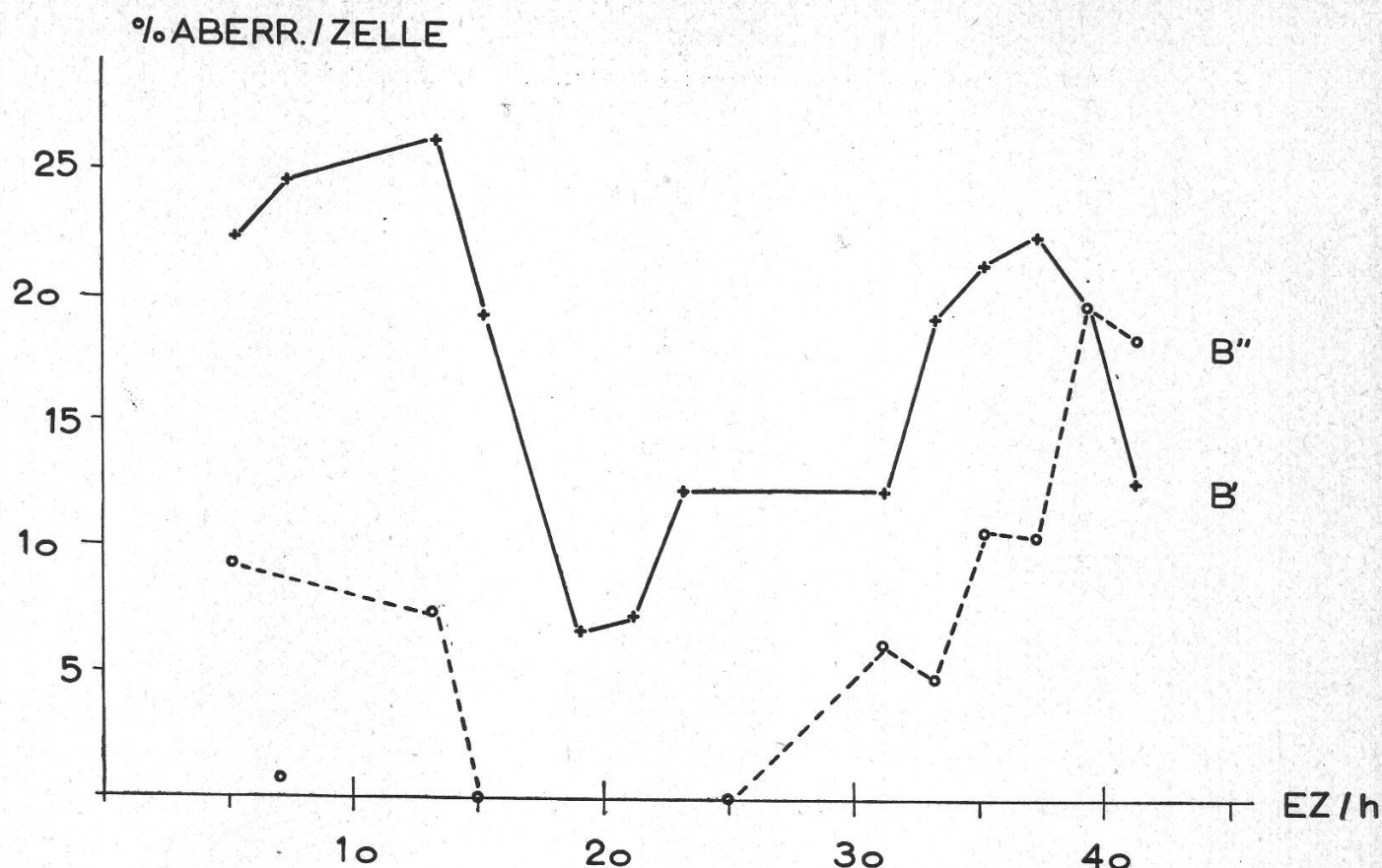


Abbildung 6

Aberrationen nach dreistündiger AAF-Behandlung

○ ---- ○ B'' + ——— + B'

Daraus ist zu schliessen, dass die Zellen in verschiedenen Stadien des Mitosezyklus verschieden empfindlich gegenüber AAF sind: Mitosezellen werden von AAF weniger geschädigt, während Interphasezellen vermehrt angegriffen werden.

Aus der Abbildung 6 sehen wir ferner, dass nach der Mitose die Sensibilität der Zellen sehr rasch ansteigt. Je näher die Zelle der Interphase kommt, um so grösser ist die Bruchwirkung von AAF.

Der erste Mitosezyklus ist nach etwa 24 h abgeschlossen. Ich bezeichne die erste Mitose nach der Behandlung mit X_1 , die zweite mit X_2 und den Behandlungszyklus mit X_0 . Die beiden Mitosezyklen X_1 und X_2 können gut voneinander unterschieden werden. Die meisten azentrischen Fragmente aus der X_1 erscheinen nämlich in der X_2 als Mikronuklei (La Cour, 1952). Das Auftreten dieser Mikrokerne zeigt also den nächsten Mitosezyklus an. Ich habe die ersten Mikronuklei nach 22 h beobachtet, folglich ist anzunehmen, dass sich die nach 22 h analysierten Zellen in der X_2 befinden.

Tabelle 5

Aberrationen nach dreistündiger Behandlung mit 18 mg AAF

EZ/h	B' %	B'' %	C ₀ %	C ₁ %	m %	Reunionen %	Zellen mit Aber- rationen %	n
5	22,3	9,2	—	—	3,7	—	24,1	54
7	24,6	0,7*	—	—	—	—	21,6	60
13	26,2	7,4	—	—	—	—	18,5	27
15	19,3	—	—	—	—	—	12,9	31
19	6,7	—	—	—	—	—	6,6	30
21	7,2	—	—	—	—	—	7,2	42
23	12,3	—	—	—	—	—	12,3	49
25	9,4	—	3,1	—	—	—	12,5	32
31	12,2	6,1	—	—	—	—	15,4	23
33	19,1	4,8	—	—	4,8	—	23,8	21
35	21,3	10,6	—	—	3,5	—	21,3	28
37	22,4	10,4	3,4	—	3,4	3,4 R''/ 1,0 C ₂	27,6	58
39	19,6	19,6	10,7	1,7	7,1	1,7 SR	23,2	56
41	12,6	18,3	9,6	—	4,8	—	20,2	104

n bedeutet die Zahl der analysierten Metaphasen. * deutet auf einen Versuchsfehler hin. Die Aberrationen sind in Prozenten pro analysierte Metaphase angegeben. Die Erholungszeit (EZ) bezieht sich auf die Zeit von der Behandlung bis zur Fixierung in Stunden

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass nach AAF-Behandlung nur sehr wenige Reunionen gebildet werden. Die meisten auftretenden Reunionen erfolgten zwischen Schwesterchromatiden (SR), vereinzelt konnten aber auch Chromosomen- bzw. Chromatidtranslokationen beobachtet werden. Nach Revells Klassifizierung handelt es sich meistens um unvollständige Interchanges, also um einen Chromatidaustausch zwischen zwei Chromo-

Abbildung 7

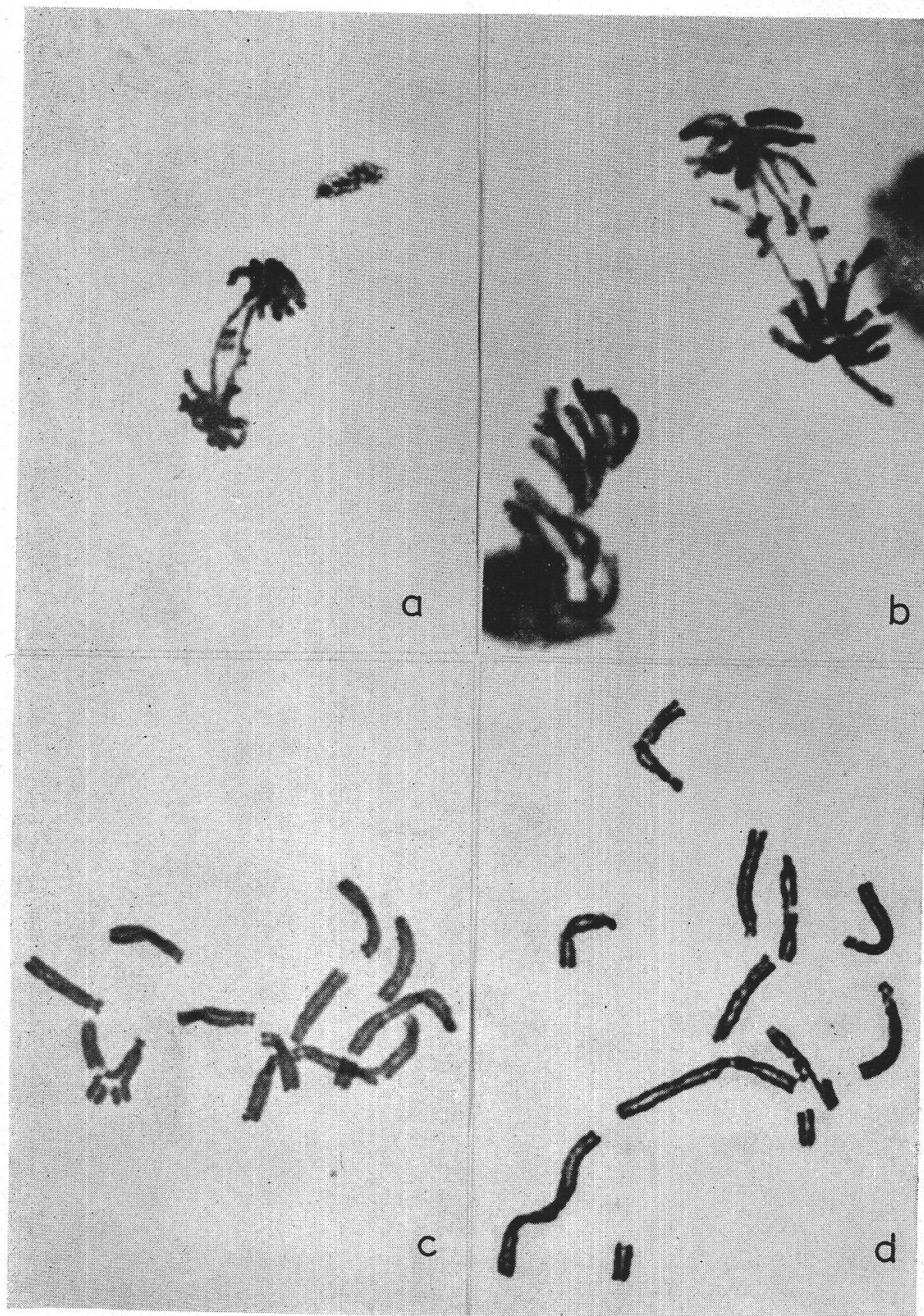
Aberrationen nach dreistündiger AAF-Behandlung

a, b zeigen Pseudochiasmata nach einer EZ von 10 h

c: Links aussen ist ein B' und ein B'' in zwei M-Chromosomen. Die gebrochenen Enden sind zum Teil verklebt. Im L_n rechts aussen ist vermutlich ein Zentromerbruch. Rechts unten ist ein «minute» zu erkennen

d: Ein M-Chromosom fehlt. Es sind zwei B' in M-Chromosomen zu erkennen. Der SAT des L_n links unten ist vom Chromosom entfernt, es handelt sich wahrscheinlich um einen Präparationsdefekt

somen. Die SR sind unvollständige Intrachanges, wobei nach AAF-Behandlung nur selten alle vier gebrochenen Enden SR eingehen. Es ist in



den wenigsten Fällen möglich, anhand der Reunionen eine genaue Aussage über den Bruchort zu machen, selbst wenn noch zugehörige Fragmente anwesend sind.

Es ist nun nicht ohne weiteres zu erwarten, dass die Zahl der B' in der X_2 bis gegen 39 h erneut ansteigt, um später wieder abzusinken. Das zweite Maximum an B' und das erste liegen etwa 23 h auseinander. Diese Zeit entspricht aber einem ganzen Mitosezyklus. Die Zellen, die sich nach 39 h in Metaphase befinden, wurden in der X_0 , also in der mittleren Interphase, behandelt. Gleichzeitig mit den B' steigt von 31 bis 41 h die Zahl der freien B'' sehr stark an und übergipfelt nach 41 h die B' . Die hier auftretenden B'' können als Folge von Chromatidbrüchen in der X_1 betrachtet werden.

Weil das zweite Maximum der B' vom ersten um einen Mitosezyklus verschoben ist, erscheint es möglich, dass die B' in der X_2 aus einer schon in der X_1 bestehenden Aberration resultieren. Nun habe ich in der X_1 Pseudochiasmata beobachtet, woraus ich schloss, dass die B' der X_2 aus einer in der X_0 induzierten Subchromatidaberration entstanden sein könnten. Die Pseudochiasmata wurden vermehrt nach 10 und vereinzelt nach 15 h festgestellt (Abb. 7 a, b). Wenn diese Subchromatidaberrationen also Ursache der B' in der X_2 sind, dann sollten die B' nach 34 und 39 h ein Maximum aufweisen, sofern der Mitosezyklus mit 24 h angenommen wird. Wie oben schon gezeigt wurde, tritt dieses Maximum tatsächlich zwischen 33 und 39 h auf.

Somit bestehen die folgenden Möglichkeiten der Bruchinduktion in der Interphase der X_0 :

a) Post-split Subchromatidaberrationen

Werden nach der Verdoppelung des Chromatinmaterials in der mittleren Interphase Subchromatiden gebrochen, so entstehen, wenn wir zwei Chromatiduntereinheiten annehmen, folgende Aberrationsbilder:

1. Nach dem Brechen *einer* Subchromatide ist in der X_1 kein Schaden feststellbar. Diese Aberrationen entziehen sich also während der ersten Mitose nach der Behandlung einer cytologischen Analyse. Nach der Verdoppelung in der Interphase der X_1 entsteht aus diesem Subchromatidbruch ein B' , der in der X_2 sichtbar wird.

2. Ein post-split Bruch von *zwei* Nicht-Schwester-Subchromatiden mit anschliessender Reunion der proximalen Enden führt zu einem Pseudochiasma in der X_1 . Wenn diese Brücke in der Anaphase oder Telophase der

ersten Teilung bricht, so resultieren daraus Chromatidbrüche, die nach der Duplikation während der Interphase der X_1 in der X_2 sichtbar werden.

Diese beiden Möglichkeiten der Bruchinduktion in der X_0 könnten das gehäufte Auftreten von Chromatidbrüchen in der X_2 bewirken, so wie sie das zweite Maximum der B' in Abbildung 6 wiedergibt. Da nun in der X_1 Pseudochiasmata festgestellt wurden, rechtfertigt sich wenigstens die Annahme von Subchromatidbrüchen, wie sie unter 2. eben beschrieben wurde. Wir können anhand des zweiten Maximums an B' das Auftreten der Pseudochiasmata abschätzen. Wie schon erwähnt wurde, müssten sie zwischen 9 und 15 h auftreten, wenn der Mitosezyklus mit 24 h angenommen wird. Sollten die B' in der X_2 wirklich aus post-split Subchromatidaberrationen resultieren, so müssten die Pseudochiasmata *vor* dem ersten Maximum der B' in der X_1 erkennbar sein. Tatsächlich wurden sie kurz vor dem ersten B' -Maximum festgestellt, was für die Richtigkeit der Hypothese spricht.

Nach 10 h EZ wurden 11,9% Pseudochiasmata pro analysierte Zellen gefunden. Folglich sollten daraus, sofern alle Brücken brechen, 24 h später mindestens 22% B' resultieren. Nach 35 h EZ stellte ich nur 15,3% B' fest. Da aber die B' in der X_2 auch aus dem Bruch *einer* Subchromatide entstehen können, ist die tiefere Zahl der B' verständlich. (Diese Resultate stammen aus einem Parallelexperiment zum oben beschriebenen.)

Ich möchte dieser quantitativen Betrachtung kein allzu grosses Gewicht beimessen. Die Grössenordnungen lassen sich wohl vergleichen, doch berechtigt die Anlage der Versuche, bei denen vor allem Metaphasen analysiert wurden, nicht zu voreiligen quantitativen Auswertungen.

In Abbildung 8 sind die oben beschriebenen Subchromatidaberrationen nach ihrem Entstehen in ein Schema zusammengefasst.

b) Pre-split Subchromatidaberrationen

Bricht eine Subchromatide *vor* der Duplikation, so resultiert daraus in der X_1 ein B' (Abb. 8). Dieser B' ergibt im zweiten Mitosezyklus einen Chromosomenbruch (B''). Es ist aber nicht möglich, zu entscheiden, ob die spät auftretenden B' in der X_1 aus Subchromatidbrüchen hervorgegangen oder ob sie direkt aus einer AAF-Wirkung entstanden sind. Experimentell lässt sich diese Frage nicht lösen. Folglich stellt die Annahme von pre-split Subchromatidaberrationen nur eine hypothetische Möglichkeit der Bruchinduktion dar, da das späte Auftreten der B' in der X_1 , also nach

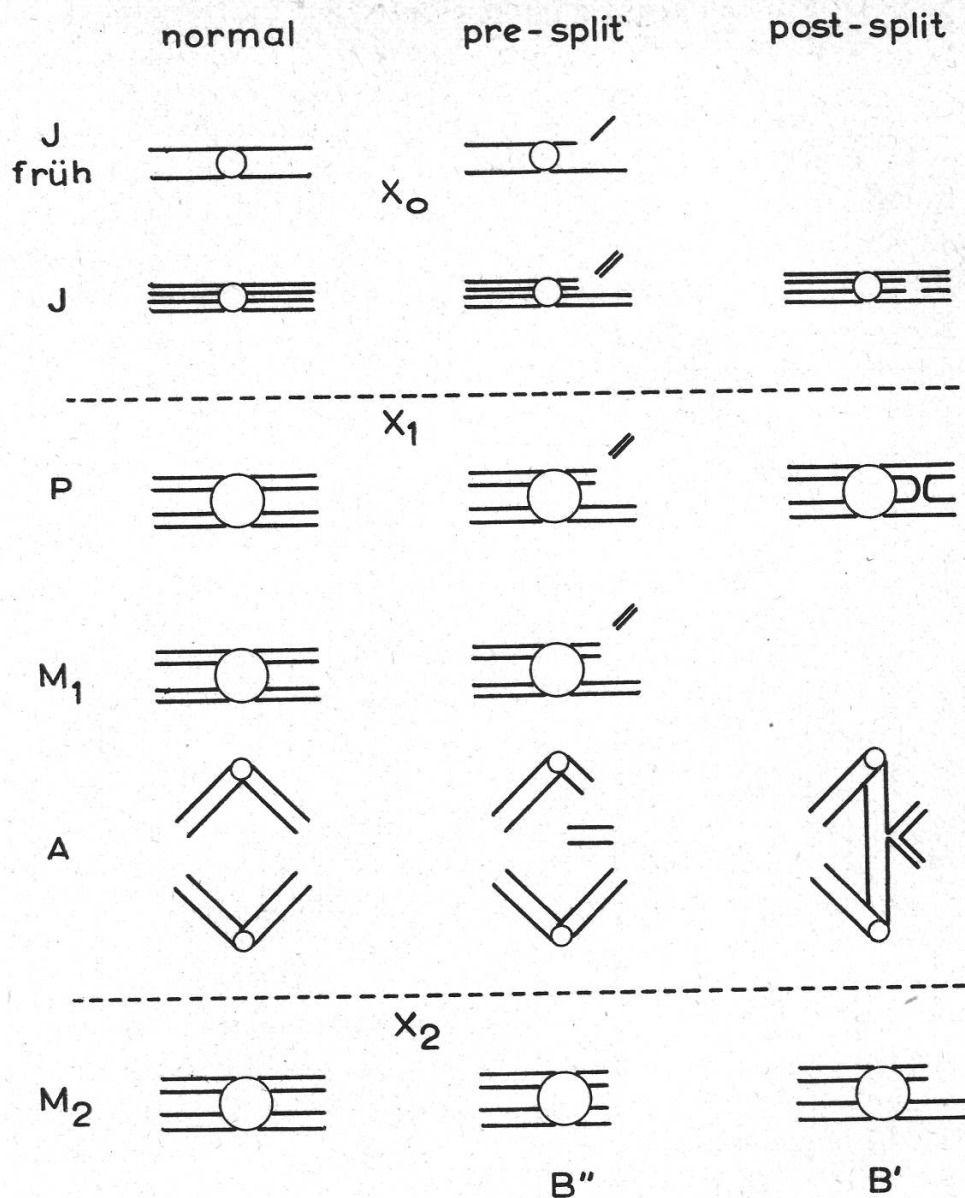


Abbildung 8

Die Entstehung und Auswirkungen von Subchromatidbrüchen
in der Interphase nach AAF-Behandlung

Links ist eine normale Teilung dargestellt. Das Chromatid wird mit zwei Untereinheiten angenommen. Die Mitosezyklen sind mit X_0 bzw. X_1 und X_2 bezeichnet. In der Mitte sind die Auswirkungen eines pre-split Subchromatidbruches gezeichnet. Daraus resultiert in der X_1 ein B' und in der X_2 ein B'' . Rechts sehen wir die Bildung eines Pseudochiasmas, das aus zwei post-split Subchromatidbrüchen in Nicht-Schwester-Chromatiden nach Reunion der proximalen und distalen Enden entsteht. In der X_2 entsteht daraus ein B'

dem ersten Maximum, nicht eindeutig für die Annahme dieser Entstehungsart spricht. Es ist zudem nicht ausgeschlossen, dass AAF in irgendeiner Form gespeichert wird und damit während längerer Zeit auf die Chromosomen bzw. die Chromatiden einwirken kann.

c) Chromatid- bzw. Chromosomenaberrationen

Beim Betrachten der Abbildung 6 und der Tabelle 5 fällt auf, dass von 5 h bis zum ersten Maximum der B' viele Chromatidbrüche auftreten. Diese B' müssen nach der Duplikation induziert worden sein und stellen folglich echte Chromatidaberrationen dar. Ganz entsprechend stellen wir bis 13 h nach der Behandlung noch freie B'' fest, die Isolocusbrüche sein könnten (Abb. 6). Diese B'' sinken freilich nach 13 h auf Null ab und steigen erst, wie schon darauf hingewiesen wurde, in der X₂ nach 31 h stark an.

AAF wirkt also während der Interphase auf die Subchromatiden wie auch auf die nächst höheren Einheiten ein. Es ist daher nicht möglich, alle Schädigungen auf Subchromatidbrüche zurückzuführen. Aus diesen Überlegungen folgt, dass die Aberrationskurven, wie sie in Abb. 6 gezeichnet sind, unter Umständen kein Abbild identischer Schädigungen darstellen könnten. Wir müssen bei der Betrachtung dieser Darstellungen genau zwischen Interpretation und Beschreibung unterscheiden. Es bestehen die folgenden Möglichkeiten der Interpretation der Aberrationskurven:

1. Die angeführten B' und B'' werden nur als freie Brüche festgestellt, wobei keine Aussage über den Zeitpunkt ihrer Induktion gemacht wird. Diese beschreibende Darstellung wird in allen folgenden Auswertungen angewendet.

2. Die Aberrationskurven werden auf Grund der Entstehungsweise der Brüche dargestellt. Dabei wird auf die Induktionsphase Bezug genommen. Somit treten der Reihe nach Chromatidaberrationen (B') und die fraglichen pre-split Subchromatidaberrationen (B') mit zunehmender EZ in der X₁ auf. In der X₂ erscheinen vorwiegend post-split Subchromatidaberrationen (B') und zudem die Auswirkungen der B' aus der X₁, die B''.

3. Behandlung unter variablen Bedingungen

a) Abhängigkeit der Wirkung von AAF vom pH der Behandlungsflüssigkeit

Die Versuche wurden mit 10 mg AAF auf 100 ml Lösung und einer Behandlungszeit von 3 h durchgeführt. Testversuche mit den reinen Pufferlösungen zeigten keine chromosomenbrechende Wirkung. Die verwendeten Puffer haben sich in andern physiologischen Versuchen als physiologisch inaktiv erwiesen. Die Lösungen wurden jeweils unmittelbar vor den Versuchen hergestellt.

Bei pH 4 lassen sich nur wenige Zellen analysieren, da die Metaphaseplatten stark verklebt sind. Bei 10 °C verstärkt sich dieser Stickiness-Effekt, verglichen mit 20 °C. Gleiche verklebte Metaphasen lassen sich auch in den Testversuchen mit reinen Pufferlösungen nachweisen. Es

scheint also, dass Stickiness durch den zu tiefen pH verursacht wird und nicht der Kombination pH 4 und AAF zuzuschreiben ist. Ähnlich, nur in vermindertem Masse, werden auch bei pH 5 verklebte Metaphasen festgestellt. Nach längeren EZ lassen sich aber die Metaphasen gut präparieren und analysieren.

Nach 45 h EZ steigt die B'-Aberrationsrate pro Zelle von 19,1 % bzw. 17,9 % auf 24,6 % für pH 4 bis 6 bei einer Temperatur von 10 °C, bei 20 °C von 12,5 % bzw. 21,0 % auf 27,7 % (Tab. 6). Bei andern EZ ergeben sich aber keine derartig gesetzmässigen Unterschiede. So ist zum Beispiel bei pH 5 die Wirkung nach 25 bis 40 h grösser als bei pH 6 (Abb. 9). Es ist daher anzunehmen, dass die auftretenden Unterschiede eher zufälliger Art sind oder dass nur eine geringe Abhängigkeit der AAF-Wirkung vom pH der Behandlungsflüssigkeit besteht. Zudem ist nicht auszuschliessen, dass das Gemisch der Pufferlösung mit AAF und Coffein einen toxischen Effekt auf die Zellen ausüben könnte in der Weise, dass weniger Zellen in die Mitose eintreten als normal.

Tabelle 6

Die Wirkung von AAF bei verschiedenen pH nach 45 h EZ

EZ/h	pH	Temperatur	B' %	B'' %	Analysierte Metaphasen
45	4	10 °C	19,1	19,1	27
45	5	10 °C	17,9	10,2	39
45	6	10 °C	24,6	17,7	73
45	4	20 °C	12,5	2,5	40
45	5	20 °C	21,0	0	19
45	6	20 °C	27,7	8,5	47

Nichtgepufferte Behandlungslösungen, wie ich sie für die weiteren Versuche benützte, zeigen einen pH zwischen 5 und 6; hier treten in der Regel mehr Metaphasen auf.

Kihlman (1956) und Naylor und Davis (cit. Kihlman 1956) haben mit verschiedenen Radiomimetica Versuche über die pH-Abhängigkeit durchgeführt. Die Behandlung mit Maleinhydrazid (MH) zeigt eine starke pH-Abhängigkeit der Wirkung, während Äthoxycoffein (EOC) und der alkylierende Diepoxypropyläther (DEPE) keine Veränderungen der Bruchrate bei verschiedenen pH aufweisen. Bei MH sinkt die Rate der Isolocusbrüche pro Zelle, wenn der pH von 4,7 auf 7,3 steigt. Als Erklärung geben Naylor und Davis eine vergrösserte Atmungshemmung des MH bei

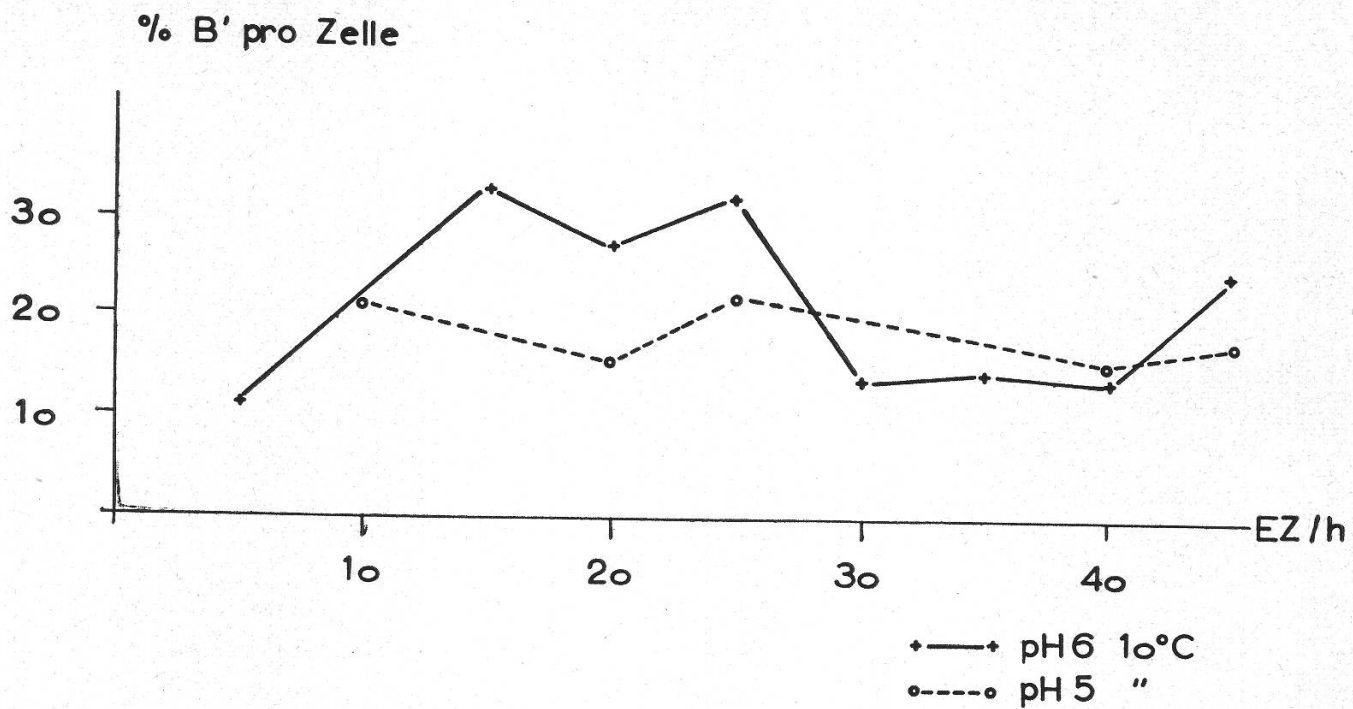


Abbildung 9

Chromatidaberrationen nach dreistündiger AAF-Behandlung bei verschiedenen pH

pH 4,7 an. Zudem könnte die H-Ionenkonzentration das Eindringen von MH in die Zellen beeinflussen. Auf die Permeabilität und deren Zusammenwirken mit der Bruchinduktion wird im nächsten Abschnitt, bei der Abhängigkeit der Wirkung von der Temperatur, näher eingegangen.

Es ist vorderhand nicht möglich, eine befriedigende Erklärung für das Verhalten von AAF bei verschiedenen pH zu geben. Hierzu sind physiologische Versuche, Atmungsmessungen und anderes notwendig.

b) Die Abhängigkeit der AAF-Wirkung vom Sauerstoffgehalt der Behandlungslösung

Für diese Experimente wurde ausgekochtes destilliertes Wasser verwendet. Während der Behandlung wurde ein reger Strom von N_2 durch die Lösung geleitet (vgl. Abb. 1). Die Behandlung erfolgte während 3 h mit 10 mg AAF in geschlossenen Gefäßen. Die Wurzeln zeigten während des Versuches keinerlei Schäden wie Schwarzwerden und andere.

Die Ergebnisse der Experimente zeigen, dass AAF in Gegenwart von Sauerstoff stärker wirkt als unter partieller Anaerobiose. Die Prozentsätze der induzierten Aberrationen liegen in N_2 -Atmosphäre tiefer als bei normaler Belüftung (Tab. 7). Die gefundene Bruchrate liegt nur wenig über der unbehandelten Wurzeln. Totale Anaerobiose lässt sich mit

Tabelle 7

AAF-induzierte Aberrationen in N₂-Atmosphäre

EZ/h	Aberrationen %	Analysierte Metaphasen	Stickstoffbehandlung ohne AAF	
			EZ/h	Aberrationen %
5	6,2 B'	48	0	4,0 B'
22	3,6 B'	55	8	—
25	3,5 B''	56	66	1,8 B'
46	2,0 B''	50		

Stickstoff aber kaum erreichen. Ich habe deshalb noch Versuche mit 2,3-Dimercaptopropanol (BAL) durchgeführt. BAL (British Anti-Lewisite) ist ein reduzierendes Agens und entfernt als solches den Sauerstoff aus den Zellen. Die Anaerobiose kann damit besser erreicht werden als mit Stickstoff (Wolff, 1954; Wolff und Atwood, 1954).

Die Wurzeln wurden während 1 h mit 2×10^{-3} M BAL-Lösung behandelt und nach längerem Auswaschen in 18 mg AAF-Lösung gebracht. Ausser Primäreffekten wie Stickiness wurden bei EZ von 5 bzw. 7 und 23 h keine Aberrationen festgestellt. Es traten viele normale Metaphasen auf, und die Färbbarkeit der Chromosomen wurde nicht beeinflusst. Unter totaler Anaerobiose werden also durch AAF keine Brüche induziert. Es ist allerdings fraglich, ob die Anaerobiose als solche wirkt. BAL wirkt nämlich gleichzeitig auch auf die Atmungskette. Bei Sauerstoffmangel wird zudem die oxydative Phosphorylierung beeinflusst. Dabei überwiegt die Spaltung des ATP gegenüber der Synthese. Es herrschen also gleichzeitig ähnliche Verhältnisse wie nach der Entkoppelung mit DNP.

Testversuche in Stickstoffatmosphäre ohne AAF haben einige weitere interessante Erscheinungen gezeigt. Wie Tabelle 8 zeigt, beeinflusst

Tabelle 8

Die Wirkung von Stickstoff auf die Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba*

EZ/h	Metaphasen %	C-Mitosen %	T %	Skistadien %	Analysierte Zellen
5	64,9	24,3	5,4	5,4	74
8	65,5	6,9	24,1	3,5	29
66	33,3	5,5	57,5	3,7	54

Die Prozentwerte beziehen sich auf die Anzahl analysierter Meta- bzw. Ana- und Telophasen

Stickstoff die Häufigkeit der Mitosestadien. Bei diesen Versuchen wurden ausschliesslich Meta- bzw. Ana- und Telophasen analysiert.

Nach 5 h treten neben 64,9 % normalen Metaphasen auch typische C-Mitosen (24,3 %) und Telophasen (5,4 %) auf. Die C-Mitosen sind von echten durch Colchicin induzierten nicht zu unterscheiden. Nach 8 h steigt die Anzahl normaler Metaphasen auf 65,5 %, während die C-Mitosen auf 6,9 % absinken. Parallel dazu steigt die Zahl der Telophasen auf 24,1 % an, so dass bei beiden EZ die Summe der C-Mitosen und Telophasen annähernd gleich gross ist. Nach 66 h, also nach mindestens zwei durchlaufenen Mitosezyklen, sind 33,3 % normale Metaphasen und nur noch 5,5 % C-Mitosen vorhanden. Gleichzeitig steigt die Zahl der Telophasen auf 57,5 % an. Die in Tabelle 8 angeführten Skistadien sind ein typisches Merkmal von C-Mitosen.

In Kontrollversuchen normal belüfteter Wurzeln beträgt der Metaphasenanteil 61,6 % pro analysierte Meta- bzw. Ana- und Telophasen. Dieser Vergleichswert ist aber nicht unbedingt zuverlässig, da bei den Kontrollversuchen Hauptwurzeln behandelt und analysiert wurden.

Aus diesem Testversuch ist also zu entnehmen, dass Stickstoffbehandlung C-Mitosen auslöst. Mit zunehmender EZ verschwindet dieser Effekt grösstenteils wieder, und die Phasenanteile werden wieder normal. Wir haben also mit Stickstoff eine zusätzliche Möglichkeit, um Metaphasen anzuhäufen. Diese Anhäufung erfolgt vor allem in den ersten Stunden nach der Behandlung. Die Wirkung des Stickstoffs scheint in einer vorübergehenden Schädigung entweder des Zentromers oder des Spindelmechanismus oder in einer Störung des Syntheseprozesses der Spindel zu liegen. Die Wirkung ist aber zeitlich beschränkt. Es sollte also in relativ kurzer Zeit möglich sein, mit N_2 eine beträchtliche Anzahl polyploider Zellen zu induzieren.

Ähnliche Versuche in dieser Richtung wurden schon mit andern Chemikalien unternommen, vor allem mit Colchicin (Van't Hof, Wilson und Colon, 1960).

c) Die Abhängigkeit der Wirkung des AAF von der Konzentration

Es ist schon in der Einleitung darauf hingewiesen worden, dass sich mit AAF nur innerhalb enger Grenzen Konzentrationsänderungen durchführen lassen, da die Löslichkeit dieser Verbindung vom Coffeingehalt des Lösungsmittels abhängig ist. AAF wurde in 1 ml absolutem Alkohol gelöst und mit einer gesättigten Coffeinelösung (0,06 M) in wässrige Lösung gebracht. Die Versuche wurden mit 10 mg und 18 mg AAF durchgeführt. Grössere Mengen AAF erfordern so viel Coffein, dass die Zellen als Folge ihre Teilungen einstellen.

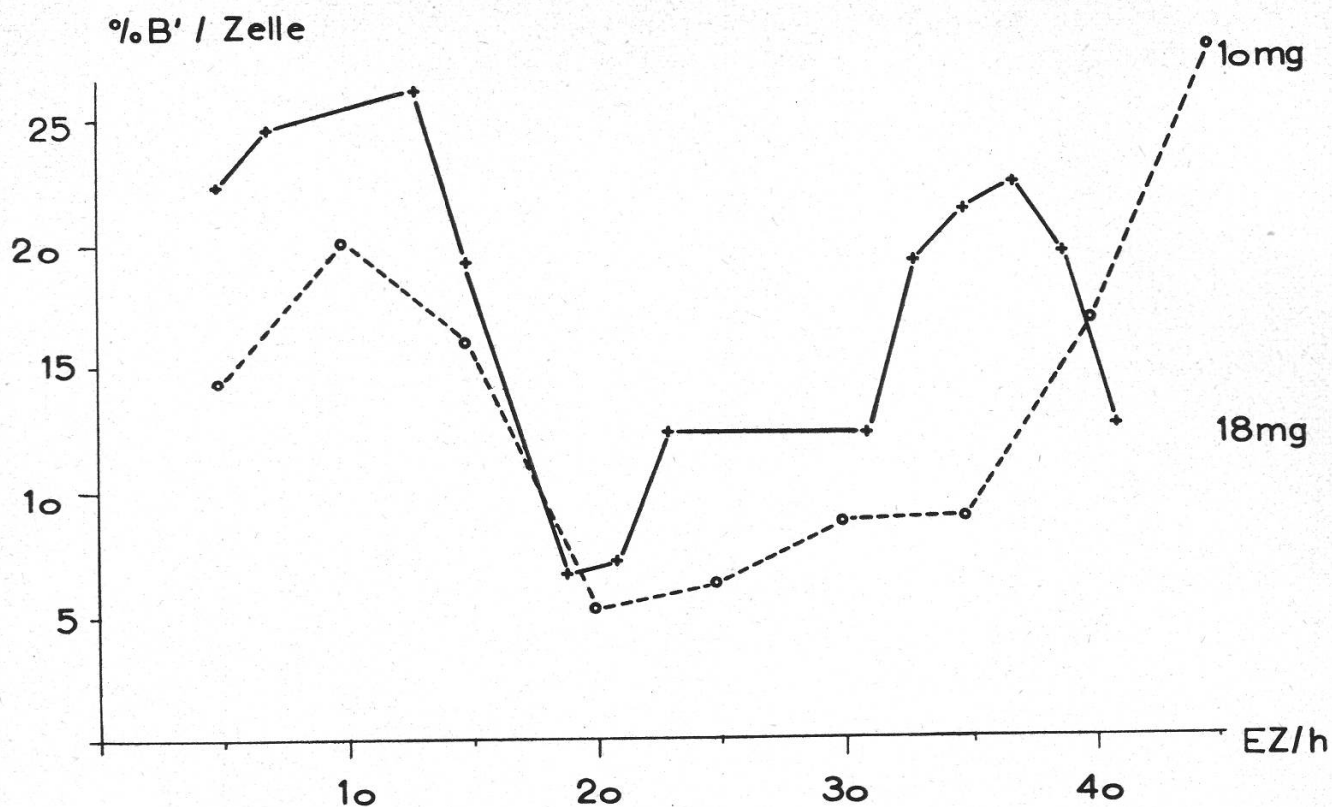


Abbildung 10

Chromatidaberrationen nach dreistündiger AAF-Behandlung
bei Konzentrationen von 10 mg bzw. 18 mg

Abbildung 10 zeigt die Wirkung von AAF bei den verwendeten Konzentrationen. Eine dreistündige Einwirkung von 18 mg AAF auf 100 ml bewirkt durchwegs die grössere Bruchrate für B' pro Zelle als bei einer Behandlung mit 10 mg. Ferner lässt sich ein paralleler Verlauf der beiden Aberrationskurven feststellen (Abb. 10 und 11). Die Maxima der B' treten, zumindest in der X_1 , zu identischen Zeiten auf. Folglich ist anzunehmen, dass mit zunehmender Konzentration die Wirkung von AAF gesteigert wird, ohne dass die Zellen in ihrer Tätigkeit gestört werden wie durch Teilungsstop, Pyknose, Fragmentierung oder Zelltod.

In der X_2 treten bei grösserer Konzentration vor allem die B'' stärker hervor. So entstanden nach 35 h EZ bei 18 mg AAF 10,6% B'', bei 10 mg nur 1,9% B'' (die Prozentzahlen bedeuten Brüche pro analysierte Zellen). Entsprechend den Erwartungen erfolgt auch hier ein Ansteigen der B'' bis gegen 40 h. Vergleichen wir parallel dazu die Zellen mit Aberrationen bei beiden Konzentrationen, so sehen wir, dass die höhere Konzentration bei EZ unter 20 h einen kleineren Prozentsatz aberranter Zellen aufweist. Von 20 h an ist aber die Rate wesentlich höher als bei der kleineren Konzentration (Abb. 11). Der Unterschied in der ersten Phase dürfte aber kaum gesichert sein.

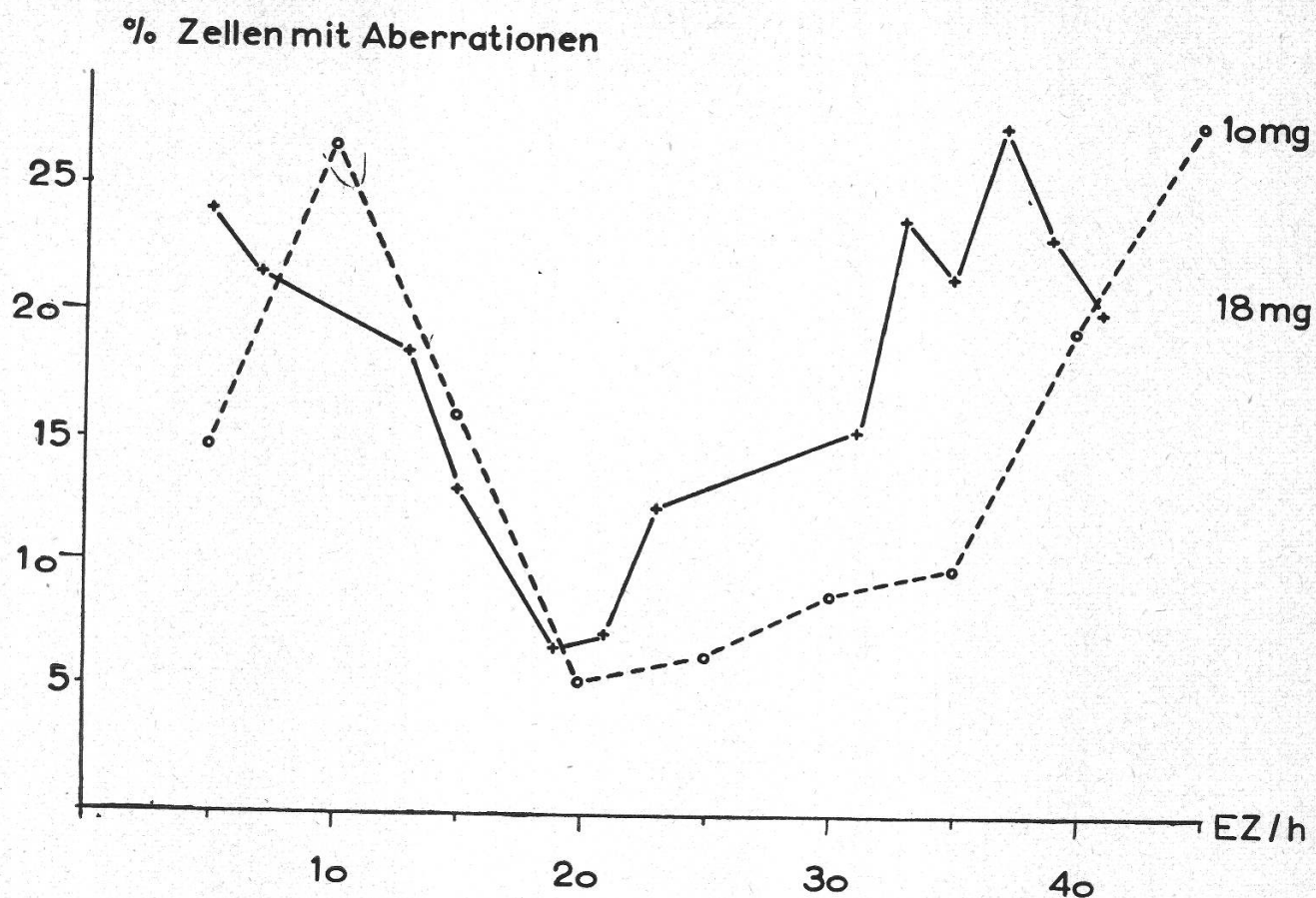


Abbildung 11

Zellen mit Aberrationen nach Behandlung mit verschiedenen AAF-Konzentrationen

Ganz allgemein kann also gesagt werden, dass die höhere Konzentration nach längeren EZ 1. mehr Brüche pro Zelle induziert und 2. mehr Zellen mit Aberrationen zeigt (es handelt sich um freie B' und B''). Von 20 h an ist zudem die totale Aberrationsrate (Summe der B' + B'' + R) bei 18mg grösser als bei 10 mg (Tab. 9). Bis zu 20 h sind die beiden Werte nicht stark verschieden.

Möglicherweise ist diese Erscheinung Ausdruck einer chemischen Wirkung in der Zelle drin. Die volle Wirksamkeit würde demnach erst gegen 20 h erreicht, mit andern Worten: die Konzentration wirkt sich erst hier aus. Gleichzeitig fällt in diese Zeit auch die Phase der grössten Empfindlichkeit der Chromosomen gegenüber Chemikalien, wie dies schon früher erwähnt wurde. Die erste Phase, die scheinbar unter dem Einfluss der Aufnahme eine gleichmässige totale Aberrationsrate zeigt, verläuft unabhängig von der Konzentration.

Bei der Betrachtung der in Tabelle 9 zusammengestellten Werte der totalen Aberrationen ist aber zu berücksichtigen, dass in der Beurteilung der Brüche die «minutes» als Folge von Brüchen nicht mitberechnet wur-

Tabelle 9

Totale Aberrationsrate nach AAF-Behandlung bei zwei verschiedenen Konzentrationen

EZ/h	18 mg AAF Aberrationen (B' + B'' + R) %	n	EZ/h	10 mg AAF Aberrationen (B' + B'' + R) %	n
5	31,3	54	5	14,3	21
7	25,3	60	10	26,6	25
11	12,3	96	15	26,0	50
13	33,3	27	20	5,2	19
15	22,5	31	25	6,2	23
19	6,7	30	30	8,7	23
21	7,2	42	35	10,7	102
23	12,3	49	40	22,3	36
25	22,5	32	45	36,2	47
31	18,3	13			
33	23,9	21			
35	31,9	28			
37	37,7	58			
39	42,6	56			
41	30,9	104			

n = analysierte Zellen

den, da es nicht möglich ist, anhand der «minutes» auf die Art der Aberration zu schliessen. Zudem sind die Reunionen nur als eine Aberration einbezogen worden. Pro Reunion müssten mindestens zwei Brüche angenommen werden. Folglich sind die in Tabelle 9 angegebenen Werte meist etwas zu klein.

d) Die Abhängigkeit der AAF-Wirkung von der Temperatur

Die Wurzeln wurden mit 10 mg AAF in gepufferter Lösung bei pH 6 behandelt. Die Temperatur, die während der Behandlungszeit herrschte, wurde auch in der EZ eingehalten. Es sind nur die beiden Temperaturen 10 °C bzw. 20 °C geprüft worden, weil bei tieferen Temperaturen Stickiness eintritt und die Chromosomen nicht mit der gewünschten Genauigkeit analysiert werden können.

Die Zahl der B' beträgt bei 10 °C nach 15 h 33,3% gegenüber 16,0% bei 20 °C. Zwischen 15 und 30 h liegt die Bruchrate bei 10 °C durchwegs höher

Tabelle 10

Die Wirkung von AAF bei verschiedenen Temperaturen und bei pH 6

EZ/h	Temperatur	B' %	B'' %	Analysierte Zellen
5	10 °C	11,2	7,4	27
5	20 °C	14,3	—	21
15	10 °C	—*	—	sehr wenig analysierbare Teilungen
15	20 °C	16,0	—	50
20	10 °C	27,5	3,4	29
20	20 °C	5,2	—	19
25	10 °C	32,2	3,2	31
25	20 °C	6,2	—	23
30	10 °C	14,0	8,0	100
30	20 °C	8,7	—	23
40	10 °C	13,3	7,9	38
40	20 °C	16,7	8,5	36

* Hier konnten nur wenige Teilungen analysiert werden

als bei 20 °C. Die Wirkung von AAF ist also bei tieferer Temperatur bei gleichbleibendem pH grösser. Doch sind auch hier die Unterschiede während der verschiedenen EZ nicht gleichförmig, ähnlich wie bei den pH-Versuchen. So erreicht die Zahl der induzierten Aberrationen nach 40 h bei 20 °C die Grösse der bei 10 °C erhaltenen (Tab. 10).

Ähnliche Ergebnisse liegen nach der Behandlung mit DEPE und MH vor (Kihlman, 1956). Mit zunehmender Temperatur steigt die Zahl der induzierten Aberrationen bei DEPE- und MH-Behandlung. Mit EOC erfolgt ein Anstieg von 3 °C bis 17 °C und ein Absinken der Wirkung von 17 °C bis 25 °C.

Es ist kaum möglich, meine Resultate als einen Permeationseffekt anzusprechen. Bei zunehmender Temperatur nimmt im allgemeinen die Permeation zu, so dass also bei höheren Temperaturen eine grössere Bruchrate zu erwarten wäre. Für AAF spielt die Permeation offenbar keine Rolle. Möglicherweise laufen chemische Prozesse ab, die temperaturabhängig sind und die später zur Induktion der Brüche führen. Kihlman (1956) schlägt für EOC diese Erklärung als zusätzliche Möglichkeit nebst der höheren Permeabilität bei grösseren Temperaturen vor. Es ist auch kaum möglich, den Grund für das verschiedene Verhalten von AAF bei

verschiedenen Temperaturen in der unterschiedlichen Mitosezeit und der Dauer des Mitosezyklus zu suchen. Die Unterschiede der Mitosedauer sind wohl bei 10 °C und 20 °C sehr gross, etwa doppelt so rasch bei 20 °C, doch ergeben sich im Mitosezyklus nach Evans (1959) nur wenige Stunden Unterschied. Somit würde diese Tatsache eher für eine Erhöhung der Bruchrate bei zunehmender Temperatur sprechen.

Bei tiefen Temperaturen werden Fermente in ihrer Aktivität meistens verringert, das könnte bedeuten, dass dadurch Restitutionen verhindert werden und folglich die gebrochenen Enden frei bleiben. Dies würde zu einer Vermehrung der feststellbaren Brüche führen.

Es muss also vorläufig bei der Feststellung der Tatsache bleiben. Radioaktive Markierungen werden vielleicht dieses Problem klären.

e) Der Einfluss von Mn^{2+} auf das Bruch- und Reunionsgeschehen

Das Studium der Beeinflussbarkeit der Bruchwirkung, insbesondere durch bekannte Katalysatoren bestimmter Fermentsysteme, weist in vielen Fällen den Weg zur Interpretation der Bruchwirkung.

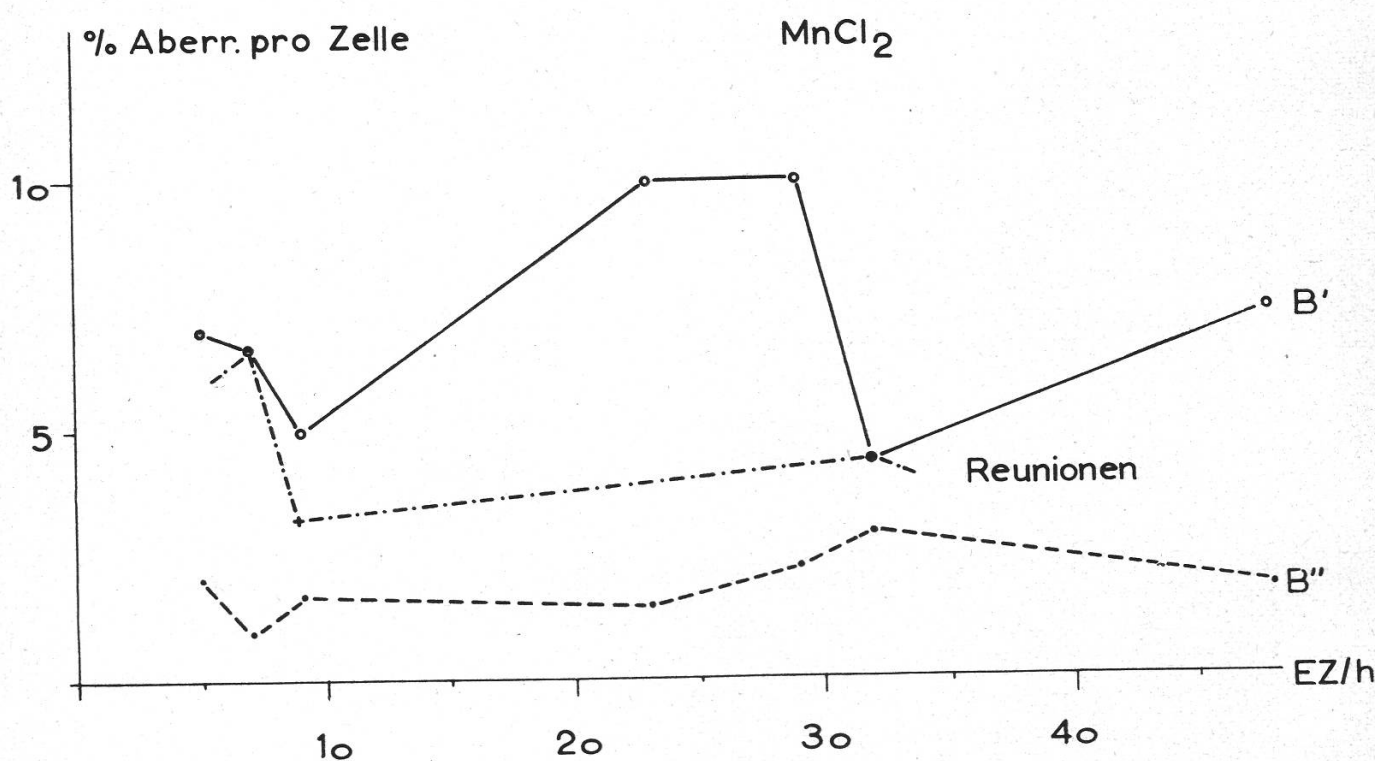


Abbildung 12

Die Wirkung von $MnCl_2$ -Vorbehandlung auf AAF-behandelte Seitenwurzeln
 + — . — . — + Reunions (SR, R') ● — — — ● B'' ○ — — — ○ B'

Seitenwurzeln von *Vicia faba* wurden während 1 h mit einer 1prozentigen $MnCl_2$ -Lösung vorbehandelt und unmittelbar anschliessend für 3 h in 10 mg AAF-Lösung ohne Puffer gebracht. Testversuche mit Manganchlorid haben keine chromosomenbrechende Wirkung gezeigt.

In Abbildung 12 sind die verschiedenen in Tabelle 11 zusammengestellten Aberrationen nach Manganchloridbehandlung aufgezeichnet. Mit der ausgezogenen Linie sind die B' dargestellt, die gestrichelte Kurve gibt die B'' an. Die Reunionen (SR, R') sind mit strichpunktierten Geraden wiedergegeben.

Tabelle 11

Die Wirkung von $MnCl_2$ auf AAF-behandelte Seitenwurzeln

EZ/h	B' %	C_0 %	C_1 %	C_2 %	Reunionen %	Zellen mit Aberrationen %	n
5	7,0	2,0	2,0	—	—	8,0	100
7	6,7	0,9	0,9	0,9	3,8 SR/ 2,9 R'	9,6	104
9	4,9	3,3	—	1,6	1,6 SR	8,2	61
23	10,0	—	1,4	—	—	10,0	70
29	10,0	3,3	2,2	—	—	8,9	90
32	4,3	1,4	2,9	—	4,3 SR	7,1	70
48	7,4	—	1,8	—	—	9,2	50

n = Zahl der analysierten Metaphasen. Die angeführten C_1 sind Chromosomenbrüche, deren azentrische Fragmente (C_0) vom C_1 entfernt liegen

Wie wir aus Tabelle 11 im Vergleich mit Tabelle 5 sehen, ist die Bruchrate nach Manganchloridvorbehandlung durchwegs kleiner als bei normaler AAF-Behandlung. Ferner treten von Anfang an mehr oder weniger konstant offene B'' in Form von C_1 auf. In den ersten 9 h erscheinen im Vergleich mit normaler AAF-Behandlung vermehrt Reunionen als SR und R' . Die C_2 , die nach 7 h bzw. 9 h zu erkennen sind, sprechen für eine Bruch-Reunion-Wirkung, doch ist daraus nicht zu ersehen, ob es sich um Chromatid- oder Chromosomenreunionen handelt. Für die ersten Stunden der EZ ist also ein vermehrtes Reunionsgeschehen festzustellen, obwohl die Brüche weniger zahlreich sind als in Kontrollen ohne Manganchloridbehandlung. Die Reunionen erfolgen vorwiegend auf chromatidaler Basis (SR, R'). Die um diese Zeit erscheinenden Brüche sind als Chromatidaberrationen zu taxieren. Aus dem Zeitpunkt des Erscheinens der Brüche lässt sich schliessen, dass das Bruch- und Reunionsgeschehen zeitlich sehr nahe beisammenliegen.

Aus physiologischen Versuchen ist bekannt, dass Mn^{2+} die Mitochondrienaktivität steigert, was zu einer vermehrten Synthese von energiereichen Phosphaten einerseits und zu einer Steigerung der Atmungsintensität andererseits führt (Wolff, 1960).

Es ist also naheliegend anzunehmen, dass nach der Manganbehandlung mehr Restitutionen auftreten, so dass als Folge davon die Zahl der feststellbaren Brüche vermindert wird. Die Restitutionen entziehen sich aber in der Analyse der Erfassung, so dass das Reunionsgeschehen allein aus den vorhandenen SR bzw. R' und R'' beurteilt werden muss. Die Annahme vermehrter Restitution ist also experimentell nicht nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch Manganchloridbehandlung die Zahl der Reunionen nach kurzen EZ ansteigt, die Bruchrate aber, im Vergleich mit normaler AAF-Behandlung, tiefer liegt.

*f) Der Einfluss von Peroxyd auf die Wirkung von AAF
unter partieller Anaerobiose¹*

Diese Versuche wurden in geschlossenen Gefässen durchgeführt, wie sie in Abbildung 1 dargestellt sind. Die Blindversuche, in denen Seitenwurzeln während 3 h mit einer 10^{-4} M Peroxydlösung behandelt wurden, zeigen keine chromosomenbrechende Wirkung. Kurze Zeit nach der Behandlung treten allerdings verklebte Metaphasen auf, sonst sind aber keinerlei Abnormitäten zu erkennen.

Während der dreistündigen Behandlung mit 10 mg AAF und 10^{-4} M H_2O_2 -Lösung wurde ein reger Stickstoffstrom durch die Behandlungslösung geleitet. Für diese Versuche wurden keine Pufferlösungen verwendet, der pH betrug etwa 6. Vor der Behandlung wurden die Wurzeln während 1 h unter Stickstoffeinfluss gehalten.

Wie aus Tabelle 12 und Abbildung 13 ersichtlich ist, tritt das Minimum der B' und B'' nach 14 h ein. Die B' steigen bis 8 h nach der Behandlung an und sinken dann bis 14 h ab. Der zweite Anstieg erfolgt nach 17 h, worauf nur ein unbedeutender Abfall gegen 43 h zu verzeichnen ist. Die Zahl der B'' , die in der X_1 bei verschiedenen EZ nur kleine Differenzen aufweist, steigt gegen das Ende der EZ stark an und übergipfelt nach 43 h die B' . Ferner ist aus Tabelle 12 zu ersehen, dass die Zahl der aberranten Zellen nach 11 h ein Maximum erreicht, nach einem starken Abfall gegen 14 h erfolgt ein kontinuierlicher Anstieg bis zu 43 h nach der Behandlung. Die Reunionen erscheinen gehäuft nach 27 h bzw. 43 h. Das erste Maximum der B' ist zeitlich gegenüber den Ergebnissen normaler AAF-Behandlung nur wenig zurückverschoben (Abb. 13). Es kann daher angenommen

¹ Es handelt sich um Hydroperoxyd.

Tabelle 12

AAF-induzierte Aberrationen in N_2 -Atmosphäre mit Peroxyd

EZ/h	B' %	B'' %	Reunionen %	Zellen mit Aberrationen %	Analysierte Metaphasen
5	11,4	—	—	11,4	61
8	15,4	2,9	—	17,4	69
11	11,3	4,5	2,3 SR	18,1	44
14	8,3	2,7	—	8,3	36
17	10,4	6,2	—	14,5	48
27	18,4	3,5	5,7 R' / 3,5 SR	18,4	87
43	15,0	21,6	3,2 R'' / 10,0 SR	20,0	60

werden, dass die Mitoseaktivität durch diese kombinierte Behandlung nicht verändert wird.

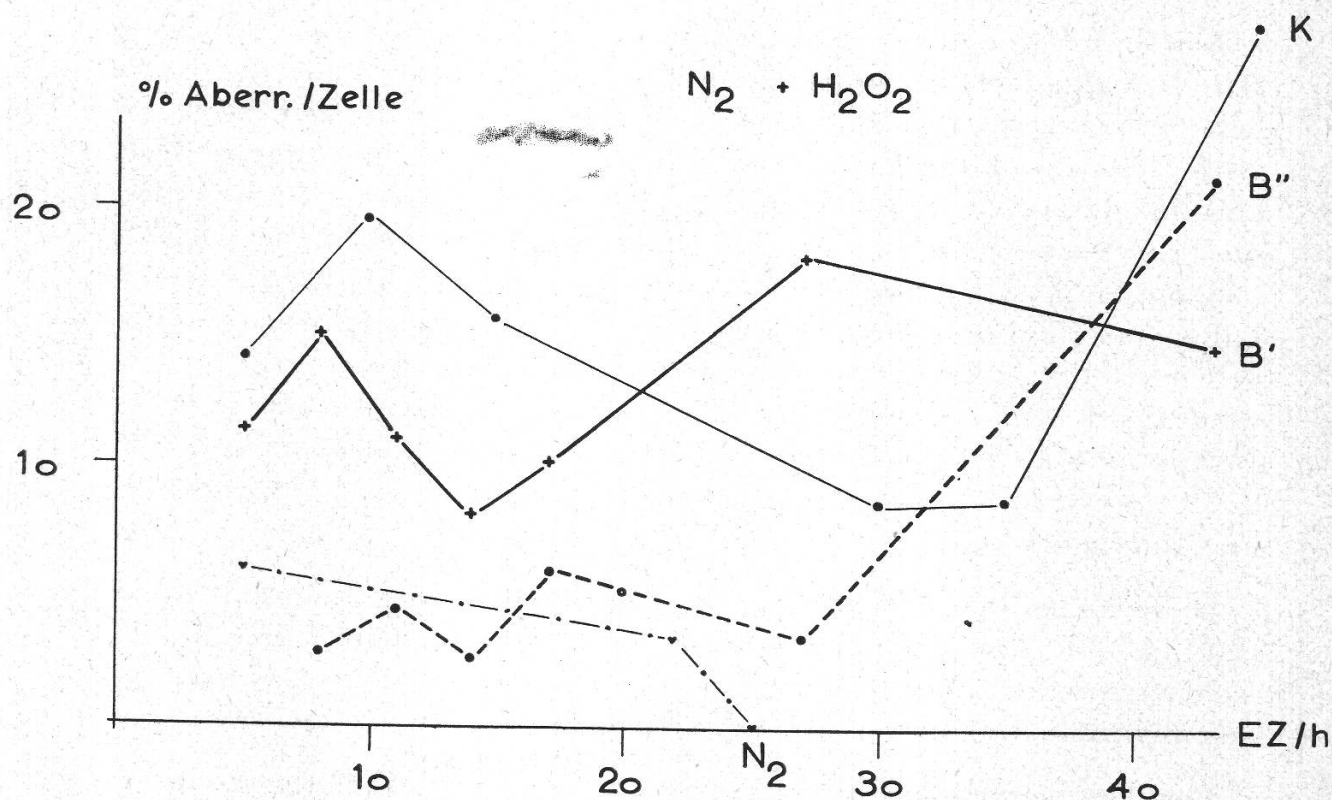


Abbildung 13

Aberrationen nach dreistündiger AAF-Behandlung in N_2 -Atmosphäre mit Peroxyd

- K Chromatidbrüche nach normaler AAF-Behandlung
- B'' nach AAF-Behandlung in $N_2 + H_2O_2$
- +—+ B' nach AAF-Behandlung in $N_2 + H_2O_2$
- ∇-.-∇ B' nach AAF-Behandlung in N_2 ohne Peroxyd

Tabelle 13

Bruchwirkung von AAF unter partieller Anaerobiose mit Peroxyd im Exsikkator

EZ/h	B' %	B'' %	Reunionen %	Zellen mit Aberrationen %	Analysierte Metaphasen
5	7,4	—	—	7,4	67
8	10,8	1,8	—	3,7	54
11	6,8	1,7	3,4 R''	10,1	59
17	7,1	3,5	—	10,7	28

Der Vergleich der kombinierten Behandlung mit normal behandelten Wurzeln zeigt, dass die beiden Aberrationsraten von der gleichen Grössenordnung sind. Ähnliche Ergebnisse und in vergleichbaren Grössenordnungen wurden nach der Behandlung im Exsikkator ohne Stickstoff erzielt. Diese Resultate sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass Anaerobiose mit Peroxyd aufgehoben werden kann. Die Aberrationsrate nach Peroxydbehandlung in N₂-Atmosphäre ist weit grösser als die der Stickstoff- bzw. BAL-Versuche. Es ist kaum wahrscheinlich, dass die induzierten Brüche auf eine Peroxydvergiftung zurückzuführen sind, da die Blindversuche nur eine kleine Zahl von Brüchen aufweisen. Man darf daher wohl annehmen, dass die kombinierte Behandlung nicht mit der indirekten Wirkung von Röntgenstrahlen vergleichbar ist, bei der Peroxyd vorübergehend in der Zelle akkumuliert wird und damit chromosomenbrechend wirkt. Die Catalase- und Peroxydaseaktivität werden vermutlich durch die Behandlung nicht gestört. Der für den Zellstoffwechsel nötige Sauerstoff wird aus der Peroxydspaltung durch Catalase gewonnen (Wolff, 1955, und Luippold).

Diese Experimente bestätigen die Annahme, dass Sauerstoff zur Induktion von Brüchen notwendig ist. Es spielt offenbar keine Rolle, in welcher Art der Sauerstoff der Zelle zugeführt wird, ob als Gas oder ob er aus intrazellulärer Zersetzung in den Stoffwechsel übertragen wird.

Bei den oben beschriebenen Versuchen ist zu berücksichtigen, dass vermutlich nur die Umgebung der Wurzeln sauerstoffärmer ist, dass aber das Sauerstoffgefälle in den Wurzeln nicht in gleichem Masse abnimmt. Der noch anwesende Sauerstoff verfälscht natürlich die Resultate.

4. Die Verteilung der Brüche über das Genom

a) Verteilung der Brüche auf einzelne Chromosomentypen

Wie schon bei der Besprechung des Chromosomensatzes von *Vicia faba* gezeigt wurde, verhalten sich die Längen der M- und L_n -Chromosomen nach meinen Messungen wie 4,7:2. Zur Untersuchung der Bruchverteilung auf die einzelnen Chromosomentypen wurde das ganzzahlige Verhältnis 5:2 gewählt. Dieses Verhältnis entspricht den Angaben von Rieger und Michaelis (1959) und anderen.

Tabelle 14

Verteilung der Brüche auf verschiedene Chromosomentypen
(Konzentration 18 mg, ohne Puffer)

Summe der Brüche (B' + B'')	Brüche in M-Chromosomen	Brüche in L_n -Chromosomen	M : L_n	χ^2 P = 0,01
erhalten 184	158,0	26,0	12,1:2	18,7
erwartet	131,4	52,6	5,0:2	

Bei der Annahme, dass die Brüche gleichmässig über das Genom verteilt sind, müssten sie im Verhältnis der entsprechenden Chromosomenlängen auftreten. In den Tabellen 14 und 15 sind für zwei Versuche die Verteilungen zusammengestellt.

Tabelle 15

(Konzentration 10 mg, gepuffert, pH 6)

Summe der Brüche (B' + B'')	Brüche in M-Chromosomen	Brüche in L_n -Chromosomen	M : L_n	χ^2 P = 0,01
erhalten 236	191,0	45,0	8,4:2	10,08
erwartet	168,6	67,4	5,0:2	

Nach diesen Untersuchungen ist in beiden Experimenten die Differenz vom erwarteten Wert gesichert. Die Abweichungen von den postulierten Werten sind also nicht zufällig. Die Brüche sind somit nicht gleichmässig über die Chromosomen verteilt. Die M-Chromosomen enthalten mehr Brüche als die L_n -Chromosomen. Wie Tabelle 16 zeigt, ist aber die Abweichung vom erwarteten 5:2-Verhältnis nicht immer gesichert. Nach Man-

ganvorbehandlung sind die Brüche entsprechend den Chromosomenlängen verteilt. Dies könnte auf vermehrte Restitution in den M-Chromosomen hinweisen.

Tabelle 16

Verteilung der Brüche auf die Chromosomentypen nach Manganvorbehandlung

Summe der Brüche (B' + B'')	Brüche in M-Chromo- somen	Brüche in L _n -Chromo- somen	M : L _n	χ^2 P = 0,01
erhalten 60	46,0	14,0	6,6:2	0,834
erwartet	42,8	17,2	5,0:2	

Es bestehen also zwischen den vorbehandelten und den normalen AAF-Behandlungen Unterschiede in der Verteilung der Brüche. Eine Erklärung kann aber anhand der durchgeführten Experimente noch nicht gegeben werden.

b) Lokalisierung der Brüche und Vergleich mit der Wirkung von Röntgenstrahlen

Röntgeninduzierte Brüche sind mehr oder weniger zufällig über die Chromosomen verteilt (Revell, 1952; Gottschalk, 1951; Thoday, 1954 u. a.). Eine spezifische Wirkung der Röntgenstrahlen auf bestimmte Loci, wie Heterochromatin, ist nicht festzustellen. Die Anwendung chemischer Agenzien zeigt dagegen oft lokalisierte Brüche, so zum Beispiel die Behandlung mit AAF.

Im Gegensatz zu AAF wurde bei Myleran und Maleinhydrazid eine spezifische Wirkung im Heterochromatin gefunden. Zudem traten auch viele Brüche in der Umgebung heterochromatischer Bezirke auf (Moutschen, 1958; McLeish, 1952). In Abbildung 14 ist eine entsprechende Anzahl röntgeninduzierter Brüche eingezeichnet. Auch hier zeigen sich Anhäufungen, die in der Lage allerdings von denen des AAF abweichen, doch ist die Verteilung im allgemeinen gleichmässiger.

Abbildung 14 gibt ein Bild von der Verteilung AAF- und röntgeninduzierter Brüche auf zehn festgelegte Chromosomensegmente. Dazu sind je ungefähr 50 Brüche in den beiden dargestellten Chromosomen lokalisiert worden. Die Zuordnung der Brüche auf einzelne Chromosomenloci stösst auf technische Schwierigkeiten. Unterschiedliche Kontraktion der Chromosomen in verschiedenen Metaphasenplatten, Zeichenfehler

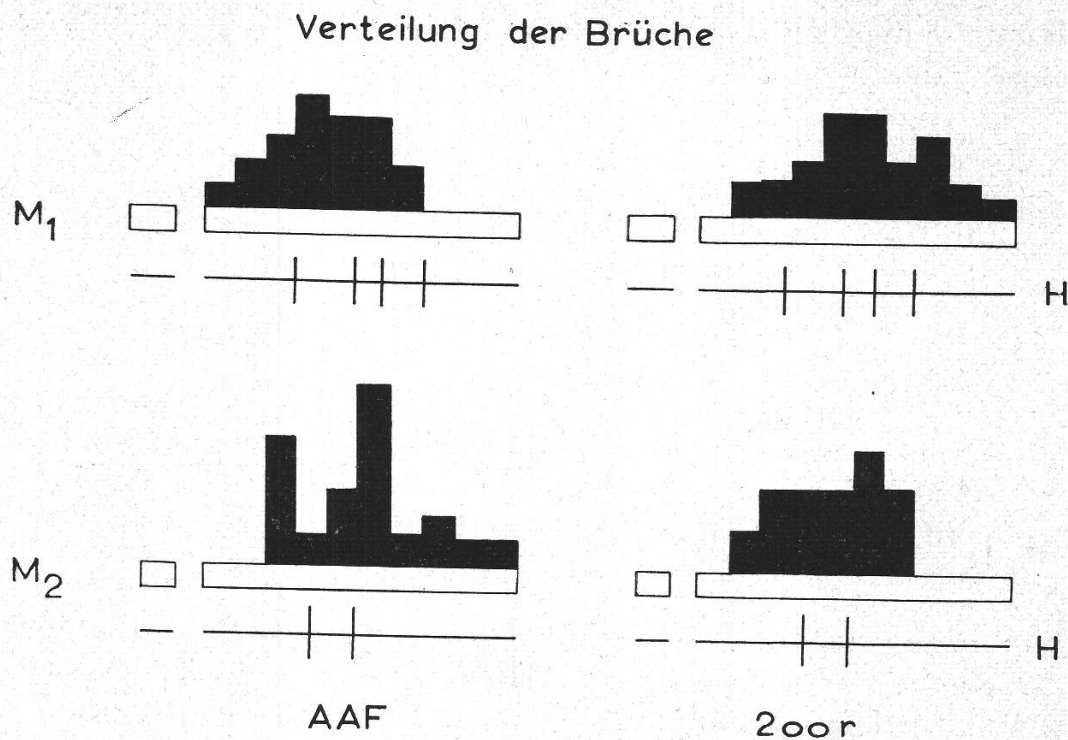


Abbildung 14

Verteilung der Brüche röntgenbestrahlter (200 r) und AAF-behandelter (10 mg) Wurzeln auf die M_1 - und M_2 -Chromosomen

Zu den gezeichneten Chromosomen sind die heterochromatischen Segmente zugefügt, um ein Bild über die gegenseitige Lage von gehäuften Brüchen und Heterochromatin zu gewinnen

usw. können das Bild stark verfälschen. Die Analysen wurden nach fotografischen Aufnahmen gemacht.

Aus den Abbildungen entnehmen wir, dass nach AAF-Behandlung in den mittleren Regionen der M-Chromosomen eine Anhäufung von Brüchen erfolgt. Die zentromernahen Stellen und die distalen Enden zeigen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber AAF. Die kleinen Arme der M-Chromosomen wiesen keine Brüche auf, und Zentromerbrüche sind nur selten gefunden worden. Die Anhäufung der Aberrationen in der Mitte der Chromosomen könnte auf eine spezifische Wirkung hinweisen, doch ist ihre Zuordnung zum Heterochromatin unsicher. Die meisten M-Chromosomen weisen zwar median eine schmale heterochromatische Zone auf, doch decken sich diese Orte nicht genau mit den Stellen gehäufter Aberrationen (Abb. 3 und 14). Nach AAF-Behandlung liegt die Mehrzahl der Brüche nicht in heterochromatischen Bereichen, sondern eher in der Nähe derselben. Wir müssen uns daher vorderhand mit der Feststellung begnügen, dass diese Brüche zwar in den mittleren Regionen der M-Chromosomen gehäuft auftreten, dass aber keine sichere Zuordnung zu bestimmten Chromosomenloci möglich ist.

Da nur wenige Brüche in den L_n auftreten, habe ich auf eine Lokalisierung verzichtet.

5. Die Wirkung von AAF in Abhängigkeit von der oxydativen Phosphorylierung und von der Atmung

a) Die Wirkung der AAF-Behandlung nach Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung von der Atmung

In den folgenden Versuchen wurden die Seitenwurzeln während 2 h mit einer 10^{-4} M DNP-Lösung vorbehandelt und unmittelbar anschliessend für 3 h in 10 mg AAF-Lösung gebracht. Die Behandlung erfolgte im Dunkeln und ohne spezielle Belüftung der Lösungen.

Die Wirkung des DNP besteht in einer Trennung der ATP-Bildung vom Elektronentransport. Durch diese Entkoppelung wird das ADP:ATP-Verhältnis verändert und wirkt somit als begrenzender Faktor für die Atmungsrate. Es ist bekannt, dass die Energie aus der Atmung zur Induktion von Chromosomenaberrationen notwendig ist (Beatty und Beatty, 1960; Kihlman, 1956; Loveless, 1952; Wolff und Luippold, 1955 u. a.).

Tabelle 17

Der Einfluss von DNP auf die Bruchwirkung von AAF

EZ/h	B' %	B'' %	C ₀ %	C ₁ %	Reunionen %	Zellen mit Aberrationen %	Analysierte Zellen
5	8,4	—	1,0	1,0	—	8,4	95
10	7,3	—	—	—	—	7,3	41
15	4,9	—	—	—	—	4,9	61
17	7,8	1,9	1,9	1,9	2,0 SR	13,7	51
35	8,3	2,7	—	5,5	—	13,9	36

Wie wir aus Tabelle 17 und Abbildung 15 erkennen, treten nach kombinierter Behandlung mit DNP und AAF Brüche auf. Die Schwankungen in der Anzahl der Brüche sind aber nicht so gross wie unter normalen Bedingungen ohne DNP-Vorbehandlung. Der Vergleich mit den Ergebnissen in Abbildung 6 zeigt, dass die Zahl der induzierten Aberrationen nach DNP-Behandlung beträchtlich tiefer liegt, ferner sind nur sehr wenige Reunionen zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse führen zum Schluss, dass die Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung von der Atmung zu einer Reduktion der Aberrationsrate führt. Sollte die Hemmung der ATP-Bildung wirklich die Ursache des Absinkens der Bruchrate sein, müsste es gelingen, durch Zugabe von ATP die ursprüngliche Wirkung des AAF zu erreichen. Es ist aber nicht möglich, festzustellen, in welcher Form ATP in die Zelle gelangt und dort wirkt. Diese Ungewissheit ist bei der Interpretation der folgenden Experimente zu berücksichtigen.

b) Die Aufhebung der Entkoppelungswirkung durch Zugabe von ATP

Diese Versuche wurden mit dem Tetranatriumsalz von ATP in 10^{-3} M Konzentration kombiniert mit 10 mg AAF nach zweistündiger Vorbehandlung mit 10^{-4} M DNP-Lösung durchgeführt. Die Anlage der Versuche erfolgte bei 19°C , ohne Puffer in Leitungswasser. Während des Versuches liessen sich keine Veränderungen der Wurzeln feststellen.

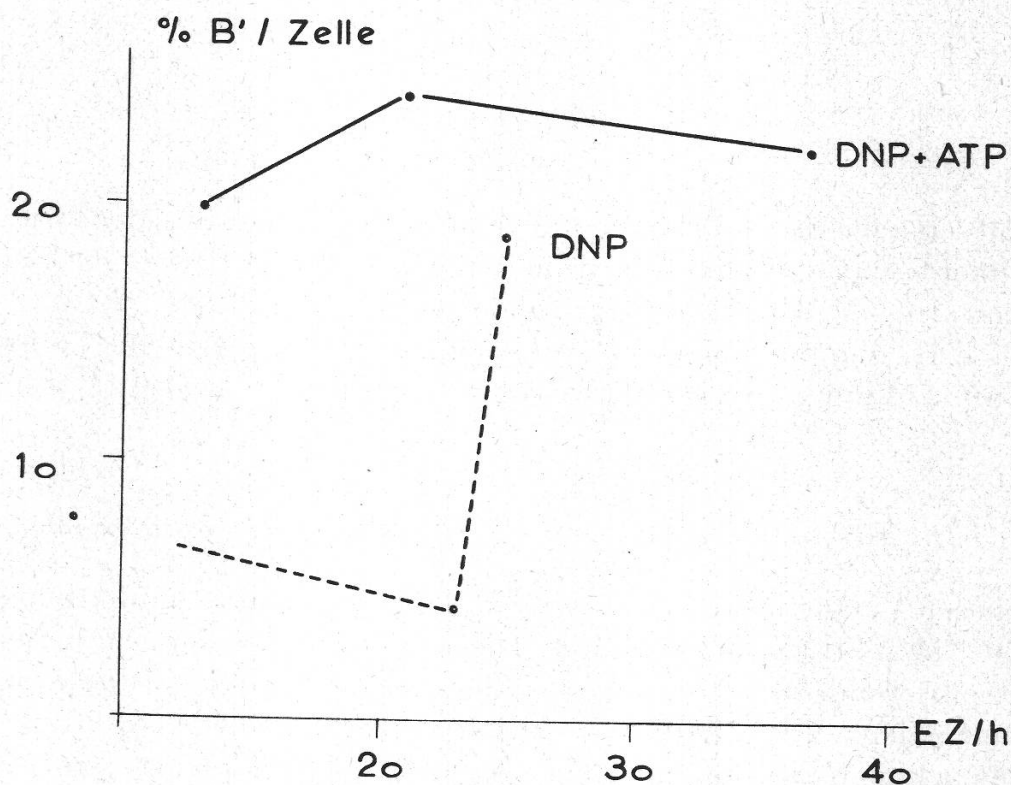


Abbildung 15

AAF-induzierte Chromatidaberrationen nach Aufhebung der Entkoppelung durch ATP

Die gestrichelte Linie in Abbildung 15 gibt die Resultate eines AAF-Experimentes nach DNP-Vorbehandlung an. Wie Tabelle 18 zeigt, treten

nach 21 h vermehrt Reunionen auf (Triradiale, SR und Chromosomenreunionen). Die Bruchrate liegt weit über der nach DNP-Vorbehandlung (Abb. 15), sie bewegt sich in Grössenordnungen der normalen AAF-Behandlung, zeitlich aber etwas verschoben. In diesem Versuch lassen sich wie nach Manganchloridbehandlung vermehrt Reunionen feststellen, was darauf hinweist, dass ATP tatsächlich zur Bildung von Reunionen benötigt wird. Die Bruchrate steigt gleichzeitig beträchtlich an, dies spricht für eine Aufhebung der Entkoppelungswirkung.

Tabelle 18

AAF-induzierte Aberrationen nach Aufhebung der Entkoppelungswirkung durch ATP

EZ/h	B' %	B'' %	C ₀ %	C ₁ %	Reunionen %	Analysierte Zellen
13	20,0	—	—	—	—	20
21	24,5	4,4	6,6	8,8	4,4 R'' / 13,3 SR / 6,6 T*	45
37	22,2	—	—	2,7	—	36

* T = Triradiale

Blindversuche mit ATP haben allerdings eine Erhöhung der Bruchrate gegenüber unbehandelten Wurzeln gezeigt. Nach dreistündiger Behandlung mit 10^{-3} M ATP-Lösung erscheinen nach 5 h 10,9% B' und nach 7 h 7,7% B'. Zudem sind die Chromosomen teilweise verklebt, was allerdings nur auf einen primären physiologischen Effekt hinweist.

c) Der Einfluss von ATP auf die Bruchrate und die Reunionen

In diesen Versuchen wurden Seitenwurzeln während 3 h mit 10 mg AAF und 10^{-3} M ATP (Na_4) behandelt. Die aus dieser kombinierten Behandlung resultierende Bruchrate liegt in der gleichen Grössenordnung wie die nach normaler AAF-Behandlung erhaltene (Abb. 16). Gleichzeitig können wir das schon früher beschriebene Absinken der Aberrationsrate gegen 20 h beobachten (Tab. 19). Die Reunionen treten nach 13 h gehäuft auf. Aus diesem Experiment zeigt sich, dass die Zahl der Reunionen vor allem in der X_1 innerhalb einer kurzen Zeitspanne zunehmen. Die Zellen mit der grössten Zahl Reunionen wurden in der mittleren Interphase behandelt, also zu einem Zeitpunkt, in dem die Chromosomen am empfindlichsten gegenüber Chemikalien sind. In dieser Zeit wird auch der Duplikationsvorgang angenommen. Dies könnte bedeuten, dass die Chromosomen nach

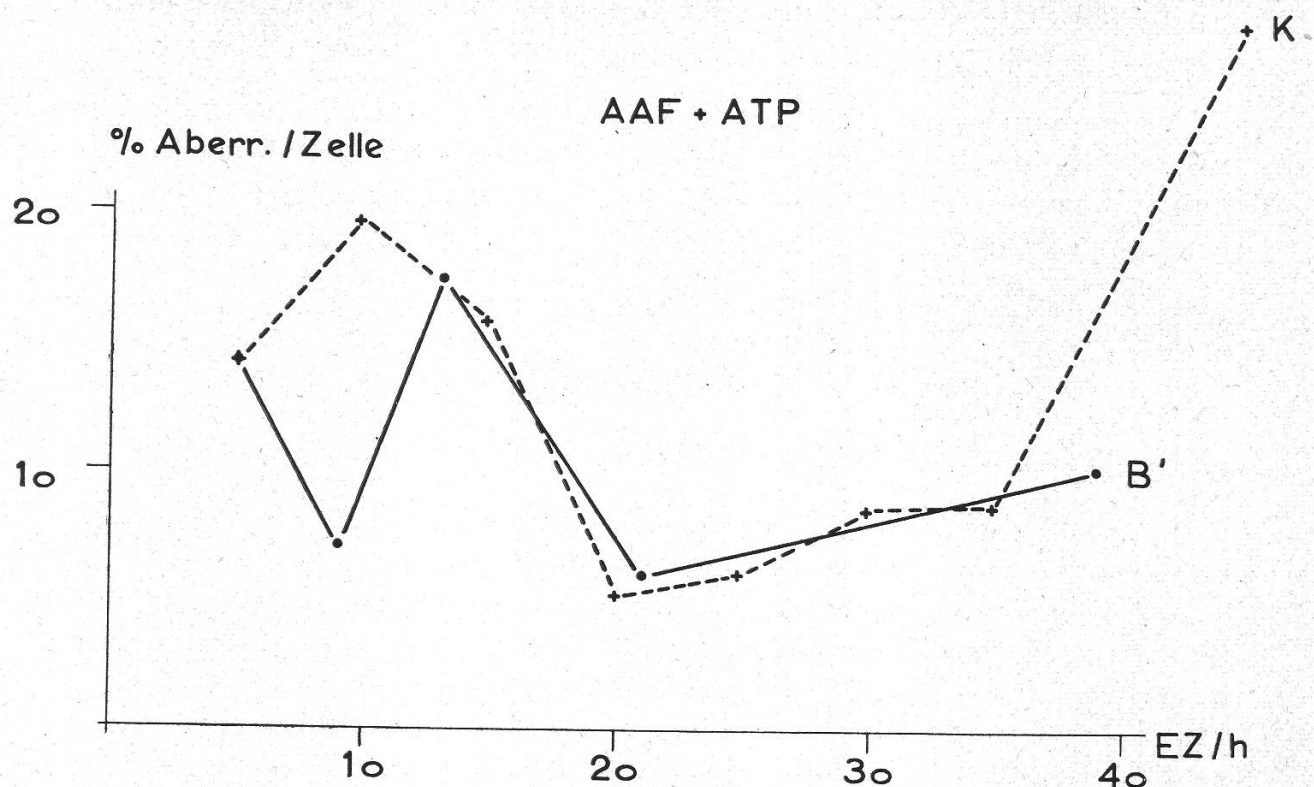


Abbildung 16

Die Wirkung von ATP auf AAF-behandelte Zellen

- + - - - + K: Chromatidaberrationen nach normaler AAF-Behandlung
 ● ——— ● Chromatidaberrationen nach dreistündiger Behandlung mit AAF + ATP

diesem Prozess vermehrt rekombinieren. In der X_2 scheint die Wirkung des ATP weitgehend erloschen zu sein, es lassen sich nur noch wenige

Tabelle 19

Die Wirkung von ATP auf die Reunionsfähigkeit gebrochener Chromosomen

EZ/h	B' %	C ₀ %	C ₁ %	Reunionen %	Zellen mit Aberrationen %	n
5	14,3	—	—	—	9,5	21
9	7,1*	—	—	—	7,1	28
13	17,6	11,7	14,7	2,9 C ₂ / 5,9 R''	26,4	34
21	6,0	—	—	—	56,0	50
39	10,2	—	8,1	2,0 SR	16,3	49

n = Zahl der analysierten Zellen

* Diese tiefe Zahl an B' dürfte auf einen Versuchsfehler zurückzuführen sein

Reunionen nachweisen. Auf den genauen Zeitpunkt der Rekombination kann natürlich aus diesen Experimenten nicht geschlossen werden.

Zusammenfassend stelle ich also fest, dass 1. ATP das Reunionsgeschehen fördert und 2. die Brüche vorwiegend während einer beschränkten Zeitspanne der X_1 zwischen 10 h und 20 h nach Versuchsbeginn Reunionen bilden.

d) Der Einfluss von Cyanid und Azid auf die Bruchwirkung von AAF

1. Die Wirkung von Azidvorbehandlung auf die Aberrationsrate

Azid wirkt wie DNP, Halogenphenole und andere Agenzien als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung von der Atmung (Lorna J. Lilly, 1956). Gleichzeitig hemmt es die Cytochromoxydaseaktivität und wirkt also als Atmungshemmstoff. Damit ist zu erwarten, dass nach Azidvorbehandlung keine oder nur wenige Brüche entstehen, weil die Phosphorylierung nicht mehr spielt. Diese Wirkung sollte noch verstärkt werden, wenn die Atmungsvorgänge zur Bruchinduktion notwendig sind.

Die Ergebnisse nach 2 h NaN_3 (10^{-3}M) Vorbehandlung und anschliessender dreistündiger Behandlung mit 18 mg AAF zeigen nach 5 bzw. 6 h keine Brüche, nach 23 h aber 14,0% B' und 3,5% B''.

Es ist recht schwierig, eine Erklärung dieser Vorgänge zu geben, da verschiedene Prozesse nebeneinander ablaufen, die nicht einzeln erfasst werden können. Vergleichen wir die Azidwirkung mit den Ergebnissen der DNP-Behandlung, so lassen sich ähnliche Resultate feststellen. Nach DNP-Behandlung wurden nach 25 h 19,5% B', 4,3% B'', 8,6% R' und 4,3% R'' festgestellt, während bis 25 h nur wenig Aberrationen auftraten. Es werden also sowohl nach Azid- wie nach DNP-Behandlung Brüche induziert, die aber später manifest werden. Eine Erhöhung der Restitution kann als Ursache dieser Resultate kaum in Betracht kommen. Es ist aber möglich, dass die Wirkung des Azids in einem Mitosestop liegt, so dass die Brüche später sichtbar werden.

2. Die Beeinflussung der Bruchwirkung von AAF durch Cyanid

Seitenwurzeln von *Vicia faba* wurden während 2 h mit 10^{-3}M Kaliumcyanidlösung und anschliessend mit 10 mg AAF behandelt. Während des Versuches wurden die Lösungen belüftet. Blindversuche mit Cyanid zeigten nur wenige Chromosomenaberrationen.

Die Cyanidvorbehandlung ergab eine relativ grosse Bruchrate für B' und C_1 , wobei die letzteren Chromosomenbrüche sind (Tab. 20). Gleichzeitig liegt die Zahl der Reunionen in allen drei Zeiten ziemlich hoch, es

Tabelle 20

Die Wirkung von Cyanidvorbehandlung auf die Bruchwirkung von AAF

EZ/h	B' %	C ₀ %	C ₁ %	Reunionen %	Analysierte Zellen
24	11,1	—	7,4	3,7 R''	27
30	10,3	3,4	13,8	6,9 SR	29
49	3,7	5,6	13,2	5,6 SR / 1,9 R'	53

sind vor allem SR, R' und R''. Diese Resultate sind nicht zu erwarten, wenn die Atmung zur Bruchinduktion des AAF notwendig ist. Cyanid hemmt aber nebst der Atmung auch die Catalaseaktivität (Levan und Wangenheim, 1952; Lorna J. Lilly, 1956, 1958). Es könnte also intrazellulär gebildetes Peroxyd gespeichert werden. Die phosphorylierenden Prozesse werden durch Cyanid nicht beeinflusst, deshalb können die entstandenen Brüche Reunionen eingehen. Es könnte also angenommen werden, dass die Brüche nicht allein durch AAF entstanden sind, sondern sekundär aus dem akkumulierten Peroxyd resultieren, da letzteres nicht gespalten werden kann. Es ist kaum möglich, die unterschiedlichen Resultate aus der Cyanid- und Azidbehandlung in Zusammenhang zu bringen. Es scheint aber, dass die Atmung keine spezifische Wirkung auf den Einfluss von AAF ausübt.

Ähnliche Resultate wurden von Michaelis und Rieger (1960) nach Myleranbehandlung von *Vicia*-Wurzelspitzen erzielt, hier bewirkte die Atmungshemmung keine Senkung der Aberrationsrate.

IV. Diskussion

1. Die Sensibilität der Chromosomen während des Mitosezyklus gegenüber radiomimetischen Stoffen und Röntgenstrahlen

Wie aus den experimentellen Ergebnissen hervorgeht, zeigen die Chromosomen von *Vicia faba* in der mittleren Interphase die höchste Sensibilität gegenüber AAF. Die Behandlung von Mitosezellen ist dagegen nur sehr wenig wirksam. Entsprechend wirken Urethanbehandlung (Deufel, 1951, 1952), Acetaldehyd (Rieger und Michaelis, 1960) und Unterwasserquellung der Samen (Rieger und Michaelis, 1958). Bei diesen Behandlungen ist ebenfalls eine maximale Bruchrate in der mittleren Interphase festzustellen, während für DEPE, Di-(2chloroethyl)-methylanilin und HN₂ (Revell, 1952; Ford, 1949), Myleran (Moutschen,

1958) und Ethylenimin (Ockey, 1960) in der frühen Interphase wirken. Im Gegensatz zu diesen Resultaten erscheinen nach Bestrahlung mit Röntgen- und α -Strahlen die ersten Aberrationsmaxima zu einem früheren Zeitpunkt. Ein erster Gipfel für B' wird kurze Zeit nach der Bestrahlung ermittelt (Thoday, 1952, 1954), woraus geschlossen wird, dass die Chromatiden kurz vor dem Eintritt in die Mitose am empfindlichsten auf Strahlen reagieren (Sparrow und Maldawer, 1950). Die Wirkung von Röntgenstrahlen lässt sich somit am ehesten mit EOC vergleichen, das ebenfalls in der späten Interphase die grösste Wirkung zeigt.

Ganz allgemein stellen wir also fest, dass AAF und eine ganze Reihe anderer radiomimetischer Stoffe früher in der Interphase wirken als Röntgenstrahlen. Die Bruchmaxima treten nach Chemikalienbehandlung im allgemeinen später auf.

Die Unterschiede zwischen Chemikalien und Strahlenwirkung bestehen aber nicht nur im Zeitpunkt der Einwirkung, sondern auch in der relativen Häufigkeit der induzierten Aberrationstypen. Nach Röntgenbestrahlung sind nach kurzen Erholungszeiten vor allem B' und Isolocusbrüche mit SR, nach längeren EZ vorwiegend Isolocusbrüche ohne SR festzustellen (Thoday, 1952). Die Isolocusbrüche ohne SR (B'') werden, nach den Versuchsergebnissen zu schliessen, in ungeteilten Chromosomen, also in der frühen Interphase, induziert. Die Isolocusbrüche mit SR erscheinen zur gleichen Zeit wie die B', woraus Thoday folgert, dass sie in geteilten Chromosomen induziert worden sind.

Die nach Chemikalienbehandlung induzierten Brüche treten vor allem als Isolocusbrüche auf. So fand Rieger (1960, 1961) nach Äthylalkoholbehandlung ausschliesslich B'', die zwischen 18 und 24 h nach der Behandlung im Maximum festgestellt wurden. Diese B'' wurden also in der frühen Interphase induziert. Ähnliche Ergebnisse werden nach Myleran- bzw. HN2-Behandlung erzielt (Rieger, 1961). Weil ausschliesslich Chromatidreunionen gebildet werden und keine freien B' auftreten, folgern Rieger und Michaelis, dass die Brüche während der Duplikation offen bleiben.

AAF verhält sich in bezug auf die Aberrationstypen anders als andere Radiomimetica. Die freien B' treten nicht nur in der X₁, sondern auch in der X₂ gehäuft auf. Die B' in der X₁ können als Chromatidaberrationen interpretiert werden, die in der X₂ zu Chromosomenbrüchen führen, während die B' in der X₂ aus Subchromatidaberrationen resultieren. AAF wirkt also sowohl auf subchromatidaler wie auch auf chromatidaler Basis.

Allerdings werden auch nach Behandlung mit andern Radiomimetica Subchromatidbrüche gefunden, so nach Urethan- (Deufel, 1952), EOC- (Kihlman, 1955) und Phenoleinwirkung (Levan und Loft, 1948).

Ähnlich wie nach AAF-Behandlung konnten Pseudochiasmata festgestellt werden, die nach EOC- bzw. Urethanbehandlung nach 2 h EZ auftraten. Es handelt sich also bei diesen Pseudochiasmata wie bei den durch AAF induzierten um post-split Subchromatidaberrationen, wie sie bereits beschrieben wurden (S. 112). Freilich erscheinen die Urethan- bzw. EOC-induzierten Pseudochiasmata früher als die AAF-induzierten. Qualitativ sind aber keine Unterschiede festzustellen.

Nach Röntgenbestrahlung wurden ebenfalls Pseudochiasmata gefunden, so im Endosperm von *Scilla sibirica* (La Cour und Rutishauser, 1953, 1954), in der Meiose von *Vicia faba* (Peacock, 1961), in *Vicia faba*-Wurzelspitzen (Revell, 1959) und anderen. Die nach EOC-Behandlung gefundenen Subchromatidbrüche wurden in der Prophase, und zwar nur während einer beschränkten Zeitspanne, induziert. Die gleichen Ergebnisse wurden von La Cour und Rutishauser (1953, 1954) nach Röntgenbestrahlung im Endosperm von *Scilla* ermittelt. Nach La Cour und Rutishauser werden Subchromatidbrüche durch Prophasebehandlung aber nicht während der Interphase oder Metaphase induziert. Demgegenüber lassen AAF-behandelte Interphasen-Subchromatidbrüche erkennen.

Wie schon in der Besprechung der Experimente mit AAF gezeigt wurde, bilden die gebrochenen Chromosomen nur wenige Reunionen bzw. Rekombinationen. Revell (1952) stellt im Gegensatz zur AAF-Wirkung fest, dass chemisch induzierte Brüche erhöhte Tendenz zu Translokationen zeigen. Revells Untersuchungen an DEPE und Diepoxyd ergeben ein konstantes Verhältnis der $R' : B''$. Wie schon erwähnt wurde, treten auch nach Acetaldehyd- und Äthylalkoholbehandlung nur wenige freie B' auf, da die meisten an Reunionen beteiligt sind (Rieger und Michaelis, 1960). Aus diesen Ergebnissen folgt, dass verschiedene Chemikalien nicht nur qualitative Unterschiede in der Wirkung zeigen, sondern dass auch ihr Wirkungsmodus verschieden ist.

Zusammenfassend kann also über die Wirkung radiomimetischer Stoffe ausgesagt werden, dass sie vorwiegend in der frühen Interphase wirken, während sie Mitosezellen kaum schädigen. Die zeitliche Übereinstimmung in bezug auf die maximale Sensibilität der Zellen scheint aber nicht allein vom Wirkungsmodus einzelner Chemikalien abzuhängen, sondern von der Wirkung der Chemikalien ganz allgemein. Revell (1952) bezeichnet die Wirkung als indirekt, ich würde sie eher als Fernwirkung ansprechen. Ionisierende Strahlen können sowohl direkt im Sinne der Treffertheorie wie auch indirekt über gebildete Radikale wirken, wobei der Effekt wenig vom stoffwechselphysiologischen Zustand der Zelle abhängt. Im Unterschied zum Strahleneinfluss wirken Radiomimetica vermutlich indirekt über veränderte stoffwechselphysiologische Zustände der Zelle.

2. Lokalisierung der Brüche

Wie bereits bei der Besprechung der Resultate gezeigt wurde, sind die Aberrationen nach Röntgenbestrahlung mehr oder weniger gleichmässig über das Genom verteilt, während AAF-Behandlung Anhäufungen in bestimmten Regionen der M-Chromosomen zeigt. Ebenso sind die M-Chromosomen nach Myleran- bzw. Äthylalkohol- und HN2-Behandlung vermehrt am Bruchgeschehen beteiligt (Moutschen, 1958; Rieger 1960, 1961). Die gleiche Bruchverteilung könnte für AAF festgestellt werden, wobei in den M-Chromosomen mehr Brüche auftraten, als entsprechend dem Längenverhältnis $M:L_n = 5:2$ erwartet wurde. Dies deutet auf eine Lokalisierung der Brüche hin.

In andern Fällen wurde das L_n -Chromosom bei *Vicia faba* häufiger gebrochen als das M, so zum Beispiel nach Behandlung mit Urethan (Deufel, 1952), Schwermetallsalzen (Gläss, 1956) und kombinierter Behandlung von Urethan mit Neutralsalzen (Deufel, 1951).

Gewisse Chemikalien schädigen bevorzugt heterochromatische Bezirke. Nach Untersuchungen von Gläss (1956), Moutschen (1958) und nach eigenen Ergebnissen weisen die M-Chromosomen in der Mitte des langen Armes schmale heterochromatische Regionen auf. Diese Zonen wurden häufiger gebrochen durch Urethan und Urethanderivate (Kihlman, 1960), Schwermetallsalze (Gläss, 1956), Phenylnitrosamine (Kihlman, 1961), Maleinhydrazid (McLeish, 1952) und andere Agenzien. Für die AAF-Wirkung ist keine sichere Zuordnung der Brüche zum Heterochromatin möglich. Die Aberrationen treten eher in der Umgebung von H-Zonen gehäuft auf.

Die Ursachen der Lokalisation der Brüche sind unbekannt. Gottschalk (1951), Marquardt (1949, 1950) und Oehlkers (1952) nehmen an, dass das lokalisierte Auftreten von Brüchen auf zellphysiologische Störungen zurückgeht, die als Primäreffekte anzusehen seien. Durch Behandlung mit Chemikalien würde ein physiologischer Zustand herbeigeführt, der sich störend auf die Chromosomenstruktur auswirkt. Da aber zellphysiologische Zustände grösstenteils durch Fermente gesteuert werden, könnte die Wirkung der Radiomimetica in einer Interferenz mit Fermentsystemen liegen. Für diese Annahme spricht die vermehrte Sensibilität der Chromosomen in der mittleren Interphase, also zu einem physiologisch äusserst aktiven Zeitpunkt. Es ist daher möglich, dass die Zonen um das Heterochromatin chemisch besonders aktiv sind und deshalb vermehrt mit gewissen Radiomimetica reagieren.

3. Der Einfluss variabler Umweltsbedingungen auf die Wirkung von Röntgenstrahlen und Chemikalien

Röntgenstrahlen können durch Milieuveränderungen in ihrer Wirkung nur beschränkt beeinflusst werden. Die grösste Wirkung zeigt Anaerobiose, bei der die Bruchwirkung sehr stark abnimmt (Wolff und Atwood, 1954). Die Grösse des Sauerstoffeffektes ist aber abhängig von der Iondichte der Strahlen, wobei mit abnehmender Ionendichte der Sauerstoffeffekt zunimmt (Swanson, 1955). Andererseits nimmt die Bruchrate zu, bei zunehmendem Sauerstoffgehalt des Mediums bis zu 21% (Giles, Beatty und Riley, 1952). Entsprechende Resultate zeigen sich auch nach Behandlung mit EOC (Kihlman, 1952) und Phenylnitrosaminen (Kihlman, 1961), während die Wirkung des alkylierenden DEPE und Urethan durch variierenden Sauerstoffgehalt des Mediums nicht verändert wird (Kihlman, 1960). Giles und Riley führen die O₂-Wirkung auf eine Beeinflussung des Zellstoffwechsels zurück, bei der die Sensibilität der Chromosomen verändert werden soll.

Wie aus der Darstellung meiner Experimente hervorgeht, zeigt auch AAF eine deutliche sauerstoffabhängige Wirkung. In Anaerobiose werden durch AAF nur wenige Aberrationen induziert (Tab. 7). Die Wirkung unter partieller Anaerobiose kann aber durch Zugabe von Peroxyd verändert werden, wodurch die Bruchrate erheblich gesteigert wird. Die Erklärung von Giles und Riley könnte deshalb auf die anaerobe Wirkung von AAF übertragen werden.

Sauerstoffmangel wirkt allerdings auch blockierend auf die oxydative Phosphorylierung. In Anaerobiose wird weniger anorganisches Phosphat in organische Bindung gebracht. Es ist daher nicht sicher, ob Anaerobiose als solche wirkt oder ob sekundäre Erscheinungen die Bruchwirkung beeinflussen. Die Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung von der Atmung mit DNP, sofern sie vor der AAF-Behandlung erfolgt, reduziert die Bruchrate (Abb. 16). In gleicher Weise werden EOC und Maleinhydrazid in ihrer Wirkung eingeschränkt, während bei DEPE die Brüche verspätet auftreten. Phenylnitrosamine werden dagegen in ihrer Wirkung nur schwach beeinflusst (Kihlman, 1961; Rieger, 1961), und das alkylierende Myleran zeigt keine Einbusse der Wirksamkeit nach DNP-Vorbehandlung. Somit ist die Myleranwirkung eher mit dem Einfluss von Röntgenstrahlen nach DNP-Vorbehandlung vergleichbar.

Diese Resultate zeigen, dass das Bruchgeschehen bei Chemikalien, wenigstens zum Teil, vom Gehalt energiereicher Phosphate abhängig ist (Beatty und Beatty, 1960). Bruch und Reunion sind zwei zeitlich gesonderte Vorgänge, die experimentell voneinander getrennt werden

können (Wolff und Atwood, 1954; Wolff und Luippold, 1958). Wolff schliesst aus seinen Experimenten, dass energiereiche Phosphate die Energie für das Bruch- und Reunionsgeschehen liefern (Cohn, 1958, 1961). Tatsächlich können die Reunionen durch Zugabe von ATP zur Behandlungslösung bei AAF gefördert werden. Gleichzeitig lässt sich damit auch die Entkoppelungswirkung von DNP im AAF-Experiment aufheben (Abb. 16). Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass das Bruchgeschehen weitgehend von der Reunionsfähigkeit der Chromosomen abhängt.

4. Allgemeine Betrachtungen über die mögliche Wirkungsweise von AAF

AAF kann nicht allein als radiomimetisches Agens geprüft werden, da es sich, wie schon gezeigt wurde, nicht in wässrige Lösung bringen lässt. Verschiedene Purine erhöhen aber die Löslichkeit heterozyklischer und polyzyklischer Verbindungen (Booth und Boyland, 1953; Kihlman, 1951). Zur Herstellung einer wässrigen AAF-Lösung wurde eine gesättigte Coffeinelösung verwendet. Somit stellt also die AAF-Wirkung das Resultat einer mit Coffein kombinierten Behandlung dar. Da Coffein nach Booth und Boyland Komplexe mit wasserunlöslichen Verbindungen eingeht, ist es nicht klar, in welcher Form AAF in die Zellen gelangt.

Die unterschiedliche Sensibilität der Zellen während des Mitosezyklus und das gehäufte Auftreten der Brüche im Zeitpunkt der Duplikation lassen vermuten, dass die Bruchwirkung mit dem Nukleinsäurezyklus zusammenhängt. Nach Howard und Pelc (1952) findet 8 h vor der Prophase und 12 h nach der Telophase kein Einbau von P^{32} statt, folglich nehmen die beiden Autoren die DNS-Synthese während etwa 6 h zwischen den beiden Zeiten an. Die mit AAF durchgeführten Versuche lassen aber vorderhand keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Bruchinduktion und Nukleinsäurezyklus erkennen. Ein Mitosezyklus dauert bei 19 °C ungefähr 24 h (Neary et al., 1959) und nicht 30 h, wie von Howard und Pelc angenommen wird. Somit haben wir keine genaue Vergleichsmöglichkeit der Zeiten. Zudem ist nicht bekannt, wie oben erwähnt wurde, in welcher Form AAF in die Zelle gelangt und dort wirkt. Diese Frage lässt sich wahrscheinlich erst mit markiertem AAF und Autoradiographie lösen.

Es ist möglich, dass AAF über Fermentsysteme wirkt, indem es das Zusammenspiel von Fermenten oder ihre Synthese beeinflusst. Diese Interpretation wird durch die Ergebnisse der Entkoppelungsversuche mit Dinitrophenol gestützt, in denen die Abhängigkeit der Bruchwirkung vom Gehalt energiereicher Phosphate gezeigt werden konnte. Ferner weist die unter Anaerobiose verminderte Wirkung von AAF auf eine indirekte Beeinflussung der Chromosomen hin.

Wir kommen zum Schluss, dass aus den durchgeführten Experimenten keine sicheren Folgerungen auf die Art der Bruchwirkung von AAF gezogen werden können. Es stehen aber verschiedene Möglichkeiten offen, wonach die Wirkung indirekt über Fermentsysteme erfolgt.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die cytologische Wirkung von *Acetylaminofluoren* (AAF) bei *Vicia faba*-Wurzelspitzenchromosomen untersucht.

1. Der Mitoseindex AAF-behandelter Wurzeln nimmt bis 6 h nach der Behandlung ab; gleichzeitig erfolgt eine Erhöhung der relativen Zahl der Prophasen, während ihr absoluter Anteil geringer ist. Die Prophase wird nach AAF-Behandlung blockiert, womit weniger Zellen in die Metaphase eintreten.
2. Die Brüche, vor allem B', treten in 2 Maxima auf. Das erste zwischen 11 und 15 h und das zweite nach 33 bis 39 h. Die Zellen reagieren auf AAF in der mittleren Interphase am empfindlichsten. Das Erscheinen von Chromatidbrüchen in der X_2 kann mit der Induktion von *Subchromatidbrüchen* erklärt werden. Pseudochiasmata wurden in der X_1 gehäuft nach 10 h und vereinzelt nach 15 h festgestellt, also 24 h vor dem zweiten Maximum der B'. Die in der X_2 auftretenden B' können somit als post-split Subchromatidaberrationen bezeichnet werden, wofür das Auftreten der Pseudochiasmata *vor* dem ersten Maximum der B' spricht. Es ist aber nicht möglich, alle Brüche auf Subchromatidaberrationen zurückzuführen.
3. Nach AAF-Behandlung wurden nur wenige Reunionen gefunden. Die festgestellten Reunionen erfolgten vorwiegend auf chromatidaler Basis.
4. Die H-Ionenkonzentration der Behandlungsflüssigkeit beeinflusst die chromosomenbrechende Wirkung von AAF. pH 6 zeigt dabei die grösste Wirkung, während bei pH 4 vermehrt Stickiness zu beobachten ist.
5. Die Behandlung in partieller Anaerobiose vermindert die Wirkung von AAF. In N_2 -Atmosphäre ist eine Reduktion der Bruchrate festzustellen, die durch Zugabe von Peroxyd auf die ursprüngliche Grösse gebracht werden kann.

Stickstoffbehandlung ohne AAF führt ähnlich wie Colchicin zu C-Mitosen.

6. Konzentrationen von 18 mg AAF zeigen durchwegs die grössere Wirkung als die Behandlung mit 10 mg. Höhere Konzentrationen können aus technischen Gründen nicht verwendet werden, da zur Lösung des AAF zu viel Coffein benötigt wird und die Zellen damit ihre Teilung einstellen. Bei höheren Konzentrationen treten nach längeren Erholungszeiten mehr Zellen mit Aberrationen und mehr freie Brüche pro Zelle auf.
7. Die Wirkung von AAF ist bei tiefer Temperatur (10 °C) bei gleichbleibender Konzentration und gleichem pH grösser als bei 20 °C. Die Wirkungsunterschiede bei 10 °C bzw. 20 °C sind aber nicht während aller Erholungszeiten gleichförmig.
8. Bei kombinierter Behandlung mit AAF und Manganchlorid treten während eines beschränkten Zeitintervalls mehr Reunionen auf als nach normaler AAF-Einwirkung. Es ist anzunehmen, dass durch die vermehrte Produktion energiereicher Phosphate der Reunionsvorgang gefördert wird.
9. Die Brüche erscheinen nach AAF-Behandlung ohne Stoffwechselinhibitoren vermehrt in den M-Chromosomen. Die Verteilung erfolgt nicht nach dem Verhältnis der Chromosomenlängen $M:L_n = 5:2$. Die Unterschiede sind aber nicht durchwegs gesichert.
10. Die Aberrationen treten in den M-Chromosomen gehäuft in den mittleren Regionen auf. In diesen Regionen wurden auch heterochromatische Stellen festgestellt. Eine genaue Zuordnung der Brüche zum Heterochromatin lässt sich aber nicht durchführen. Es scheint, dass die Brüche gehäuft in der Umgebung heterochromatischer Bezirke auftreten.
11. Vorbehandlung mit DNP entkoppelt die oxydative Phosphorylierung von der Atmung und bewirkt eine Reduktion der Bruchrate. Das Bruch- und Reunionsgeschehen ist also von der oxydativen Phosphorylierung abhängig. Der DNP-Effekt kann durch Zugabe von ATP aufgehoben werden. Zugleich können vermehrt Reunionen als SR, R'' und Triradiale festgestellt werden. Die gleichen Erscheinungen wurden auch nach Manganchloridbehandlung beobachtet (8).
12. Die Hemmung der Atmung durch Cyanid und Azid zeigt unterschiedliche Resultate. Nach kombinierter Behandlung mit Azid und AAF wird die Bruchrate stark herabgesetzt, steigt aber nach 23 h wieder an. Kombinierte Cyanid- und AAF-Behandlung ergibt dagegen viele Brüche und Reunionen. Diese Bruchwirkung kann als Folge des gespeicherten Peroxyds in der Zelle angesehen werden. Es ist aber anhand der durchgeführten Experimente nicht möglich, eine eindeutige Wirkung der Atmungsvorgänge auf das Bruch- und Reunionsgeschehen festzustellen.

Summary

In the present paper the cytological effect of 2-Acetylaminofluorene (AAF) on the root tip chromosomes is studied.

1. The mitotic index of AAF-treated roots declines until 6 h after treatment. At the same time a raise in the relative number of prophases follows, meanwhile its absolute part is lower. Prophase seems to be blocked after the treatment with AAF so that fewer cells enter into metaphase.
2. The breaks, mainly B', appear in 2 maxima. The first between 11 and 15 h and the second after 33 to 39 h. Thus the cells are most sensible in interphase. The appearance of chromatid breaks in X_2 can be explained with the induction of subchromatid breaks. In X_1 pseudochiasmata could be found after 10 h and sporadically after 15 h, that means 24 h before the second maximum of B'. Consequently the B' which appear in X_2 can be regarded as post-split subchromatid aberrations, what seems to be confirmed by the appearance of pseudochiasmata before the first maximum of B'. But it is not possible to derive all breaks from subchromatid aberrations.
3. AAF-treatment involves only few reunions. Most of the detectable reunions occurred preferentially on chromatidal base.
4. The H-ion concentration of the treatment solution influences the chromosome breaking effect of AAF. pH 6 shows the greatest effect while stickiness is often to be seen at pH 4.
5. The treatment in partial anaerobiosis reduces the breaking effect of AAF. In nitrogen atmosphere a reduction in the breaking rate can be observed. This effect can be brought to its original size by means of adding hydroperoxyde. Treatment with nitrogen without AAF leads to C-mitoses as does colchicine.
6. Concentrations of 18 mg AAF show without doubt a greater effect than the treatment with 10 mg. Greater concentration can not be employed due to technical difficulties. With higher concentration (18 mg) there appear, after a considerable recovery time, more cells with aberrations and more free breaks per cell.
7. The effect of AAF is greater in lower temperatures (10 °C) than in 20 °C considering uniform concentrations and same pH. But the differences are not constant during all recovery times.
8. Combined treatment with AAF and manganeseous chloride show more reunions during a limited time interval than after a normal AAF-treat-

ment. It can be supposed that an increased production of energy-rich phosphates influences the process of reunion.

9. AAF-treatment without respiratory inhibitors involves a preferential distribution of breaks in the M-chromosomes. The distribution does not happen according to the chromosome length ratio $M:L_n = 5:2$. But the differences are not always secured.
10. The aberrations appear often in the middle parts of the M-chromosomes. In these regions also have been found heterochromatic spots. But an exact adjoint of the breaks to heterochromatin can not be done. It seems that the breaks often appear nearby heterochromatic segments.
11. Pre-treatment with DNP encouples the oxydative phosphorylation from respiration and involves a reduction of the breaking rate. Thus, the breakage- and reunion process depends on the oxydative phosphorylation. The DNP-effect can be restored by means of adding ATP. At the same time, increasingly, reunions can be found, as SR, R' and triradials.
12. The inhibition of respiration caused by cyanide and azide show different results. After combined treatment with azide and AAF the breaking rate is considerably reduced but raises again after 23 h. On the contrary a combined treatment with cyanide and AAF produces many breaks and reunions. These breaks can be explained as a consequence of stored peroxyde in the cell. But it is not possible to assure an effect of the respiration on the breakage- and reunion process.

Literaturverzeichnis

- Alexander P. 1959. Radiation imitating chemicals. *Scientific American* 1959, Jan.
- und Fox A. 1952. Differences in the reaction of macromolecules with X-rays and a nitrogen mustard. *Nature* **169**, 572.
- Allison J. et al. 1952. Some effects of 2-AAF on the dog. *Cancer Res.* **12**, 305.
- D'Amato F. D. und Gustafsson A. 1948. Studies on the experimental control of the mutation process. *Hereditas* **34**, 335.
- 1949. Sull'attività mutagena e sul tipo di mutazioni cromosomiche indotte dall'acenaphthene. *Caryologia* **1**, 201–208.
- et al. 1956. Metabolism and spontaneous mutation. *Adv. in Genet.* **8**, 1–18.
- Ambrose E. J. 1952. Molecular orientation and chromosome breakage. *Heredity Suppl.* **VI**, 277.
- Auerbach Ch. 1950. Some recent results with chemical mutagens. *Hereditas* **37**, 1–16.
- 1950. -SH-poisoning and mutation. *Experientia* **6**, 17.
- 1958. Mutagenic effects of alkylating agents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **68**, 731–736.
- und Moser H. 1950. Production of mutations by monochlormustards. *Nature* **166**, 1019–1020.
- Avanzi M. G. 1950. Osservazioni sull'attività citologica di alcuni composti chimici. *Caryologia* **3**, 234–248.
- 1950. Frequenza e tipi di aberrazioni cromosomiche indotte da alcuni derivati dell'alfa-naftalene. *Caryologia* **3**, 165–180.
- Bacq Z. M. und Alexander P. 1955. *Fundamentals of Radiobiology*. Butterworths Scientific Publications, London.
- Baeckeland E. 1959. Contribution de l'action cellulaire du Myleran. *Bull. Acad. roy. Méd. Belg.*, sér. **6/24**, 141–177.
- Battaglia F. 1950. Nuove sostanze inducenti fragmentazione cromosomica. *Pubbl. Staz. Zool. Nap.*, Suppl. **22**, 125–157.
- Bauch R. 1948. Irreversible Chromosomenschädigungen durch Trypaflavin. *Planta* **35**, 536–554.
- Beatty A. V. und Beatty J. W. 1960. Postirradiative effects on chromosomal aberrations in *Tradescantia* microspores. *Genetics* **45**, 331–344.
- Bielschowsky F. 1944. Distant tumours produced by 2-AAF. *Brit. J. Exp. Path.* **25**, 1–4.
- Booth E. und Boyland E. 1953. The reaction of the carcinogenic dibenzcarbazoles and dibenzacridines with purines and nucleic acid. *Biochem. et Biophys. Acta* **12**, 75.
- Bowen C. und Wilson G. B. 1954. A comparison of the effects of several antimutagenic agents. *J. of Heredity* **45**, 3–9.
- Boyland E. 1958. The biological examination of carcinogenic substances. *Brit. Med. Bull.* **14**, 24.
- Brauer I. 1949. Experimentelle Untersuchungen am Wurzelmeristem von *Vicia faba*. II. Einfluss des Milieus. *Planta* **36**, 466–477.
- Chury J. und Slouka F. 1949. The effects of bromine on mitosis in root tips of *Allium cepa*. *Nature* **163**, 27.
- Cohn N. S. 1958. An analysis of the rejoining of X-ray induced ends of chromosomes in *Allium cepa*. *Genetics* **43**, 362–372.
- 1961. Production of chromatid aberrations by diepoxybutane and an iron chelator. *Nature* **192**, 1093–1094.
- Darlington C. D. und Koller P. C. 1947. The chemical breakage of chromosomes. *Heredity* **1**, 187–221.
- und La Cour F. 1945. Chromosome breakage and nucleic acid cycle. *J. of Genetics* **46**, 180–251.

- Demerec M. 1948. Induction of mutations in *Drosophila* by 1,2,5,6-dibenzanthracene. *Genetics* **33**, 337–348.
- Deschner Eleanor und Sparrow A. H. 1955. Chromosome rejoining capacity with respects to breakage sensitivity to X-rays and thermal neutrons. *Genetics* **40**, 460–475.
- Deufel J. 1951. Untersuchungen über den Einfluss von Chemikalien und X-Strahlen auf die Mitose von *Vicia faba*. *Chromosoma* **4**, 239–272.
- 1952. Auslösungen von Chromosomenmutationen durch Äthylurethan in Abhängigkeit von der Konzentration. *Chromosoma* **4**, 611–620.
- Dustin P. Some new aspects of mitotic poisoning. *Nature* **159**, 794.
- Dyer H. M. 1955/56. A comparison of the patterns of excretion and the carcinogenicity in the rat of 2-AAF and related compounds. *J. of Cancer Inst.* **16**, 11–30.
- Ehrenberg L. 1960. Chemical mutagenesis: Biochemical and chemical points of view on mechanism of action. *Abh. DAW Kl. f. Med.* **1**, 124–136.
- Evans H. J. 1959. The effect of temperature on mitosis and on the action of colchicine in root meristem cells of *Vicia faba*. *Exp. Cell Res.* **18**, 51–61.
- 1961. Chromatid aberrations induced by gamma irradiation. II. Non randomness in the distribution of chromatid aberrations in *Vicia faba* root tip cells. *Genetics* **46**, 277–289.
- und Bigger T. R. 1961. Chromatid aberrations induced by gamma irradiation. I. The structure and frequency of chromatid interchanges in diploid and tetraploid cells of *Vicia faba*. *Genetics* **46**, 257–275.
- Ford C. E. 1949. Chromosome breakage in *Vicia faba* root tip cells. *Proc. 8th Int. Congr. Genetics*, 570.
- Galinsky I. 1948. The effects of certain phosphates on mitosis. *Genetics* **33**, 611.
- Giles N. H., Beatty A. und Riley H. P. 1952. The effects of oxygen on the production of chromosomal aberrations by fast neutron in *Tradescantia* microspores. *Genetics* **37**, 641–649.
- Gläss E. 1956. Die Verteilung von Fragmentationen und achromatischen Stellen auf den Chromosomen von *Vicia faba* nach Behandlung mit Schwermetallsalzen. *Chromosoma* **8**, 260–284.
- Goldacre R. J., Loveless A. und Ross W. C. 1949. Mode of production of chromosome abnormalities by the nitrogen mustards. *Nature* **163**, 667–669.
- Gottschalk W. 1951. Der Vergleich von röntgen- und chemisch induzierten Chromosomenaberrationen im Pachytän von *Solanum lycopersicum*. *Chromosoma* **4**, 342–358.
- Gray L. H. 1952. Characteristics of chromosome breakage by different agents. *Heredity Suppl.* **VI**, 311.
- und Scholes M. E. 1951. The effect of ionizing radiation on the broad bean root. Part VIII. Growth rate studies and histological analysis. *Brit. J. Radiol. N.S.* **24**, 82.
- Gustafsson A. 1960. Chemical mutagenesis. *Abh. DAW Kl. f. Med.* **1**, 14–29.
- Haddow E. 1958. Chemical carcinogens and their mode of action. *Brit. Med. Bull.* **14**, 79.
- Hemmerley J. und Demerec M. 1955. XIII. Tests of chemicals for mutagenicity. *Cancer Res.* **3**, Suppl. 69–75.
- Hohl K. 1947. Beeinflussung der Mitose durch Urethan. *Experientia* **3**, 109.
- Hosokawa T. 1960. Study on the participation of cell respiration in the mitosis of root tip cells. *American Naturalist*, 1960.
- Howard A. und Pelc S. R. 1952. Synthesis of DNA in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity Suppl.* **VI**, 261–273.
- Hungerford D. A. 1958. Cytological effects of prefixation treatment. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 391–400.

- Keck K. und Hoffmann-Ostenhof O. 1954. Über den chemisch induzierten Chromatinaustritt aus pflanzlichen Zellkernen. *Exp. Cell Res.* **7**, 111-124.
- Kihlman B. A. 1950. Induction of structural chromosome changes with adenine. *Hereditas* **36**, 103-105.
- 1951. The permeability of the nuclear envelope and the mode of action of purine derivatives on chromosomes. *Symb. Bot. Upsal.* **XI**, 5-39.
 - 1952. A survey of purine derivatives as inducers of chromosome changes. *Hereditas* **38**, 115-127.
 - 1955. Chromosome breakage in *Allium* by EOC and X-rays. *Exp. Cell Res.* **8**, 345 bis 365.
 - 1955. Oxygen and the production of chromosome aberrations by chemicals and X-rays. *Hereditas* **41**, 384-404.
 - 1956. Factors affecting the production of chromosome aberrations by chemicals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 543-555.
 - 1958. The effect of oxygen, NO and respiratory inhibitors on the production of chromosome aberrations by X-rays. *Exp. Cell Res.* **14**, 639-642.
 - 1959. Induction of structural chromosome changes by visible light. *Nature* **183**, 976-978.
 - 1960. The radiomimetic effect of N-nitroso-N-methylurethan in *Vicia faba*. *Exp. Cell Res.* **20**, 657-658.
 - 1961. Cytological effects of phenylnitrosamines. I. The production of structural chromosome changes in the presence of light and acridine orange. *Radiation Botany* **1**, 35-42.
 - 1961. II. Radiomimetic effects. *Radiation Botany* **1**, 45-60.
 - 1961. III. The effect of X-ray sensitivity to low oxygen tensions. *Radiation Botany* **1**, 51-60.
 - und Levan A. 1951. Localised chromosome breakage in *Vicia faba*. *Hereditas* **37**, 382-388.
- Koller P. C. 1958. Comparative effects of alkylating agents on cellular morphology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **68**, 783-801.
- La Cour F. 1952. The physiology of chromosome breakage and reunion in *Hyacinthus*. *Heredity Suppl.* **VI**, 163-179.
- und Rutishauser A. 1953. Chromosome breakage experiments with endosperm: Subchromatid breakage. *Nature* **172**, 163-179.
 - — 1954. X-ray breakage experiments with endosperm. I. Subchromatid breakage. *Chromosoma* **6**, 696-709.
- Levan A. 1949. The influence on chromosomes and mitosis of chemicals, as studied in the *Allium* test. *Hereditas Suppl.* **35**, 325-335.
- 1951. Chemically induced reactions in *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Symp. Cold Spring Harbor*, Vol. **XVI**.
 - und Loft J. 1948. Induction of chromosome fragmentations by phenols. *Hereditas* **34**, 453-484.
 - und Loft Th. 1950. Spontaneous chromosome fragmentation in seedlings of *Vicia faba*. *Hereditas* **36**, 470-482.
 - und Tjio J. 1951. Penicillin in the *Allium* test. *Hereditas* **37**, 306-324.
 - und von Wangenheim. 1952. Potassium cyanide in the *Allium* test. *Hereditas* **38**, 297-313.
- Lilly L. J. 1956. Effects of cyanide on the roots of *Vicia faba*. *Nature* **177**, 338.
- 1958. Effects of cyanide and ionizing radiation on the roots of *Vicia faba*. *Exp. Cell Res.* **14**, 257-267.

- Loveless A. 1951. Qualitative aspects of the chemistry and biology of radiomimetic substances. *Nature* **167**, 338–342.
- 1952. Chemical and biochemical problems arising from the study of chromosome breakage by alkylating agents and heterocyclic compounds. *Heredity Suppl.* **VI**, 299–317.
 - 1960. Some observations on the interaction between alkylating agents and phage and their relevance to the problem of chemical mutagenesis. *Abh. DAW Kl. f. Med.* **1**, 71–75.
 - und Revell H. S. 1949. New evidence on the mode of action of mitotic poisons. *Nature* **164**, 938.
- Marquardt H. 1949. Qualitative Auswertungen eines Versuches zur Auslösung von Chromosomenmutationen durch Äthylurethan-Kaliumchlorid-Gemisch. *Experientia* **5**, 443.
- 1950. Neuere Auffassung über einige Probleme aus der Pathologie der Kernteilung. *Naturwissenschaften* **37**, 416–424.
- McLeish J. 1952. The action of maleic hydrazide in *Vicia faba*. *Heredity Suppl.* **VI**, 125–136.
- 1954. The consequence of localized chromosome breakage. *Heredity* **8**, 385–407.
- Michaelis A. K., Ramshorn K. und Rieger R. 1959. Äthylalkohol als radiomimetisches Agens bei *Vicia faba*. *Naturwissenschaften* **46**, 381–382.
- und Rieger R. 1958. Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem von *Vicia faba*. II. Preferentielle Verteilung der chromosomalen Bruch- und Reunionspunkte nach anaerober Quellung der Samen. *Chromosoma* **9**, 514–536.
 - — 1960. Einige experimentelle Ergebnisse zur Wirkung von Myleran auf die Chromosomen von *Vicia faba*. *Züchter* **30**, 150.
- Moutschen J. und M. 1958. Sur l'évolution des lésions causées par EOC chez *Hordeum sativum* et *Vicia faba*. *Hereditas* **44**, 18–36.
- 1958. L'action du Myleran sur les chromosomes chez *Hordeum sativum* et *Vicia faba*. *Hereditas* **44**, 415–446.
 - 1959. Chromosome deficiencies induced with Myleran. *Experientia* **15**, 310–311.
 - 1960. Action combinée du Myleran et des rayons X et son importance au point de vue génétique. *Hereditas* **46**, 471–480.
 - und Ehrenberg L. 1959. Chromosome disturbances and mutations produced in plant-seeds by oxygen at high pressures. *Hereditas* **45**, 2–3.
- Neary G. J., Evans J. und Tonkinson S. M. 1959. Radiation induced mitotic delay. *J. Genetics* **56**, 917.
- Nilan R. A. 1955. Postradiation storage effect on chromosomes in barley seeds X-rayed at normally ineffective dosages. *Genetics* **40**, 588.
- Ockey Ch. 1957. A quantitative comparison between the cytotoxic effects produced by proflavine, acetylenimine and triethylene-melamine in root tips of *Vicia faba*. *J. of Genetics* **55**, 525–550.
- 1960. Chromatid aberrations induced by ethyleneimine. *Abh. DAW Kl. f. Med.* **1**, 47.
- Oehlkers F. 1943. Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. *Z. f. Vererbungslehre* **81**, 313.
- 1946. Weitere Versuche zur Mutationsauslösung durch Chemikalien. *Biol. Zentralblatt* **65**, 176.
 - 1952. Chromosome breaks induced by chemicals. *Heredity Suppl.* **VI**, 95–105.
 - und Linnert G. 1949. Neue Versuche über die Wirkungsweise von Chemikalien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen. *Z. f. Vererbungslehre* **83**, 136.

- Oestergren G. 1948. Chromosome bridges and breaks by coumarin. *Botaniska Notiser* 4, 376-380.
- und Wakonig T. 1954. True or apparent subchromatid breakage and the true induction of labile states in cytological chromosome loci. *Botaniska Notiser* 4, 357-375.
- Peacock W. J. 1961. Subchromatid structure and chromosome duplication in *Vicia faba*. *Nature* 191, 832-833.
- Price C. H. 1958. Fundamental mechanisms of alkylation *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 68, 609.
- Read J. 1959. *Radiation Biology of Vicia faba* in relation to the general problem. Blackwell Sc. Publ. Oxford.
- und Kihlman B. A. 1956. Comparison of the effects of EOC and X-rays on the cytology and growth of roots of *Vicia faba*. *Hereditas* 42, 485.
- Revell H. S. 1952. Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in *Vicia faba*. *Heredity Suppl.* VI, 107-124.
- 1958. A new hypothesis for the interpretation of chromatid aberrations and its relevance to theories for the mode of action of chemical agents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 68, 802-810.
- 1959. The accurate estimation of chromatid breakage and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations by ionizing radiation. *Proc. Roy. Soc. (B)* 150, 563-589.
- Rieger R. und Michaelis 1959. Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem der Wurzelspitze von *Vicia faba*. III. Automutagene Stoffwechselprodukte. *Biol. Zentralblatt* 78, 291-307.
- und Michaelis 1959. Vergleichende Untersuchungen zur Verteilung durch verschiedene Mutagene induzierter Brüche über den Chromosomensatz von *Vicia faba*. *Chromosoma* 10, 163-178.
- und Michaelis 1960. Über die radiomimetische Wirkung von Äthylalkohol bei *Vicia faba*. *Abh. DAW Kl. f. Med.* 1, 54.
- und Michaelis 1960. Chromosomenaberrationen nach Einwirkung von Acetaldehyd auf die Primärwurzeln von *Vicia faba*. *Biol. Zentralblatt* 79, 1-5.
- und Michaelis 1961. Beziehungen zwischen dem Wurzelwachstum und der Sensibilität der Wurzelmeristeme gegenüber verschiedenen Radiomimetica bei *Vicia faba*. *Chromosoma* 11, 573-581.
- und Michaelis A. 1958. Der Einfluss der Unterwasserquellung auf die chromosomale Aberrationsrate. *Chromosoma* 9, 238-257.
- Röhrborn G. 1960. Chemische Konstitutionen und mutagene Wirkung. Klassifizierungsversuch chemischer Mutagene. *Experientia* 116, 523-529.
- Rosen G. 1954. Breaking of chromosomes by the action of elements of the periodical system and by some other principles. *Hereditas* 40, 258-263.
- Ross W. C. J. 1953. The chemistry of cytotoxic alkylating agents. *Adv. in Cancer Res.* 1, 397-450.
- Sandhya Mitra. Effects of X-rays on chromosomes of *Lilium longiflorum* during meiosis. *Genetics* 33, 771-789.
- Sharma A. and Sharma A. 1958. Recent advances in the study of chromosome structure. *The Bot. Rev.* 24, 511-539.
- Sparrow A. H. 1951. Radiation sensitivity of cells during mitotic and meiotic cycles with emphasis on possible cytochemical changes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 1508-1540.
- 1952. A cytological and cytochemical approach to an understanding of radiation damage in dividing cells. *Brit. J. Radiol.* 25, 182-188.
- und Maldawer M. 1950. Differential rejoining as a factor on apparent sensitivity of chromosomes to X-ray breakage. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 36, 636-643.

- Swanson C. P. 1955. Relative effects of qualitatively different radiations on the production of chromatid aberrations in air and nitrogen. *Genetics* **40**, 193-203.
- 1958. *Cytology and Cytogenetics*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J.
- Therman E. 1949. The action of pyrogallol on secondary constrictions. *Hereditas* **35**, 250-251.
- Thoday J. M. 1952. Sister-union isolocus breaks in irradiated *Vicia faba*. The target theory and physiological variation. *Heredity Suppl.* **VI**, 299-309.
- 1954. Radiation induced chromosome breakage, DNA-synthesis and the mitotic cycle in root meristem cells of *Vicia faba*. *New Phytologist* **53**, 511-516.
- Van't Hof J. und Wilson G. B. 1960. Studies on the control of mitotic activity. I. The use of colchicine in the tagging of synchronous populations of cells in the meristem of *Pisum sativum*. *Chromosoma* **11**, 313-321.
- Wada B. 1953. Effects of chemicals studied in *Tradescantia* cells in vivo. III. 2-amino-1,3-diazazulene, a chromosome doubling agent. *Cytologia* **18**, 266-276.
- Wilson G. B. 1950. Cytological effects of some antibiotics. *J. of Heredity* **41**, 227-231.
- und Morrison J. H. 1961. *Cytology*. Reinhold Publ. Corp. Chapman and Hall Ltd., London.
- und Sparrow A. H. 1960. Configurations resulting from isosubchromatid unions after meiotic and mitotic prophase irradiation. *Chromosoma* **11**, 229-244.
- Wilson R. H. 1946. The carcinogenic activity of 2-AAF. *Cancer Res.* **7**, 444-449.
- Wolff S. 1954. Delay of chromosome rejoining in *Vicia faba* induced by irradiation. *Nature* **173**, 501-502.
- 1960. Radiation studies on the nature of chromosome breakage. *American Naturalist*. Jan./Febr. 85.
- und Atwood K. C. 1954. Independent X-ray effects on chromosome breakage and reunion. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **40**, 188-192.
- und Luippold D. E. 1955. Metabolism and chromosome-break rejoining. *Science* **122**, 231-232.
- — 1958. Modification of chromosomal aberration yield by postirradiation treatment. *Genetics* **43**, 493-501.
- Woll E. 1953. Einwirkung von Nukleinsäuren und ihren Baustoffen auf die Wurzelspitzenmitose. *Chromosoma* **5**, 391-427.