Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 81 (1971)

Artikel: Chromosomenmutationen durch ein organisches Peroxyd

Autor: Keusch, Felix

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-57131

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: 03.10.2025

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

Ber. Schweiz. Bot. Ges. *81*, 180–272 (1971)

Chromosomenmutationen durch ein organisches Peroxyd

Untersuchungen an Wurzelmeristemzellen von *Vicia faba* sowie in einem Nebenversuch an *Ascites*tumorzellen der Maus zur Prüfung der Peroxydhypothese der indirekten Strahlenwirkung

Von *Felix Keusch*

(Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich)

Manuskript eingegangen am 3. März 1971

Inhalt

Seite

Einleitung und Problemstellung 181

Material, Methode und Terminologie 185

Resultate

I. Physiologische Vorversuche 192

II. Chromosomenmutagene und zytostatische Wirkung bei *Vicia faba* 197

III. Chromosomenmutagene Wirkung bei *Ascites*tumoren der Maus 246

Diskussion 251

Zusammenfassung 261

Summary 262

Literatur 264

Verzeichnis der Abkürzungen

c	=	Curie
DHMP	=	Dihydroxymethylperoxyd
DNS	=	Desoxyribonukleinsäure
EAC	=	Ehrlich-*Ascites*carcinom
G_1	=	präsynthetische Interphase
G_2	=	postsynthetische Interphase
^3H	=	Tritium
M	=	Mitose
MI	=	Mitoseindex
MIp	=	Prophasenmarkierungsindex
MI_{tot}	=	totaler Markierungsindex
S	=	DNS-Synthesephase
T	=	Gesamtmitosezyklusdauer
TdR	=	Thymidin

Einleitung und Problemstellung

Bei der Bearbeitung einer chemischen Stoffklasse auf ihre mutagene und zytostatische Wirkung kann bereits auf eine grosse Fülle von Befunden zurückgegriffen werden, die mit den verschiedensten physikalischen und chemischen Mutagenen erarbeitet worden sind. Chemische Agenzien, die die wichtigsten biologischen Endeffekte ionisierender Strahlen zu kopieren vermögen, das heisst Chromosomenaberrationen und Genmutationen induzieren, zytostatische Aktivität besitzen sowie Nukleinsäuren in vitro depolymerisieren, werden als «radiomimetisch» bezeichnet (Koller, 1954). Im weiteren Sinne wird der Terminus «radiomimetisch» auch dann verwendet, wenn zumindest Genmutationen und Chromosomenaberrationen ausgelöst werden (Rieger und Michaelis, 1967).

Mutagene werden für verschiedene biologische Zwecke verwendet. Die Wirkung von Radiomimetika und ionisierenden Strahlen wird ausgenützt, um wirtschaftlich oder therapeutisch vorteilhafte Effekte zu erzielen, in der Landwirtschaft bei der Erzeugung wirtschaftlich wertvoller Genmutationen (Gaul, 1963) und Chromosomenmutationen – zum Beispiel Translokationen zur Erzeugung von «gerichteten» Duplikationen oder verschiedene chromosomale Strukturumbauten zur Diploidisierung von Polyploiden (Gaul, 1963) –, in der Medizin bei der therapeutischen Bekämpfung verschiedenster Neoplasmen (Schindler, 1965), um nur einige der vielen Anwendungsgebiete zu nennen.

Trotz der weitgediehenen praktischen Nutzanwendung und der Fülle an theoretischem Wissen über die verschiedensten Mutagene ist es bislang nicht in einem einzigen Fall gelungen, eine lückenlose Reaktionskette aufzuzeigen, die zur Entstehung der chromosomalen Strukturveränderungen führt (Rieger und Michaelis, 1967). Dass Genmutationen die Folge von Veränderungen in der DNS-Komponente der Chromosomen darstellen, kann als gesichert gelten (Heslot, 1965). Für Chromosomenmutationen ist die Ableitung einer Kausalkette weit komplexer. Der Grund hiefür liegt im lückenhaften Wissen um den molekularen Aufbau der Chromosomen mit einer Reihe von verschiedenen Modellvorstellungen (Freese, 1958; Beermann, 1961; Taylor, 1963 und 1966; Hart, 1968), im Fehlen eindeutiger Kenntnisse um die Bedeutung der verschiedenen chemischen Bausteine der Chromosomen für die Aufrechterhaltung der Struktur (Kaufmann et al., 1960; Beermann, 1961; Krone et al., 1965; Rieger et al., 1968) und in der Tatsache, dass neben der DNS auch andere chemische Komponenten des Chromosoms mit physikalischen und chemischen Mutagenen reagieren (Kirby-Smith und Randolph, 1961; Kihlman, 1957; Kihlman et al., 1957). Obwohl dadurch die biologisch entscheidenden Reaktionen schwer erkennbar sind, kann zumindest für alkylierende Agenzien angenommen werden, dass der Ausgangspunkt der Aberrationsentstehung in Molekularläsionen an der chromosomalen DNS zu suchen ist (Evans und Scott, 1964 und 1969; Grant und Heslot, 1966; Matagne, 1969). Eine solche Annahme kann allerdings nur dann als Arbeitshypothese in Frage kommen, wenn durch das Mutagen tatsächlich Molekularläsionen an der DNS induziert werden und der Schritt von der molekularen Läsion der DNS-Doppelhelix zur zytologisch erfassbaren Strukturveränderung des Chromosoms experimentell fundiert erklärt werden kann. Hiezu sind folgende Tatsachen bekannt: Energiereiche Strahlen, alkylierende Agenzien und Antimetaboliten vermögen Molekularläsionen an der DNS zu induzieren, energiereiche Strahlen durch Brüche der Internukleotidbindungen,

Zerstörung und Abspaltung von DNS-Basen, Vernetzung («cross-linkage») innerhalb und zwischen den Polynukleotidsträngen sowie Denaturierung der DNS-Doppelhelix (Rieger und Michaelis, 1967), alkylierende Agenzien durch Brüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNS durch Basenalkylierung, Basenausfall, Phosphatalkylierung sowie – bei Verwendung polyfunktioneller Alkylierungsmittel – «cross-linkage»-Effekte zwischen den Polynukleotidketten der DNS-Doppelhelix durch N-7-Guaninalkylierung (Rieger und Michaelis, 1967), Antimetaboliten durch Störung der De-novo-Synthese von Purinen bzw. Pyrimidinen, Einbaufehler in die DNS sowie Beeinflussung der DNS-Polymerase (Rieger und Michaelis, 1967). Die grosse Lücke zwischen Molekularläsionen einerseits und chromosomalen Strukturveränderungen andererseits bleibt für energiereiche Strahlen und Antimetaboliten offen. Im Fall der Antimetaboliten glaubte man lange, das Bindeglied in der beobachteten DNS-Synthesehemmung gefunden zu haben (Taylor et al., 1962; Kihlman, 1962a, b). Heute besteht indes kaum ein Zweifel mehr, dass der durch Antimetaboliten induzierten Replikationshemmung keine kausale Bedeutung in der Aberrationsentstehung zukommt (Bell und Wolff, 1964; Odmark und Kihlman, 1965). Einzig für Alkylierungsmittel und einige andere Agenzien, deren Aberrationsrealisierung an das Durchlaufen der S-Periode der Interphase gebunden ist und offenbar in Beziehung zur chromosomalen DNS-Replikation steht, kann man sich spekulationsärmer ein Bild davon machen, wie Primärläsionen am DNS-Molekül zur grösseren Dimension der Chromosomenläsionen oder chromosomalen Strukturumbauten umgewandelt werden. Evans und Scott (1964 und 1969), Grant und Heslot (1966) sowie Matagne (1969) nehmen an, dass molekulare Veränderungen an der DNS durch den Prozess der chromosomalen DNS-Replikation, zum Beispiel durch Replikationsfehler oder verändertes Replikationsverhalten der DNS, zur Entstehung von chromosomalen Strukturveränderungen führen.

Eine weitere wichtige Frage ist die der aktiven Form des Mutagens. Für ein physikalisches oder chemisches Mutagen kann angenommen werden, dass es entweder unmittelbar mit den Chromosomen reagiert (direkte Wirkung) oder im Zellstoffwechsel Intermediärprodukte entstehen lässt, die erst die entscheidenden reaktiven Spezies darstellen und als solche mit den Chromosomen reagieren (indirekte Wirkung). Insbesondere bei Anwendung energiereicher Strahlen geben beide Möglichkeiten Anlass zu Arbeitshypothesen (Butler, 1959; Zimmer, 1960; Michaelis und Rieger, 1962; Rieger und Boehme, 1962), die zwar in ihren Einzelaussagen experimentell abgestützt sind, doch noch bei weitem kein widerspruchsloses Bild über die tatsächlichen Wirkungsmechanismen der energiereichen Strahlen als Mutagene zu geben vermögen. Die physikalisch definierte energiereiche Strahlung tritt bei der Einstrahlung in das biologische Objekt mit dem organischen Material in physikalische, chemische und biochemische Wechselwirkung. Tritt energiereiche Strahlung in der Zelle auf Materie, so gibt sie Energie an das System ab, indem sie längs ihres Weges Ionen und Ionenpaare erzeugt, die als Urheber aller Strahlenschäden anzusehen sind. Die ionisierten Atome und Moleküle unterscheiden sich wesentlich von normalen Atomen und Molekülen, sind chemisch sehr aktiv und induzieren deshalb molekulare Veränderungen, die im biologischen System zum Ablauf einer Reaktionskette führen, an deren Ende der beobachtbare biologische Effekt steht, zum Beispiel Gen- oder Chromosomenmutationen (Bacq und Alexander, 1961). Man nimmt an, dass ionisierende Strahlen biologische Effekte auf zwei Arten erzeugen, entweder auf direktem oder auf indirek-

tem Weg. Die direkten Effekte werden durch sogenannte «physikalische Treffer» in einem biologischen Treffbereich ausgelöst, wobei die Absorption von Strahlenenergie in demselben Molekül stattfindet, in dem auch die Schädigung auftritt. Diese als Treffertheorie bezeichnete Hypothese setzt die biologischen Endeffekte direkt in Beziehung zum primären physikalischen Prozess, das heisst durch Anregungen und Ionisationen zu induzierten molekularen Schäden (Bacq und Alexander, 1961; Michaelis und Rieger, 1962). Die Treffertheorie ist experimentell gut abgestützt und vermag viele Phänomene der quantitativen Strahlenbiologie am eindeutigsten zu erklären (Zimmer, 1960). Andererseits weiss man heute mit Sicherheit, dass auch chemische Vorgänge an der Strahlenreaktionskette beteiligt sind (Burton und Magee, 1956; Bacq und Alexander, 1961). Dies führt zur indirekten Strahlenwirkung, deren Hauptaussage darin besteht, dass die Energieübertragung von der ionisierenden Strahlung auf eine biologisch wichtige Molekülspezies indirekt über strahleninduzierte diffusible Substanzen erfolgt, das heisst, die Energieabsorption findet nicht in demselben Molekül statt, in dem die Schädigung auftritt (Alexander, 1960; Zimmer, 1960; Bacq und Alexander, 1961; Michaelis und Rieger, 1962; Conger, 1963). Dieser indirekte Effekt wird auch «chemischer Treffer» genannt. Die indirekte Wirkung, die vermutlich neben der direkten erfolgt, findet ihre Stütze in radiochemischen Befunden zur Wasserzersetzung sowie in der modifikatorischen Beeinflussung der Strahleneffekte (Rieger und Boehme, 1962). Versuche über die Radiolyse des Wassers ergaben, dass die Wassermoleküle, zahlenmässig alle andern Molekülarten in der Zelle weit übertreffend, die primären Substrate für die indirekten Strahleneffekte darstellen. Bestrahlung des Wassers mit ionisierenden Strahlen führt über verschiedene Prozesse zu den hochreaktiven freien Radikalen $H^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$ sowie zum Molekularprodukt Wasserstoffperoxyd (H_2O_2) als Primärprodukte (Burton und Magee, 1956; Dainton, 1959; Bacq und Alexander, 1961; Schwarz, 1964). Daneben können die gebildeten freien Radikale Sekundärreaktionen eingehen, die zu langlebigen organischen Radikalen und organischen Peroxyden führen (Conger, 1962; Walling, 1963). Die strahleninduzierten reaktiven Verbindungen sind weitgehend experimentell erfassbar mit Ausnahme von sehr kurzlebigen freien Radikalen (Conger und Randolph, 1959; Zimmer, 1959; Conger, 1961; Aebi, 1963; Latarjet et al., 1963). Die Frage nach der Bedeutung radiolytisch entstandener chemischer Agenzien in der strahleninduzierten Mutagenese kann nicht eindeutig beantwortet werden (Rieger und Boehme, 1962). Es ist aber möglich, wenigstens einige der unter Strahleneinfluss entstandenen chemischen Agenzien darauf zu prüfen, ob sie an den durch energiereiche Strahlen erzeugten biologischen Effekten ursächlich mitbeteiligt sind. So ist Wasserstoffperoxyd, das immer wieder am Zustandekommen der sauerstoffabhängigen Strahlenwirkung in Hypothesen Aufnahme fand (Thoday und Read, 1947 und 1949; Warburg, 1964), von mehreren Autoren an unterschiedlichen Testsystemen als nicht radiomimetisch erkannt worden. Wasserstoffperoxyd führt auch dann nicht zu Chromosomenaberrationen, wenn die Peroxydase und Katalase durch Inhibitoren blockiert werden (Loveless, 1951; Kihlman, 1957; Michaelis und Rieger, 1962; Maekinen, 1963). Eine Ausnahme kann gemacht werden, gelang es doch Schoeneich 1967, bei Ascitestumoren der Maus durch Wasserstoffperoxyd Chromatidenaberrationen zu erzeugen. Da es sich aber um ein pathologisch verändertes Testsystem handelt, dürfte diesem Befund keine allgemeine Bedeutung im Rahmen der Strahlenbiologie zukommen. Gestützt auf experimentelle Belege erscheint es heute ebenfalls unwahrscheinlich, dass in der Zelle kurz-

lebige freie Radikale der genannten Typen über grössere Entfernungen hin eine bedeutende Rolle als Induktoren indirekter Strahleneffekte spielen (Zimmer, 1960; Michaelis und Rieger, 1962). Eine Beteiligung an der direkten Strahlenwirkung scheint indes durchaus im Bereich des Möglichen (Ehrenberg, 1959; Michaelis und Rieger, 1962). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass den strahlenchemisch erzeugten Wasserzersetzungsprodukten $H^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$, $HO_2^{\cdot}$ und H_2O_2 kaum eine Bedeutung bei der Induktion indirekter Strahlenwirkungen sowie deren Sauerstoffsensibilisierung zukommt (Dainton, 1959; Ehrenberg, 1959; Zimmer, 1960; Michaelis und Rieger, 1962; Rieger und Boehme, 1962). Es verbleiben als wirksame Molekülspezies der indirekten Strahlenreaktionskette noch die organischen Radikale und organischen Peroxyde, die heute ganz im Vordergrund der Diskussion stehen (Sobels, 1958 und 1963; Scholes und Weiss, 1959 und 1962; Wacker, 1962; Conger, 1963; Scholes, 1963). Langlebige – vermutlich organische – Radikale sind noch lange nach der Bestrahlung nachweisbar (Conger, 1961; Swartz et al., 1965), und es besteht eine positive Korrelation zwischen der Strahlensensibilität und der Lebensdauer strahleninduzierter Radikale (Conger und Randolph, 1959; Zimmer, 1959). Aus In-vitro-Versuchen wird ersichtlich, dass nach Bestrahlung organische Peroxyde gebildet werden (Okada, 1958; Weiss, 1958; Butler, 1959; Scholes und Weiss, 1960; Latarjet et al., 1963). Verschiedene organische Peroxyde sind auf ihre radiomimetische Wirkung getestet worden, wobei von mehreren Autoren eine teilweise ausgesprochen zytostatische (Weitzel et al., 1961) und mutagene Wirkung (Dickey et al., 1949; Altenburg, 1954; Sobels, 1954a, b und 1956) festgestellt worden ist, währenddem im Fall der Induktion von Chromosomenmutationen erst wenige positive Ergebnisse vorliegen (Loveless, 1951; Revell, 1953; Kihlman, 1957).

Offensichtlich bestehen noch zahlreiche echte Lücken im Wissen um die strahlenbiologischen Prozesse, zumal viele strahlenchemische Befunde in vitro an einem Modellsystem erarbeitet worden sind und nur mit grosser Vorsicht auf biologische Objekte übertragen werden dürfen. Je nach der Art der Untersuchung ist man versucht, entweder nur die direkte oder nur die indirekte Strahlenwirkung gelten zu lassen. Unter Berücksichtigung aller verfügbaren Fakten darf heute angenommen werden, dass direkte und indirekte Wirkungsweise nebeneinander an der Entstehung der vielfältigen strahleninduzierten biologischen Veränderungen beteiligt sind, wobei organischen Peroxyden und organischen Radikalen, durch Strahleneinwirkung direkt oder aus gewissen Stoffwechselprodukten indirekt gebildet, eventuell strahlenbiologische Bedeutung zukommt. Diese Vermutung bleibt aber solange spekulativ, als experimentell eindeutige Beweise fehlen. Es erscheint deshalb nützlich, ein organisches Peroxyd auf seine radiomimetische Wirkung zu prüfen und mit den entsprechenden Strahleneffekten zu vergleichen, um so mehr als die bis anhin zytologisch untersuchten organischen Peroxyde tert. Butylhydroperoxyd (Loveless, 1951; Revell, 1953; Kihlman, 1957), Diacetylperoxyd und Benzoylperoxyd (Loveless, unveröff.) sowie Formaldehyd + H_2O_2 (= Dihydroxymethylperoxyd) (Loveless, 1951) zu wenig umfassend getestet worden sind, als dass ein Vergleich mit der strahleninduzierten zytostatischen und chromosomenmutagenen Wirkung möglich wäre.

In der vorliegenden Arbeit habe ich das organische Peroxyd Dihydroxymethylperoxyd

$HO—CH_2—O—O—CH_2—OH$

auf die zytostatische und chromosomenmutagene Wirkung bei *Vicia faba* und die

chromosomenmutagene Wirkung bei *Ascites*tumoren der Maus getestet. Es sollen dabei jene zytologischen Probleme etwas ausführlicher dargestellt werden, die im Zusammenhang mit einer möglichen Deutung der Peroxydhypothese der Strahlenwirkung von besonderer Bedeutung erscheinen, und andererseits die chromosomenmutagene Wirkung des organischen Peroxyds mit derjenigen von bereits gut bekannten chemischen Agenzien verglichen werden, um mögliche Beziehungen zu den wichtigsten Gruppen von Radiomimetika festzustellen.

Die Arbeit umfasst folgende Probleme:

1. Physiologische Charakterisierung von Dihydroxymethylperoxyd im Zusammenhang mit seinem möglichen Abbau durch Peroxydase bei *Vicia faba*
2. Chromosomenmutagene und zytostatische Wirkung bei *Vicia faba*
3. Zeitpunkt der chromosomenmutagenen Wirkung im Mitosezyklus, Beeinflussung der Mitosezyklusdauer und Wirkung auf die DNS-Synthese bei *Vicia faba*
4. Verteilung der Brüche über das Genom bei *Vicia faba*
5. Chromosomenmutagene Wirkung bei *Ascites*tumoren der Maus

Material, Methode und Terminologie

Versuchsobjekte

Als Hauptversuchsobjekt wurde *Vicia faba* «Windsor», die weisse Puffbohne mit der Chromosomenzahl $2n = 12$, gewählt. Der Karyotyp dieser Spezies eignet sich durch die Grösse und Struktur seiner Chromosomen besonders gut für die Erfassung von Chromosomenmutationen in der Mitose und ist deswegen zu einem Standardobjekt der Zytologie geworden.

Die zur Anzucht ausgewählten Samen waren alle ungefähr gleich gross und nicht älter als 1 Jahr, denn Samenalterung führt meist zu einer drastischen Steigerung der spontanen chromosomalen Aberrationsrate (Nichols, 1941). Die Samen wurden in Seifenwasser gewaschen und in Petrischalen während 2 Tagen in fliessendem Leitungswasser angequollen. Nach Entfernen der Testa keimte jeder Samen in einem 100-ml-Glasröhrchen – mit Verengung in der Mitte – in einem Wärmeschrank bei Dunkelheit und konstanter Aufzuchttemperatur von 24 °C. Leitungswasser als Keimmedium wurde bis zur Verengung des Röhrchens aufgefüllt, so dass der Samen direkt über das Wasser zu liegen kam. Das Wasser wurde alle 2 Tage gewechselt, bis nach 6 bis 7 Tagen die ersten Sekundärwurzeln sich zu entwickeln begannen. Die weitere Anzucht der Sekundärwurzeln erfolgte in einem 200-ml-Weithals-Erlenmeyerkolben in Leitungswasser (24 °C, Dunkelheit) und dauerte 1 bis 2 Tage. Zytologische Versuche mit Wurzeln sollten immer unter Belüftung durchgeführt werden, denn die O_2-Konzentration der Lösung sinkt durch die Atmung unter diejenige der Gleichgewichtskonzentration. Bei offenen Kulturgefässen tritt zwar Luftsauerstoff in die Lösung über, die Nachdiffusion erfolgt indes sehr viel langsamer als der Verbrauch durch die Wurzelatmung (Wanner, 1950), so dass das O_2-Defizit in der Lösung bestehen bleibt. Aus diesem Grund wurde während der Aufzucht belüftet, um so mehr als partielle Anaerobiose durch Gärung und Akkumulierung von Äthylalkohol im Meristem zu drastischen Erhöhungen der spontanen Chromosomenaberrationsrate führt (Rieger und Michaelis, 1959a und 1960a). Zur Behandlung wurden ausschliesslich Sekundärwurzeln von 1–3 cm Länge verwendet. Gefüttert wurde in offenen, belüfteten 100-ml-Bechergläsern. Durch die Belüftung konnte neben der O_2-Versorgung eine gleichmässigere Konzentration der Behandlungslösung an den einzelnen Wurzeln erzielt werden. Für die Erholungszeiten (EZ) galten die gleichen Bedingungen wie für die Aufzucht. In den Versuchen zur Chromosomenanalyse wurde durch 2,5stündige Colchicinfütterung (0,05 %) vor Ende der EZ eine Metaphasenakkumulierung erreicht.

Für einen Nebenversuch wurde das hyperdiploide Ehrlichsche *Ascites*carcinom, Stamm A, verwendet, ein transplantabler Tumor, der in *Ascites*form übergeführt werden kann. In Zellen transplantabler Tumoren ist die Gesetzmässigkeit der Zahlkonstanz der Chromosomen weitgehend

ausgeschaltet, so dass für jeden Stamm die Chromosomenzahlen um einen Mittelwert pendeln, der sogenannten «stemline-number» oder s-Zahl. Diese beträgt für den hyperdiploiden Stamm A 45/46. Jeder Stamm besitzt ausserdem noch aberrante Chromosomen, die eine bemerkenswerte Konstanz innerhalb eines Tumorstammes zeigen und als Markierungschromosomen anzusehen sind: Für Stamm A sind es die Chromosomen A, D und m (Rutishauser, 1963). Für die Versuche wurden C_3H-Mäuse aus einer Inzucht vom Tierspital Zürich verwendet. Die 20–25 g schweren Tiere wurden im Kantonsspital Zürich mit frischem *Ascites* i.p. inokuliert. Ungefähr nach 4 Tagen konnten die Tiere für die Versuche eingesetzt werden.

Testsubstanz

Die Darstellung von Dihydroxymethylperoxyd – auch Bis-hydroxymethylperoxyd genannt – erfolgte nach der Methode von Weitzel et al. 1961. 34 ml 10 % Wasserstoffperoxyd und 60 ml 10 % Formaldehyd wurden vermischt und 2 h bei Zimmertemperatur belassen. Die erhaltene Lösung wurde in Fraktionen aufgeteilt und diese gefriergetrocknet. Durch diesen Arbeitsgang konnte das Wasser aus dem Reaktionsgemisch bei tiefer Temperatur entfernt werden, ohne dass das entstandene, thermolabile Peroxyd zerfällt. Als Rückstand erhielt ich weisse Kristalle, die mit wenig Äther vom Kolben abgelöst und nach Abgiessen des Äthers im Vakuum getrocknet wurden. Unter Vermeidung von Reiben und Stossen mit dem Spatel wurde in kleine Portionen abgefüllt und im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Prüfung des Reinheitsgrades wurde nach jeder Darstellung eine Schmelzpunktanalyse gemacht. Diese ergab immer 60–65 °C (Literaturwert: 62–64 °C). Eine qualitative Analyse des Syntheseprodukts im Organisch-Chemischen Institut der Universität Zürich ergab chemisch reines Dihydroxymethylperoxyd. Wenn die Substanz sich zu zersetzen beginnt, wird sie ölig-viscös und riecht stechend nach Ameisensäure, in die sie sich verwandelt. Im basischen Milieu ist dieser Zerfall stark begünstigt, im sauren Milieu dagegen ist die Substanz recht stabil. Das völlig trockene, kristalline Produkt ist im Kühlschrank gut haltbar. Die Substanz verpufft in der Flamme und ist gegen Stoss und Schlag empfindlich (Weitzel et al., 1961). Dihydroxymethylperoxyd wurde für alle Versuche in H_2O dest. gelöst; pH der Lösung 4 bis 5. Die Konzentration der ausgetesteten Substanz betrug in allen Versuchen mit *Vicia faba* 4 mM oder 38 mg/100 ml, für EAC 20 mg/kg Körpergewicht.

Methoden

a) Feulgen-Quetschmethode bei Wurzelmeristemzellen von Vicia faba

Abgeschnittene Wurzelspitzen wurden in Äthanol/Eisessig/1 n HCl (3:1:1) während einer Stunde fixiert, über Nacht in 96 % Äthanol gelegt und dann in 70 % Äthanol bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Als Färbung wurde die auf DNS weitgehend spezifische «Nucleal-Reaktion» nach Feulgen und Rossenbeck 1924 gewählt. Die Farbstoffkomponente des Feulgen- oder Schiffschen Reagens bildete basisches Fuchsin (Gurr, Ltd., New Kings Road, London). Der Feulgen-Farbstoff wurde nach de Tomasi 1936 und Coleman 1938 hergestellt. Die für die Feulgen-Reaktion kritische saure Hydrolyse wurde unter thermostatischer Kontrolle bei 60 °C in 1 n HCl durchgeführt, wobei die optimale Hydrolysezeit beim gewählten Fixiergemisch bei 7–9 min lag. Der Feulgen-Quetschmethode (Hillary, 1940) lag folgendes Arbeitsschema zugrunde: Übertragen der Wurzeln in 30 % Äthanol, Spülen in kalter 1 n HCl und Hydrolyse in 1 n HCl bei 60 °C während 7–9 min, dann Spülen in H_2O dest. und Färbung mit Feulgen-Reagens für 1–2 h. Übertragen in Leitungswasser für 1 bis mehrere Stunden. Für den anschliessenden Quetschvorgang werden nach Entfernen der Calyptra zwei Drittel der dunkel gefärbten Wurzelspitze auf dem Objektträger in einen Tropfen 45 % Essigsäure gelegt und nach leichtem Erwärmen mit dem Deckglas – mit getrocknetem Eiweissglycerin-Überzug – gequetscht. Nach Ablösung des Deckglases und anschliessender Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylolpassage wird das Material in Eukitt eingeschlossen.

b) Orceinfärbung von EAC-Zellen (Methode nach Rutishauser, 1963, modifiziert

Punktierte *Ascites*flüssigkeit wurde während 30–60 min in einer hypotonischen Natriumcitratlösung (0,8 %) gequellt (ca. doppelt so viel Citratlösung wie *Ascites*). Nach Zentrifugation der Proben wurde der Überstand dekantiert und dem Zentrifugat im Überschuss Carnoys Fixierflüssigkeit (Äthanol/Eisessig, 3:1) zugegeben. Nach Resuspendierung und 20minütigem Stehenlassen im Kühlschrank wurde erneut zentrifugiert und mit Methanol/Eisessig (3:1) überschichtet. Stehenlassen, Zentrifugation und Zugabe von neuem Fixiergemisch wurden 2- bis 3mal wiederholt.

In der letzten Stufe wurden die Zellen in so viel Methanol/Eisessig suspendiert, dass eine leicht getrübte Suspension entstand. Nach mindestens 15minütigem Stehenlassen im Kühlschrank wurden zytologische Präparate hergestellt: Auftragen von einem Tropfen Suspension in die Mitte eines entfetteten, gleichmässig mit H_2O dest. überzogenen Objektträgers. Leicht erwärmen und mindestens 4 Stunden trocknen lassen (Trockenfixation). Färbung über Nacht in Orcein nach Gurr (1 % in 45 % Essigsäure), Auswaschen in 45 % Essigsäure und Herstellen von Dauerpräparaten durch Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, Überführung in Xylol und Einschluss in Eukitt.

c) Autoradiographie (siehe u.a. Zweidler, 1965; Ruthmann, 1966)

In allen autoradiographischen Experimenten wurden Seitenwurzeln von *Vicia faba* verwendet. Gebrauchtes Isotop: ^{3}H-Thymidin, methylmarkiert, spez. Akt. 15,0 c/mM (Radiochemical Centre, Amersham, England). Die Konzentration des Isotops betrug in allen Versuchen 2 μc/ml entsprechend einer molaren Thymidinkonzentration von 0,14 μM.

Fütterung: Für die in allen Untersuchungen angewandte Pulsmarkierung mit maximal 2stündiger Fütterungsdauer mit dem radioaktiven Isotop wurden die Wurzeln in die Leitungswasserlösung der radioaktiven Substanz eingetaucht. Nach der Fütterung wurden die Wurzeln sorgfältig gespült und dann in frischem Leitungswasser weitergezogen. Fütterungsdauer und Erholungszeiten sind bei den verschiedenen Versuchen angegeben. Zur Erfassung der Markierung auf den chromosomenaberranten Metaphasen wurde während der letzten 2,5 h jeder Erholungszeit mit 0,05 % Colchicinfütterung eine Metaphasenanreicherung erzeugt. Die vor allem bei Pulsmarkierung von tierischen Zellen in Gewebskultur empfohlene Nachfütterung mit inaktivem Thymidin zwecks Verdünnung des «Pools» an aktiven Molekülen und damit einer Vermeidung von weiterem Einbau aktiver Moleküle in die DNS nach Fütterungsabbruch (Cleaver, 1967) ist bei *Vicia faba* nicht nötig, denn Versuche von Evans (1964) zeigen eine umgekehrte Beziehung. ^{3}H-Thymidin wird innerhalb von 10 min nach Fütterungsende aufgebraucht, während bei Nachbehandlung mit inaktivem Thymidin der intrazelluläre «Pool» an ^{3}H-Thymidin bis 40 min für den Einbau in die DNS zur Verfügung steht.

Herstellen der Präparate: Feulgen-Quetschpräparation wie oben beschrieben. Nach Bryant (1969) führt die saure Hydrolyse der Feulgenreaktion zu einem von der Hydrolysezeit abhängigen beträchtlichen Verlust von ^{3}H-Thymidin und damit Körnern auf der Autoradiographie, so dass zwischen gleichartigen Versuchen bei nicht identischen Hydrolysezeiten der Markierungsindex sowie die Kornzahl pro Zellkern sehr unterschiedlich sein kann. Eine diesbezügliche Verfälschung der Resultate fällt in meinen Versuchen kaum in Betracht, denn die autoradiographisch verglichenen Versuche wurden alle mit ungefähr identischen Hydrolysezeiten (ca. 8 min) gefärbt. Der Markierungsverlust dürfte deshalb überall ungefähr gleich gross gewesen sein. Die Wurzeln wurden auf Objektträgern mit getrocknetem Eiweiss-Glycerin-Überzug in 45 % Essigsäure unter leichtem Erwärmen gequetscht und darauf das Deckglas in 30 % Äthanol wieder abgelöst. Überführen der Objektträger mit dem anhaftenden Material in dest. Wasser.

Aufziehen des Stripping-Filmes: Stripping-Film Kodak AR-10-Film auf der Platte mittels Schablone in Quadrate von zirka 4 mal 4 cm geschnitten und auf dest. Wasser von 23–25 °C mit Schichtseite nach unten ausgebreitet und gequellt. Das Filmstück wurde hierauf mit schief gehaltenem Objektträger von unten aufgenommen und geglättet. Die Präparate kamen über Nacht zum Trocknen in eine Holzschachtel und wurden dann in einer gut verschliessbaren, lichtdichten Präparateschachtel zusammen mit einem in etwas Gaze verpackten Trocknungsmittel ($CaCl_2$) für 3 bis 4 Wochen im Kühlschrank bei 4 °C exponiert.

Entwicklung der Autoradiographie: Nach Bestreichen der Rückseite des Präparates – mit den freien Filmrändern – mit verdünntem Kanadabalsam und Antrocknen wurde 2 bis 3 min bei 16–18 °C je nach gewünschter Korngrösse in Kodak-Entwickler D 19b entwickelt, in Leitungswasser gleicher Temperatur gespült und in saurem Fixierbad (Kodak, Metafix) 8 bis 9 min fixiert. Anschliessend wurde in Leitungswasser während gut 30 min gewässert. Nach Entfernen der überflüssigen Filmstücke auf der Rückseite des Objektträgers wurde getrocknet und über Xylol mit Eukitt zum Dauerpräparat eingeschlossen.

d) Enzymversuche

Histochemie: Die Lokalisation einer generellen Peroxydaseaktivität im Wurzelmeristem von *Vicia faba* wurde nach der Methode von Graham et al. (1965) histochemisch nachgewiesen.

Gefrierschnitte: Wurzelspitzen wurden 2- bis 3mal in 0,5 M Saccharoselösung infiltriert und mit dem Gefriermikrotom 120-μ-Schnitte angefertigt.

Histochemischer Nachweis: 4 mg 3-Amino-9-Äthylcarbazol (AAC; Grade II, Practical, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) wurden in 0,5 ml N,N-Dimethylformamid (puriss., Fluka AG, Buchs) gelöst. Dann wurde mit 9,5 ml Acetatpuffer (0,05 M) von pH 5,1 auf 10 ml aufgefüllt. Diese Inkubationslösung wurde etwa 2 h vor Inkubation hergestellt und vor Gebrauch filtriert. Die H_2O_2-Konzentration war: 1 Tropfen 3 % H_2O_2 zu 1 ml Lösung. Die Schnitte wurden 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert, anschliessend gut ausgewaschen und mit 4 % Formalinlösung während zirka 4 h fixiert. Die Schnitte mit dem roten, wasserunlöslichen Reaktionsprodukt wurden in Glyceringelatine eingeschlossen. Zur Abklärung möglicher Artefakte durch Pseudoperoxydasereaktion erfolgten Kontrollreaktionen durch Hitzeinaktivierung der Schnitte während 10 min bei 100 °C (Deane et al., 1960), durch Inkubation der Schnitte in einem Medium ohne H_2O_2 (Reiss, 1967) sowie durch Vorbehandlung und Inkubation der Schnitte zusammen mit einem Peroxydaseinhibitor (Natriumazid: 10 mM NaN_3-Lösung. NaN_3 gelöst in 0,1 M Citratpuffer von pH 4,5 – nach Nuotclà, 1969).

Titrimetrie: Titrimetrische Bestimmung des Abbaus von Dihydroxymethylperoxyd durch pflanzliche Peroxydase und deren Hemmung durch verschiedene Enzyminhibitoren.

Es existieren zahlreiche Methoden zur Erfassung der Peroxydaseaktivität. In dieser Arbeit wurden zwei Methoden verwendet: Methode I nach Weitzel et al. (1961), modifiziert, und Methode II nach Purr (1950).

Prinzip von Methode I und II: Der den beiden Methoden zugrunde liegende Reaktionsmechanismus der Peroxydasereaktion sieht nach Mahler und Cordes (1961) folgendermassen aus:

$$\begin{array}{lcl}
 & & \text{ROOR (z.B. Dihydroxymethylperoxyd)} \\
 & & \downarrow \\
\text{Fe-OH (= Peroxydase)} & + & \text{ROOH} \rightarrow \text{Fe-OOH} + \text{ROH} \\
\text{Fe-OOH} & + & \text{Substrat-H}_2 \rightarrow \text{Fe-OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{Substrat} \\
\hline
\text{Fe-OH} + \text{ROOH} & + & \text{Substrat-H}_2 \rightarrow \text{Fe-OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{Substrat} + \text{ROH}
\end{array}$$

Methode I: Jodometrische Titration des nach einer bestimmten Reaktionszeit noch nicht abgebauten Peroxyds. Das Peroxyd als Oxydationsmittel wird jodometrisch titriert: Jod wird aus KJ freigesetzt und mit Na-thiosulfat zurücktitriert.

$$2\,J^- \rightarrow J_2 + 2\,e^-$$
$$2\,S_2O_3^{2-} + J_2 \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2\,J^-$$

Methode II: Jodometrische Titration des nach einer bestimmten Reaktionszeit durch die Peroxydasereaktion mit H_2O_2 oder Alkylhydroperoxyd noch nicht oxydierten Substrates. Das Substrat wird in Form von Ascorbinsäure und o-Tolidin dem Reaktionsgemisch in definierter Menge zugegeben. Ascorbinsäure wird dabei nicht direkt durch das Peroxyd oxydiert, sondern überträgt den Wasserstoff auf das Semichinon des o-Tolidins, das in dieser Reaktion als primäres Oxydationsprodukt anzusehen ist. Der Verbrauch an Ascorbinsäure ist proportional der Enzymaktivität. Die jodometrische Bestimmung des Reduktionsmittels Ascorbinsäure geschieht durch Jod direkt. Jod wird dabei zum Jodidion reduziert.

$$J_2 + 2\,e^- \rightarrow 2\,J^-$$

Durchführung von Methode I und II: Als Enzymquelle diente Enzymrohextrakt und reine Meerrettichperoxydase, A grade, RZ = 3,0 (Calbiochem, Luzern). Für die Herstellung des Enzymrohextraktes wurden Sekundärwurzeln von *Vicia faba* in eisgekühltem 0,1 M Phosphatpuffer von pH 7 homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert, und der Überstand diente für die Enzymansätze.

Methode I: Enzym: 2,0 ml *Vicia-faba*-Wurzelrohextrakt oder 0,05 ml Meerrettichperoxydase +5 ml Pyrogallol (10 mM) als H_2-Donator (bei Enzymrohextrakt nicht nötig, da im Extrakt genügend oxydierbare Substanzen). Substrat: 20 ml DHMP (0,2 mM) in 1/150 M Phosphatpuffer von pH 7. Enzymansatz: Das in 20 ml Phosphatpuffer gelöste DHMP wurde mit 2 ml Enzymrohextrakt bzw. 0,05 ml Meerrettichperoxydase+5 ml Pyrogallol bei Zimmertemperatur inkubiert.

Nach 2 h wurden 2 ml des Ansatzes entnommen und der Gehalt an aktivem Peroxyd jodometrisch bestimmt:

2 ml Enzymansatz
5 ml Eisessig
1 ml gesättigte KJ-Lösung
5 h stehen lassen
1 ml Stärkelösung (0,5 %)
Titration mit $Na_2S_2O_3$ (0,02 n)

Für die Enzymhemmversuche wurden folgende Inhibitoren getestet: In den Versuchen mit Enzymrohextrakt KCN (verschiedene Konzentrationen von 0,01 mM bis 5 mM), NaF (10 mM), KSCN (10 mM), Thiouracil (0,5 mM) und in einem Versuch mit Meerrettichperoxydase KCN (1 mM). In den Versuchen mit Enzymrohextrakt wurden die Wurzeln mit dem Inhibitor bei pH 7 (Phosphat-Puffer, 1/150 M) für 30 min gefüttert. Herstellen des Extraktes und Enzymansatz wie oben angegeben. Im Versuch mit Meerrettichperoxydase wurde 0,5 ml Enzym für 30 min mit 5 ml KCN (1 mM) versetzt. Anschliessend Entnahme von 0,5 ml – entsprechend 0,05 ml Enzym – für den Enzymansatz.

Titrimetrie: In der jodometrischen Titration wurde das noch vorhandene DHMP ermittelt, indem durch Reaktion des Peroxyds als Oxydationsmittel mit KJ-Lösung eine dem Oxydationswert des Peroxyds äquivalente Jodmenge in Freiheit gesetzt wurde und diese mit einer 0,02 n Na-thiosulfat-Lösung titriert wurde. Die verbrauchte Menge Na-thiosulfat entspricht der Menge an freiem Jod und damit der Menge an nicht abgebautem Peroxyd im Enzymansatz. Da in den Versuchen mit Rohextrakt der Extrakt selbst eine Oxydationskraft zeigte, musste die durch den Extrakt selbst verbrauchte Thiosulfatmenge mitberücksichtigt werden. Die verbrauchte Menge Na-thiosulfat ist proportional zur Menge an nicht abgebautem Peroxyd und deshalb proportional zur Enzymhemmung bzw. umgekehrt proportional zur Enzymaktivität (ausgedrückt in %).

Methode II: Einer auf 25 °C erwärmten Mischung von Ascorbinsäure, Phosphat-Citronensäure- und Phosphat-Oxalsäure-Puffer (pH 5), o-Tolidin (Fluka, Buchs) und DHMP wurde eine entsprechende Menge pflanzlicher Peroxydase (Enzymrohextrakt) hinzugefügt. Nach Ablauf einer bestimmten Zeit ermittelte man in einer äquivalenten Menge des Ansatzes nach vorhergehender Inaktivierung der Peroxydase durch überschüssige 2 n Schwefelsäure die noch vorhandene Ascorbinsäure durch direkte Titration mit 1/250 n Jodlösung. Zuerst galt es zu prüfen, ob in Gegenwart von DHMP und Enzymrohextrakt eine quantitative Bestimmung der Ascorbinsäure durch jodometrische Titration in schwefelsaurer Lösung mit einer 1/250 n Jodlösung möglich ist. Die ermittelten Zahlenwerte zeigten eindeutig, dass die gewählte Ascorbinsäurebestimmung die theoretisch zu erwartenden Ascorbinsäurewerte auch in Gegenwart der Reaktionsteilnehmer ergibt.

Puffer: Phosphat-Citronensäure- und Phosphat-Oxalsäure-Trockenpuffer wurden hergestellt, indem 18 g Phosphat-Citronensäure + 2 g Phosphat-Oxalsäure in 250 ml dest. Wasser gelöst wurden (genauere Angaben siehe Purr, 1950).

Enzymansatz: 4 ml Ascorbinsäure (1/20 n)
5 ml DHMP (0,1 M)
2 ml o-Tolidin (0,5 %)
2 ml Enzymrohextrakt
10 ml Pufferlösung (pH 5)

Ansatz mit dest. Wasser auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und ins Wärmebad von 25 °C gestellt. Nach den Reaktionszeiten von 5, 20, 40 und 60 min wurde die Reaktion in 10 ml des Ansatzes unterbrochen durch Zugabe von 2,5 ml 2 n Schwefelsäure und dann mit 1 ml 1 % Stärkelösung als Indikator die noch vorhandene Menge Ascorbinsäure mit 1/250 n Jodlösung titriert. Die Differenz der verbrauchten Jodmenge zum Leerwert ergab den relativen Ascorbinsäureverbrauch, ausgedrückt in % Abnahme der Ascorbinsäure; dieser ist proportional der Enzymaktivität.

Für die Hemmversuche mit KCN (verschiedene Konzentrationen von 0,01 bis 5 mM) wurde das oben beschriebene Reaktionssystem mit Phosphat-Citronensäure-Puffer auf pH 7 eingestellt und die Enzymaktivität geprüft. Anschliessend erfolgten die Hemmversuche mit KCN bei pH 7.

e) Auswertungen

Die zytologische Analyse erfolgte bei *Vicia faba* mit Planapochromat-, bei EAC mit Phasenkontrastobjektiven bei zirka 400- bis 1000facher Vergrösserung. Für die quantitativen Auswertungen diente ein Zählapparat als Mithilfe. Zur Chromosomenbruchanalyse wurden die aberranten

Metaphasenplatten gezeichnet. Eine Auswahl der gezeichneten Metaphasenplatten erfolgte nur nach der Bildqualität, so dass es sich um Stichproben im statistischen Sinne handeln dürfte. Zur Erstellung des Karyogramms und Erfassung der Bruchlokalisierung wurden mit einem Zeiss-Fotomikroskop Mikrofotogramme hergestellt und die Chromosomen mit einem Stechzirkel ausgemessen. Die pro Versuchsbedingung ausgewertete Zellzahl ist in den einzelnen Versuchen angegeben. Bei *Vicia faba* wurde zur statistischen Prüfung der Werte der Mitoseindices, Phasenindices und Prophasenmarkierungsindices die Standardabweichung der Mittelwerte bestimmt, bei der Erfassung der relativen Längen unbehandelter und DHMP-behandelter Chromosomen die Mittelwerte anhand des t-Testes verglichen und in den quantitativen Auswertungen wichtiger Aberrationscharakteristika beobachtete und erwartete Werte einem χ^2-Test unterworfen (nach Rapoport und Raderecht, 1962, sowie Herskowitz, 1965).

Terminologie

Die quantitative und qualitative mikroskopische Auswertung der induzierten Chromosomenmutationen erfolgte in der ersten mitotischen Metaphase nach Behandlung, in einem Experiment in der zweiten Metaphase nach Behandlung. Da bei Anaphasenauswertungen nur Chromosomenbrücken und -fragmente erfassbar sind, wurde diese Art der Auswertung nur bei der Prüfung auf eventuelle Subchromatidenaberrationen mit den leicht diagnostizierbaren Pseudochiasmata oder Subchromatidbrüchen (Levan und Tjio, 1948) verwendet.

Nach dem gegenwärtigen Stand der Chromosomenstrukturforschung darf als gesichert gelten, dass das Chromosom aus linear angeordneten Untereinheiten besteht, deren funktionell wichtigste die beiden lichtmikroskopisch sichtbaren Chromatiden darstellen, die sich evtl. noch in je zwei Halbchromatiden gliedern (Bajer, 1965; Trosko und Wolff, 1965; Peveling, 1968; Wolfe und Martin, 1968). Brüche und Reunionsvorgänge können den ganzen Chromosomenquerschnitt oder auch nur Untereinheiten betreffen, so dass in der ersten Mitose nach Aberrationsentstehung folgende Aberrationsklassen auftreten können: Chromosomenaberrationen, Chromatidenaberrationen und evtl. Subchromatidenaberrationen (Rieger und Michaelis, 1967). Die einzelnen Aberrationstypen sind: Deletionen, Defizienzen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen. Die Deletionen, Defizienzen, Duplikationen und Inversionen sind auf das Einzelchromosom beschränkt. An den Translokationen sind ein, zwei oder in seltenen Fällen mehr als zwei Chromosomen beteiligt (Rieger und Michaelis, 1967).

a) Chromosomenaberrationen (Rieger und Michaelis, 1967; Rieger et al., 1968)

Chromosomale Aberrationen entstehen während des präreplikativen Abschnittes der Interphase (G_1). Da die Chromosomen in der G_1-Phase funktionell einsträngig vorliegen, spricht man auch von «presplit»-Aberrationen.

Intrachromosomale Aberrationen: Alle an einer Aberration beteiligten Brüche treten im gleichen Chromosom auf.

Deletionen: Interkalare Chromosomenstückausfälle, wobei die Deletion als perizentrisch bezeichnet wird, wenn die zwei Brüche in beiden Chromosomenarmen liegen, als parazentrisch, wenn die zwei Brüche im gleichen Chromosomenarm liegen. Interkalare Deletionen geben meistens Anlass zu Reunionen zwischen den Bruchflächen, so dass zentrische oder azentrische Ringe entstehen. Ringe sind immer das Ergebnis von zwei Brüchen vor dem Eintritt der Chromosomenreduplikation im Interphasekern. Sehr kleine azentrische Ringe werden als «minutes» bezeichnet.

Defizienzen: Terminale Chromosomenstückausfälle oder Chromosomenbrüche (B″).

Inversionen: Intrachromosomale Strukturumbauten, charakterisiert durch invertierte interkalare Chromosomensegmente. Nach der Bruch-Reunions-Hypothese sind Inversionen das Resultat von zwei Brüchen in einem Chromosom, Drehung des Segments zwischen den Brüchen um 180° und Reunion der Bruchflächen. Von perizentrischen Inversionen spricht man, wenn das invertierte Segment Teile beider Chromosomenarme umfasst, von parazentrischen, wenn das invertierte Segment auf einen Chromosomenarm beschränkt bleibt. Die letzteren sind mikroskopisch nicht erkennbar.

Duplikationen: Verdoppelungen von Chromosomensegmenten, wobei die identischen Segmente in beiden Chromosomenarmen (interarm) oder im gleichen Chromosomenarm (intraarm) lokalisiert sein können.

Translokationen: Strukturumbauten, in deren Verlauf ein Chromosomensegment in neuer Lage im gleichen Chromosom innerhalb des gleichen (intraradial) oder zwischen den beiden Chromo-

somenarmen (extraradial) eingebaut wird. Dieser Aberrationstyp ist mikroskopisch meist nicht sichtbar.

Interchromosomale Aberrationen: Die an einer Aberration beteiligten Brüche treten in verschiedenen Chromosomen auf.

Translokationen: Strukturumbauten, in deren Verlauf ein Chromosomensegment auf ein anderes Chromosom übertragen wird (= nicht reziproke Translokation oder Transposition, wobei es zu Duplikation im einen und Deletion im andern Chromosom kommt) oder zwei Segmente zwischen homologen oder inhomologen Chromosomen wechselseitig ausgetauscht werden (= reziproke Translokation). Reziproke Translokationen sind asymmetrisch, wenn dizentrische Chromosomen und azentrische Fragmente entstehen, symmetrisch, wenn nach der Translokation weiterhin monozentrische Chromosomen vorliegen. Die letzteren sind mikroskopisch nur dann sichtbar, wenn die ausgetauschten Segmente von deutlich unterschiedlicher Grösse sind.

b) Chromatidenaberrationen (Rieger und Michaelis, 1967; Rieger et al., 1968)

Im Vergleich zu den Chromosomenaberrationen bestehen mehr intrachromosomale Umbaumöglichkeiten, so dass die Zahl der möglichen Aberrationstypen grösser wird. Chromatidale Aberrationen entstehen während und nach der Chromosomenreduplikation (S und G_2 der Interphase, aktive Kernteilungsstadien). Da die Chromosomen in diesen Stadien funktionell doppelsträngig vorliegen, spricht man auch von «postsplit»-Aberrationen.

Intrachromosomale Aberrationen: Alle an einer Aberration beteiligten Brüche treten in Chromatiden des gleichen Chromosoms (Schwesterchromatiden) auf.

Deletionen: Die zentrischen oder azentrischen Chromatidenfragmente interkalarer peri- und parazentrischer Deletionen können zu zentrischen oder azentrischen Ringchromatiden führen, während die entsprechenden Chromosomenaberrationen typische Ringchromosomen zeigen.

Defizienzen: Terminale Chromatidenstückausfälle sind möglich durch Bruch in einer Chromatide (= Chromatidenbruch, B′) oder Brüche in beiden Chromatiden (= Isolocus- oder Isochromatidenbrüche, Iso-B′). Der Isolocustyp ist in der Regel mit Schwesterchromatidenreunion (SR) im zentrischen und/oder azentrischen Fragment begleitet. SR führt zu Anaphasenbrückenbildung. Eine Unterscheidung der Iso-B′ von den B″ der Chromosomenaberrationen ist insofern möglich, als im ersten Fall die SR die Regel, im zweiten die Ausnahme ist. Thoday (1952) charakterisiert die möglichen Isolocustypen mit folgenden Abkürzungen:

NUpd	= «non union proximal distal»		SUpd	=	«sister union proximal distal»
NUp	= «non union proximal»	mit	SUd	=	«sister union distal»
NUd	= «non union distal»	mit	SUp	=	«sister union proximal»

Inversionen: Peri- und parazentrische Inversionen, wobei wie bei den entsprechenden Chromosomenaberrationen die parazentrischen mikroskopisch nicht feststellbar sind.

Duplikationen: Von inter- oder intraarmen Duplikationen werden am häufigsten intraarme Duplikationen (DD) gefunden. Dabei wird nach Eintritt von 3 Chromatidenbrüchen ein Segment einer Chromatide in die andere als Duplikation eingebaut (Duplikation im einen und Deletion im andern Chromatid desselben Chromosoms). DD können auch aufgefasst werden als intrachromosomale nicht reziproke Translokationen oder Transpositionen.

Interchromosomale Aberrationen: Die an einer Aberration beteiligten Brüche treten in Chromatiden verschiedener Chromosomen auf.

Translokationen: Nicht reziproke Chromatidentranslokationen (T′) oder Transpositionen sind selten, reziproke T′ mit wechselseitigem Austausch von Chromatidensegmenten zwischen Chromatiden verschiedener Chromosomen häufig. Wie bei den entsprechenden Chromosomenaberrationen sind reziproke T′ asymmetrisch, wenn dizentrische Chromatiden und azentrische Chromatidenfragmente entstehen, symmetrisch, wenn nach der Translokation weiterhin monozentrische Chromatiden vorliegen. Symmetrische und asymmetrische reziproke T′ sind im Gegensatz zu den entsprechenden Chromosomenaberrationen alle eindeutig mikroskopisch feststellbar. Nach Evans (1961) sind durch weitere Unterteilung der reziproken T′ nach der gegenseitigen Zentromerlage (polarisiert oder nicht polarisiert), nach dem Austauschtyp (X- oder U-förmiger Typ), nach dem Vorhandensein von Bruchflächen, die keine Reunionen erfahren haben (vollständig oder unvollständig) und nach der Lage der offen gebliebenen Bruchstellen (proximal oder distal) 10 Typen von reziproken T′ möglich. Die sogenannten Triradiale gehören als dreiarmige interchromosomale Umbaukonfigurationen ebenfalls zu den T′. Triradiale sind Chromosomenumbauten, basierend auf

einem B′ im einen, einem Iso-B′ im andern Chromosom und Reunion der Bruchflächen. Asymmetrische Triradiale sind von einem azentrischen Fragment, symmetrische von einem zentrischen Fragment begleitet.

c) Subchromatidenaberrationen (Levan und Tjio, 1948; La Cour und Rutishauser, 1954; Rieger und Michaelis, 1967; Rieger et al., 1968)

In dieser Aberrationsklasse sind strukturelle Untereinheiten der Chromatiden – Subchromatiden, wahrscheinlich die Halbchromatiden – die dem Mutationsgeschehen zugrunde liegende Einheit. Die diagnostischen Merkmale subchromatidaler Strukturveränderungen sind Subchromatidbrücken oder Pseudochiasmata in der Anaphase. Die Induktion erfolgt in der späten Interphase, in der Prophase oder auch noch in der Metaphase. Subchromatidenaberrationen ohne Reunionen führen zu keinen Pseudochiasmata und sind deshalb mikroskopisch nicht erfassbar.

Achromatische Läsionen oder «gaps» sind ungefärbte, Feulgen-negative Chromatidensegmente, die vermutlich keine echten Diskontinuitäten im Chromatid darstellen. Es ist bis heute nicht entschieden, ob «gaps» als Chromosomenmutationen zu bezeichnen sind oder nicht. Aus diesem Grunde habe ich in meinen Auswertungen «gaps» nicht als echte Aberrationen mitgezählt.

Die Chromosomenmutationen sind das Endresultat von komplizierten Prozessen, deren Verlauf noch weitgehend unbekannt ist. Zwei Modellhypothesen sind entwickelt worden, ohne dass darin eine Aussage über die Art des Primärereignisses sowie die genauen Wirkungsmechanismen zur Aberrationsentstehung (siehe Einleitung) enthalten wäre. Es sind dies: (1) die Bruch-Reunions-Hypothese und (2) die Austauschhypothese. Nach Hypothese (1) sind die chromosomalen Strukturveränderungen primär das Ergebnis von Brüchen im Sinne von Diskontinuitäten in der chromosomalen Längsstruktur, spontan oder durch Einwirkung von Mutagenen entstanden. 90–99 % dieser Brüche verbinden sich wieder zum ursprünglichen Zustand (Restitution), so dass keine Strukturveränderungen entstehen. Ein sehr kleiner Teil von Brüchen vermag die Restitution nicht richtig zu vollziehen; es kommt zu einer «Stabilisierung» der Bruchflächen, so dass eine echte Diskontinuität erhalten bleibt (Defizienz oder terminale Deletion), oder aber zwei oder mehr Brüche treten in Wechselwirkung und vereinigen sich nicht in der alten, sondern in neuer Ordnung (Reunion), so dass inter- und intrachromosale Strukturumbauten entstehen (z.B. Sax, 1940; Evans, 1962; Rieger, 1966). Nach Hypothese (2) sind die chromosomalen Strukturveränderungen nicht primär das Ergebnis von Brüchen im Chromosom, sondern von «labilen Zuständen» unbekannter Natur, die einen Austauschprozess einleiten, der im Prinzip dem meiotischen Crossing-over gleichen soll. Auf die «Austauscheinleitung» folgt der mechanische Austauschprozess, der im Endeffekt zu den Chromosomenmutationen führt. Wenn aus räumlichen oder zeitlichen Gründen zwei «labile Zustände» nicht in Wechselwirkung treten und somit keine «Austauscheinleitung» vollziehen, werden sie durch Restitution «repariert» (Revell, 1959 und 1963; Evans, 1962; Rieger, 1966). Solange das Wissen über Chromosomenstruktur und molekulare Prozesse zur Aberrationsentstehung (siehe Einleitung) lückenhaft ist, bleiben die beiden Modellvorstellungen nicht mehr als Hypothesen, ohne dass es möglich wäre, die Gültigkeit der einen Hypothese zugunsten der andern eindeutig auszuschliessen (Rieger und Michaelis, 1967). Wenn in der vorliegenden Arbeit die Austauschhypothese nicht speziell erwähnt ist, bezieht sich die Bruchanalyse im beschreibenden Sinne – wie in der Mehrzahl diesbezüglicher Arbeiten – auf das Bruch-Reunions-Konzept.

Die benutzten Termini des Mitosezyklus und seiner Phasenabschnitte sind: T der Gesamtmitosezyklus, M die Mitose, S die Zeitspanne der DNS-Synthese im mittleren Bereich der Interphase, G_1 und G_2 («gap») der präsynthetische bzw. postsynthetische Abschnitt der Interphase. Die erste Mitose nach ^{3}H-TdR- bzw. DHMP-Behandlung wird als X_1, die zweite als X_2 bezeichnet.

Resultate

I. Physiologische Vorversuche

1. Einleitung

Da der zytologische Effekt eines exogen zugeführten Peroxyds zytologisch getestet werden soll, muss die Frage abgeklärt werden, ob im Wurzelmeristem von *Vicia faba* ein aktives, peroxydabbauendes Enzymsystem vorhanden ist und das gewählte orga-

nische Peroxyd durch dieses abgebaut wird. Trifft dies zu, so ist ein Test des Peroxyds auf radiomimetische Wirkung nur unter Hemmung des enzymatischen Abbaus möglich. Das dabei am ehesten in Frage kommende Enzym, die zu den direkten Oxydasen gehörende Peroxydase, ist ein Zellhämin, das die Oxydation einer Vielzahl von H_2-Donatoren, insbesondere von Phenolen und Aminen mit Hilfe von H_2O_2 oder organischen Peroxyden (Alkylhydroperoxyden) als H_2-Akzeptoren katalysiert – Reaktionsmechanismus siehe Methoden – (Sumner und Myrbaeck[1], 1951; Mahler und Cordes, 1961). Die Katalase, ebenfalls ein Zellhämin mit der Wirkung einer direkten Oxydase, oxydiert mit Hilfe von H_2O_2 ein zweites Molekül H_2O_2 (H_2-Donator), was einer Zersetzung von H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff gleichkommt, oder aber sie wirkt peroxydatisch mit H_2O_2 oder einem organischen Peroxyd (Alkylhydroperoxyd) als H_2-Akzeptor sowie einem organischen Substrat als H_2-Donator (Sumner und Myrbaeck[1], 1951); sie vermag nach Weitzel et al. (1961) DHMP nicht peroxydatisch abzubauen, so dass ein Abbau nur durch Peroxydase zu erwarten ist.

Peroxydasen sind in Pflanzen weit verbreitet (van Fleet, 1947, 1959 und 1962). Ihre Funktion im physiologischen Geschehen der Pflanze ist weitgehend umstritten. Sie steht unter anderem in Diskussion beim Indolessigsäure-Abbau, bei Respirationsvorgängen, bei Hydroxylierungen, bei der Polymerisation des Lignins, bei der Oxydation biologisch aktiver Proteine (aus Hess, 1968), bei der Zelldifferenzierung und Histogenese (van Fleet, 1947 und 1959; Jensen, 1955), im Zellwand- bzw. Mittellamellenstoffwechsel (Nuotclà, 1969) und beim Abbau des durch eine Anzahl von Dehydrierungsprozessen entstehenden H_2O_2 (siehe Leuthardt, 1963). Peroxydatischer Abbau von gewissen organischen Peroxyden ist zwar möglich (Sumner und Myrbaeck, 1951; Mahler und Cordes, 1961), dürfte aber unter normalen Stoffwechselbedingungen kaum vorkommen, da im allgemeinen keine Reaktionen bekannt sind, die zur Entstehung von organischen Peroxyden führen. Diese Art des Abbaus gewinnt vermutlich erst dann an Bedeutung, wenn die Pflanze aus irgendwelchen Gründen organische Peroxyde von aussen aufgenommen hat (z. B. in meinen Versuchen durch Behandlung mit einem organischen Peroxyd) oder der Stoffwechsel direkt im Sinne der Bildung von organischen Peroxyden beeinflusst wird (z. B. durch Bestrahlung mit energiereichen Strahlen).

Die Frage nach der Lokalisation einer aktiven Peroxydase im Wurzelmeristem von *Vicia faba* wurde durch einen histochemischen Nachweis geklärt, und diejenige nach der peroxydatischen Abbaufähigkeit des DHMP durch titrimetrische In-vitro-Versuche mit Wurzelextrakt von *Vicia faba* und reiner Meerrettichperoxydase.

2. Histochemische Lokalisation der Peroxydaseaktivität

Es gibt eine grosse Zahl von verschiedenen Verfahren zum histochemischen Nachweis der Gruppe der Peroxydasen (Reiss, 1967); keine Methode vermag aber voll zu befriedigen. Ursache hiefür ist die geringe H_2-Donator-Spezifität der Peroxydasen. Von den durch H_2O_2 oder organische Peroxyde oxydierbaren Aminen und Phenolen muss gefordert werden, dass sie farbige, wasserunlösliche und stabile Oxydationsprodukte ergeben. Die von Graham et al. 1965 vorgeschlagene Methode mit Aminoäthylcarbazol vermag diese Anforderungen der Histochemie am ehesten zu erfüllen

[1] Enzyme Nomenclature. Recommendations 1964 of the International Union of Biochemistry. Elsevier Publ. Co., Amsterdam 1965.

und wurde deshalb für meine Versuche verwendet. Das Prinzip besteht dabei darin, dass die nachzuweisende Peroxydase die Oxydation von Aminoäthylcarbazol durch H_2O_2 oder ein geeignetes organisches Peroxyd katalysiert; die Reaktion liefert ein wasserunlösliches rotes Reaktionsprodukt. Der verwendete Versuchsansatz (siehe Methoden) ergab positive Resultate; wie Abbildung 1 zeigt, ist in Zellen des *Vicia-faba*-Wurzelmeristems eine aktive Peroxydase lokalisiert. Hitzeinaktivierung, Azidbehandlung und Inkubation ohne H_2O_2 als Kontrollreaktionen lassen den Schluss zu, dass die gefundene Peroxydaseaktivität wahrscheinlich nicht durch andere intrazelluläre Oxydasesysteme (sog. Pseudoperoxydasereaktion) oder Adsorptionsartefakte (Deane et al., 1960; van Fleet, 1962; Nuotclà, 1969) vorgetäuscht wurde. Hitzeinaktivierung führte zu einem vollständigen Verschwinden der Farbreaktion mit dem Aminoäthylcarbazolreagens. Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Nuotclà (1969) an Zea-Mays-Wurzeln mit demselben Testreagens. Da eine durch Fe^{+++}-haltige Verbindungen verursachte Pseudoperoxydasereaktion erst bei Temperaturen weit über 100 °C inaktiviert wird (Deane et al., 1960), dürfte die fehlende Färbung bei Temperaturen um 100 °C folgende Schlüsse zulassen: Die genannte Pseudoperoxydasereaktion täuscht im Kontrollversuch (ohne Hitzeinaktivierung) keine Peroxydaseaktivität vor. Die Peroxydaseaktivität des Kontrollversuchs beruht auf einer hitzelabilen Peroxydase (siehe auch Nuotclà, 1969). Weitere Versuche mit Natriumazid als Peroxydaseinhibitor (Nuotclà, 1969) sowie mit Inkubationsmedien ohne das Substrat H_2O_2 (Reiss, 1967) führten zu weniger eindeutigen Ergebnissen, das letztere wohl darauf beruhend, dass im Gewebe trotz fehlender Zugabe von H_2O_2 noch genügend endogenes Peroxyd als H_2-Akzeptor zur Verfügung steht. Die als Pseudoperoxydasereaktion wirkende Phenoloxydase vermag das Nadireagens durch intrazelluläre Chinone zu oxydieren (Deane et al., 1960). Diese Reaktion dürfte beim verwendeten Carbazolreagens genau so wenig in Frage kommen wie der von van Fleet 1959 und 1962 erwähnte, durch Chinone bedingte Adsorptionsartefakt bei Anwendung des Nadireagens. Leider konnte das sehr wirksame, die Peroxydase reversibel hemmende KCN (Deane et al., 1960) nicht in die Kontrollversuche einbezogen werden, da das verwendete Carbazolreagens im sauren pH-Bereich die besten Resultate liefert, in der KCN-Lösung aber andererseits erst bei pH $\geqq 7$ freie Cyanidionen vorliegen, die allein hemmend wirken (Bard, 1966).

Trotzdem nicht mit absoluter Sicherheit Pseudoperoxydasereaktionen ausgeschlossen werden können, darf zusammen mit den im nächsten Kapitel besprochenen In-vitro-Versuchen mit Enzymextrakten von *Vicia-faba*-Wurzeln sowie reiner Meerrettichperoxydase geschlossen werden, dass im Meristem eine aktive Peroxydase lokalisiert ist. Mehrere Autoren (van Fleet, 1947 und 1959; Jensen, 1955; Nuotclà, 1969) fanden an Wurzeln unterschiedlicher Pflanzenspezies den gleichen Sachverhalt. Die intensive Reaktion in meristematischen Zellen (Abb. 1) steht nach Nuotclà (1969) möglicherweise im Zusammenhang mit der Synthese von Zellwandmaterial.

3. Enzymatischer Abbau von DHMP

Nach Wieland und Sutter (1930) werden mit der Pyrogallolmethode nach einer Reaktionszeit von 5 min H_2O_2 vollständig, Alkylhydroperoxyde schwach und Dialkylperoxyde nicht abgebaut. Wenn man aber die Reaktionszeit verlängert, dann wird aufgrund eigener Versuche mit zwei unterschiedlichen titrimetrischen Methoden (Me-

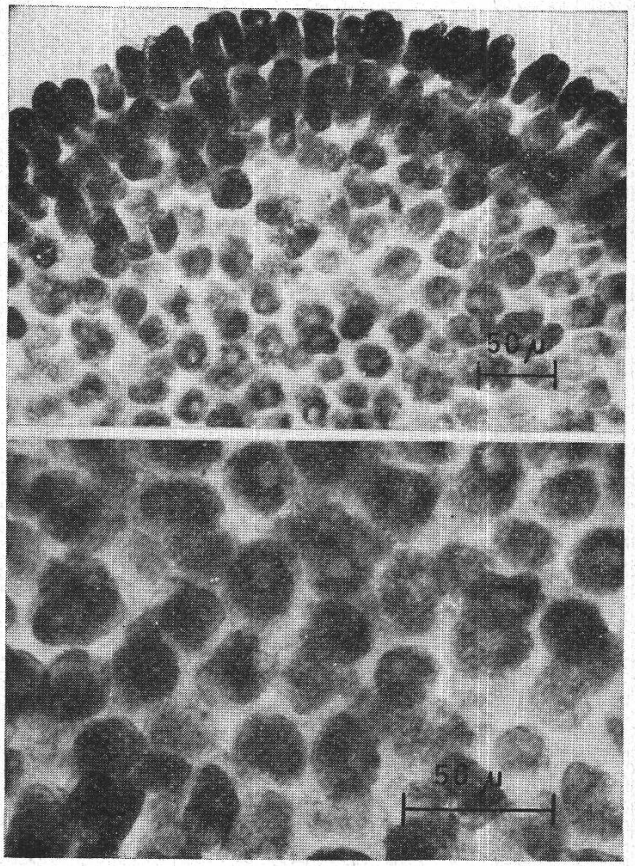


Abbildung 1

Histochemischer Peroxydasenachweis in Wurzelmeristemzellen von *Vicia faba* (Methode nach Graham et al., 1965)

thode I nach Weitzel et al., 1961, modifiziert, und Methode II nach Purr, 1950, siehe Methoden) das getestete DHMP nach der allgemeinen Peroxydasereaktion (siehe Methoden) abgebaut. Die der Methode II zugrunde liegende Abnahme des Oxydationsproduktes Ascorbinsäure als Mass der Peroxydaseaktivität ergab eine eindeutige Beziehung zur Reaktionszeit (Abb. 2), bestätigte aber trotzdem das von Wieland und Sutter 1930 veröffentlichte Ergebnis, wonach nach 5minütiger Reaktionszeit organische Peroxyde nicht nennenswert abgebaut werden. Da Dialkylperoxyde von Peroxydasen nicht angegriffen werden (Sumner und Myrbaeck, 1951), wohl aber Alkylhydroperoxyde, muss angenommen werden, dass erst der von Wieland und Wingler 1923 beschriebene hydrolytische Zerfall (halbseitige Hydrolyse) des DHMP (in Lösung) zum Monohydroxymethylhydroperoxyd einen peroxydatischen Abbau des DHMP ermöglicht. Abbildung 2 zeigt weiter, dass der Ablauf der Peroxydasereaktion gemäss einer Reaktionsgleichung erster Ordnung bis zu einer ungefähr 20prozentigen Ascorbinsäureabnahme verläuft und die Reaktion im gewählten Testsystem bei pH 5 weit optimaler läuft als bei pH 7. Wie Tabelle 1 zeigt (siehe nächstes Kapitel) führten nach Methode I (chemische Bestimmung des abzubauenden Peroxyds nach einer bestimmten Reaktionszeit) sowohl *Vicia-faba*-Enzymrohextrakt als auch Meerrettichperoxydase als Enzymquellen nach einer Reaktionsdauer von 2 h zu einem fast vollständigen Abbau von DHMP, obwohl die Reaktion im Hinblick auf die im nächsten

Kapitel zu besprechenden Enzymhemmversuche nicht unter den optimalen pH-Bedingungen der Methode II durchgeführt worden ist.

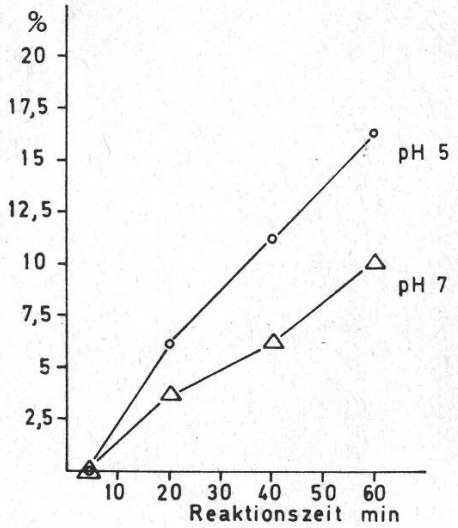


Abbildung 2

Peroxydasewirkung von *Vicia-faba*-Wurzelenzymextrakt auf Ascorbinsäure mit DHMP als Oxydationsmittel bei pH 5 und pH 7 (Methode II nach Purr, 1950). Ordinate: Abnahme der Ascorbinsäure in % (= Enzymaktivität)

Da im *Vicia-faba*-Wurzelmeristem mit einiger Sicherheit eine aktive Peroxydase histochemisch lokalisiert werden konnte und das Testreagens DHMP im In-vitro-Versuch durch dieses Enzymsystem abgebaut wurde, mussten geeignete Enzyminhibitoren gefunden werden, die den Peroxydabbau verhindern, ohne selbst radiomimetisch zu wirken, oder zumindest nicht bei den gewählten Konzentrationen.

4. Hemmung des enzymatischen Abbaus von DHMP

Es wurden verschiedene Inhibitoren mit den Methoden I und II (siehe Methoden) auf ihre peroxydatische Hemmwirkung geprüft. Das Wirkungsoptimum der pflanzlichen Peroxydase liegt zwar für das gewählte Reaktionssystem der Methode II bei pH 5, ist aber auch bei pH 7 aktiv (Abb. 2), so dass für beide Methoden pH 7 gewählt wurde, um so mehr als nach Heinen 1963 der pH-Bereich der Peroxydaseaktivität zwischen pH 5 und 8 liegt und andererseits für KCN als Hemmstoff ein pH $\geqq$ 7 unbedingt erforderlich ist, zumal erst im neutralen oder basischen Bereich freie Cyanidionen vorliegen, die allein hemmend wirken (Bard, 1966). Es kamen folgende Hemmstoffe zur Anwendung: KCN, Thiouracil, KSCN und NaF. Unter den gewählten Bedingungen hemmten Thiouracil, KSCN und NaF zwischen 30 und 50 %, während KCN als bekannter Hemmstoff schwermetallhaltiger Enzymsysteme bei der höchsten angewandten Konzentration die Peroxydaseaktivität um 95 % hemmte und bei der – aus zytologischen Kontrollversuchen mit Sicherheit nicht radiomimetischen (Abb. 6) – Konzentration von 0,1 mM immer noch um 75 % (Tab. 1). Das in den histochemischen Versuchen für die Kontrollreaktionen verwendete Natriumazid mit schwach positiver Hemmwirkung wurde in diesen In-vitro-Versuchen nicht getestet,

denn aus einer Arbeit von Kihlman (1957) ist zu entnehmen, dass für eine ungefähr 60prozentige Peroxydasehemmung im Vicia-Wurzelmeristem eine Konzentration von 10 mM nötig ist. Diese Konzentration ist für die anschliessende zytologische Prüfung eines Testagens völlig ungeeignet, denn sie wirkt selbst so stark zytostatisch, dass praktisch keine Zellteilungen mehr ablaufen (Kihlman, 1957).

Tabelle 1

Enzymatischer Abbau von DHMP und Enzymhemmung mit verschiedenen Inhibitoren

Reaktionsgemisch	Inhibitor	Aktives Peroxyd (%) Methode I	Peroxydaseaktivität (%) Methode I	Methode II
Kontrolle: DHMP		100	0	0
Kontrolle: DHMP+Pyrogallol		100	0	
Kontrolle: Enzymrohextrakt		0	100	100
DHMP+Enzymrohextrakt		8	92	
DHMP+Meerrettichperoxydase +Pyrogallol		6	94	
DHMP+Meerrettichperoxydase +Pyrogallol	KCN (1 mM)	95	5	
DHMP+Enzymrohextrakt	NaF (10 mM)	50	50	
DHMP+Enzymrohextrakt	KSCN (10 mM)	40	60	
DHMP+Enzymrohextrakt	Thiouracil (0,5 mM)	30	70	
DHMP+Enzymrohextrakt (+Ascorbinsäure bei Methode II)	KCN (5 mM)	97	3	5
DHMP+Enzymrohextrakt (+Ascorbinsäure bei Methode II)	KCN (1 mM)	93	7	5
DHMP+Enzymrohextrakt (+Ascorbinsäure bei Methode II)	KCN (0,5 mM)	85	15	14
DHMP+Enzymrohextrakt (+Ascorbinsäure bei Methode II)	KCN (0,1 mM)	75	25	27
DHMP+Enzymrohextrakt (+Ascorbinsäure bei Methode II)	KCN (0,05 mM)	50	50	55
DHMP+Enzymrohextrakt (+Ascorbinsäure bei Methode II)	KCN (0,01 mM)	0	100	100

Bemerkungen: Methode I nach Weitzel et al. (1961), modifiziert: Chemische Bestimmung des nicht abgebauten DHMP nach 2stündiger Reaktionszeit (pH 7). Methode II nach Purr (1950): Chemische Bestimmung der nach 1stündiger Reaktionszeit noch nicht durch DHMP oydierten Ascorbinsäure (pH 7).

II. Chromosomenmutagene und zytostatische Wirkung bei Vicia faba

1. Einleitung

Das bei *Neurospora* (Dickey et al., 1949) und *Drosophila* (Sobels, 1954a) als mutagen und bei *Ascites*tumoren der Maus als zytostatisch (Weitzel et al., 1961) beschriebene DHMP induzierte in Wurzelmeristemzellen von *Vicia faba* bei direkter Behand-

lung mit unterschiedlichen Konzentrationen, Einwirkungszeiten und pH der Versuchslösung ausser einigen wenigen Fragmentierungseffekten keine chromosomalen Strukturumbauten. Loveless (1951) erzeugte mit DHMP am selben Testsystem eine radiomimetische Wirkung, ohne indes den erzielten Effekt näher beschrieben zu haben; vermutlich handelt es sich ebenfalls um vereinzelte Fragmentierungseffekte der Chromosomenlängsstruktur. Aufgrund meiner physiologischen Vorversuche ist anzunehmen, dass DHMP enzymatisch abgebaut wird. Die beobachteten Fragmentierungseffekte könnten deshalb darauf beruhen, dass nicht DHMP, sondern ein Abbauprodukt oder höchstens ein geringer Anteil nicht abgebauter DHMP-Moleküle zur Wirkung kommt, wobei im letzteren Fall eventuell durch eine gleichzeitige Akkumulierung irgendwelcher Abbauprodukte die zum Chromosomenstrukturumbau nötigen Sekundärreaktionen nicht mehr ablaufen könnten. Zur Prüfung der effektiven Wirkung als Radiomimetikum ergibt sich damit die Notwendigkeit, vor oder gleichzeitig mit der DHMP-Behandlung eine Peroxydasehemmung durchzuführen. Wie Tabelle 1 der physiologischen Vorversuche sowie Befunde von Kihlman (1956 und 1957) zeigen, ist KCN der wirkungsvollste Hemmstoff, vermag er doch bei Konzentrationen um 1 mM unter anderem die Peroxydase- und Katalaseaktivität zu 90–100 % zu hemmen, ist dann allerdings selbst – unter aeroben Bedingungen – als Radiomimetikum anzusehen (Abb. 6). Es wurde deshalb eine tiefere KCN-Konzentration gewählt, nämlich 0,1 mM bei pH 7 (Phosphatpuffer, 1/150 M) unter aeroben Verhältnissen (belüftet). Unter diesen Bedingungen wurde die Peroxydase nach Tabelle 1 zu 70–80 % gehemmt, ohne dass das KCN eine signifikante zytostatische und chromosomenmutagene Eigenaktivität zeigte (Abb. 4, 5, 6, 10 und Tab. 4, 5). Alle beschriebenen zytologischen Versuche mit dem organischen Peroxyd DHMP wurden demzufolge mit KCN-Vorbehandlung unter den genannten Bedingungen ausgeführt und mit Kontrollversuchen (KCN allein) verglichen. Die Enzymhemmung wurde als Vorbehandlung gewählt, weil in der KCN-Lösung erst bei pH $\geqq 7$ die hemmenden Cyanidionen vorliegen. Bei gleichzeitiger Behandlung mit DHMP, das nur bei pH < 7 stabil bleibt und deshalb immer beim natürlichen pH seiner Lösung (ungefähr pH 4) verfüttert wurde, wäre das Cyanidion vollständig protoniert und als Hemmstoff unwirksam (Bard, 1966). DHMP (4 mM, ungepuffert) wurde in allen Versuchen während 1 h gefüttert.

2. Normalkaryogramm

Zur Metaphasenanreicherung wurden die Wurzeln vor der Fixierung 100 min mit einer Colchicinlösung (0,05 %) behandelt. Die Colchicinbehandlung führte zu besser analysierbaren Metaphasenplatten, bewirkte indes eine zusätzliche Chromosomenkontraktion, die im Durchschnitt nach Michaelis und Rieger (1959) gegenüber der Kontrolle zirka 25 % geringere Chromosomenlängen nach sich zieht. Da eine eventuell unterschiedliche Kontraktion der für die Auswertung ausgelesenen Platten eine Fehlerquelle bei der Chromosomenlängenmessung darstellt, wurde in allen Versuchen gleich lang mit Colchicin behandelt und die Längenmessung nur an solchen Chromosomen durchgeführt, die ungefähr dieselbe Chromatidenspreizung zeigten, eine Erscheinung, die mit steigender Dauer der Colchicinbeeinflussung zunimmt (Levan, 1938; Molé-Bajer, 1958). Gleiche Chromatidenspreizung der Chromosomen dürfte deshalb als optisches Mass für gleich lange Beeinflussung der Chromosomen

durch Colchicin und damit ungefähr gleich stark geförderte Chromosomenkontraktion gelten. Zur Karyogrammanalyse wurden die Chromosomenlängen durch Ausmessen von Mikrofotos mit Stechzirkel und Massstab ermittelt. Aus den Mittelwerten von 60 ausgemessenen Chromosomen pro Typ (total 360 Chromosomen) wurde umgerechnet auf relative Länge der einzelnen Chromosomenarme. Die Relativwerte sind auf das M-Chromosom (= 1,00) bezogen worden und zwecks Signifikanz der relativen Längenunterschiede einem statistischen Test (t-Test) unterworfen worden. Für die einzelnen Chromosomen wurden die Karyogrammsymbolisierungen von Evans (1961) übernommen (in Klammern Symbolisierungen nach Michaelis und Rieger, 1959).

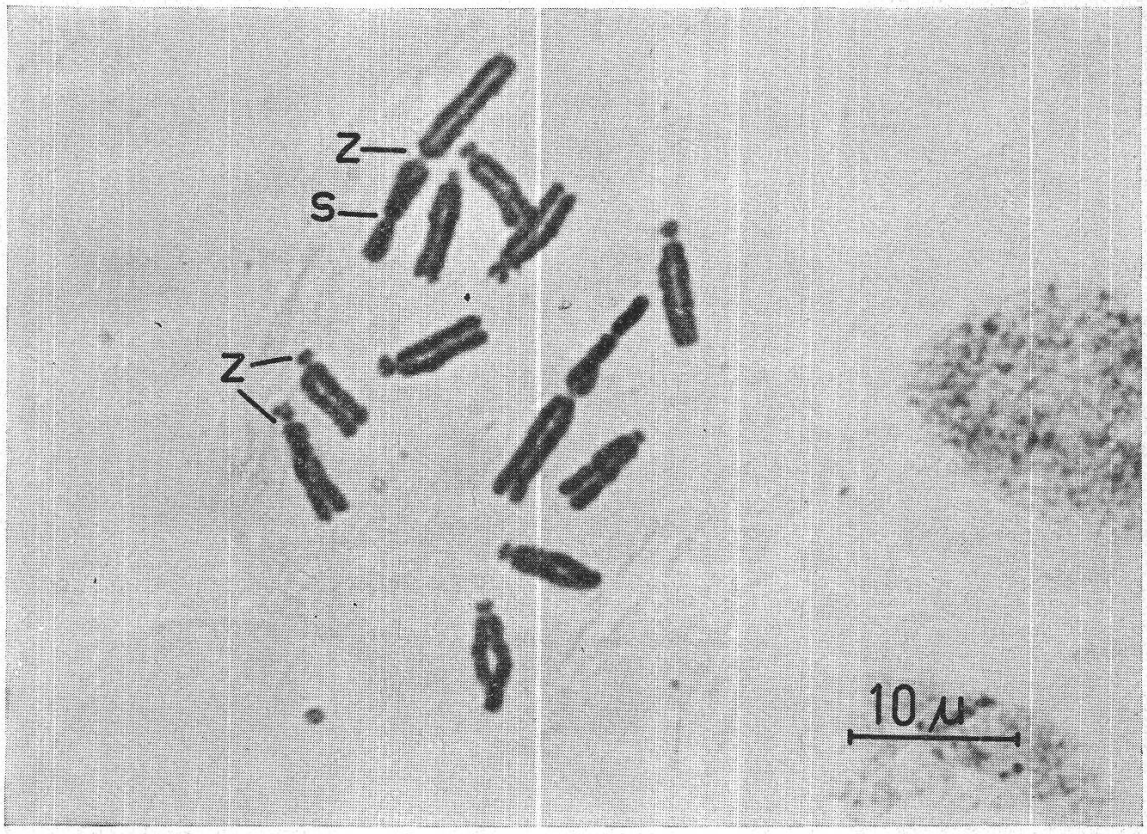


Abbildung 3a

Somatische Metaphase von *Vicia faba* (2 n = 12) mit 2 M- oder Satellitenchromosomen (Z = Zentromer; S = Sekundäreinschnürung oder Nukleolusorganisator) sowie 10 S-Chromosomen (Z = Zentromer)

Das Genom von *Vicia faba* lässt sich morphologisch eindeutig in 2 Gruppen unterteilen (Abb. 3a), nämlich ein grosses M- oder Satellitenchromosomenpaar mit metazentrischem Zentromer und einer einen Satelliten vom Chromosomenrestkörper abschliessenden Sekundäreinschnürung sowie 5 kleine S-Chromosomen-Paare mit akrozentrischem Zentromer. Die S-Chromosomen können durch lichtmikroskopische Abbildung allein morphologisch nicht mit Sicherheit unterteilt werden, es sei denn, die Chromosomen werden nebst der Strukturbeobachtung durch exakte Längenmessungen miteinander verglichen oder noch besser durch Erstellen von abstrakten

Äquivalentbildern mittels Mikroautoradiographie und/oder Kältebehandlung, welch letzteres einen Vergleich des Replikationsmusters der einzelnen Chromosomen bzw. der kältereaktiven und damit heterochromatischen Abschnitte der Chromosomen ermöglicht. Die Längenmessung ist mit vielen methodischen Fehlern behaftet, erlaubt aber am schnellsten eine grobe Typisierung. Die Chromosomenlängenmessung genügt zur Charakterisierung eines Karyotyps, der zu künstlich induzierten Karyotypveränderungen herangezogen wird, denn die zu analysierenden Chromosomenstrukturveränderungen sind vom Normalkaryotyp meist morphologisch gut unterscheidbar. Erst wenn es darum geht, verschiedene Karyotypen als systematisches Merkmal für taxonomische und evolutionistische Fragestellungen zu vergleichen, ist es unumgänglich, neben den morphologischen auch zytogenische und zytochemische Methoden heranzuziehen.

Im Karyogramm von Evans (1961) sowie Evans und Bigger (1961) konnten alle S-Chromosomen durch Vergleich der absoluten Längen unterschieden werden, ohne dass indes die Unterschiede statistisch gesichert wären. Das in meinem Karyogramm verwendete Mass der relativen Länge erscheint zuverlässiger, denn der Relativwert erhebt jeden Einzelwert zu einer Art Mittelwert, so dass präparativ unterschiedliche Längenausdehnungen ziemlich gut kompensiert werden. Eine übliche Anordnung der Chromosomen nach abnehmender relativer Länge des ganzen Einzelchromosoms ergibt keine gesicherte Signifikanz für irgendein S-Chromosom. Es ist deshalb zweckmässiger, die relativen Längen der einzelnen Chromosomenarme gesondert zu betrachten. Die dabei gefundenen Werte stimmen gut mit Vergleichswerten von Micha-

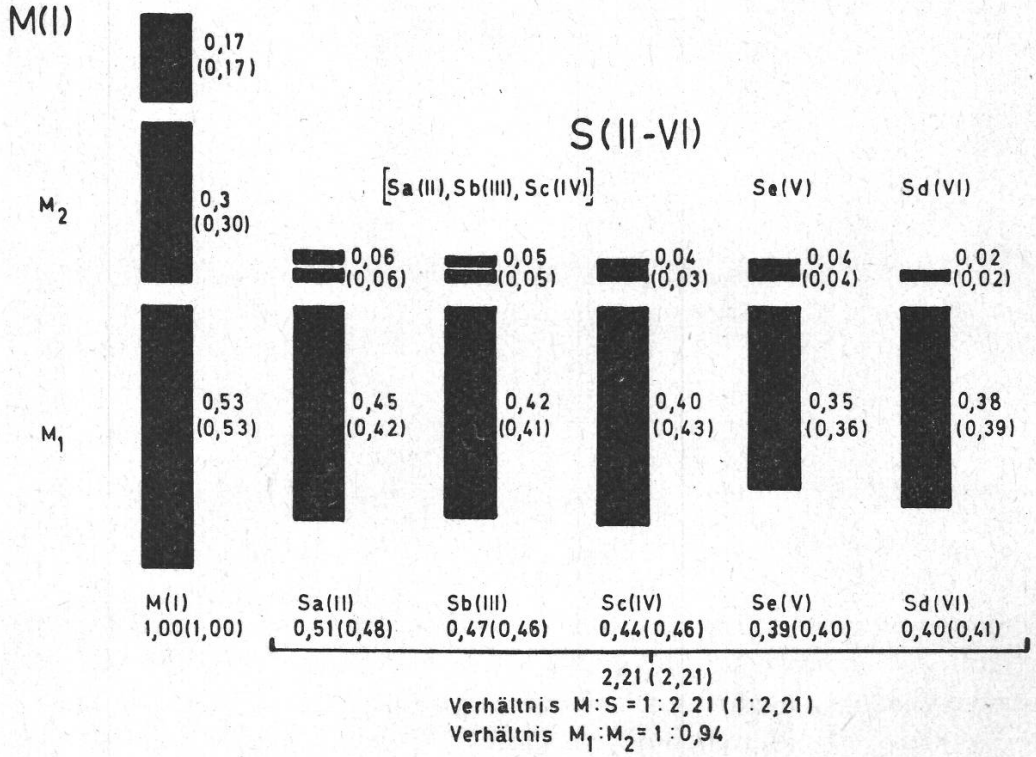


Abbildung 3b

Karyogramm des haploiden Chromosomensatzes von *Vicia faba* «Windsor». Relative Länge der betreffenden Chromosomenabschnitte, bezogen auf M-Chromosom = 1,00. In Klammern Vergleichswerte nach Michaelis und Rieger (1959)

elis und Rieger (1959) überein. Es ist durch Längenmessung nicht möglich, alle S-Chromosomen eindeutig zu unterscheiden; einzig der lange Arm von Chromosom Se und der kurze Arm von Sd zeigen statistisch gesicherte Längenunterschiede (Abb. 3b bzw. Tab. 2). Damit sind Sd und Se von der Gruppe (Sa, Sb, Sc) unterscheidbar: Sd aufgrund des statistisch signifikanten Unterschieds der relativen Länge des kurzen Armes und Se aufgrund des statistisch signifikanten Unterschieds der relativen Länge des langen Armes. Die S-Chromosomen können somit eindeutig in die 3 Gruppen (Sa, Sb, Sc), (Sd) und (Se) eingeteilt werden (Abb. 3b, Tab. 2). Der vielfach verwendete Armindex ergibt keinen Unterschied für Se. Die von verschiedenen Autoren erwähnten morphologischen Kriterien zur weiteren Unterscheidung der Chromosomen Sa, Sb und Sc – nämlich die 2geteilten kurzen Arme von Sa und Sb (z. B. Rieger und Michaelis, 1959) – können nicht in jeder Präparation beobachtet werden. Das Verhältnis der Länge von Chromosom M zur Gesamtlänge der 5 S-Chromosomen ist 1 : 2,21 (Abb. 3b). Die Vergleichswerte nach Michaelis und Rieger (1959) bzw. Evans und Bigger (1961) sowie Evans (1961) lauten 1 : 2,21 bzw. 1 : 2,16.

3. Karyogramm nach DHMP-Behandlung – Einfluss auf Chromosomenlänge

In diesem Versuch soll abgeklärt werden, ob nach DHMP-Behandlung die S-Chromosomen immer noch in 3 Gruppen unterteilt werden können. Trifft dies zu, dann ist eine gesonderte Bruchanalyse in jeder der genannten Chromosomengruppen möglich. Zu diesem Zweck wurden an aberranten Platten nach KCN + DHMP-Behandlung und überdies Metaphasenanreicherung durch Colchicin (siehe Kapitel II, 5, b) die absoluten und relativen Längen der Chromosomen bestimmt. Die relativen Längen waren kaum verändert (Tab. 2), so dass wie beim Normalkaryogramm das M-Chromosomen-Paar sowie von den S-Chromosomen-Paaren die 3 Gruppen (Sa, Sb, Sc), (Sd) und (Se) statistisch gesichert unterschieden werden konnten (Tab. 2). Da die relativen Längen – wie bereits erwähnt – eine eventuelle Veränderung der absoluten Chromosomenlängen nach Behandlung nicht aufzuzeigen vermögen, wurden die absoluten Chromosomenlängen unbehandelter und behandelter Karyotypen miteinander verglichen. DHMP-Behandlung führte zu einer beträchtlichen Längenzunahme der einzelnen Chromosomen mit einer übergrossen Streckung der Zentromere und einer im Vergleich zur Kontrolle stetig abnehmenden Längenzunahme von den grossen zu den kleinen Chromosomen (Tab. 2). Die positive Beeinflussung der Chromosomenkontraktion durch Colchicin – nach Michaelis und Rieger (1959) ungefähr 25 % – wird durch DHMP-Behandlung nahezu kompensiert. Ein Vergleichsversuch mit KCN als Peroxydaseinhibitor ohne anschliessende DHMP-Behandlung ergab keine Längenzunahme. Es kann vermutet werden, dass DHMP in irgendeiner Weise den Spiralisationszyklus der Chromosomen beeinflusst. Am unterschiedlichen Grad der Streckung in den verschiedenen Chromosomengruppen könnte die ungleiche Heterochromatinverteilung zumindest mitbeteiligt sein.

Tabelle 2

Relative Länge der Chromosomenarme von *Vicia-faba*-Chromosomen unbehandelt und nach DHMP-Behandlung, bezogen auf das M-Chromosom (= 1,00). Veränderung der absoluten Länge nach DHMP-Behandlung

			Relative Länge unbehandelt	behandelt	Absolute Länge (μ) unbehandelt	behandelt
M (I)	M_2	SAT	0,17	0,17	16,4	19,5 (= +19 %)
		SAT-Arm	0,30	0,31		
	M_1	Langer Arm	0,53	0,52		
Sa Sb Sc (II III IV)		Kurzer Arm	0,06/0,05/0,04	0,06/0,05/0,04	7,8	8,8 (= +14 %)
		Langer Arm	0,45/0,42/0,40	0,43/0,41/0,39		
Sd (VI)		Kurzer Arm	0,02[1]	0,02[2]	6,6	7,2 (= +10 %)
		Langer Arm	0,38	0,37		
Se (V)		Kurzer Arm	0,04	0,04		
		Langer Arm	0,35[3]	0,31[4]		

[1] Kurzer Arm statistisch gesichert um 60 % kleiner; t = 4,0 (bei $t_{0,1}$ = 1,7)
[2] Kurzer Arm statistisch gesichert um 58 % kleiner; t = 12,0 (bei $t_{0,1}$ = 1,64)
[3] Langer Arm statistisch gesichert um 15 % kleiner; t = 5,5 (bei $t_{0,1}$ = 1,7)
[4] Langer Arm statistisch gesichert um 23 % kleiner; t = 6,7 (bei $t_{0,1}$ = 1,64)

Längenverhältnis zwischen M- und S-Chromosomen (M:S): unbehandelt: 1:2,21
behandelt: 1:2,12

4. Mitose- und Phasenindex nach DHMP-Behandlung

Zur Ermittlung des Mitoseindex (MI) und seines eventuellen diurnalen Rhythmus trotz der gewählten Kulturbedingungen (siehe Methoden) sowie der Phasenindices unbehandelter Wurzelmeristeme wurden Sekundärwurzeln von 1–3 cm Länge – unter Anzuchtbedingungen, das heisst konstanter Temperatur von 24 °C und Dunkelheit gehalten – während 2 Tagen zu verschiedenen Tages- und Nachtzeiten (12.00/21.00/

09.30/12.00/16.00/24.00/05.00/10.00/15.00 Uhr) fixiert. Pro Bedingung wurden an je 2 Wurzelspitzen 2000 Meristemzellen ausgewertet. Für den Mitoseindex und die Phasenindices unter Peroxydeinfluss fütterte ich während 1 h mit KCN (0,1 mM, pH 7, Phosphatpuffer, 1/150 M) zur Peroxydasehemmung und anschliessend während 1 h mit DHMP (4 mM, ungepuffert) und fixierte nach 1, 4, 12, 20, 32, 40, 47, 67, 75 und 90 h. Pro Bedingung wurden an je 2 Wurzelspitzen 2000 Meristemzellen ausgewertet. Ein Kontrollversuch mit dem Enzyminhibitor allein erfolgte nach der gleichen Versuchsanordnung wie oben angegeben, aber ohne das Testreagens DHMP.

Normale Zellen weisen im allgemeinen ein typisches Muster von tagesperiodischen Funktionen auf: Zellteilungen und in engem Zusammenhang unter anderem Nukleinsäurestoffwechsel, Proteinsynthese und Energieumsatz durchlaufen während 24 h Maxima und Minima zu bestimmten Tageszeiten (Rensing, 1969). Wurzelmeristeme von *Vicia faba* zeigen unter natürlichen Licht- und Temperaturverhältnissen tageszeitliche Schwankungen der Mitosefrequenz mit einem Maximum um die Mittagszeit und einem Minimum während der Nacht (Harte und Zinecker-Brauer, 1960). Der Mitoseindex unbehandelter Wurzeln zeigt im eigenen Versuch (Abb. 4) bei konstanter Temperatur und Dunkelheit – in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Neary et al. (1959) – keinen diurnalen Rhythmus. Diese Aperiodizität des Testsystems ist eine Voraussetzung zu einer gesicherten Aussage über eine mögliche Beeinflussung des MI durch ein Agens sowie zur autoradiographischen Bestimmung der Mitosezyklusdauer und damit zur Erfassung der Sensibilität verschiedener Zellteilungsstadien

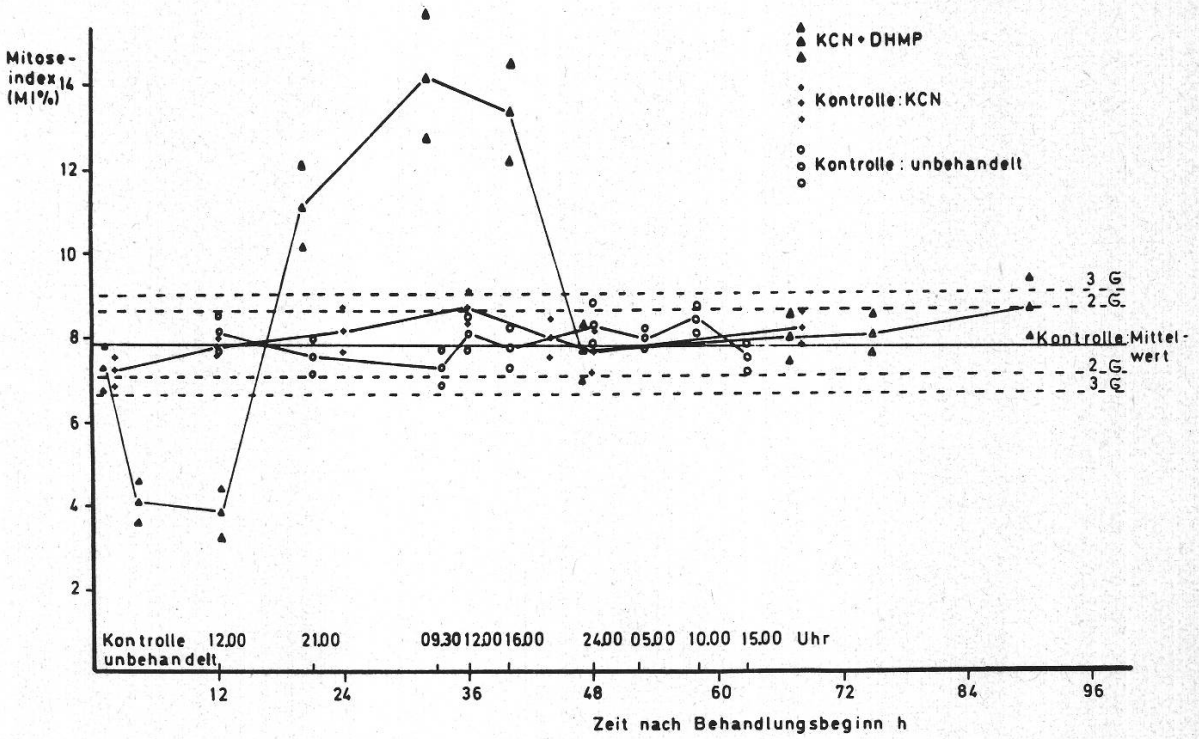


Abbildung 4

Mittelwerte und Standardabweichung der Mitoseindices DHMP-behandelter und unbehandelter Sekundärwurzeln. Kontrollversuch mit dem Enzyminhibtor KCN. Die Kontrollwerte unbehandelter Wurzeln mit einer horizontalen Geraden dargestellt. Gestrichelte Linien für die 2- bzw. 3-ς-Grenze der Kontrollwerte

gegenüber chromosomenmutagenen Agenzien. Der MI beträgt 7,8 ± 0,4 %; die Schwankungen zu verschiedenen Tageszeiten liegen unter den gewählten Bedingungen alle innerhalb der 3-ς-Grenzen (Abb. 4). Vergleichswerte verschiedener Autoren zeigen zum Teil beträchtliche Abweichungen. Neben Unterschieden in der Samensorte, im Samenalter sowie in der Grösse methodischer Fehler bei der Präparation und Aus-

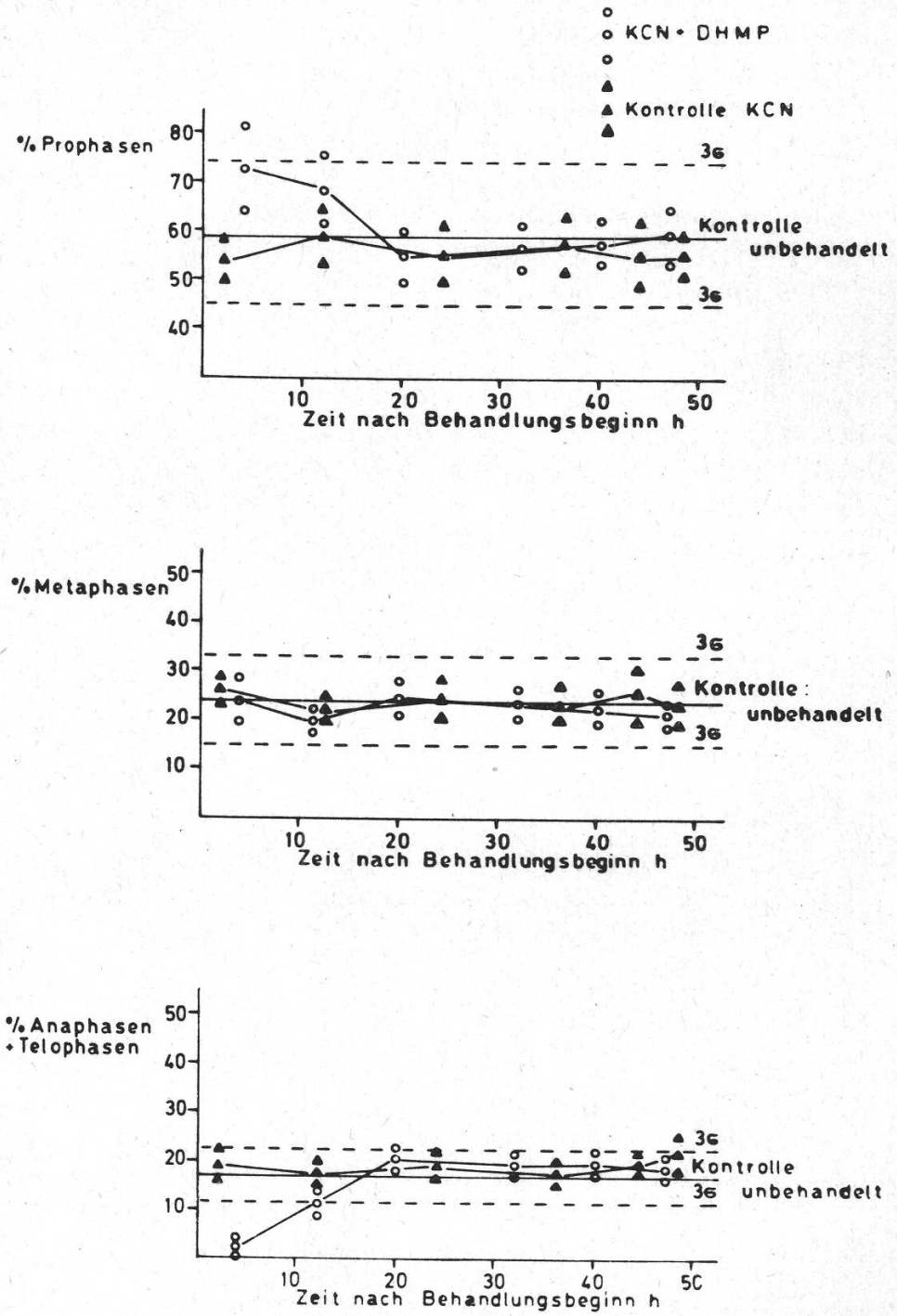


Abbildung 5

Mittelwerte und Standardabweichung der Phasenindices DHMP-behandelter und unbehandelter Sekundärwurzeln. Die Kontrollwerte unbehandelter Wurzeln mit einer horizontalen Geraden dargestellt. Gestrichelte Linien für die 3-ς-Grenze der Kontrollwerte

wertung dürften die verschiedenen Werte vor allem darauf zurückzuführen sein, dass sie sich meist auf andere Versuchstemperaturen beziehen. So fanden Neary et al. (1959) für 19 °C einen MI von 10,1 %, Evans und Scott (1964) für 19 °C 10,0 %, Keller (1963) für 18 °C 8,9 % und Murin (1964) für 25 °C 9,9 %, Evans und Savage (1959) hingegen für die gleiche Temperatur wie in meinen Versuchen (24 °C) 8,0 %, ein Wert, der recht gut mit dem von mir gefundenen MI von 7,8 % übereinstimmt. Zur Ermittlung der Phasenindices unbehandelter Wurzeln wurden die Ana- und Telophasen als eine Phase zusammengefasst, da späte Anaphasen nicht eindeutig von frühen Telophasen abgegrenzt werden können. Die Phasenindices unbehandelter Wurzeln ergaben die folgenden Prozentwerte (siehe auch Abb. 5):

Prophasen	59,0 ± 4,7
Metaphasen	24,0 ± 3,1
Ana-/Telophasen	17,0 ± 1,8

Nach Behandlung mit DHMP kommt es vorerst zu einem starken Abfall des MI, gefolgt von einem kompensatorischen Anstieg mit Mitoseindices, die um fast 100 % über den Kontrollwerten liegen. Maxima und Minima der MI-Veränderungen liegen weit ausserhalb der 3-σ-Grenzen der Kontrollen. Nach etwa 48 h werden wieder die normalen Werte der Kontrollen (mit und ohne KCN) erreicht mit Schwankungen, die innerhalb der 3-σ-Grenzen der Kontrollen liegen (Abb. 4). Die Kontrolle mit dem Enzyminhibitor KCN allein zeigt deutlich, dass die starke Beeinflussung des MI durch KCN + DHMP nicht durch direkte zytologische Wirkung des KCN zustande kommt, sondern eindeutig der – bereits weiter oben gemachten – Annahme entspricht, wonach dem KCN lediglich eine Vermittlerrolle in der Peroxydwirkung zukommt, nämlich eine Hemmung des enzymatischen Abbaus von DHMP im Meristem und in der Folge eine Akkumulierung des Peroxyds bis zu einer Konzentration, die zur Induktion eines zytostatischen oder mutagenen Effekts erforderlich ist. Der Phasenindex zeigt nach Peroxydbehandlung zum Zeitpunkt der stärksten Erniedrigung des MI Verschiebungen in den einzelnen Phasenanteilen; neben einem relativen Anstieg an Prophasen ist eine deutliche, bis unter die 3-σ-Grenze der Kontrollwerte fallende Abnahme an Ana-/Telophasen festzustellen (Abb. 5). Wenn die Mitosehemmung in allen Phasen der Mitose ungefähr gleich stark erfolgt, ist keine Verschiebung der Phasenindices zu erwarten, wenn dagegen in unserem Fall auf einen Prophasenanstau ein fast völliges Verschwinden der Ana-/Telophasen im gleichen Zeitabschnitt folgt, muss zwischen den beiden Phasen eine agensinduzierte Blockierung stattgefunden haben.

Der zytostatische Effekt von DHMP ist mit demjenigen von Röntgenstrahlen schwacher Dosis insofern vergleichbar, als bei beiden im Anschluss an den Abfall des MI ein kompensatorischer Anstieg erfolgt. Ein kritischer Zeitpunkt scheint für das organische Peroxyd und für Röntgenstrahlen (Neary et al., 1959) unter anderem zwischen Prophase und Anaphase zu liegen. Röntgenbestrahlte Zellen, die diese Stadien bereits durchlaufen haben, sind im Teilungsablauf kaum verzögert, wenn die verwendete Dosis niedrig ist (Swanson, 1960). DHMP induziert überdies Verzögerungen in der interphasischen, vor allem an die S-Phase gebundenen Zellproliferation (Abb. 10, Tab. 3) und gleicht damit stark der zytostatischen Wirkung von Röntgenstrahlen höherer Dosis (Scott und Evans, 1967, siehe auch Tab. 3). Die kompensatorische Steigerung des MI ist bei DHMP und Röntgenstrahlen höherer Dosis vermutlich das Resultat einer Teilsynchronisierung von Zellen, die zum Zeitpunkt der

Behandlung in Mitose selbst oder in der Interphase waren (siehe Kapitel II, 5, c), während bei Röntgenstrahlen niedriger Dosis die Teilsynchronisierung vorwiegend auf mitotische Zellen beschränkt bleibt, indem die anfänglich unverzögerten Mitosezellen nach Ablauf eines Mitosezyklus die verzögerten Mitosezellen zeitlich aufgeholt haben und in der Folge zusammen in Mitose treten (Swanson, 1960).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DHMP zytostatische Effekte induziert, die sich etwa mit denjenigen von Röntgenstrahlen, insbesondere höherer Dosis, vergleichen lassen.

5. Chromosomenbrüche nach DHMP-Behandlung

a) Beziehung zwischen Peroxydasehemmung durch KCN und Chromosomenbruchinduktion durch DHMP nach Vorbehandlung mit verschiedenen KCN-Konzentrationen

Sekundärwurzeln von *Vicia faba* wurden mit je verschiedenen KCN-Konzentrationen (5 mM; 1 mM; 0,5 mM; 0,1 mM; 0,05 mM; 0,01 mM; pH 7, Phosphatpuffer, 1/150 M) während 1 h vorbehandelt und anschliessend bei allen Konzentrationen für 1 h mit DHMP (4 mM, ungepuffert) gefüttert. In einer Testserie wurde normal belüftet, in einer zweiten die KCN-Lösung mit Stickstoff begast, währenddem die nachfolgende DHMP-Behandlung wieder normal belüftet wurde. Kontrollversuche

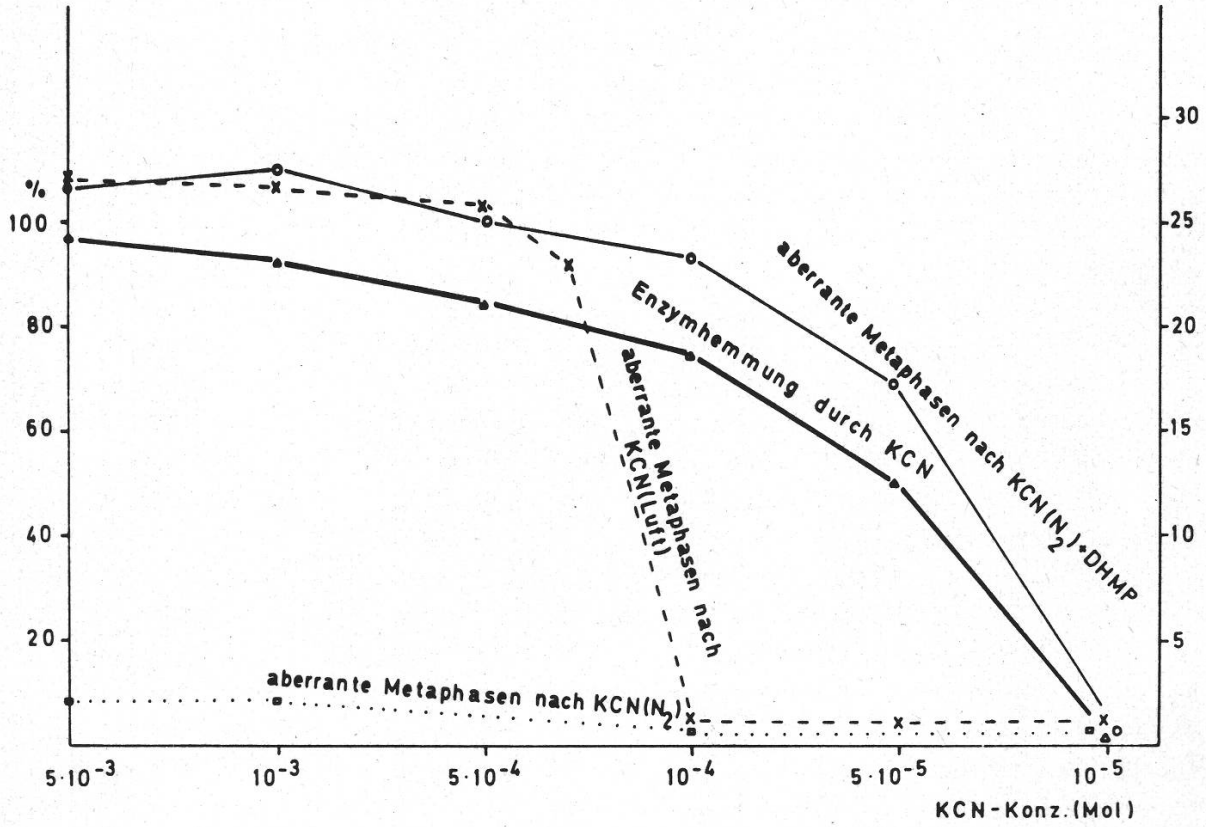


Abbildung 6

Beziehung zwischen Enzymhemmung (Peroxydase) durch KCN und Chromosomenbruchinduktion durch DHMP nach Vorbehandlung mit verschiedenen KCN-Konzentrationen. Abszisse: KCN-Konzentration (Mol). Ordinate links: Enzymhemmung in %. Ordinate rechts: Metaphasen aberrant in %

mit KCN allein führte ich unter den gleichen Bedingungen durch. Die Erholungszeiten nach Fütterungsende betrugen in allen Versuchen 25 h. Die zytologische Auswertung auf aberrante Metaphasen – Karyotypen mit Chromosomenstrukturveränderungen ohne Berücksichtigung der Zahl der Schäden pro aberrante Metaphasen – erfolgte an je 200 bis 500 Metaphasen pro Bedingung. Vergleichshalber wurde ein Wert der Bedingung KCN, belüftet (0,3 mM), aus einer Arbeit von Kihlman (1957) übernommen und in Abbildung 6 mitberücksichtigt. Die zytologisch erfassbare Schädigungsrate wurde verglichen mit den in den physiologischen Vorversuchen nach Methode I und II (siehe Methoden) ermittelten Enzymhemmungen bei verschiedenen KCN-Konzentrationen.

Da erst eine Vorbehandlung mit einem Peroxydaseinhibitor (siehe Kapitel II, Einleitung) zu einer radiomimetischen Wirkung von DHMP führt, soll die Frage abgeklärt werden, ob der chromosomenmutagene Effekt bei kombinierter Behandlung KCN + DHMP durch KCN-Hemmung des enzymatischen Abbaus von DHMP zustande kommt und damit DHMP als eigentliches Mutagen wirkt oder ob das DHMP bloss den bei bestimmten Konzentrationen erzeugten chromosomenmutagenen Effekt von KCN (Lilly und Thoday, 1956; Kihlman, 1957 und 1961; Lilly, 1958) zu sensibilisieren vermag. Dabei wird von der Annahme ausgegangen, dass die mit abnehmender KCN-Konzentration je verminderte Hemmung des enzymatischen DHMP-Abbaus (Tab. 1) zu einer abnehmenden intrazellulären Akkumulierung von DHMP führt und damit auch ein abnehmender radiomimetischer Effekt zytologisch erfassbar wird, wenn DHMP als Radiomimetikum wirkt. Zur Abklärung der Beziehung zwischen Enzymhemmung durch KCN einerseits und zytologischer Wirkung der kombinierten Behandlung KCN + DHMP andererseits sind Versuche unter anaeroben KCN-Fütterungsbedingungen am aussagekräftigsten. Obwohl durch die angewandte 1stündige Stickstoffbegasung die Sauerstoffwerte im Gewebe vielleicht nur unwesentlich absinken und keine radiomimetischen Effekte induziert werden (Merz, 1959), führt Stickstoffbegasung zu einem fast vollständigen Verschwinden der für normal aerobe Bedingungen typischen chromosomenmutagenen Wirkung von KCN bei Konzentrationen $> 0{,}1$ mM (Abb. 6), so dass auch Konzentrationen $> 0{,}1$ mM in der kombinierten Behandlung KCN + DHMP zytologisch getestet werden können, ohne dass eine radiomimetische Wirkung durch KCN zu erwarten wäre. Der Enzymhemmstoff KCN erweist sich für Konzentrationen $> 0{,}1$ mM unter aeroben Bedingungen als recht wirkungsvolles Radiomimetikum, bei partiell anaeroben Bedingungen für Konzentrationen $> 0{,}1$ mM und bei aeroben oder partiell anaeroben Bedingungen für Konzentrationen $\leqq 0{,}1$ mM dagegen als radiomimetisch sehr schwach bis völlig unwirksam (Abb. 6, siehe auch Lilly und Thoday, 1956; Kihlman, 1956, 1957 und 1961). Die Versuche nach Abbildung 6 weisen auf eine eindeutige Beziehung zwischen der In-vitro-Enzymhemmung durch KCN (siehe auch Tab. 1) und der radiomimetischen Wirkung der Kombination KCN (N_2) + DHMP. Sinkende Enzymhemmung bei abnehmender KCN-Konzentration führt in zytologischen Vergleichsversuchen mit entsprechenden KCN-Konzentrationen – unter Stickstoffbegasung – als Vorbehandlung zu ebenfalls ziemlich parallel abfallender radiomimetischer Wirkung, wobei KCN (N_2) selbst in keiner Konzentration nennenswert Chromosomenmutationen erzeugt. Der je nach Enzyminhibitorkonzentration unterschiedliche zytologische Effekt bestätigt die Annahme, wonach die chromosomenmutagene Wirkung von DHMP erst durch eine Enzymhemmung mög-

lich wird. KCN-Konzentrationen von 0,1 mM zeigen in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Kihlman (1956 und 1957) auch unter normal aeroben Bedingungen nie einen signifikant über der Spontanmutationsrate liegenden radiomimetischen Effekt, wohl aber eine Enzymhemmung, die genügt, dass wahrscheinlich der grösste Teil des DHMP in vivo in nicht abgebauter Form zur Wirkung kommen kann.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass KCN unter den gewählten Bedingungen den Mutationseffekt von DHMP nicht vortäuscht, sondern diesen vielmehr durch Hemmung des enzymatischen Abbaus erst ermöglicht. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche zur Erfassung der chromosomenmutagenen Wirkung wie bei der Abklärung der zytostatischen Wirkung mit KCN-Vorbehandlung durchgeführt, und zwar unter den gleichen Bedingungen wie in der Einleitung von Kapitel II angegeben, nämlich 0,1 mM bei pH 7 (Phosphatpuffer, 1/150 M) unter aeroben Verhältnissen (1 h). Unter N_2-Begasung wäre zwar eine KCN-Konzentration von 1 mM – mit über 90prozentiger Hemmung des enzymatischen DHMP-Abbaus – verwendbar, ohne dass bei der kurzen N_2-Begasung von 1 h mit einer nennenswerten Erhöhung der spontanen Aberrationsrate zu rechnen wäre (Abb. 6). Trotzdem erscheint es mir im Hinblick auf eine eindeutigere Interpretation der Versuchsergebnisse mit DHMP angebracht, unter normal aeroben Verhältnissen zu arbeiten.

b) Induktion von chromosomalen Strukturveränderungen durch DHMP

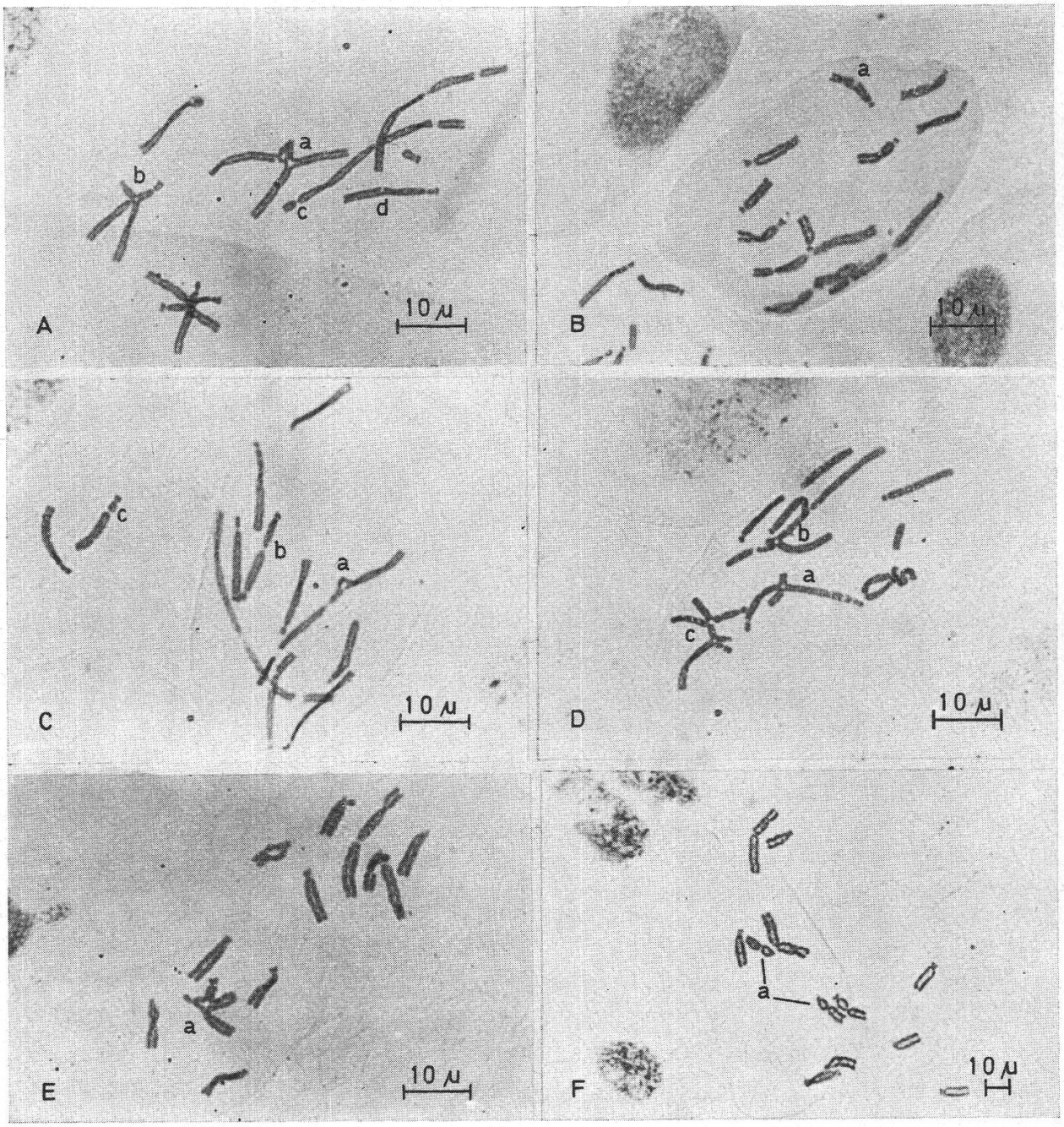
Nach KCN-Vorbehandlung gemäss Angaben in den Kapiteln II, Einleitung, sowie II, 5, a wurde während 1 h mit DHMP (4 mM, ungepuffert) gefüttert und nach 4, 10, 12, 14, 24, 32, 45, 50, 60 und 70 h Erholungszeit fixiert. In den Erholungszeiten eingeschlossen ist eine 2,5stündige Colchicinfütterung (0,05 %) unmittelbar vor der Fixierung. Kurzversuche ergaben bei einer DHMP-Konzentration von 1 mM praktisch keine Aberrationsinduktion, bei 4 mM eine recht hohe Induktion von chromosomalen Strukturveränderungen sowie bei 10 mM eine so stark zytostatische Wirkung, dass es in den meisten Zellen zum sogenannten «Interphasetod» (Bacq und Alexander, 1961) kam – vorwiegend ersichtlich an Pyknoseeffekten des Zellkerns –, das heisst, die Zellen starben unmittelbar nach Behandlung ab und traten nicht mehr in die Mitose ein; eine Erfassung induzierter Aberrationen bei einer DHMP-Konzentration von 10 mM wurde dadurch verunmöglicht. Das relativ enge radiomimetische Wirkungsoptimum von DHMP und die sehr grossen Schwierigkeiten im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Konzentrationswirkungsbeziehung chemischer Agenzien bei der Auslösung von Chromosomenmutationen sind Gründe, weshalb ich in allen Versuchen immer dieselbe Konzentration von 4 mM DHMP verwendet habe. Die Auswertung geschah an mindestens 2 bis 3 Wurzeln pro Bedingung mit Bezug der Aberrationen auf je 100 Zellen. Die in die zytologischen Auswertungen einbezogenen Aberrationstypen umfassen die totale Anzahl aller analysierten Aberrationstypen, deren Unterteilung in T′, B′, Iso-B′ (NUpd, NUp, NUd) und Iso-B′ (SUpd, SUp, SUd) – siehe Kapitel Terminologie – sowie nach 70 h das Verhältnis von Chromatid- zu Chromosomentypaberrationen. Für die Kontrollversuche (unbehandelt und KCN allein) wurde auf totale Anzahl Aberrationen pro 100 Zellen ohne Berücksichtigung der einzelnen Aberrationstypen ausgewertet.

Die chromosomenmutagene Wirkung eines Agens kann nur dann mit Erfolg erfasst werden, wenn die Spontanmutationsrate des biologischen Testsystems in

bezug auf chromosomale Strukturveränderungen bekannt ist. Die Spontanmutationsrate kann objekt-, entwicklungs- und gewebsspezifisch sein und zudem starken Schwankungen unterliegen, bedingt durch verschiedene innere und äussere Faktoren (Rieger und Michaelis, 1967). Die spontane Chromosomenaberrationsfrequenz pro Zelle liegt im allgemeinen für verschiedene pflanzliche und tierische Objekte im Bereich von 0,1–2 % (Giles, 1940; Nichols, 1941; Rieger und Michaelis, 1959a; Chu et al., 1961; Bender und Gooch, 1962). Für Sekundärwurzelmeristeme von *Vicia faba* fand ich in total 250 analysierten Zellen 4 Chromosomenaberrationen, das heisst die Chromosomenaberrationsfrequenz pro Zelle betrug 1,6 %. Die spontan eingetretenen Aberrationen waren alle vom Typus einfacher Fragmentationen der Chromosomenlängsstruktur. Reunionsereignisse wurden keine festgestellt. Verschiedene endogene und/oder exogene Faktoren sind an der Entstehung spontaner Chromosomenaberrationen beteiligt. Diese Faktoren könnten nach Rieger und Michaelis (1967) unter anderem durch stoffwechselphysiologische Veränderungen zur Entstehung oder Anreicherung atypischer Zellinhaltsstoffe führen, die bei Überschreiten einer Wirkungsschwelle oder eventuellem Zusammenbruch von Schutzmechanismen als Automutagene wirken könnten. So konnte im Wurzelmeristem von *Vicia faba* sehr eindeutig gezeigt werden, dass bei längerandauernder partieller Anaerobiose als exogenem Faktor die Anaerobiose nicht direkt die spontane Chromosomenaberrationsrate erhöht, sondern indirekt durch Stoffwechselumsteuerung im Sinne einer Akkumulierung von Äthylalkohol durch vermehrte Gärung (Michaelis et al., 1959; Rieger und Michaelis, 1959a und 1960a). Auch unter ungefähr normal aeroben Verhältnissen dürfte im Wurzelmeristem Äthylalkohol eine bedeutende Rolle als Automutagen spielen, zumal von Buder (1967) trotz normaler O_2-Spannung der Gefässatmosphäre über der Kulturlösung im Wurzelmeristem von *Vicia faba* partielle Gärung nachgewiesen wurde, bedingt durch unzureichende Versorgung des Meristems mit Sauerstoff. Dies gilt insbesondere für Wurzelspitzen in nicht durchlüfteten Zuchtmedien, denn Wanner (1950) hat gezeigt, dass fehlende Durchlüftung zu einem O_2-Defizit im Zuchtmedium und in der Folge in Weizenwurzeln zu einem drastischen Abfall der Atmungsintensität und bevorzugter anaerober Atmung führt. Obwohl in meinen Versuchen belüftet wurde, ist es durchaus möglich, dass partielle Anaerobiose und damit Äthylalkohol zumindest teilweise an der relativ hohen spontanen Chromosomenaberrationsrate von 1,6 % ursächlich beteiligt ist.

Gegenüber der spontanen chromosomalen Mutabilität umfasst die induzierte diejenigen Chromosomenmutationen, die durch kontrollierte experimentelle Einwirkung entstehen. Dabei bedeutet experimentelle Induktion von chromosomalen Strukturveränderungen streng genommen nichts anderes als eine künstliche Erhöhung der spontanen Aberrationsrate durch physikalische oder chemische Mutagene ohne Entstehung grundsätzlich neuer Aberrationstypen. Allerdings sind Reunionen und die daraus resultierenden komplexen Aberrationen bei der experimentellen Induktion die Regel, im spontanen Mutationsgeschehen dagegen die Ausnahme (Rieger und Michaelis, 1967). Dies ist aber durchaus verständlich, wenn man bedenkt, dass für eine Reunion 2 eng benachbarte Brüche erforderlich sind und die Wahrscheinlichkeit hiefür beim spontanen Mutationsgeschehen sehr gering, bei der experimentellen Induktion dagegen bedeutend höher ist. Ein getestetes Agens kann nur dann als eindeutiges Chromosomenmutagen oder Radiomimetikum bezeichnet werden, wenn eine statistisch gesicherte Erhöhung der spontanen Chromosomenaberrationsrate

induziert wird, in meinem Fall also für Aberrationsfrequenzen pro Zelle, die deutlich über 2 % liegen. Das getestete organische Peroxyd erweist sich unter den gewählten Bedingungen als recht stark chromosomenmutagen. Die totale Aberrationsfrequenz pro Zelle liegt je nach Zeitpunkt der Induktion im Mitosezyklus zwischen 20 und 60 % gegen 1,6 % der Spontanrate. Vergleichsversuche mit unterschiedlichen DHMP-Konzentrationen ergaben optimale Wirkung bei 4 mM. Die bereits im Kapitel II, 5, a näher erläuterte Peroxydasehemmung mit KCN als Vorbehandlung ist bei der verwendeten Konzentration, in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Kihlman (1957), selbst nicht radiomimetisch, liegen doch die Werte der Kontrollversuche im Bereich der spontanen Chromosomenaberrationsrate (Abb. 6 und 9). Aus dem Erholungszeitenversuch nach Abbildung 9 – zytologische Auswertung zu unterschiedlichen



Zeiten nach der experimentellen Einwirkung – können folgende Aberrationscharakteristika herausgelesen werden:

1. Bis 10 h nach Behandlungsbeginn können in X_1 keine chromosomalen Strukturveränderungen nachgewiesen werden, die Chromosomen zeigen die durch energiereiche Strahlen in typischer Weise induzierten sogenannten «Sticky-Effekte» (Marquardt, 1938) überhaupt nicht, und es treten auch keine Pseudochiasmata auf, wie Anaphasenauswertungen kurz nach Behandlungsbeginn gezeigt haben (aus Untersuchungen nach Abb. 5). 12 h nach Behandlungsbeginn erscheint eine sehr hohe Zahl von Metaphasen mit Chromosomenstrukturumbauten; die ermittelte Aberrationsfrequenz pro Zelle erreicht im Vergleich zu allen späteren Erholungszeiten nach 12 h das Aberrationsmaximum. Nach 14 h fällt die Aberrationsfrequenz bereits wieder ab, bleibt dann ungefähr konstant bis 45 h nach Behandlungsbeginn und fällt nach 50 h erneut bis auf die Höhe der Spontanmutationsrate ab. Der Erholungszeitenversuch nach Abbildung 9 lässt eine verzögerte Wirkung von DHMP erkennen, denn die – als Sekundäreffekte in der Interphase induzierten – Chromosomenaberrationen treten erst nach einer gewissen Latenzzeit auf, und die – als Primäreffekte in der Mitose induzierten – «Sticky-Effekte» und Pseudochiasmata (Marquardt, 1938) können nie beobachtet werden.

2. Bei den induzierten chromosomalen Strukturveränderungen handelt es sich fast immer eindeutig um Aberrationen auf chromatidaler Basis. Die mikroskopische Auswertung von Metaphasen der X_1 ergibt folgende Bruchtypen auf chromatidaler Basis (Erklärung der Bruchtypen siehe Kapitel Terminologie): B′ als sehr seltene Ereignisse, in grosser Zahl dagegen Iso-B′ mit und ohne SU im zentrischen oder azentrischen oder – in wenigen Fällen – in beiden Chromosomenfragmenten sowie reziproke symmetrische und asymmetrische Translokationen zwischen 2 Chromosomen, vereinzelt Triradiale, Duplikationsdeletionen und als «gaps» bezeichnete lokale Achromasien, die aber nicht als echte Bruchereignisse mitgezählt wurden (Beispiele für verschiedene Aberrationstypen siehe Abb. 7 und 8). Duplikations-

Abbildung 7

Metaphasen von *Vicia faba* (2 n = 12) mit verschiedenen Umbautypen nach DHMP-Behandlung. Alle Zellen befinden sich in der ersten Metaphase nach der Aberrationsentstehung (X_1)

A: Metaphase mit zwei dreiarmigen, als chromatidales Translokationsergebnis auftretenden, interchromosomalen Umbaukonfigurationen mit zentrischem Fragment (Triradial, a) und azentrischem Fragment (Triradial, b), einer Isochromatidendeletion mit Schwesterchromatidenreunion in beiden Fragmenten (c) sowie einer achromatischen Läsion («gap», d)

B: Metaphase mit einem gebrochenen Chromatid (a)

C: Metaphase mit einer durch Duplikation verlängerten und einer entsprechend verkürzten Schwesterchromatide (Duplikationsdeletion, a) sowie zwei Isochromatidendeletionen mit Schwesterchromatidenreunion wahrscheinlich in allen Fragmenten (b und c)

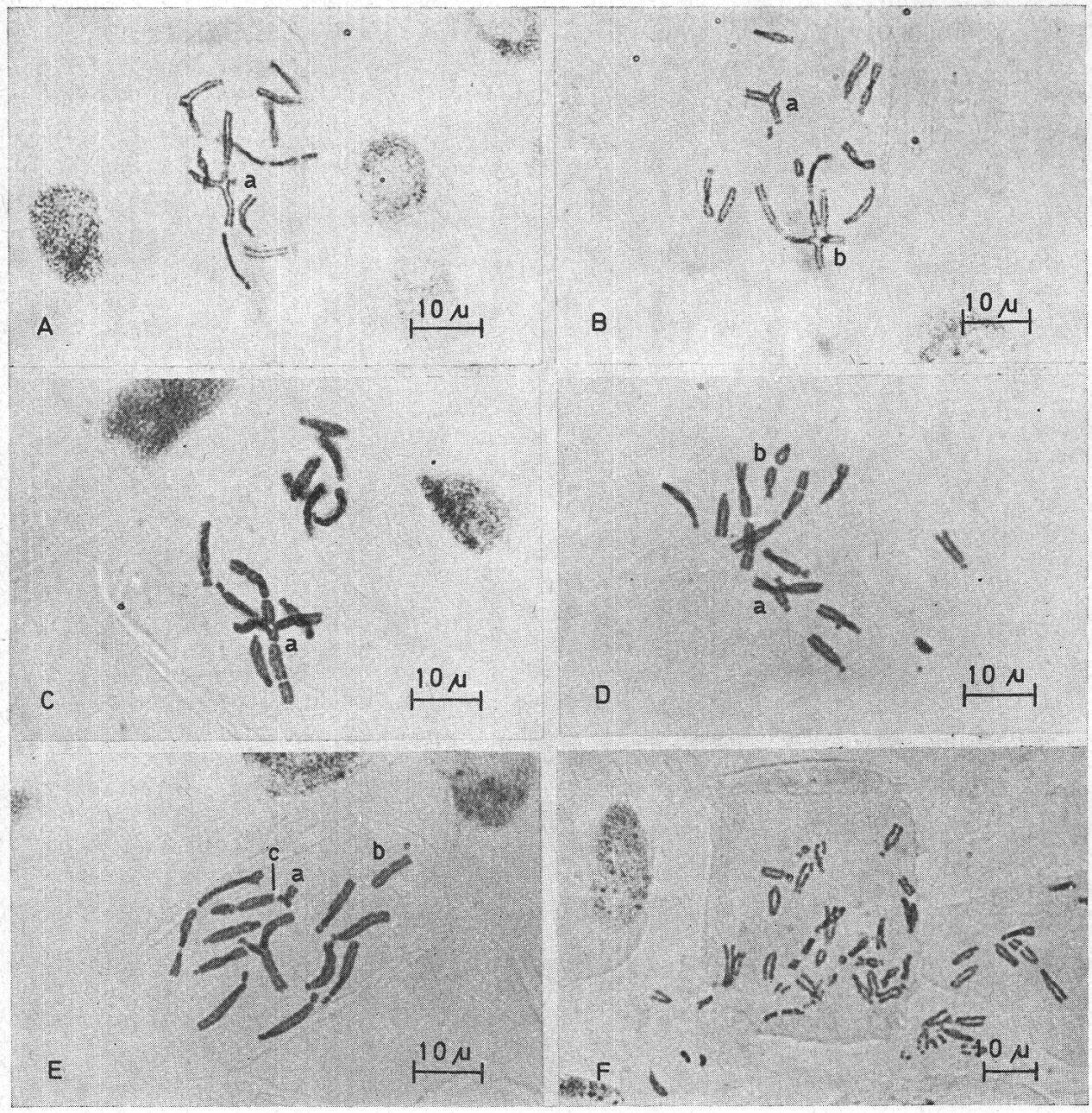
D: Metaphase mit einer symmetrischen reziproken Chromatidentranslokation mit eventuell einem «gap» (a), einer Chromatidentranslokation mit zentrischem Fragment, vermutlich einem Triradial (b) sowie einer asymmetrischen reziproken Chromatidentranslokation mit einer Isochromatidendeletion ohne Schwesterchromatidenreunion in den Fragmenten (c)

E: Metaphase mit einer asymmetrischen reziproken Chromatidentranslokation (a)

F: Metaphase mit drei Isochromatidendeletionen mit Schwesterchromatidenreunion in allen Fragmenten (a)

deletionen können als Translokationsereignisse aufgefasst werden und wurden deshalb in Abbildung 9 zu den T′ gezählt.

Nach Abbildung 9 sind fast die Hälfte aller analysierten Aberrationstypen Translokationen, Ereignisse also, denen 2 bis mehrere Brüche mit 1 bis mehreren Reunionen zugrunde liegen. Nach der Bruch-Reunions-Hypothese werden die Bruchflächen zwischen verschiedenen Chromosomen nur dann durch einen sogenannten «Reunionsprozess» in neuer Ordnung wiedervereinigt oder nach der Austauschhypothese Primärereignisse nur dann zu einem Austauschprozess befähigt, wenn die Brüche oder Primärereignisse zeitlich und räumlich eng genug zusammenfallen, um in Kooperation treten zu können (Evans, 1961; Rieger und Michaelis, 1963 und 1967). Die Wahrscheinlichkeit einer derartigen Wechselwirkung steigt mit zunehmender Anzahl experimentell induzierter Brüche oder Primärereignisse an. Dies ist sicher



ein Hauptgrund, wieso das Verhältnis B′ und Iso-B′ zu interchromosomalen Reunionsereignissen (Translokationen) bei Anwendung chemischer oder physikalischer Agenzien meist sehr viel weiter zugunsten der Translokationen verschoben ist als das entsprechende Verhältnis bei der Spontanaberrationsrate, die bei *Vicia faba* praktisch nie Translokationen enthält. Es gibt allerdings Ausnahmen dazu, indem gewisse Radiomimetika mit unverzögerter zytologischer Wirkung zwar die Zahl von Brüchen oder Primärereignissen erhöhen, vermutlich aber zugleich den Reunionsprozess hemmen. Solche Agenzien, wie die als DNS-Antimetaboliten wirksamen Verbindungen 5-Fluordesoxyuridin, Desoxyadenosin und Cytosinarabinosid (Taylor et al., 1962; Bell und Wolff, 1964; Brewen, 1965; Kihlman, 1966), induzieren dann gehäuft freie Brüche, aber praktisch nie Umbautypen, zu deren Entstehung Reunionsvorgänge erforderlich sind. Das getestete organische Peroxyd zeigt in eindeutiger Weise eine Verschiebung des genannten Verhältnisses zugunsten erhöhter Translokationsbereitschaft, ein Hinweis, dass der Reunionsprozess unter DHMP-Einfluss stattfinden kann; eine partielle Hemmung dieses Prozesses ist dagegen möglich (siehe Kapitel II, 5, d). Etwa 5 % der total analysierten Brüche können sowohl als Chromatid- wie Chromosomentypaberrationen gedeutet werden; es sind dies die Iso-B′ ohne SU in beiden Fragmenten, die in der Regel als «presplit»-Aberrationen im präsynthetischen Stadium des Zellzyklus (G_1) induziert werden (Thoday, 1954) und unter diesen Bedingungen eindeutig als terminale Chromosomenstückausfälle (B″) zu bewerten sind. In Kapitel II, 5, c beschriebene Experimente zur Ermittlung der Bruchsensibilität im Mitosezyklus weisen indes nach, dass funktionell einsträngige – «presplit» – Chromosomen der frühen und mittleren G_1-Phase sich gegenüber DHMP nicht aberrationssensibel verhalten, so dass die gefundenen Iso-B′ ohne SU als «postsplit»-Aberrationen interpretiert werden müssen. Dass keine eindeutige «presplit»-Aberrationsinduktion erfolgt, ist auch daran ersichtlich, dass zentrische oder azentrische Ringchromosomen nie nachgewiesen werden konnten. Anaphaseauswertungen ergeben nach DHMP-Behandlung (aus Untersuchungen nach Abb. 5) ein für die meisten Radiomimetika typisches Störungsbild: durch Chromatid- und

Abbildung 8

Metaphasen von *Vicia faba* (2 n = 12) mit verschiedenen Umbautypen nach DHMP-Behandlung. Die Zellen A bis E befinden sich in der ersten Metaphase (X_1), die Zelle F in der zweiten Metaphase nach der Aberrationsentstehung (X_2)

A: Metaphase mit einer Chromatidentranslokation, vermutlich vom Typus einer asymmetrischen reziproken Umbaukonfiguration (a)

B: Metaphase mit einer dreiarmigen chromatidalen Strukturveränderung mit zentrischem oder azentrischem Fragment (Triradial, a) sowie zwei Chromatidbrüchen (b), die durch «Sticky-Effekte» (Verklebungen) eine Translokationsfigur vortäuschen oder aber einer echten, komplexen Chromatidentranslokation mit drei beteiligten Chromosomen (b)

C: Metaphase mit einer symmetrischen reziproken Chromatidentranslokation (a)

D: Metaphase mit einer asymmetrischen reziproken Chromatidentranslokation (a) und einer Isochromatidendeletion mit Schwesterchromatidenreunion in beiden Fragmenten (b)

E: Metaphase mit einer Isochromatidendeletion ohne Schwesterchromatidenreunion im zentrischen Fragment (a), einem «gap» (b) sowie eventuell einem Zentromerbruch (c)

F: Metaphase mit einer grossen Zahl von terminalen Deletionen oder Chromosomenbrüchen in der X_2 (Chromosomentypaberrationen)

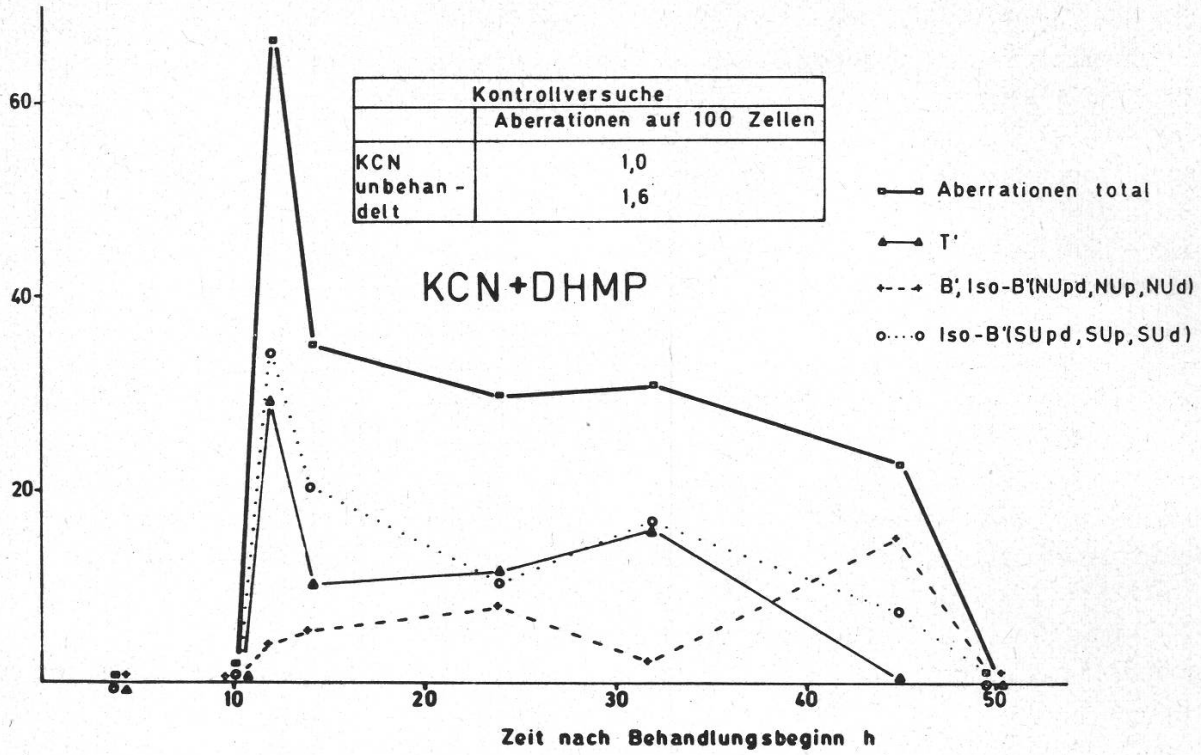


Abbildung 9

Vicia faba, Chromosomenaberrationsfrequenz durch DHMP im Erholungszeitenversuch. Ordinate: Aberrationen auf 100 Zellen

Isochromatidbrüche erzeugte azentrische Fragmente sowie durch asymmetrische, unvollständige und vollständige reziproke Translokationen erzeugte Anaphasebrükken und azentrische Fragmente (Fabergé, 1958; siehe auch Rieger und Michaelis, 1967). In der anschliessenden Interphase kam es zu einer starken Häufung von Kleinkernen (Mikronuklei; Thoday, 1951). Kleinkernbildung infolge Eliminierung azentrischer Fragmente führt meist zum Zelltod durch genetisch unvollständige bzw. unbalancierte chromosomale Ausrüstung (Read und Kihlman, 1956). Zentrische Fragmente und dizentrische Chromatiden bleiben dagegen erhalten, wenn die Genombalance nicht wesentlich gestört ist (McLeish, 1954), und können in X_2 sowie eventuell auch noch in späteren Mitosen als Aberrationen auf chromosomaler Basis zytologisch erfasst werden (siehe Kapitel II, 5, c).

Ein Vergleich der DHMP-induzierten chromosomenmutagenen Wirkung mit derjenigen energiereicher Strahlen vermag deutliche Unterschiede aufzuzeigen: Das organische Peroxyd DHMP erzeugt nie eindeutige Chromosomentypaberrationen, dagegen in grosser Zahl Chromatidtypaberrationen. Durch diesen Wirkungsmodus unterscheidet sich DHMP wesentlich von vergleichbaren Effekten energiereicher Strahlen, welch letztere Chromosomen-, Chromatid- und Subchromatidtypaberrationen induzieren (Evans, 1962), deckt sich aber innerhalb der chemischen Agenzien mit radiomimetischer Wirkung weitgehend mit der Aberrationscharakteristik der Gruppe von Alkylierungsmitteln mit ausschliesslicher Induktion von Chromatidtypaberrationen als Resultat verzögerter Wirkung (Kihlman, 1961; Rieger und Michaelis, 1962; Evans und Scott, 1964 und 1969; Matagne, 1969). Die aus Abbildung 9 geschlos-

senen Ergebnisse geben zu verschiedenen Vermutungen Anlass: Bis 50 h nach Behandlungsbeginn treten Chromatidtypaberrationen auf, so dass die Mitosezyklusdauer der X_1 sehr wahrscheinlich stark verlängert ist. Da erst nach ungefähr 12 h Erholungszeit Aberrationen, und zwar Chromatidtypaberrationen nachweisbar werden und in keiner Erholungszeit eindeutige Chromosomentypaberrationen auftreten, ist anzunehmen, dass das Postsynthesestadium (G_2) nicht aberrationssensibel oder aber sehr stark verzögert ist, in der frühen und mittleren G_1-Phase sicher keine Aberrationen erzeugt werden und offenbar die Aberrationsentstehung hauptsächlich an die DNS-Syntheseperiode der Interphase (S) und eventuell die späte G_1-Phase gebunden ist. Ausserdem weist das Aberrationsmaximum unmittelbar zu Beginn des Auftritts der ersten Chromosomenstrukturveränderungen nach ungefähr 12 h auf eine bevorzugte Sensibilität der späten S-Phase. Mit Ausnahme der Feststellung, dass in der frühen und mittleren G_1-Phase keine Chromosomentypaberrationen induziert werden, bleiben alle gemachten Vermutungen solange spekulativ, als experimentell eindeutige Beweise fehlen. Es ist sicher ungenau, wenn nicht falsch, aus der früher mitunter verwendeten Beziehung zwischen dem Kurvenverlauf einer solchen Untersuchung einerseits und der ungefähren normalen Mitosezyklusdauer andererseits die gegenüber dem Testagens aberrationssensiblen Phasenabschnitte genau zu definieren, denn nach Behandlung mit einem Agens wird als Begleiterscheinung die Mitosezyklusdauer in mannigfacher Weise verändert (Evans und Scott, 1964; Scott und Evans, 1967; Scott, 1968), so dass die genannte Korrelation zu völlig falschen Schlussfolgerungen führen kann. Die genaue Bestimmung der aberrationssensiblen Phasenabschnitte innerhalb des Mitosezyklus ist nur durch genaue Erfassung der Mitosezyklusparameter unbehandelt und nach Behandlung mit dem Testagens mittels autoradiographischer Untersuchungen möglich (Evans und Savage, 1963; Evans und Scott, 1964; Scott und Evans, 1964 und 1967; Wolff und Luippold, 1964; Grant, 1965; Scott, 1968).

c) Mitosezyklusdauer und Zeitpunkt der Aberrationsinduktion

Die Versuche zu den autoradiographischen Untersuchungen wurden wie folgt durchgeführt: In den Kontrollversuchen wurden Seitenwurzeln von *Vicia faba* während 2 h mit dem methylmarkierten Isotop ^{3}H-TdR (spez. Aktivität: 15,0 c/mM) bei einer Konzentration von 2 μc/ml (= Markierungsdosis) gefüttert, in belüftetem Leitungswasser unter den angegebenen Kulturbedingungen weitergezogen und nach folgenden Erholungszeiten fixiert: 2,5, 5, 10, 14, 21, 31, 34 und 41 h. Ein paralleler Kontrollversuch mit dem zur Enzymhemmung verwendeten KCN (0,1 mM, pH 7, Phosphatpuffer, 1/150 M) während 1 h und daran anchliessender ^{3}H-TdR-Fütterung (2 μc/ml) während 2 h umfasste folgende Erholungszeiten: 7, 10, 12, 13, 19, 22, 25, 29, 37 und 39 h. Für jede Fixierungszeit wurden 2 bis 3 Wurzeln ausgewertet mit Bezug der markierten Prophasen auf je 100 Zellen. In den DHMP-Versuchen wurde das chromosomenbrechende Agens in Kombination mit ^{3}H-TdR gegeben, indem zuerst für 1 h mit KCN (0,1 mM, pH 7, Phosphatpuffer, 1/150 M), dann 1 h mit DHMP (4 mM, ungepuffert) und anschliessend 1 h mit ^{3}H-TdR (2 μc/ml) gefüttert wurde. Unmittelbar vor der Fixierung erfolgte eine 2,5stündige Colchicinfütterung (0,05 %) zur Metaphasenanreicherung zwecks besserer Auswertung der markierten Zellen auf Aberrationen. Für die Erholungszeiten 11, 15, 22,5, 29, 33, 42, 45,5, 46, 49

und 60 h wurden je 2 bis 3 Wurzeln fixiert und auf den Prophasenmarkierungsindex ausgewertet. Die Aberrationserfassung an markierten und unmarkierten Metaphasen geschah in den Erholungszeiten 15, 22,5, 29, 42, 45,5 und 49 h durch Auswertung derselben 2 bis 3 Wurzeln je Erholungszeit, die für den Prophasenmarkierungsindex verwendet wurden. Ermittelt wurden die unmarkierten und markierten aberranten Metaphasen, bezogen auf je 100 Zellen. Die Aberrationsfrequenz im Erholungszeitenversuch nach Abbildung 9 wurde zu Vergleichszwecken in die autoradiographischen Versuche miteinbezogen. Für die Aberrationserfassung in X_2 wurde nach einer Erholungszeit von 60 bzw. 70 h fixiert und an 2 bis 3 Wurzeln auf je 100 Metaphasen ausgewertet. Ein weiterer Markierungsversuch galt der Idee, ^{3}H-TdR-markierte Zellen erst dann der DHMP-Behandlung auszusetzen, wenn sich die markierten Zellen in der G_2-Phase und in Mitose befinden. Zu diesem Zweck verfütterte ich zuerst während 1 h ^{3}H-TdR (2 μc/ml), liess dann die markierten Zellen um die Zeitdauer ihrer mittleren S-Phase weiterproliferieren, das heisst 10 h, und behandelte dann mit KCN + DHMP sowie mit Colchicin unmittelbar vor Ende der jeweiligen Erholungszeit unter den gleichen Bedingungen wie in früheren Versuchen. Anschliessend wurde der Prophasenmarkierungsindex an je 2 bis 3 Wurzeln, bezogen auf 100 ausgewertete Zellen, bei folgenden Erholungszeiten bestimmt: 3, 7, 11, 17, 22, 25 und 32 h. Die Auswertung auf markierte und unmarkierte aberrante Metaphasen geschah in den Erholungszeiten 22, 25 und 32 h für die ^{3}H-TdR-Behandlung bzw. 12, 15 und 22 h für die DHMP-Behandlung. Ausgewertet wurde wiederum an je 2 bis 3 Wurzeln, bezogen auf 100 ausgewertete Zellen. Einem Versuch quantitativer Autoradiographie zur Bestimmung der relativen Rate des ^{3}H-TdR-Einbaus in DNS-synthetisierende Zellen der S-Phase lagen folgende Ansätze zugrunde: In Kontrollversuchen ^{3}H-TdR-Fütterung (2 μc/ml) für 2 h mit unmittelbar anschliessender Fixierung der Wurzeln sowie KCN-Behandlung wie oben angegeben mit folgender ^{3}H-TdR-Fütterung (2 μc/ml) für 2 h und Fixierung. Im Testversuch Behandlung mit KCN + DHMP wie bereits beschrieben und 2stündige ^{3}H-TdR-Fütterung (2 μc/ml) nach den Erholungszeiten 0, 50 und 72 h sowie Fixierung nach Abbruch der Markierungsfütterung. Pro Bedingung wurde an durchschnittlich je 800 bis 1100 Zellen der totale Markierungsindex und an je zirka 300 aktiven Zellen die mittlere Silberkornzahl abgeschätzt und daraus die mittlere Frequenz der Silberkörner pro aktiven Zellkern als Mass der DNS-Syntheserate berechnet. Zytologische Präparation, Aufziehen der Stripping-Filme, Exposition und Entwicklung der Autoradiographien siehe Kapitel Material, Methode und Terminologie.

Zellen aus Gewebekulturen oder Wurzelspitzen teilen sich angenähert ideal asynchron. Die genaue Bestimmung der Mitosezyklusdauer unbehandelt und nach Behandlung mit einem Testagens ist nur möglich durch Synchronisierung der Zellpopulation (Brewen, 1964) oder aber durch Markierung asynchroner Zellen in einem definierten Stadium des Mitosezyklus. Da meistens nur eine partielle Synchronisierung zu erreichen ist (Taylor, 1963), werden allgemein die Markierungsmethoden bevorzugt oder zusammen mit der Synchronisierungsmethode angewandt. Zellpopulationen können markiert werden durch Behandlung mit Spindelgiften wie Colchicin (van't Hof et al., 1960), im speziellen pflanzliche Zellpopulationen durch Hemmstoffe der Zellplattenbildung wie Coffein und Theophyllin (Kihlman, 1955) oder – als heute wohl wichtigste Methode – durch Markierung mit radioaktiven Isotopen und autoradiographischer Erfassung der emittierten β-Strahlung auf einer Fotoschicht (Quast-

ler und Sherman, 1959; Evans und Savage, 1963). Für zellkinetische Untersuchungen wird vorwiegend ^{3}H-TdR verwendet, da es selektiv in die DNS eingebaut wird und praktisch keinem «turnover» unterliegt (Cleaver, 1967). Die in dieser Arbeit gewählte Methode besteht darin, dass durch Kurzfütterung des tritiummarkierten DNS-Vorläufers TdR die Zellen in der S-Phase des Mitosezyklus markiert werden (Evans und Scott, 1964; Scott, 1968). Diese als Pulsmarkierung bezeichnete Methode vermag nicht nur die Mitosezyklusdauer, sondern auch enger definierte Phasenabschnitte innerhalb des Mitosezyklus zu erfassen, ist aber nur dann aussagekräftig, wenn durch geeignete Wahl der Versuchsbedingungen die wichtigsten möglichen Fehlerquellen klein gehalten oder ganz ausgeschaltet werden können; es sind dies:

1. Mögliche zytostatische und chromosomenmutagene Wirkung durch die endogene Strahlung von ^{3}H-TdR. Tritium ist ein weicher β-Strahler. Inkorporation von tritiummarkiertem TdR in die chromosomale DNS kann bei zu hoher TdR-Konzentration, bedingt durch zu grosse Markierungsdosis bei relativ niedriger spezifischer Aktivität des Isotops und bei zu hoher Tritiummenge, das heisst Strahlenbelastung, bedingt durch zu grosse Markierungsdosis bei relativ niedriger und hoher spezifischer Aktivität des Isotops in verschiedenen Testobjekten wie *Vicia faba*, *Tradescantia paludosa* und Zellkulturen menschlicher Leukozyten Chromosomenmutationen induzieren (Wimber, 1959; Natarajan, 1961; Bender et al., 1962) und bei *Vicia faba* überdies eine Depression des MI bewirken (Natarajan, 1961; Scott und Evans, 1967). Nach Natarajan (1961) ist es vorteilhaft, mit relativ hohen spezifischen Aktivitäten, aber geringer Markierungsdosis zu arbeiten, denn je höher die spezifische Aktivität (= Menge an tritiiertem TdR), desto geringer wird für eine bestimmte Markierungsdosis die molare TdR-Konzentration in der Fütterungslösung. Bei kleinen Markierungsdosen ist es dadurch möglich, die Konzentration von TdR in der Behandlungslösung klein zu halten und eventuelle Schäden durch TdR oder nach Abspaltung der Desoxyribose durch Thymin (Woll, 1953) weitgehend auszuschalten. Bei geringer Markierungsdosis ist auch die Strahlenbelastung relativ gering (Evans und Savage, 1963; Evans und Scott, 1964; Cleaver, 1967). Durch Vorversuche habe ich abgeklärt, welche Konzentration des Isotops in der Versuchslösung (= Markierungsdosis), Inkubationszeit und Expositionszeit bei gegebener relativ hoher spezifischer Aktivität ausreicht, um ein qualitativ und quantitativ auswertbares Autoradiogramm zu erhalten, ohne dass eine wesentliche Induktion von Chromosomenmutationen auftritt. Geringe Effekte mit höchstens einigen wenigen Fragmentierungen, aber nie Chromosomenstrukturumbauten als Folge von Reunionsprozessen zeigten die folgenden Versuchsbedingungen, die für alle weiteren Versuche verwendet wurden (vgl. auch Evans und Savage, 1963; Evans und Scott, 1964):

spezifische Aktivität	15,0 c/mM
Markierungsdosis	2 μc/ml (TdR-Konzentration: 0,14 μM)
Inkubationszeit	1 bzw. 2 h
Expositionszeit	3 bis 4 Wochen

2. Mögliche Abweichungen des Wurzelmeristems von Bedingungen, die bei zellkinetischen Studien nach Pulsmarkierung vom Testsystem zu erfüllen sind. Die Zellpopulation muss sich asynchron teilen (Wimber und Quastler, 1963) – ersichtlich an einer weitgehenden Aperiodizität des MI –, das heisst, alle Zellen haben ungefähr gleich schnell zu proliferieren, so dass die Zahl der Zellen in einer Phase direkt propor-

tional der zeitlichen Dauer dieser Phase ist und pro Zeiteinheit immer die gleiche Anzahl Zellen in eine Phase – zum Beispiel die Mitose – tritt. Die meisten biologischen Systeme entwickeln unter natürlichen Bedingungen metabolische Rhythmen, die unter anderem eine Zellpopulation partiell synchronisieren können und dadurch zu tageszeitlichen Schwankungen in der Mitosefrequenz führen (Rensing, 1969). Unter den gewählten Kulturbedingungen kommt es jedoch zu keinem diurnalen Rhythmus des MI (siehe Kapitel II, 4; Abb. 4). Des weiteren sollte sich die Zellpopulation in einem Fliessgleichgewicht befinden (Wimber, 1960; Wimber und Quastler, 1963), das heisst, die Zellzahl sollte während des Versuchsablaufs ungefähr konstant bleiben. In einer wachsenden Zellpopulation – so auch in Meristemen – ist die Zahl der Zellen in einer Phase nicht direkt proportional der zeitlichen Dauer dieser Phase. Nach jeder Mitose ersetzen 2 junge Tochterzellen eine alte Elternzelle, wobei nicht nach jeder Mitose eine der Tochterzellen ausdifferenziert und damit aus der teilungsaktiven Zellpopulation entfernt wird, so dass die Gesamtzahl der Zellen nicht konstant bleibt, also kein Fliessgleichgewicht besteht (Edwards et al., 1960). Nach Edwards et al. (1960) sowie Wimber und Quastler (1963) führt deshalb das relativ höhere Alter und damit die relativ grössere Zellzahl von Phasen am Ende eines untersuchten Mitosezyklus bei einer Umrechnung nach der Beziehung – Anzahl Zellen in einer Phase direkt proportional der Dauer dieser Phase – zu einer zu grossen Zyklusdauer, von Phasen am Anfang des Zyklus dagegen zu einer zu geringen Zyklusdauer, während die Berechnung aus Phasen in der Mitte ziemlich gut stimmt. Die in der autoradiographischen Zyklusbestimmung markierte S-Phase als Bezugsgrösse für die Berechnung aller Zyklusparameter liegt ungefähr in der Mitte des Mitosezyklus, so dass die geforderte Bedingung einer Zellpopulation im Fliessgleichgewicht für diese Bezugsgrösse angenähert erfüllt ist (Edwards et al., 1960; Wimber, 1960; Wimber und Quastler, 1963).

3. Mögliche Verlängerung der experimentell angesetzten Fütterungszeit durch endogenen ^{3}H-TdR-«Pool», der zu einer weiteren Inkorporation des Isotops nach Abbruch der Inkubationszeit führen kann. Versuche nach Evans (1964) an *Vicia faba* sowie Quastler und Sherman (1959) an der Maus haben gezeigt, dass dieser «Pool» nach ungefähr 10 min voll aufgebraucht ist und somit nur eine vernachlässigbar geringe Verlängerung der experimentell angesetzten Fütterungszeit zu erwarten ist.

Obwohl die Methode der autoradiographischen Pulsmarkierung beim Studium der Zellkinetik mit noch weiteren Fehlerquellen behaftet sein kann, ergibt sie recht gut reproduzierbare Werte, zeigen doch von verschiedenen Autoren am selben Objekt gemachte Angaben zur Mitosezyklusdauer weitgehende Übereinstimmung (z.B. bei *Vicia faba:* Evans und Scott, 1964; Grant und Heslot, 1966; Scott und Evans, 1967).

Mitosezyklusdauer: In der asynchronen Population mitotisch proliferierender Zellen des Wurzelmeristems von *Vicia faba* werden durch ^{3}H-TdR-Pulsmarkierung die Zellen in der DNS-Synthese-Phase selektiv markiert und können dadurch in ihrer Zellproliferation verfolgt werden. Durch zytologische Erfassung der relativen Anzahl markierter Zellen in einer andern, mikroskopisch erkennbaren Phase des Mitosezyklus (z.B. Prophase der nächsten Mitose) erhält man im Erholungszeitenversuch zu verschiedenen Zeitintervallen nach Markierung die sogenannten Markierungsindices einer mikroskopisch erkennbaren Phase (z.B. Prophasenmarkierungs-

indices – MIp). Die Markierungsindices (z.B. MIp), in einem Diagramm gegen verschiedene Zeiten nach Behandlungsbeginn aufgetragen, ergeben eine Kurve, die die Proliferation durch den Mitosezyklus derjenigen Zellen angibt, die mit ^{3}H-TdR während der DNS-Synthese-Periode markiert wurden. Das Markierungsindex-Zeit-Diagramm nach Abbildung 10 zeigt, dass die markierten Zellen der S-Phase in einer Wellenbewegung durch die nächste Mitose treten. Anhand des Diagramms lassen sich die postreplikative G_2-Phase, die DNS-Synthese-Phase (S) und die Gesamtmitosezyklusdauer (T) direkt graphisch bestimmen sowie die übrigen Phasen des Zyklus (präreplikative G_1-Phase, Mitose und ihre Phasenabschnitte) rechnerisch ermitteln (Quastler und Sherman, 1959; Wimber, 1960; Evans und Scott, 1964; Grant und Heslot, 1966). Jedes Maximum der Kurve entspricht einer Teilungswelle der markierten Zellen. In den Kontrollversuchen nach Abbildung 10 entspricht somit das erste Markierungsmaximum der ersten Mitose nach Behandlungsbeginn (X_1), das angedeutete zweite der X_2. Die Kontrollversuche (ohne und mit KCN) zeigen praktisch identischen MIp-Kurven-Verlauf mit einem ersten Auftreten markierter Prophasen nach etwa 5 h, einem steilen Anstieg und Erreichen eines Plateaus ungefähr 12–13 h nach Beginn der ^{3}H-TdR-Behandlung, einem Absinken nach 17–18 h und Erreichen eines Minimums nach 28–31 h. Das zweite Maximum wird nach zirka 40–43 h erreicht. Das Maximum der MIp-Kurve sollte theoretisch 100 % erreichen, beträgt aber in den Kontrollversuchen nach Abbildung 10 in X_1 bloss zirka 80 % und in X_2 nur noch 55 %. In verschiedenen Arbeiten liegt eine Bestätigung dieser objektbedingten Abweichung vor (Zweidler, 1965; Grant und Heslot, 1966; Scott und Evans, 1967). Versuche nach Wimber (1960) haben gezeigt, dass nach jedem weiteren Teilungszyklus das Markierungsmaximum der untersuchten Mitosephase stärker absinkt und deshalb eine Zyklusbestimmung bereits anhand der zweiten markierten Teilungswelle äusserst ungenau würde. Die Abweichungen des Markierungsmaximums vom Idealwert könnten in X_1 durch präparative Miterfassung der biosynthetisch wenig aktiven Zellen der Ruhezone des Wurzelmeristems zustande gekommen sein (Clowes und Hall, 1963), um so mehr als die Zellen der Wurzelhaube in allen Versuchen wegpräpariert worden sind und deshalb kaum in Frage kommen. In X_2 beruhen die Abweichungen wohl eher auf einer allmählichen Überlagerung markierter Zellen mit unmarkierten, indem vermutlich markierte Zellen teils schneller, teils langsamer als unmarkierte Zellen proliferieren. Trotz Abweichung von ideal asynchronen Verhältnissen kommt es dabei zu keiner Erhöhung des MI im Sinne einer Teilsynchronisierung der Zellpopulation. Obwohl zur Zyklusbestimmung nur die MIp von X_1 verwendet wurden, liegt dennoch eine objektbedingte Fehlerquelle vor, die unberücksichtigt bleiben muss. Daneben kommen eventuell noch weitere, weniger offensichtliche Fehlermöglichkeiten in Frage, so dass aus der MIp-Kurve eher Schätzwerte als exakte Grössen ermittelt werden können.

Die Mitosezyklusparameter werden wie folgt bestimmt: In der Kontrolle (unbehandelt, d.h. ^{3}H-TdR-Fütterung allein) ergibt die Zeit zwischen Fütterungsbeginn und dem halben Maximum des MIp auf dem ansteigenden Ast der ersten markierten Teilungswelle (42,5-%-Wert, da MIp maximal nur 85 % erreicht) die Interphase zwischen später DNS-Synthese-Phase und Prophase, das heisst die Dauer der G_2-Phase. Sie beträgt *8,5 h*. Die Standardabweichung kann bei Annahme einer Gaussschen Normalverteilung direkt aus der Graphik (Abb. 10) als Differenz zwischen dem halbmaximalen MIp, also dem 42,5-%-Wert und dem 14-%- bzw. 71-%-Wert (= $^2/_3$-

Abweichungen) des ansteigenden Astes, entnommen werden (Wimber, 1960), nämlich ± etwa 2,3 h. Der Anstieg der Kurve entspricht dem Ende der S-Phase, das Absinken der Kurve dem Beginn dieser Phase. S, die Periode der DNS-Synthese, kann deshalb graphisch ermittelt werden als die Breite des ersten Kurvenmaximums bei halbmaximalem MIp minus die Fütterungszeit von ^{3}H-TdR. Die Fütterungszeit ist zu berücksichtigen, denn während dieser Zeit treten immer neue Zellen der G_1-Phase in die S-Phase und werden dadurch zu markierten S-Zellen, was die wahre DNS-Synthese-Phase ungefähr um die Dauer der Fütterung verlängert. Die durchschnittliche S-Phase beträgt in diesem Fall 13,5–2 = *11,5 h*. Eine rechnerische Bestimmung der S-Phase ist möglich über den totalen Markierungsindex (MI_{tot}) von 43,8 % und der Gesamtmitosezyklusdauer (T) von 28,4 h (inkl. Fütterungszeit). T = 28,4 h repräsentiert den Mittelwert zwischen dem graphisch – Intervall zwischen dem halben Maximum der ansteigenden Kurvenäste der ersten und zweiten Teilungswelle (MIp) oder Intervall zwischen den beiden Kurvenmaxima – und dem rechnerisch (siehe weiter unten) ermittelten Wert von T. Da MI_{tot} proportional der Dauer von S + Fütterungszeit ist, entspricht S + Fütterungszeit nach der Formel

$$S = \frac{MI_{tot} \cdot T}{100}$$

einer durchschnittlichen Zeitdauer von 12,4 h, S also 12,4–2 = 10,4 h. Das Mittel aus dem der Graphik direkt entnommenen und dem errechneten Wert beträgt S = *10,9 h*. Für die Standardabweichung des graphisch ermittelten Wertes von S wird neben der bereits für G_2 abgeschätzten ⅔-Wahrscheinlichkeit für Werte zwischen dem 14-%- und 42,5-%-Wert bzw. 42-%- und 71-%-Wert des ansteigenden Astes diejenige für G_2 + S in analoger Weise am absteigenden Ast bestimmt. Die Differenz zwischen dem 42,5-%-Wert und dem 14-%- bzw. 71-%-Wert des absteigenden Astes ergibt zirka 3,3 h. Die Standardabweichung von S allein ist gleich der Wurzel aus der Differenz der Streuungsquadrate von G_2 + S und G_2 (Wimber, 1960), also ± zirka 2,4 h. Neben der graphisch abgeschätzten Gesamtmitosezykluszeit T von *24 h* (ohne Fütterungszeit) kann diese Grösse auch über den Markierungsindex aller Zellen (MI_{tot}) berechnet werden, wenn die Dauer von S bekannt ist (Zweidler, 1965; Cleaver, 1967). Die Grundlage bildet wiederum die bereits bei der rechnerischen Bestimmung von S gebrauchte Beziehung, wonach der MI_{tot} unter den gewählten Bedingungen proportional der Dauer von S ist, so dass gilt:

$$T = \frac{S \cdot 100}{MI_{tot}}$$

Da nach der Graphik S + Fütterungszeit = 13,5 h und der MI_{tot} 43,8 % markierte Zellen ergibt, ist T = 30,8–2 h Fütterungszeit = *28,8 h*. Das Mittel aus errechnetem und der Graphik entnommenem Wert lautet T = zirka *26,4 h* (inkl. Fütterungszeit: *28,4 h*). Da der MI 7,8 % ausmacht, kann aus T nach der Formel

$$M = \frac{MI \cdot T}{100}$$

die durchschnittliche Mitosedauer (M) berechnet werden. Sie beträgt *2,1 h*. Die G_1-Phase wird gefunden durch Subtraktion der Summe der Dauer aller übrigen

Phasen (G_2 = 8,5 h, S = 10,9 h, Mitose = 2,1 h, total 21,5 h) von der Gesamtmitosezyklusdauer T = 26,4 h. G_1 = T–(G_2 + S + M) = *5,3 h*. Zusammenfassung der Mitosezyklusparameter von *Vicia-faba*-Wurzelmeristemzellen siehe Tabelle 3.

Die gefundenen Werte – in Analogie zu Arbeiten von Wimber (1960), Evans und Scott (1964), Zweidler (1965), Grant und Heslot (1966) und Scott und Evans (1967) berechnet – sind mit verschiedenen schwer abschätzbaren Fehlern behaftet und haben deshalb bloss Schätzcharakter. Da die Werte streng genommen nur für die möglicherweise in ihrer Zellproliferation beeinflussten markierten Zellen gelten, kann nicht entschieden werden, ob die angegebenen Zyklusparameter auch auf die Zellpopulation unter natürlichen – das heisst unmarkierten – Bedingungen übertragen werden dürfen. Sicher ist die Bestimmung von G_2 und S bei kurzer und schwacher Markierung weniger stark beeinflusst als G_1 (Wimber und Quastler, 1963; van't Hof, 1965). G_1 kann überdies nur sehr indirekt bestimmt werden und dürfte deshalb mit dem grössten Fehler behaftet sein (Scott, 1968). Obwohl für verschiedene pflanzliche und tierische Zellen ziemlich ähnliche Werte von T gefunden werden (Kihlman, 1966; Cleaver, 1967), können die Zeiten im selben Objekt und Zelltyp trotz weitgehend identischer Versuchsbedingungen recht stark variieren (Evans und Scott, 1964; Scott und Evans, 1967). Im häufig untersuchten *Vicia-faba*-Wurzelmeristem liegen die Werte bei 19 °C im Bereich von 18–20 h nach der ^{3}H-TdR-Methode (Evans und Scott, 1964; Grant und Heslot, 1966; Scott und Evans, 1967) und um 26 h nach der Colchicinmethode (Evans und Savage, 1959), während bei 24 °C im eigenen Versuch zirka 27 h ermittelt worden sind und der Vergleichswert nach der Colchicinmethode zirka 23 h beträgt (Evans und Savage, 1963). Bei gleicher Temperatur vorliegende Unterschiede können auf echten Variationen beruhen oder auf Unterschieden von methodischen Fehlern je nach Wahl und Durchführung der Versuchsmethode; dies sind wohl Gründe, weshalb verschiedene Autoren nie völlig identische Werte von T bei gleichem Objekt und gleicher Temperatur angeben.

Der für die Peroxydversuche verwendete Enzymhemmstoff KCN macht zu einer eindeutigen Sicherstellung der zytologischen Wirkung der Kombination Enzymhemmstoff + organisches Peroxyd einen weiteren Kontrollversuch nötig. Behandlung mit KCN unter den angegebenen Bedingungen führt im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelt) zu keiner nennenswerten Verzögerung im Auftreten markierter Prophasen, das heisst zu einem ungefähr identischen Verlauf der MIp-Kurve in X_1 und zu Beginn von X_2, abgesehen von einem leicht herabgesetzten Markierungsmaximum in X_1 (Abb. 10). Die Mitosezyklusparameter entsprechen demzufolge ungefähr denjenigen der Kontrolle (unbehandelt), wie Tabelle 3 zeigt. Eine nennenswerte Beeinflussung des Mitosezyklus tritt nach KCN-Behandlung allein nicht auf.

Der maximale MIp bildet nach Behandlung der Kombination KCN + DHMP ein Plateau, das nur noch eine Höhe von zirka 67 % erreicht, um zirka 7 h verzögert erscheint, bedeutend breiter ist als dasjenige der beiden Kontrollversuche, nur sehr langsam vom maximalen Wert absinkt und ungefähr 50 h nach Versuchsbeginn sein Minimum erreicht (Abb. 10). G_2 und S werden wie in den Kontrollversuchen aus der Graphik abgeschätzt, wobei in diesem Fall das halbe Maximum des MIp als Messhöhe 33,5 % beträgt (maximaler MIp = 67 %). Für die Standardabweichungen gelten als Messhöhen die $^2/_3$-Abweichungen vom 33,5-%-Wert auf dem ansteigenden und absteigenden Ast, nämlich der 11-%- bzw. 56-%-Wert. Die G_2-Phase beträgt durchschnittlich *11,5* ± *2,0 h*, die S-Phase *22,8* ± *7,7 h*. T, G_1 und M können rech-

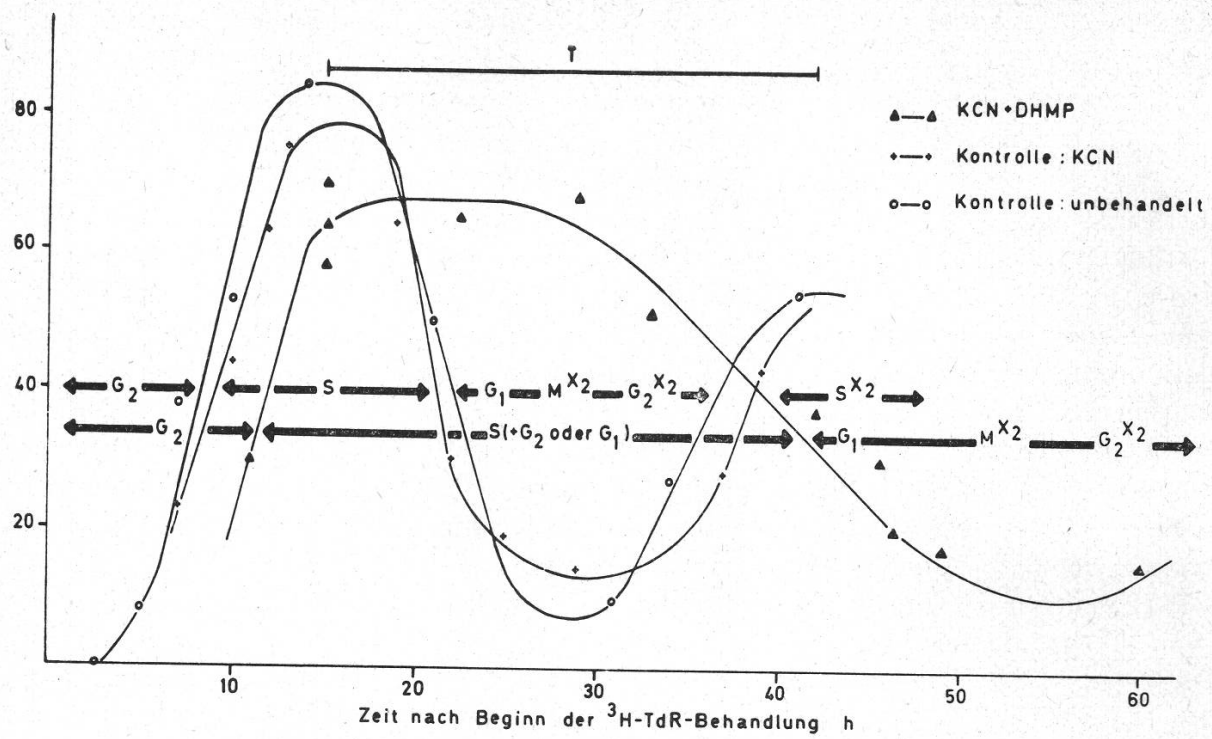


Abbildung 10

Markierungsindexkurven für Prophasen von *Vicia faba* (MIp = relative Anzahl markierter Prophasen zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der ^{3}H-TdR-Fütterung) unbehandelt, das heisst ^{3}H-TdR allein, nach ^{3}H-TdR+KCN sowie nach ^{3}H-TdR+DHMP bei gleichzeitiger KCN-Vorbehandlung. Ordinate: Prophasemarkierungsindex (MIp %)

nerisch nicht ermittelt werden, da die Voraussetzung dazu – eine Zellpopulation ohne Periodizität – nicht erfüllt ist. Die graphisch ermittelte S-Phase ist gegenüber den Kontrollen drastisch verlängert. Durch die flach abfallende MIp-Kurve ist der Wert von S mit einer grossen Streuung behaftet. Der Streuwert – direkt aus der Graphik ermittelt – dürfte methodische Fehler, bedingt durch Abweichung des Kurvenbildes vom Idealzustand (maximaler MIp über 90 %, aperiodische Zellpopulation), in etwa berücksichtigen. Die normale Dauer der S-Phase liegt deutlich ausserhalb der Standardabweichung der entsprechenden Werte für S nach KCN + DHMP-Behandlung, so dass die gefundene Phasenverlängerung von S als statistisch gesichert anzusehen ist (Tab. 3). Unter Peroxydeinwirkung ist die Zellproliferation in der S-Phase stark verzögert. Dies führt zu einer Teilsynchronisierung von markierten Zellen der S-Phase mit unmarkierten Zellen der G_1- und eventuell der G_2-Phase, ersichtlich am maximalen MIp von nur zirka 67 % (Abb. 10) bei gleichzeitiger Periodizität des MI mit einer starken Erhöhung zwischen zirka 18 und 45 h nach Behandlungsbeginn (Abb. 4). Vermutlich werden in der Zellproliferation zur Hauptsache stark verzögerte markierte Zellen der S-Phase von schwach oder nicht verzögerten Zellen der G_1-Phase eingeholt und in geringerem Mass die nach Abbildung 10 nur schwach verzögerten Zellen der G_2-Phase eventuell ihrerseits von einem kleinen Anteil markierter S-Zellen – wahrscheinlich Zellen der späten S-Phase, die der Hemmwirkung entgehen konnten – eingeholt, so dass in der Folge die 2 oder eventuell 3 teilweise überlagerten Phasenabschnitte synchron laufen; dies führt notwendigerweise zu einem Anstieg des MI (Abb. 2).

Tabelle 3

Mitosezyklusdauer und einzelne Phasenabschnitte, unbehandelt und nach KCN- bzw. KCN+ DHMP-Behandlung. Vergleich mit Röntgenstrahlen

	G_1	S	G_2	M	T
Kontrolle: unbehandelt (24 °C)	5,3 h	10,9±2,4 h	8,5±2,3 h	2,1 h	26,8 h
Kontrolle: KCN (0,1 mM, 24 °C)	5,5 h	10,9±1,6 h	9,0±1,5 h	2,2 h	27,6 h
KCN (0,1 mM)+DHMP (4 mM) (24 °C)		22,8±7,7 h	11,5±2,0 h		
Röntgenstrahlen:					
50 rad (19 °C) (Scott, 1968)		9,5 h	9,0 h		
100 rad (19 °C) (Scott und Evans, 1967)		16,0 h	9,5 h		
150 rad (19 °C) (Scott und Evans, 1967)		15,5 h	11,0 h		

Ein Versuch quantitativer Autoradiographie gilt der Frage nach der Beeinflussung der DNS-Synthese in DHMP-behandelten Zellen der S-Phase als mögliche Ursache der bevorzugten Verlängerung der S-Phasen-Dauer. Nach 2stündiger ^{3}H-TdR-Fütterung von unbehandelten oder KCN- bzw. KCN + DHMP-behandelten Wurzelmeristemzellen wurde (1) die relative Zahl der aktiven Zellkerne (Tab. 4) und (2) die durchschnittliche Zahl der Silberkörner pro aktiven Zellkern (Tab. 5) bestimmt. Da der Hintergrund in allen Präparaten zwischen 10 und 15 Silberkörner pro Kernareal ausmachte, wurden nur solche Kerne als aktiv bezeichnet, über denen mehr als 15 Körner festgestellt werden konnten. Die Körnchenzählung kann mit methodischen Fehlern behaftet sein; so ist bei Tritium mit der sehr beschränkten Reichweite seiner β-Strahlen (Wimber und Quastler, 1963) in Quetschpräparaten variierender Dicke mit unterschiedlicher Selbstabsorption zu rechnen, und nach Ruthmann (1966) können durch sogenannte Koinzidenzfehler bei zu hoher Tritiumeinbaudichte 2 β-Strahlen auf dasselbe AgBr-Teilchen treffen. Die genannten methodischen Fehler dürften aufgrund identischer spezifischer Aktivität und Markierungsdosis des verwendeten Isotops, ungefähr identischer zytologischer Präparation sowie gleich langer Expositionszeit in allen verglichenen Versuchen ähnliche Grössenordnung besitzen und deshalb eine Aussage über die relativen Markierungsunterschiede zwischen peroxydbehandelter und unbehandelter Zellpopulation kaum verfälschen. Tabelle 4 zeigt, dass die Frequenz der aktiven Zellkerne (= MI_{tot}) in den Kontrollen und nach Peroxydbehandlung ungefähr gleich gross ist, das Peroxyd also den Einbau von TdR in keinem Zellkern der S-Phase völlig verhindert.

Hinsichtlich der mittleren Frequenz der Silberkörner pro aktiven Zellkern ergibt sich dagegen ein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrollen und der Peroxydbehandlung (Tab. 5); die Kornzahl pro aktiven Kern ist unmittelbar nach der Peroxydbehandlung zirka 50 % und in den Erholungszeiten 25, 50 und 72 h nach Behandlungsbeginn immer noch zirka 40 % geringer als in den Kontrollen. Der beobachtete Unterschied kann nicht durch natürliche Schwankungen der ^{3}H-TdR-Einbaurate – bedingt durch einen relativ schnellen Einbau in Zellkerne der frühen und späten S-Phase sowie einen relativ langsamen in mittleren Bereichen der S-Phase (Howard und Dewey, 1962) – zustande gekommen sein, denn die Auszählung einer relativ grossen Zahl willkürlich ausgewählter Zellkerne der S-Phase schliesst eine bevorzugte Erfassung bestimmter Abschnitte der S-Phase aus.

Tabelle 4

Frequenz der aktiven Zellkerne unmittelbar nach 2stündiger ^{3}H-TdR-Fütterung, unbehandelt und nach KCN- bzw. KCN+DHMP-Behandlung

Behandlungsart	h vor ^{3}H-TdR-Fütterung	Anzahl aller analysierten Kerne	aktiven Kerne[1]	Aktive Kerne (%)[1] (= MI_{tot})
Kontrolle: unbehandelt	0	800	261	32,6
Kontrolle: KCN (0,1 mM)	0	1000	349	34,9
KCN (0,1 mM)+DHMP (4 mM)	0	1074	322	30,0
KCN (0,1 mM)+DHMP (4 mM)	25	972	318	32,6
KCN (0,1 mM)+DHMP (4 mM)	50	914	286	31,3
KCN (0,1 mM)+DHMP (4 mM)	72	1154	382	33,1

[1] Aktive Kerne unter Abzug der Kerne im Aktivitätsgrenzbereich von 10–15 Silberkörnern (= Hintergrund).

Tabelle 5

Frequenz der Silberkörner pro aktiven Zellkern unmittelbar nach 2stündiger ^{3}H-TdR-Fütterung, unbehandelt und nach KCN- bzw. KCN+DHMP-Behandlung

Behandlungsart	h vor ^{3}H-TdR-Fütterung	Summe aller aktiven Kerne[1]	Silberkörner total	Mittlere Frequenz der Silberkörner	
				Variationsbreite bei aktiven Kernen[1]	pro aktiven Kern[1]
Kontrolle: unbehandelt	0	261	20 538	15–150	78,7
Kontrolle: KCN (0,1 mM)	0	349	25 230	15–150	72,3
KCN (0,1 mM)+DHMP (4 mM)	0	322	11 780	15–50	35,0
KCN (0,1 mM)+DHMP (4 mM)	25	318	13 580	15–80	42,7
KCN (0,1 mM)+DHMP (4 mM)	50	286	12 920	15–80	42,3
KCN (0,1 mM)+DHMP (4 mM)	72	382	16 880	15–80	43,0

[1] Aktive Kerne unter Abzug der Kerne im Aktivitätsgrenzbereich von 10–15 Silberkörnern (= Hintergrund).

Die Anzahl Silberkörner pro Zellkern gilt als ein Mass für die Intensität des ^{3}H-TdR-Einbaus und damit der DNS-Synthese-Rate (Perry, 1964; Rutishauser und Bollag, 1967). Die Resultate nach Tabellen 4 und 5 bedeuten, dass die DNS-Synthese nach DHMP-Behandlung in allen Zellkernen stark herabgesetzt, in keinem aber völlig verhindert wird. Die Hemmung der DNS-Synthese ist sicher ein wesentlicher Grund der DHMP-induzierten Verlängerung der S-Phasen-Dauer (siehe Tab. 3), zumal zwischen der mittleren Silberkornzahl und der Dauer der S-Phase Reziprozität besteht (Koburg und Maurer, 1962), das heisst eine im Vergleich zur Kontrolle geringere DNS-Synthese-Rate zur DNS-Replikation des gesamten Genoms eine längere S-Phasen-Dauer impliziert.

Zeitpunkt der Aberrationsinduktion: Zur Erfassung der Aberrationssensibilität in den einzelnen Phasenabschnitten des Mitosezyklus wurde die MIp-Kurve nach DHMP-Behandlung (Abb. 10) mit den Aberrationsfrequenzen des Erholungszeitenversuchs nach Abbildung 9 sowie einem weiteren Versuch mit Erholungszeiten von 60 und 70 h verglichen. Wie Abbildung 11 zeigt, treten die DHMP-induzierten aberranten Zellen praktisch gleichzeitig mit den tritiummarkierten S-Zellen in die erste Mitose nach Behandlung (X_1). Das deutliche Aberrationsmaximum etwa 12 h nach Behandlungsbeginn liegt im Bereich des ansteigenden Astes der MIp-Kurve, also von Zellen der späten S-Phase. Dieser Befund stützt im wesentlichen die bereits im Kapitel II, 5, b gemachte Vermutung, wonach die S-Phase und im speziellen die späte S-Phase der bruchsensibelste Abschnitt der Interphase sein könnte, gibt aber keine eindeutige Klärung des Sachverhalts. Der Vergleich zeigt lediglich, dass die Brüche im Erholungszeitenversuch zusammen mit den markierten Zellen der S-Phase auftreten. Da mit den markierten Zellen gleichzeitig auch unmarkierte G_1- und eventuell G_2-Zellen in Mitose treten (siehe II, 5, c, Mitosezyklusdauer), ist nicht auszuschliessen, dass zumindest ein Teil der beobachteten Aberrationsfrequenzen aus Zellen stammt, die ausserhalb der S-Phase geschädigt worden sind.

Aus den Versuchen geht dagegen eindeutig hervor, dass alle Brüche in der Interphase vor X_1 induziert worden sind und in der Interphase nach X_1 keine neuen Aberrationstypen mehr induziert werden. Nach Abbildung 12 kommt es in X_2 zwar zu einer erhöhten Frequenz von Chromosomentypaberrationen, nicht aber von

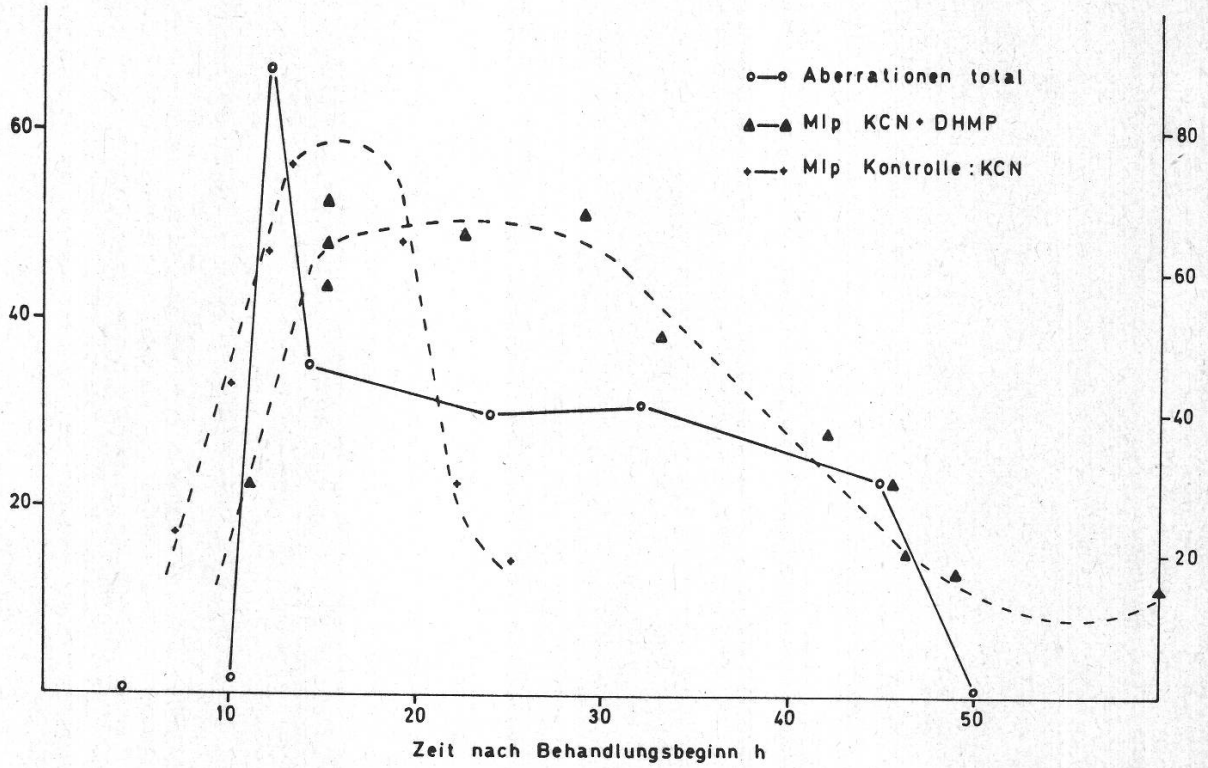


Abbildung 11

Vicia faba, Aberrationsfrequenz zu verschiedenen Zeiten nach Behandlung mit KCN+DHMP. Vergleich mit dem Prophasenmarkierungsindex als Mass der Zellproliferation markierter S-Zellen nach Behandlung mit KCN+DHMP+^{3}H-TdR. Ordinate links: Aberrationen auf 100 Zellen. Ordinate rechts: Prophasemarkierungsindex (MIp %)

Chromatidtypaberrationen. Wäre das Agens auch noch in der Interphase nach X_1 wirksam, wie zum Beispiel die bifunktionell alkylierenden Agenzien L-Diepoxybutan (Matagne, 1969) und Stickstofflost (Evans und Scott, 1969), oder würden in G_2 der Interphase vor X_1 molekulare Veränderungen am Chromatid induziert, die in der X_1 noch zu keinem Bruchbild führen, beim Durchlaufen der nächsten chromosomalen DNS-Replikation aber in eine Chromatidtypaberration umgewandelt werden, wie zum Beispiel nach Behandlung mit Maleinsäurehydrazid (Evans und Scott, 1964; Scott, 1968), L-Diepoxybutan (Matagne, 1969) und Stickstofflost (Evans und Scott, 1969), dann müssten in X_2 gehäuft Chromatidtypaberrationen auftreten. Die Chromosomentypaberrationen in X_2 können unmöglich in G_1 des zweiten Zyklus nach Behandlung induziert worden sein, denn bereits im ersten Zellzyklus sind praktisch keine Chromosomentypaberrationen erzeugt worden, und die MIp-Kurve zeigt zwischen 60 und 70 h Erholungszeit den Mitoseeintritt (X_2) von G_2- und den ersten S-Zellen an, nicht aber von G_1-Zellen. Auch die Möglichkeit, dass in der G_1 der Interphase vor X_1 induzierte Aberrationen von Zellen des Ruhezentrums aufgrund ihrer sehr viel langsameren Zellproliferation erst in die X_1 treten, wenn die Zellen des aktiven Meristems bereits in X_2 sind, dürfte unwahrscheinlich sein, zumal die Mitosezyklusdauer von Zellen des Ruhezentrums zwischen 200 und 300 h beträgt (Clowes und Hall, 1963). Der starke Anstieg der Chromosomentypaberrationen in

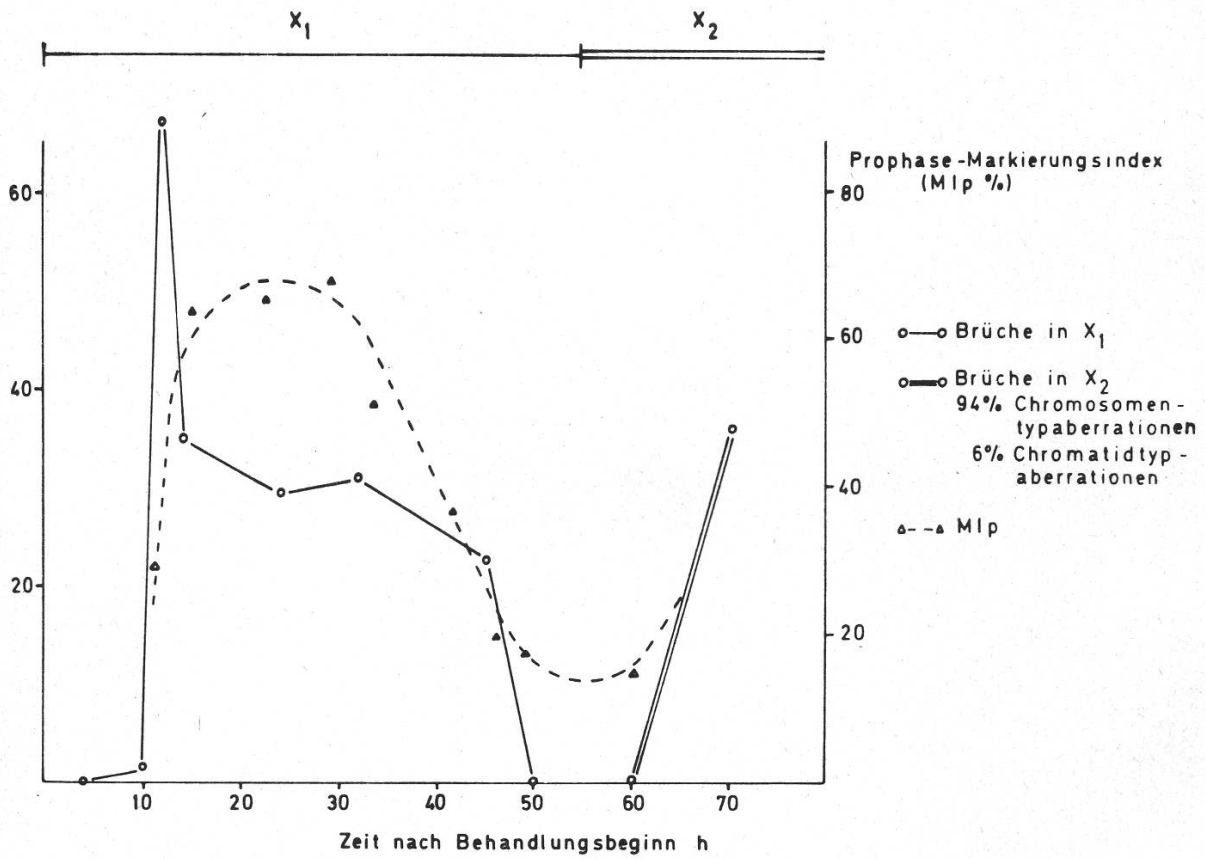


Abbildung 12

Vicia faba, Aberrationsfrequenz und Beziehung zur ersten (X_1) und zweiten Mitose (X_2) nach Behandlung mit KCN+DHMP bzw. KCN+DHMP+^{3}H-TdR. Ordinate links: Aberrationen auf 100 Zellen

X_2 ist einzig dadurch zu erklären, dass von den in X_1 sichtbaren Chromatidtypaberrationen nur die azentrischen Fragmente unter Kleinkernbildung eliminiert werden, während viele zentrische Fragmente im Hauptkern verbleiben und nach Passage der Chromosomenreduplikation in der nächsten Interphase als Chromosomentypaberrationen in X_2 nachweisbar werden. Neben DHMP sind auch Röntgenstrahlen (Scott und Evans, 1967; Scott, 1968) sowie Nitrosomethylurethan und Nitrosoäthylurethan (Grant und Heslot, 1966) unfähig, auch noch in Mitosezyklen nach X_1 neue Aberrationen zu induzieren. Der Wirkungsverlust von DHMP nach relativ kurzer Zeit könnte wie bei Nitrosomethylurethan sowie Nitrosoäthylurethan (Grant und Heslot, 1966) auf einem schnellen Abbau beruhen, denn die KCN-Behandlung zur Peroxydasehemmung ist reversibel, so dass schon relativ kurze Zeit nach der kombinierten Behandlung KCN + DHMP mit einem peroxydatischen Abbau zu rechnen ist.

Zur experimentellen Prüfung der oben gemachten Vermutung, wonach die gleichzeitig mit den markierten S-Zellen in X_1 auftretenden aberranten Zellen nach Abbildung 11 eine zusätzliche Induktion von Chromosomenbrüchen in unmarkierten Zellen der G_1- und eventuell G_2-Phase nicht ausschliessen, habe ich einen weiteren autoradiographischen Versuch unternommen. Die Technik beruht, in Anlehnung an Versuche von Evans und Savage (1963), Scott und Evans (1967), Scott (1968) mit Röntgenstrahlen, Evans und Scott (1964) mit Maleinsäurehydrazid, Scott und Evans (1964) mit 8-Äthoxycoffein sowie Evans und Scott (1969) mit Stickstofflost, auf der

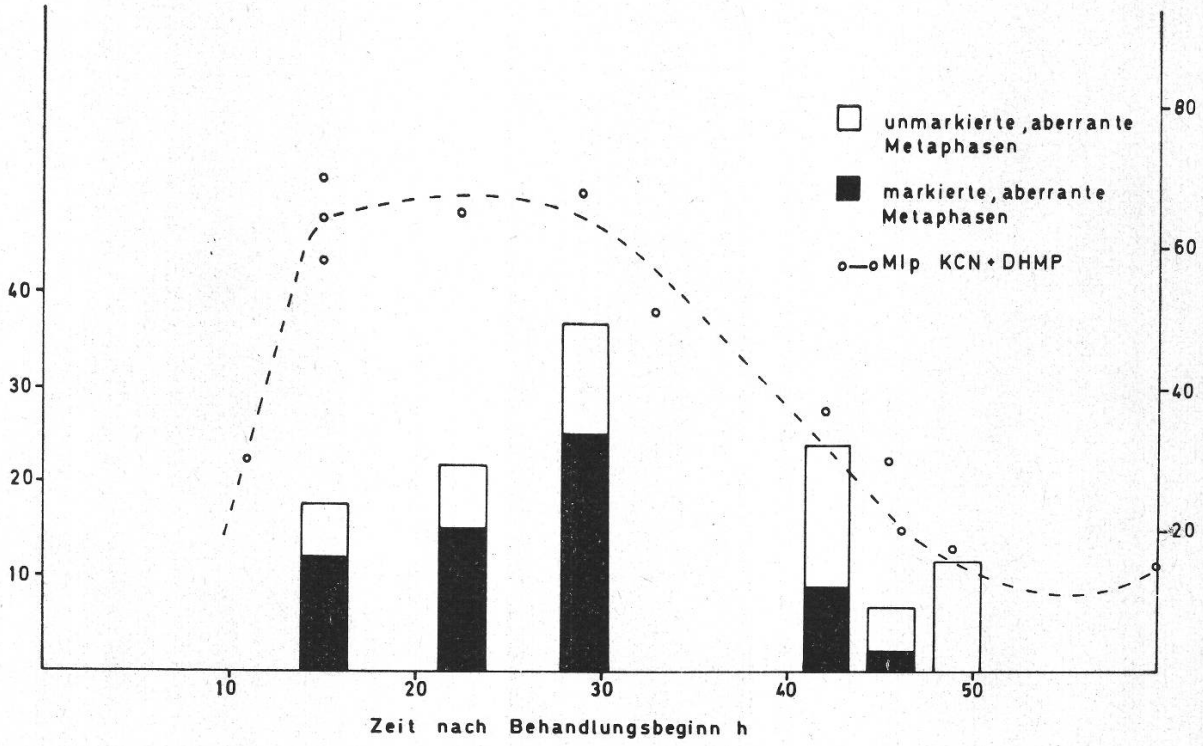
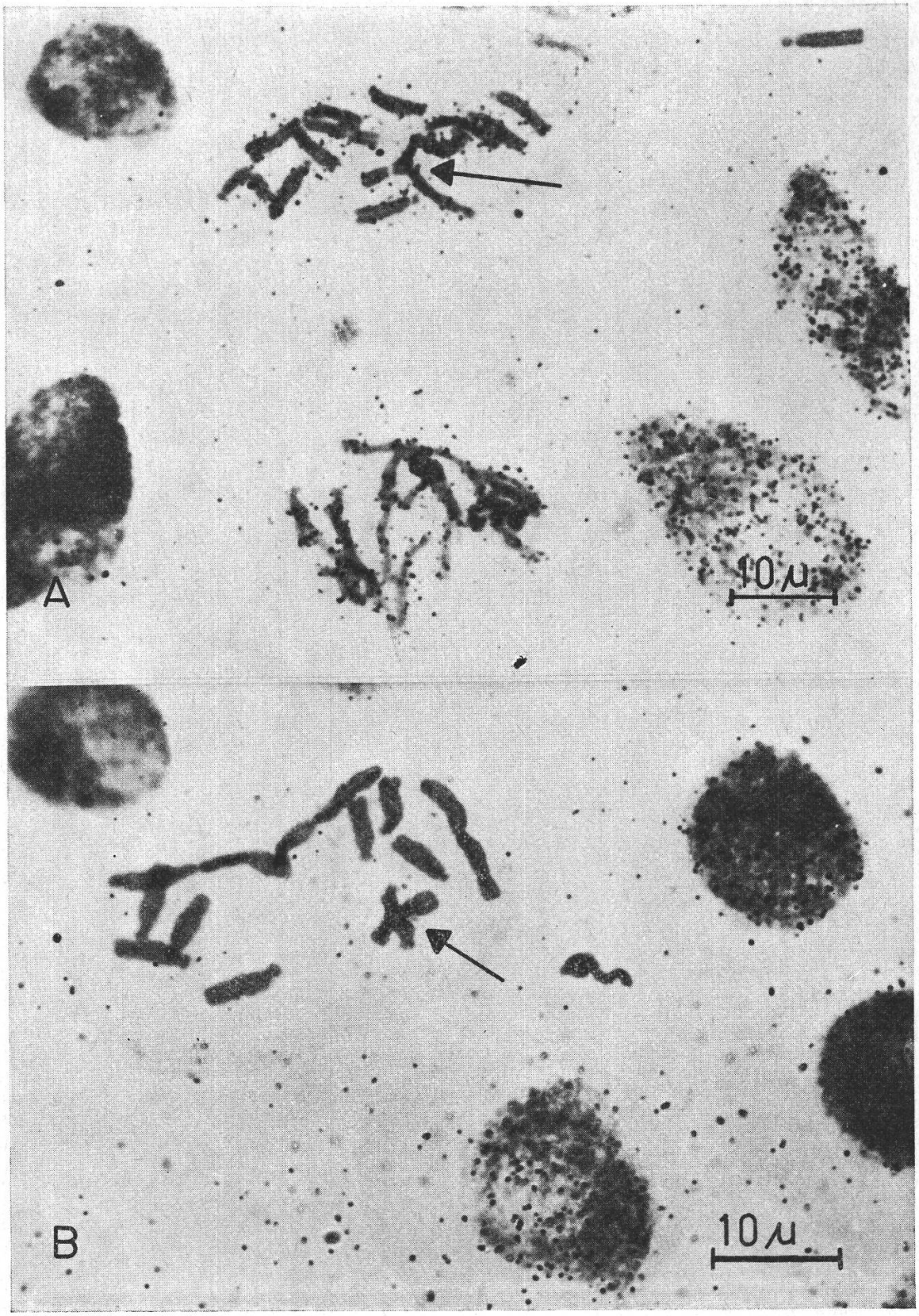


Abbildung 13

Vicia faba, markierte und unmarkierte aberrante Metaphasen nach Behandlung mit KCN+DHMP +^{3}H-TdR zur Prüfung der Aberrationssensibilität in der präsynthetischen (G_1) und/oder postsynthetischen Interphase (G_2). Ordinate links: aberrante Metaphasen in %. Ordinate rechts: Prophasemarkierungsindex (MIp %)

Behandlung der Meristeme mit KCN + DHMP in Verbindung mit ^{3}H-TdR und Ermittlung des Auftritts oder Fehlens von Chromosomenmutationen in markierten und unmarkierten Zellen zu verschiedenen Erholungszeiten. Markierte aberrante



bzw. unmarkierte aberrante X_1-Metaphasen verweisen auf Aberrationsinduktion in der S-Phase bzw. G_1- und eventuell G_2-Phase. Das Versuchsresultat nach Abbildung 13 zeigt eindeutig, dass neben der S-Phase auch andere Phasenabschnitte der Interphase aberrationssensibel sind. Die Erfassung des Anteils markierter und unmarkierter aberranter Metaphasen innerhalb der S-Phase ergibt rund einen Drittel unmarkierte aberrante Zellen innerhalb des Markierungsindexplateaus und einen grösseren Prozentsatz unmarkierter aberranter Zellen im Bereich des absteigenden MIp-Kurvenastes (Abb. 13 und 14). Erholungszeiten zwischen 40 und 50 h mit vorwiegend unmarkierten aberranten Metaphasen lassen mit Sicherheit auf Zellen schliessen, die zum Zeitpunkt der Behandlung in später G_1 waren. Für Erholungszeiten im Bereich des Markierungsindexplateaus kommen neben späten G_1-Zellen eventuell auch frühe G_2-Zellen als Träger der unmarkierten Aberrationen in Frage. Aufgrund der bisher beschriebenen autoradiographischen Versuche ist nicht entscheidbar, welche Zellen mit den markierten S-Zellen überlagert sind (siehe auch II, 5, c, Mitosezyklusdauer), und damit eine genaue Zuordnung zu eng definierten Phasenabschnitten unmöglich.

Die der Abbildung 15 zugrunde liegende Versuchsanordnung klärt die Frage nach der Phasenzugehörigkeit der nach Abbildung 13 unmarkierten aberranten Zellen sowie die mögliche Beeinflussung der Zellproliferation von G_2-Zellen zum Zeitpunkt der Peroxydbehandlung. Mittels ^{3}H-TdR-Pulsmarkierung und einem anschliessenden Zeitintervall vor der Peroxydbehandlung kann die Aberrationssensibilität der G_2-Phase geprüft werden. Anhand der bisherigen Versuche – Behandlung mit dem Testagens und unmittelbar anschliessender Pulsmarkierung – schliesst das Fehlen von Aberrationen in Zellen, die zeitlich vor dem ansteigenden Ast der MIp-Kurve liegen, eine Aberrationsinduktion in Zellen der G_2-Phase nicht aus, denn infolge der beobachteten Teilsynchronisierung können neben aberranten Zellen der späten G_1-, eventuell auch solche der G_2-Phase zusammen mit den markierten Zellen der S-Phase in Mitose (X_1) treten. Ein ideal festgesetzter Zeitintervall lässt nach Pulsmarkierung alle markierten S-Zellen so lange weiter proliferieren, bis sie die S-Phase verlassen haben und sich in der postreplikativen G_2-Phase bzw. Mitose befinden. Die S-Phase (unbehandelt, d.h. 2stündige ^{3}H-TdR-Fütterung allein) dauert nach Tabelle 3 ungefähr 10,9 h. Unter Berücksichtigung der im Versuch nach Abbildung 15 kürzeren ^{3}H-TdR-Fütterungszeit von 1 h dürfte die S-Phasen-Dauer, bedingt durch eine eventuell relativ schwächere Verzögerung der Zellproliferation durch das Markierungsisotop, eher etwas kleiner als 10,9 h sein; als mittlere Dauer von S wurden deshalb 10 h gewählt. Eine Weiterproliferation der markierten S-Zellen um die mittlere Dauer der S-Phase von zirka 10 h stellt einigermassen sicher, dass sich die meisten markierten Zellen in der G_2-Phase und in Mitose befinden. Wird erst jetzt die Peroxydbehandlung durchgeführt, so stehen dem Agens für die Aberrationsinduktion nicht mehr unmarkierte G_1-, G_2- und mitotische Zellen sowie markierte S-Zellen zur

Abbildung 14

Vicia faba, Autoradiographie von Metaphasen der ersten Mitose nach Behandlung mit KCN + DHMP + ^{3}H-TdR

A: markierte aberrante Metaphase mit einer Chromatidentranslokation (→). Aberrationsinduktion erfolgt während der DNS-Synthese-Zeit

B: unmarkierte aberrante Metaphase mit einer Chromatidentranslokation (→). Aberrationsinduktion erfolgt ausserhalb der DNS-Synthese-Zeit

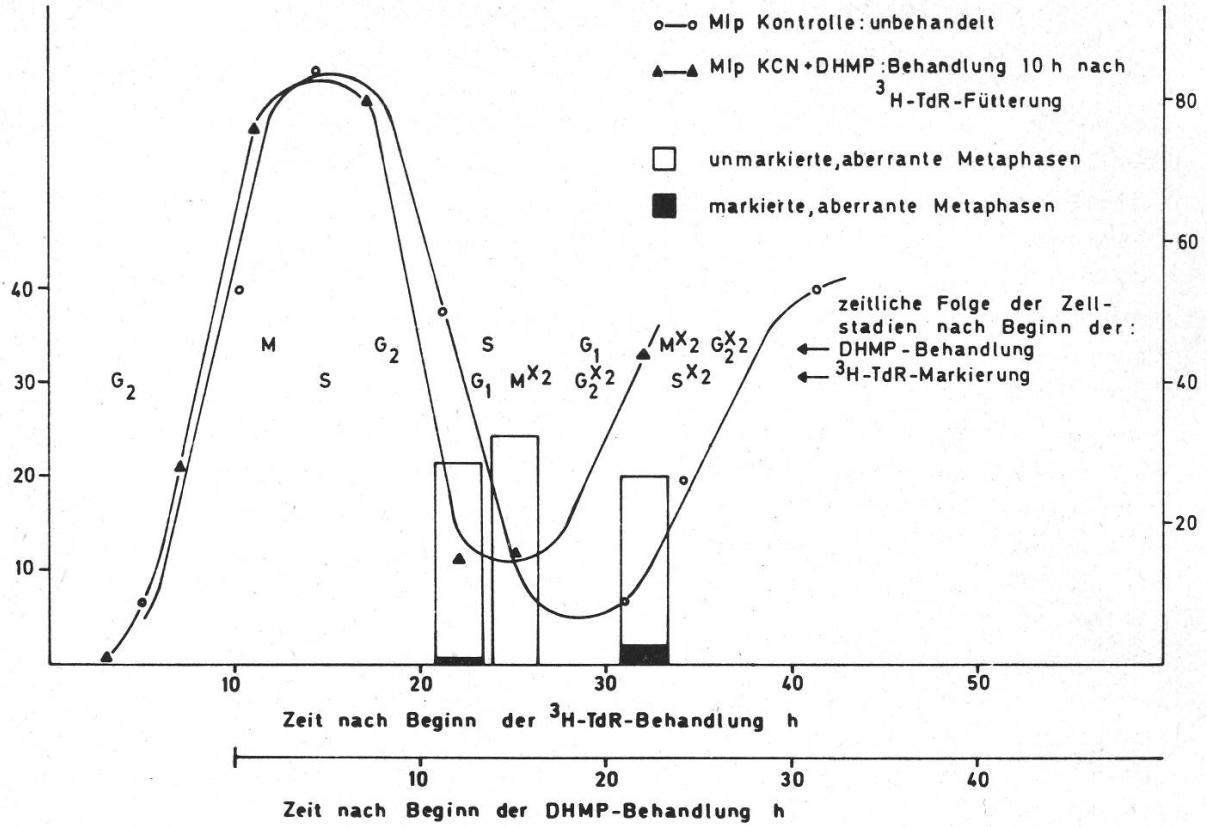


Abbildung 15

Vicia faba, Beziehung zwischen markierten und unmarkierten aberranten Metaphasen, wenn die tritiummarkierten Zellen zum Zeitpunkt der Peroxydbehandlung in der postsynthetischen Interphase (G_2) und in Mitose sind. Prüfung der Aberrationssensibilität in der G_2-Phase nach Behandlung mit ^{3}H-TdR, 10stündiger Erholungszeit und anschliessender Behandlung mit KCN+DHMP. Die Prophasemarkierungsindexkurve zeigt die Zellproliferation der markierten S-Zellen zum Zeitpunkt der ^{3}H-TdR-Fütterung bzw. die Zellproliferation der markierten G_2-Zellen zum Zeitpunkt der Peroxydbehandlung. Ordinate links: aberrante Metaphasen in %. Ordinate rechts: Prophasemarkierungsindex (MIp %)

Verfügung, sondern unmarkierte G_1- und S-Zellen sowie markierte G_2- und mitotische Zellen. Für den Zeitpunkt der Peroxydbehandlung liegt somit eine Zellpopulation mit markierten Zellen der G_2-Phase und Mitose vor. Nach dieser Versuchsidee kann die peroxydinduzierte Beeinflussung der Zellkinetik und die Aberrationssensibilität der G_2-Phase abgeklärt werden. Die MIp-Kurve weist nicht mehr den Proliferationsverlauf der markierten S-Zellen unter Peroxydeinfluss nach, sondern denjenigen der markierten G_2-Zellen, sowie die zu verschiedenen Erholungszeiten auf Chromosomenmutationen untersuchten markierten Zellen nicht mehr die Aberrationsinduktion in markierten S-Zellen, sondern diejenige in markierten G_2-Zellen. Wenn nun das Agens in S und G_2 Brüche induziert, dann sind unmarkierte und markierte Brüche zu erwarten, wenn aber die Brüche in S und der späten G_1 induziert werden, dann sind vorwiegend unmarkierte Brüche zu erwarten. Beim Vergleich der MIp-Kurven nach Abbildung 15 ist zu erkennen, dass nach Peroxydbehandlung die G_2-Zellen in der Zellproliferation kaum verzögert werden, ein weiterer Beweis, dass die Ursache der stark verlängerten Mitosezyklusdauer auf einer hauptsächlichen

Beeinflussung der DNS-Synthese-Phase beruht. Die vermutete Beteiligung von G_2-Zellen am Zustandekommen der Teilsynchronisierung der S-Zell-Population scheint sich nicht zu bestätigen, setzt doch die Überlagerung der 2 Zellpopulationen eine im Vergleich zu den bereits verzögerten S-Zellen noch langsamere Proliferation der G_2-Zellen voraus. Damit kommt den präsynthetischen G_1-Zellen bei der Entstehung dieses Effektes sicher die Hauptbedeutung zu, indem diese Zellen relativ schwächer verzögert sind als die S-Zellen, diese einholen und die 2 Zellpopulationen nun gemeinsam in Mitose treten. Das Schema zeigt weiter, dass 22, 25 und 32 h nach ^{3}H-TdR-Fütterung bzw. 12, 15 und 22 h nach Peroxydbehandlung – wenn die in der S-Phase tritiummarkierten Zellen zum Zeitpunkt der Peroxydbehandlung bereits um 10 h verschoben in der G_2-Phase und in Mitose sind – praktisch nur noch unmarkierte aberrante Metaphasen auftreten. Die gefundenen aberranten Metaphasen liegen alle im Bereich des MIp-Kurven-Minimums und setzen sich zu gut 95 % aus unmarkierten aberranten Zellen zusammen. Da zudem innerhalb des ersten MIp-Kurven-Maximums keine markierten aberranten Zellen in Mitose treten, ist eine Aberrationsinduktion in Zellen der frühen G_2-Phase mit ziemlicher Sicherheit, in Zellen der mittleren und späten G_2-Phase mit grosser Sicherheit auszuschliessen. Bei den gefundenen 4,5 % markierten aberranten Metaphasen dürfte es sich um vereinzelte Zellen der S-Phase handeln, die aufgrund verzögerter Zellproliferation zum Zeitpunkt der Peroxydbehandlung noch nicht in G_2-Phase waren und deshalb zusammen mit den – nach der Versuchsidee – überwiegend unmarkierten S-Zellen der Aberrationsinduktion unterlagen. Auch bei Annahme einer Aberrationsinduktion in der G_2-Phase sind 4,5 % markierte aberrante Zellen keine Stütze für eine experimentell bewiesene

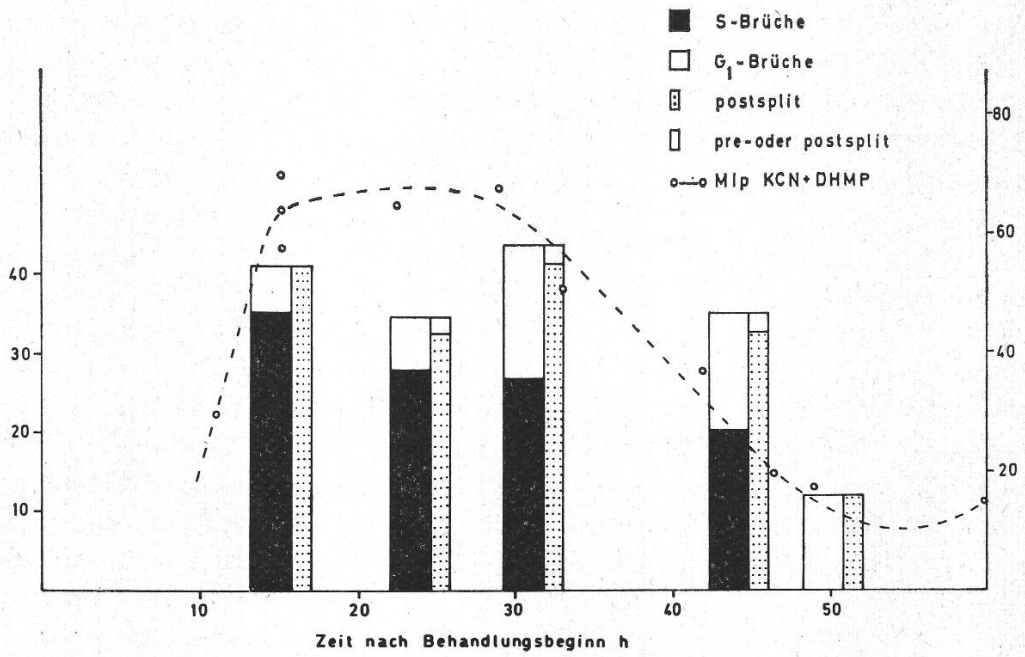


Abbildung 16

Vicia faba, Chromosomentyp- («presplit»), Chromatidtypaberrationen («postsplit») in der G_1- und S-Phase nach Behandlung mit KCN+DHMP. Vergleich mit der Prophasemarkierungsindexkurve nach Behandlung mit KCN+DHMP+^{3}H-TdR. Ordinate links: Aberrationen auf 100 Zellen. Ordinate rechts: Prophasemarkierungsindex (MIp %)

Aberrationssensibilität dieser Phase, denn der Anteil müsste bei mindestens 20 % liegen, um beweiskräftig zu sein. Die überwiegende Mehrheit der gefundenen Aberrationen ist unmarkiert und kann unter den gewählten Versuchsbedingungen nur in der S-Phase und der präsynthetischen G_1-Phase induziert worden sein. Damit lassen sich anhand der Abbildung 15 die zu Abbildungen 10 und 13 gemachten Vermutungen zu folgenden experimentell gesicherten Ergebnissen präzisieren: (1) Die Teilsynchronisierung der S-Zellen kommt durch Überlagerung mit präsynthetischen G_1-Zellen zustande, und (2) die zu diesem Zeitpunkt unmarkierten aberranten Zellen sind G_1-Zellen.

In Abbildung 16 sind die Aberrationen aus den markierten und unmarkierten aberranten Zellen von Abbildung 13 in die beiden grossen Aberrationskategorien Chromosomentyp- («presplit») und Chromatidtypaberrationen («postsplit») unterteilt. Während die ersteren im allgemeinen während des präreplikativen Abschnittes der Interphase (G_1) im funktionell einsträngig vorliegenden Chromosom entstehen, werden die letzteren im allgemeinen während des replikativen (S) und postreplikativen Abschnittes der Interphase (G_2) im funktionell zweisträngig vorliegenden Chromosom induziert (Thoday, 1952; Evans und Savage, 1963; Rieger und Michaelis, 1967). Die Graphik bestätigt diese Theorie für Brüche, die in markierten Zellen der S-Phase gebildet worden sind, nicht aber für die zu dieser Zeit auftretenden unmarkierten G_1-Brüche. Das Experiment nach Abbildung 15 hat eindeutig gezeigt, dass der unmarkierte Anteil an aberranten Zellen aus Abbildung 13 der G_1-Phase zuzuordnen ist, wobei die enthaltenen Aberrationen fast ausschliesslich «postsplit»-Charakter aufweisen. Lediglich in einigen Erholungszeiten treten zirka 12 % unmarkierte Aberrationen auf, die keinen typischen «postsplit»-Charakter zeigen, nämlich sehr wenige dizentrische Chromosomen und einige Iso-B′ ohne SU im zentrischen und azentrischen Fragment. Da diese Aberrationstypen in Zellen der G_1-Phase die Regel sind (Rieger und Michaelis, 1967), indem ihre Entstehung am einfachsten an funktionell einsträngigen Chromosomen erklärt werden kann (Thoday, 1954), andererseits die Bildung dieser Bruchtypen auch noch mit funktionell zweisträngigen Chromosomen interpretierbar ist (Evans und Savage, 1963), werden sie hier als «presplit»- oder «postsplit»-Aberrationen bezeichnet. Eine Induktion von «postsplit»-Aberrationen in noch nicht autoradiographisch nachweisbar replizierenden Chromosomen der G_1-Phase wurde von mehreren Autoren an verschiedenen Testobjekten bei Anwendung energiereicher Strahlen und chemischer Agenzien gefunden, so mit energiereichen Strahlen bei *Vicia faba*, *Trillium grandiflorum*, menschlichen Lymphozyten und beim Chinesischen Hamster (Evans und Savage, 1963; Wolff und Luippold, 1964; Grant, 1965; Hsu et al., 1962; Wolff, 1969) sowie mit Maleinsäurehydrazid und Stickstofflost bei *Vicia faba* (Evans und Scott, 1964 und 1969; Scott, 1968). Alle Autoren kommen zum übereinstimmenden Ergebnis, dass der Wechsel von Aberrationen auf chromosomaler zu solchen auf chromatidaler Basis nicht streng korreliert ist mit der chromosomalen DNS-Synthese und Chromosomenreduplikation in der S-Phase, sondern dass die Chromosomen schon während einer kurzen Zeitspanne vor Beginn der nachweislichen DNS-Synthese – für *Vicia faba* bis 2 h zuvor (Wolff und Luippold, 1964) – funktionell zweisträngig reagieren. Es darf somit auch in meinen Versuchen als gesichert gelten, dass die in Abbildung 16 dargestellten unmarkierten «postsplit»-Aberrationen hauptsächlich in der späten G_1-Phase induziert worden sind. Die zirka 12 % unmarkierten «presplit»- oder «post-

split»-Aberrationen sind ebenfalls dieser oder eventuell als echte Chromosomentypaberrationen der frühen und mittleren G_1-Phase zuzuordnen.

Zusammenfassend lässt sich über den Zeitpunkt der DHMP-Wirkung im Mitosezyklus folgendes aussagen: Die G_1 kann im Stadium der unmittelbaren chromosomalen Replikationsvorbereitungen mit bereits funktionell geteilten Chromosomen (= späte G_1-Phase) als bruchsensibel bezeichnet werden, während sie im eindeutig prärepliktiven Stadium mit funktionell ungeteilten Chromosomen (= frühe und mittlere G_1-Phase) nicht oder höchstens schwach sensibel ist. Die DNS-Synthese-Phase (= S-Phase) ist der aberrationssensibelste Abschnitt des Mitosezyklus. Im postreplikativen Stadium (= G_2-Phase) werden keine Aberrationen induziert.

d) Inter-, intrachromosomale Reunionen, Beeinflussung des Reunionssystems, interchromosomale Reunionsfrequenz zwischen homologen Chromosomen und Verteilung der Brüche über das Genom

Zur Erfassung weiterer Bruchcharakteristika diente eine diesbezügliche Auswertung der Versuche, die den Abbildungen 6, 9 und 13 zugrunde liegen. Bei der Ermittlung des Verhältnisses von Reunionen zwischen verschiedenen Chromosomen und innerhalb des Chromosoms wurden total 131 Aberrationen auf den Anteil T′ als interchromosomale Aberrationen bzw. Iso-B′ und DD als intrachromosomale Aberrationen analysiert. Zur Erfassung des Anteils von Aberrationen mit Brüchen, die inter- oder intrachromosomal reuniert haben bzw. keine Reunionen eingegangen sind, wurden total 195 Aberrationen ausgewertet und das Verhältnis offener Brüche zu Reunionen ermittelt. Zum Vergleich mit der Wirkung energiereicher Strahlen wurden die von Revell 1959 nach Röntgenbestrahlung (*Vicia faba*, 50 rad) erhaltenen Aberrationswerte übernommen und auf die genannten Reunionsverhältnisse umgerechnet. Die interchromosomale Reunionsfrequenz zwischen homologen und heterologen Chromosomen erhielt ich durch Analysierung von total 60 Translokationsfiguren auf die am Reunionsprozess beteiligten Chromosomentypen M und S (M zu M, M zu S, S zu S). Da Reunionen zwischen 2 M-Chromosomen zweifelsohne homologen Chromosomen zuzuordnen sind, nicht aber Reunionen innerhalb der S-Chromosomen, die nur als Untergruppen identifizierbar sind, habe ich allein die Translokationsfrequenz zwischen den M-Chromosomen als gesicherte homologe Reunionen angesehen. Der Vergleich mit energiereichen Strahlen geschah mit entsprechenden Werten von Evans (1961) nach ^{60}Co-Gammabestrahlung (*Vicia faba*, 51–147 rad). Die beobachteten Reunionshäufigkeiten wurden zur Ermittlung der Signifikanz der Abweichungen von den erwarteten Zufallshäufigkeiten mit dem χ^2-Test geprüft. Ist die Zahl des Dispersionsindex χ^2 grösser als die zur entsprechenden Anzahl der Freiheitsgrade sowie zu der gewünschten Irrtumswahrscheinlichkeit p von $< 1\,\%$ gehörende Signifikanzschwelle, so gilt der Unterschied vom Erwartungswert als signifikant. Die beobachtete Abweichung übersteigt dann den theoretisch zu erwartenden Wert über das durch Zufall erklärbare Mass hinaus. Als Mass für die Verteilung der Brüche über das Genom wurde die Bruchverteilung zwischen den sehr leicht unterscheidbaren Chromosomentypen M und S (M:S-Verhältnis) und innerhalb der S-Chromosomen die Verteilung zwischen den Chromosomengruppen (Sa, Sb, Sc) und (Sd, Se) sowie diejenige zwischen einzelnen Chromosomenbereichen der M-Chromosomen bzw. der Chromosomengruppen (Sa, Sb, Sc) und (Sd, Se)

bestimmt. Für das M:S-Verhältnis wurden total 123 Brüche (B′, Iso-B′, T′) zeichnerisch ausgewertet. Die interchromosomale Bruchverteilung zwischen den 2 Gruppen von S-Chromosomen machte zur Unterscheidung Längenmessungen an den S-Chromosomen nötig, die anhand von Mikrofotos durchgeführt wurden. Eine Auslese der fotografierten Metaphasenplatten erfolgte nur nach ihrer Qualität, so dass angenommen werden kann, dass es sich bei den 62 Mikrofotogrammen (Vergrösserung 1700- bis 4200mal) mit total 128 Brüchen (B′, Iso-B′, T′) um Stichproben im statistischen Sinne handelt. In der Karyogrammanalyse nach Abbildung 3b und Tabelle 2 konnten das Sd- und Se-Chromosom statistisch gesichert voneinander und von den übrigen S-Chromosomen unterschieden werden. Eine Identifizierung war aber nur möglich durch Vergleich der relativen Längen der kurzen bzw. langen Arme. In den vorliegenden Versuchen wurde eine Unterteilung der S-Chromosomen nur durch Ermittlung der relativen Länge des ganzen Chromosoms getroffen, so dass die Chromosomen Sd und Se nicht mehr getrennt von der Gruppe (Sa, Sb, Sc) unterschieden werden konnten und deshalb in einer Gruppe (Sd, Se) zusammengefasst wurden. Zum Vergleich mit der Wirkung energiereicher Strahlen diente eine Arbeit von Evans und Bigger (1961) mit ^{60}Co-Gammastrahlen (*Vicia faba*, 120 rad). Die für M- und alle S-Chromosomen getrennt ermittelten Bruchfrequenzen basieren in dieser Arbeit auf einer statistisch nicht gesicherten Unterscheidung der S-Chromosomen durch Vergleich der absoluten Längen. Damit die Werte als Vergleich dienen konnten, wurden sie in denjenigen Chromosomengruppen zusammengefasst, die nach meinen Untersuchungen eindeutig unterscheidbar sind, nämlich (Sa, Sb, Sc) und (Sd, Se). Der statistischen Prüfung zur Signifikanz der Abweichungen vom Erwartungswert unter Annahme einer direkten Proportionalität zur Chromosomenlänge diente wiederum der χ^2-Test. Die Werte gelten als gesichert, wenn sie grösser sind als die Signifikanzschwelle für eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 1\,\%$ für das M:S-Verhältnis bzw. $< 5\,\%$ für die Bruchfrequenzen zwischen den Chromosomen und Chromosomengruppen M (M_1, M_2), (Sa, Sb, Sc) und (Sd, Se). Der intrachromosomalen Aberrationsverteilung dienten die obenerwähnten Mikrofotogramme mit total 128 chromosomalen Strukturveränderungen (B′, Iso-B′, T′). In Anlehnung an die Arbeiten von Evans und Bigger (1961) sowie Rieger und Michaelis (1959b) wurden die Chromosomen und Chromosomengruppen in Segmente eingeteilt und die Aberrationen den entsprechenden Segmenten zugeordnet. Zwecks Vergleichs mit den strahleninduzierten Werten von Evans und Bigger (1961) unterteilte ich die Chromosomen und Chromosomengruppen in 8 Segmente. Für jede ausgewertete Aberration wurde an den jeweils beteiligten Chromosomen (B′, Iso-B′: 1 Chromosom; T′: 2 und in seltenen Fällen mehr als 2 Chromosomen) mit Stechzirkel und Millimetermassstab die Gesamtlänge gemessen, so dass eine Klassifizierung gemäss den erwähnten Chromosomen und Chromosomengruppen möglich wurde, wobei das M-Chromosom zusätzlich auch ohne Messung immer eindeutig identifizierbar war. Division durch die Segmentzahl 8 lieferte den längenmässigen Segmentbereich. Ermittlung des Längenabstandes Zentromer bis Bruch- bzw. Reunionspunkt für die Schenkel M_1 und M_2 des M-Chromosoms und Abstand Telomer des kurzen Schenkels bis Bruch- bzw. Reunionspunkt auf dem langen Schenkel für die S-Chromosomen sowie Division durch die Länge eines Segmentes und die daraus resultierende Segmentzahl ermöglichten eine Zuordnung der intrachromosomalen Aberrationslage zu einem der 8 Segmentbereiche für das untersuchte Chromosom. Da Segmentbereich und Länge

bis zum Bruch- bzw. Reunionspunkt auf jedem Chromosom in Beziehung zur Gesamtlänge gesetzt wurden, ergeben sich Relativwerte, die eine vergleichende Zuordnung der Aberrationslage in eines der 8 Segmente für alle analysierten Chromosomen ermöglichen. Die intrachromosomalen Aberrationsfrequenzen aus einer Arbeit von Evans und Bigger (1961), erhalten durch ^{60}Co-Gammabestrahlung (*Vicia faba*, 120 rad) nach 3,5- bis 5stündiger Erholungszeit und Auswertung der Iso-B′ und T′ ohne Berücksichtigung der B′ (Aberrationen total 300), wurden wie im Fall der obenerwähnten interchromosomalen Aberrationsverteilung in den S-Chromosomen-Gruppen (Sa, Sb, Sc) und (Sd, Se) zusammengefasst und mit dem Peroxydversuch verglichen. Der statistischen Auswertung zur Prüfung der beobachteten Abweichungen vom Erwartungswert unter Annahme einer zufälligen Verteilung auf die Segmente der einzelnen Chromosomen und Chromosomengruppen auf Signifikanz diente wiederum der χ^2-Test. Als gültige Grenze wird die 5prozentige Irrtumswahrscheinlichkeit p genommen. Ein χ^2 mit einem $p > 5\,\%$ wird als nicht gesicherte Abweichung gegenüber der Zufallsverteilung angesehen (in Tab. 8 mit 0 bezeichnet). Ein Wert mit einem $p < 5\,\%$ wird als gesicherte Abweichung gegenüber der Zufallsverteilung angesehen (in Tab. 8 Defizit mit –, Überschuss mit + bezeichnet).

Inter-, Intrachromosomale Reunionen, Beeinflussung des Reunionssystems und Interchromosomale Reunionsfrequenz zwischen homologen Chromosomen: Brüche im Sinne der – nach der Bruch-Reunions-Hypothese – postulierten Primärläsionen bleiben nur eine beschränkte Zeit existenzfähig, ehe die Bruchflächen entweder zu einer Wiedervereinigung unter Wiederherstellung der Ausgangsstruktur durch Reparatur der Primärläsionen (= Restitution, Darlington und Upcott, 1941) oder zu einer Wiedervereinigung in neuer Ordnung unter Bildung von inter- und intrachromosomalen Strukturumbauten (= Reunion, Rieger, 1966) kommen. Ein kleiner Teil von Primärläsionen bleibt meistens unter Stabilisierung der Bruchflächen als Diskontinuität erhalten (Rieger und Michaelis, 1967) und führt in der Folge zu den leicht diagnostizierbaren terminalen Deletionen oder Defizienzen (B′, B″, Iso-B′ ohne SU im proximalen und distalen oder einem der beiden Fragmente). Nach der Austauschhypothese (Revell, 1959) erfolgt Restitution vor der postulierten Austauscheinleitung, Reunion und – im Fall von terminalen Deletionen – Stabilisierung von Bruchflächen dagegen zwischen Austauscheinleitung und dem eigentlichen Austauschprozess. Das quantitative gegenseitige Verhältnis der Chromatidenumbauten zwischen verschiedenen Chromosomen (= interchromosomale Aberrationen) und innerhalb des Chromosoms (= intrachromosomale Aberrationen) kann einen ungefähren Anhaltspunkt geben, ob die Wechselwirkung zwischen den induzierten Primarläsionen auf der Basis von Reunionen rein zufallsmässig erfolgt oder nicht. In Analogie zu Überlegungen von Sax (1940) kann die theoretische Erwartung inter- und intrachromosomaler Umbauten bei zufallsgemässer Kooperation zweier Primärläsionen für Zellen von *Vicia faba* wie folgt abgeschätzt werden: *Vicia faba*, 2 n = 12 Chromosomen enthält 14 Paare von Chromatidenarmen (4 Paare der metazentrischen M-Chromosomen und 10 Paare der akrozentrischen S-Chromosomen). Eine Primärläsion in einem Paar dieser Chromatidenarme kann theoretisch mit jeder verfügbaren Läsion in jedem der anderen Paare von Chromatidenarmen in Reunion treten unter Bildung einer Chromatidentranslokation (= interchromosomaler Aberrationstyp). Zur Entstehung eines intrachromosomalen Strukturumbaus ist eine gleichzeitig verfügbare Läsion im gleichen Paar von S-Chromatiden-Armen sowie im Fall der M-Chromosomen im

gleichen oder andern Paar von Chromatidenarmen innerhalb des Chromosoms (M_1- oder M_2-Arm) nötig. Bei gleicher Chance für jedes Paar von Chromatidenarmen je 1 Primärläsion zu tragen und zufallsmässiger Kooperation zweier Läsionen ist die Wahrscheinlichkeit zur Bildung eines intrachromosomalen Umbaus im selben Arm 13mal geringer und diejenige zwischen den 2 Armen des M-Chromosoms 12mal geringer als die Wahrscheinlichkeit zur Bildung eines interchromosomalen Umbaus zwischen verschiedenen Chromosomen. Die theoretischen Häufigkeiten des Verhältnisses interchromosomaler zu intrachromosomalen Reunionen dürften deshalb bei 12–13:1 liegen. Die Verhältniszahlen für peroxyd- und röntgenstrahleninduzierte (Revell, 1959) chromosomale Strukturumbauten mit 2 beteiligten Bruch- und Reunionsereignissen (Tab. 6: Reunionsverhältnis interchromosomal zu intrachromosomal, bezogen auf interchromosomale Reunionen = 1) zeigen eine deutliche Bevorzugung intrachromosomaler Reunionen, ein Hinweis, dass die Wechselwirkung zwischen Primärläsionen nicht zufallsgemäss erfolgt. Da Primärläsionen nur innerhalb eines ausdehnungsmässig begrenzten Volumens, des sog. «site» wechselwirkungsfähig sind (Wolff, 1959), ist für Chromatidtypaberrationen anzunehmen, dass das relativ viel seltener auftretende Ereignis zweier Läsionen in Schwesterchromatiden aufgrund enger zugeordneter räumlicher Lage grössere Chance zur Kooperation (Reunion) hat als zwei Läsionen auf Nichtschwesterchromatiden, die häufiger ausserhalb des «site» liegen und deshalb vermehrt zur Ausgangslage restituieren. Die idealeren Raumverhältnisse müssen damit notwendigerweise die Entstehung intrachromosomaler Umbautypen begünstigen. Die recht gut übereinstimmenden Verhältniswerte nach chemischer (DHMP) und physikalischer (Röntgenstrahlen) Aberrationsinduktion (Tab. 6) deuten darauf hin, dass die Kooperationsdistanz der Primärläsionen für beide Induktionsarten bei *Vicia faba* dieselbe bleibt. Nach Atwood (1963) beträgt sie zirka 0,1 μ. Neben dem Raumfaktor hängt die Aberrationsentstehung zweier Läsionen auch vom Zeitfaktor ab, das heisst der Zeit, während der die Läsionen wechselwirkungsfähig bleiben; sie beträgt für *Vicia faba* bis mehrere Stunden (Wolff, 1954; Michaelis et al., 1965). Für peroxydinduzierte Brüche könnte sie sehr wohl im Bereich mehrerer Stunden liegen, zumal die meisten Läsionen in der DNS-Synthese-Phase induziert werden und nach Dewey und Humphrey (1964) Chromosomenläsionen beim Chinesischen Hamster während der gesamten S-Phase wechselwirkungsfähig sein sollen.

Eine Bestimmung des Anteils Brüche, die zu ihrer Entstehung das Reunionssystem nicht benötigen bzw. benötigen, gibt Hinweise einer agensspezifischen Beeinflussung des Reunionssystems (Bailey und Wolff, 1964). Das zu diesem Zweck bestimmte Verhältnis von Aberrationen mit Brüchen, die inter- oder intrachromosomal reuniert haben bzw. keine Reunionen eingegangen sind (offene Brüche/Aberrationstypen mit Reunionen) zeigt nach Peroxydbehandlung im Gegensatz zur Röntgenstrahlenwirkung (Revell, 1959) deutlich verminderte Reunionsbereitschaft (Tab. 6). DHMP induziert offensichtlich eine sehr viel stärkere Hemmung des Reunionssystems als Röntgenstrahlen.

Einer weiteren Charakterisierung des Reunionssystems dient der Anteil von Translokationsereignissen zwischen homologen bzw. heterologen Chromosomen. Die erwartete Zufallsverteilung der Chromatidentranslokationsfrequenz zwischen homologen und heterologen Chromosomen kann nach Evans und Bigger (1961) folgendermassen abgeschätzt werden: Unter Annahme eines einzigen Austausches

Tabelle 6

Inter-, intrachromosomale Reunionen, Beeinflussung des Reunionssystems und interchromosomale Reunionsfrequenz zwischen den homologen M-Chromosomen; Wirkung von DHMP und energiereichen Strahlen im Vergleich

	Reunionsverhältnis interchromosaler (T′) zu intrachromosomaler (Iso-B′ mit SU, DD) Aberrationen[1]	Reunionsverhältnis offener Brüche (B′, Iso-B′ ohne SU) zu Aberrationen mit Reunionen (T′, Iso-B′ mit SU, DD)[1]	Reunionsfrequenz (T′) zwischen den homologen M-Chromosomen (%)	χ^2	p
DHMP (4 mM) Brüche aus Zellen der S-Phase	1:1,1	1:4,0	erwartet: 1,1 beob.: 3,4[2]	7,3	<0,01
DHMP (4 mM) Brüche aus Zellen der späten G_1-Phase	1:0,6	1:0,8			
Energiereiche Strahlen	1:1,3 Röntgenstrahlen 50 rad (Revell, 1959)	1:9,6	erwartet: 1,1 beob.: 5,7[2] ^{60}Co-Gammastrahlen, 51–147 rad (Evans, 1961)	97,9	<0,01

[1] Intrachromosomale Aberrationen vom Typus interkalarer perizentrischer Deletionen mit zentrischen Ringchromatiden, entstanden durch Reunion von 2 Primärläsionen auf dem M_1- bzw. M_2-Arm des M-Chromosoms, konnten nie beobachtet werden.

[2] Signifikanz für $p<0{,}01$

zwischen 2 Chromatiden von *Vicia faba* (2 n = 12 Chromosomen) ergeben sich bei Behandlung der M_1- und M_2-Arme der M-Chromosomen als separate Chromosomenteile 28 Chromatiden mit $2^{28} = 378$ möglichen Kombinationen von Chromatidenpaaren. Von diesen sind 14 intrachromosomale Aberrationen vom Typus der Iso-B′ mit SU, so dass noch 364 mögliche Kombinationen von Chromatidenpaaren für interchromosomale Aberrationen vom Typus der T′ zur Verfügung stehen. Davon sind bei gleicher Reunionswahrscheinlichkeit aller Chromatiden 28, das heisst 7,69 % Paare von Homologen. Da nur die M-Chromosomen eindeutig als Homologe identifizierbar sind, kommen nur noch 4, das heisst 1,1 % Paare von Homologen in Frage. Bei gleicher Wahrscheinlichkeit aller Chromatiden, mit irgendeinem andern Chromatid zu reunieren, sind somit in 2 n-Zellen mit 1 oder mehreren Chromatidentranslokationen pro Zelle 7,69 % T′ zwischen Chromatiden homologer Chromosomen und im speziellen 1,1 % T′ zwischen Chromatiden der homologen M-Chromosomen zu erwarten. Nach Peroxydbehandlung sind 3,4 % der T′ das Resultat interchromosomaler Reunionsereignisse zwischen dem homologen M-Chromosomen-Paar (Tab. 6). Dieser Wert liegt statistisch gesichert deutlich über dem geschätzten Erwartungswert (bei Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 1$ % für das berechnete χ^2). Die verglichenen energiereichen Strahlen induzieren mit einer noch ausgeprägteren Bevorzugung T′ zwischen homologen M-Chromosomen-Paaren (Tab. 6). Ähnliche Verhältnisse gelten nach Anwendung vieler anderer Mutagene, so bei *Vicia faba* nach Aberrationsinduktion mit Mitomycin C (Rao und Natarajan, 1967),

Maleinsäurehydrazid (McLeish, 1953; Revell, 1953), Anaerobiose bzw. Äthylalkohol (Michaelis und Rieger, 1958), Di-(2,3-Epoxypropyl-)Äther (Revell, 1953), Methyl- und Äthylmethansulfonat sowie Chloräthylmethansulfonat (Rao und Natarajan, 1967) und bei menschlichen Leukozyten nach Aberrationsinduktion mit Mitomycin C (Shaw und Cohen, 1965). Vermutlich ist die starke Bevorzugung von Reunionen zwischen homologen Chromosomen ein Charakteristikum der chromosomenmutagenen Wirkung ganz allgemein. Wie im Fall der begünstigten Induktion intrachromosomaler Aberrationen könnte auch diese Aberrationseigenschaft durch räumlich enger benachbarte Lage der homologen wie der heterologen Interphasechromosomen zustande kommen, indem die Primärläsionen dadurch grössere Chance haben, innerhalb des wechselwirkungsfähigen «site»-Bereichs zu liegen (Wolff und Atwood, 1954; Wolff, 1959). Gleichgültig, was für ein Mutagen zur Anwendung kommt, immer müsste diese unterschiedliche Lage homologer und heterologer Chromosomen zu einer Begünstigung von Reunionen zwischen homologen Chromosomen führen. Für das M-Chromosomen-Paar werden die postulierten engeren Raumverhältnisse in der Interphase mit der Nukleolenbildung in Zusammenhang gebracht (Michaelis und Rieger, 1958).

Verteilung der Brüche über das Genom: Eine nicht zufallsgemässe Aberrationsverteilung kann zwischen den Chromosomen oder Chromosomengruppen des Chromosomensatzes (= interchromosomale Aberrationsverteilung) und/oder innerhalb der Chromosomen oder Chromosomengruppen (= intrachromosomale Aberrationsverteilung) vorliegen, wobei sich der erste Fall in einer nicht längenproportionalen Aberrationsverteilung zwischen den Chromosomen oder Chromosomengruppen, der zweite Fall in einer nicht längenproportionalen Aberrationsverteilung innerhalb der Chromosomen oder Chromosomengruppen ausdrückt (Rieger und Michaelis, 1962). Eine längenproportionale Verteilung der Aberrationen zwischen den leicht unterscheidbaren M- und allen S-Chromosomen von *Vicia faba* schliesst eine Aberrationshäufung in den M_1- oder M_2-Armen der beiden M-Chromosomen bzw. eine ebensolche in einzelnen S-Chromosomen, das heisst in unserem Fall den Gruppen (Sa, Sb, Sc) oder (Sd, Se) nicht aus und umgekehrt, so dass zur Erfassung einer eventuell präferentiellen interchromosomalen Bruchauslösung die Aberrationsfrequenzen aller eindeutig unterscheidbaren Chromosomen oder Chromosomengruppen, das heisst die M_1- und M_2-Arme der M-Chromosomen sowie die beiden Chromosomengruppen (Sa, Sb, Sc) und (Sd, Se) mit den Erwartungswerten bei zufallsgemässer, längenproportionaler Aberrationsverteilung verglichen werden müssen. Eine dem Erwartungswert entsprechende oder gewisse Chromosomen oder Chromosomengruppen bevorzugende interchromosomale Aberrationsverteilung gibt ihrerseits keine Anhaltspunkte über die intrachromosomale Aberrationshäufigkeit in verschiedenen Chromosomenregionen (Rieger und Michaelis, 1958). Aus diesen Gründen kann nur eine möglichst genau ermittelte inter- und intrachromosomale Aberrationsverteilung in allen einwandfrei unterscheidbaren Chromosomen bzw. Chromosomengruppen die Frage nach einer präferentiellen Bruchauslösung durch das Testagens klären. *Die interchromosomale Verteilung* induzierter Aberrationen kann bei *Vicia faba* dadurch überprüft werden, dass die Aberrationsfrequenzen der beiden M- oder Satellitenchromosomen einerseits und der 10 akrozentrischen S-Chromosomen andererseits erfasst und zur Gesamtmetaphasenlänge der 2 M- und 10 S-Chromosomen in Beziehung gesetzt werden (Michaelis und Rieger, 1958; Rieger und Michaelis,

1959b). Da das relative Längenverhältnis der beiden M-Chromosomen und der 10 S-Chromosomen des 2-n-Chromosomen-Satzes von *Vicia faba* in der Metaphase unbehandelter und peroxydbehandelter Zellen nach meinen Messungen – in weitgehender Übereinstimmung mit entsprechenden Angaben von Brauer (1949), Revell (1953), Michaelis und Rieger (1959) sowie Rieger und Michaelis (1962) für unbehandelte Zellen von *Vicia faba* – zwischen 1:2,1 und 1:2,2 (siehe Tab. 2 und Abb. 3b) beträgt, ist bei zufallsgemässer, längenproportionaler Aberrationsverteilung zwischen den beiden Chromosomengruppen M und S das gleiche Verhältnis von ungefähr 1:2,2 zu erwarten. Wie Tabelle 7 zeigt, liegt das Verhältnis für DHMP-induzierte Aberrationen in S-Zellen bei 1:4,7 sowie für Aberrationen in späten G_1-Zellen bei 1:3,9, während das entsprechende Verhältnis für ^{60}Co-Gammastrahlen-induzierte Aberrationen nach Evans und Bigger (1961) 1:3,7 beträgt. Die Differenz vom erwarteten Wert ist nach dem χ^2-Test bei $p < 0{,}01$ für peroxydinduzierte Brüche der S-Phase und die verglichenen strahleninduzierten Brüche statistisch gesichert. Da zudem das ermittelte Längenverhältnis für behandelte Chromosomen kaum von demjenigen unbehandelter Chromosomen abweicht (siehe Tab. 2), ist eine Vortäuschung der nicht längenproportionalen Aberrationsverteilung über die Chromosomengruppen M und S durch differentielle Kontraktion der M- bzw. S-Chromosomen auszuschliessen.

Tabelle 7

Interchromosomale Aberrationsverteilung zwischen den M- und S-Chromosomen; Wirkung von DHMP und energiereichen Strahlen im Vergleich

		Bruchverteilung auf die Chromosomentypen M und S (M:S-Verhältnis)					
		Summe der Brüche	Brüche in M-Chromosomen	Brüche in S-Chromosomen	Bruchverhältnis M:S	χ^2	p
DHMP (4 mM)							
	erwartet		23,2	50,8	1:2,2		
S-Phase		74				8,9	<0,01
	beobachtet		13	61	1:4,7[1]		
DHMP (4 mM)							
	erwartet		15,3	33,7	1:2,2		
späte G_1-Phase		49				3,7	>0,01 <0,07
	beobachtet		10	39	1:3,9		
^{60}Co-Gammastrahlen (120 rad)[2]	erwartet		126	274	1:2,2		
		400				25,4	<0,01
	beobachtet		86	314	1:3,7[1]		

[1] Signifikanz für p<0,01
[2] Nach Evans und Bigger (1961)

Die präferentielle interchromosale Bruchverteilung basiert nach DHMP-Behandlung auf einer statistisch signifikanten Bevorzugung der Chromosomengruppe (Sa,

Sb, Sc) sowie nach Bestrahlung mit ^{60}Co-Gammastrahlen (Evans und Bigger, 1961) auf einer statistisch signifikanten Bevorzugung der Chromosomengruppe (Sd, Se) bei gleichzeitig vorliegendem Defizit in den M_2-Armen der M-Chromosomen (Tab. 8). Die eindeutig nicht längenproportionale interchromosomale Aberrationsverteilung nach Peroxydbehandlung (Tab. 7 und 8) kann wie für viele andere chemische Mutagene (McLeish, 1953; Michaelis und Rieger, 1958; Natarajan und Upadhya, 1964; Scott und Evans, 1964; Michaelis et al., 1965) und energiereiche Strahlen (Rieger und Michaelis, 1959b; Evans und Bigger, 1961; siehe auch Tab. 7 und 8) das Ergebnis einer nicht längenproportionalen Beteiligung bestimmter Chromosomenregionen am Aberrationsgeschehen sein, ist aber auch bei ungefähr gleich starker Aberrationsbeteiligung aller Chromosomenregionen möglich, so dass eine zusätzliche experimentelle Bestimmung des *intrachromosomalen Verteilungsmusters* der induzierten Aberrationen unumgänglich ist. Bei Unterteilung der Chromosomen bzw. Chromosomengruppen in je 8 Segmente zeigt sich für peroxydinduzierte und die verglichenen strahleninduzierten (Evans und Bigger, 1961) Chromatidenaberrationen eine nicht längenproportionale Verteilung in bestimmten Chromosomenregionen (Abb. 17). Da beide Versuche mit ungefähr gleich grossen methodischen Fehlern behaftet sein dürften und die Differenz der beobachteten Bruchfrequenz vom Erwartungswert bei zufallsgemässer, längenproportionaler Aberrationsverteilung für jedes Segment mit

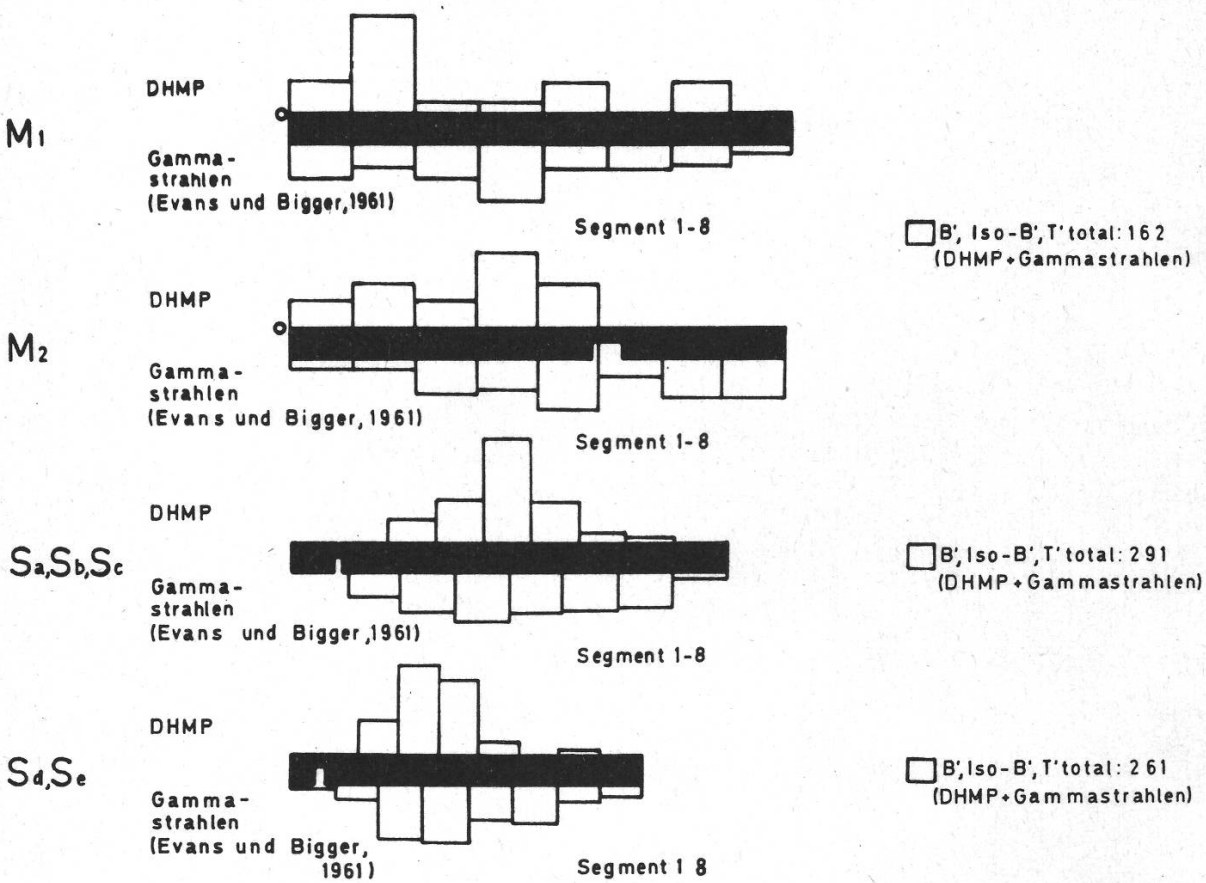


Abbildung 17

Vicia faba, intrachromosale Verteilung peroxydinduzierter Aberrationen nach Behandlung mit KCN+DHMP. Vergleich mit den Ergebnissen von Evans und Bigger (1961) nach ^{60}Co-Gammabestrahlung

dem χ^2-Test bei gleichem $p < 0{,}05$ auf Signifikanz getestet worden ist (Tab. 8), vermag der Vergleich statistisch gesicherte Übereinstimmungen und Unterschiede im intrachromosomalen Verteilungsmuster peroxyd- und strahleninduzierter Aberrationen aufzuzeigen (Tab. 8 enthält überdies die statistische Auswertung der Bruchfrequenzen zwischen den Chromosomen bzw. Chromosomengruppen).

Tabelle 8

Ergebnisse der statistischen Auswertung der Bruchfrequenzen zwischen (= interchromosale Verteilung) und innerhalb der einzelnen Chromosomen bzw. Chromosomengruppen (= intrachromosomale Verteilung): Wirkung von DHMP und energiereichen Strahlen im Vergleich

Chromosomen (-gruppe)	Behandlungsart	Metaphasenchromosomenlänge (μ)	Erwartete Frequenz aufgrund der Länge	Beobachtete Frequenz	Werte von χ^2 unter Annahme einer zufälligen Verteilung zwischen den Chromosomen (-gruppen)	Werte von χ^2 unter Annahme einer zufälligen Verteilung innerhalb der Chromosomen (-gruppen)[3] Segmente 1	2	3	4	5	6	7	8
M (M_1)	DHMP (4 mM)	10,08	20	14	3,25	0	+	0	0	0	0	0	0
	Gammastrahlen (120 rad)[1]	8,7	66	57	1,23	0	0	0	+	0	0	0	0
M (M_2)	DHMP (4 mM)	9,39	18	15	1,36	0	0	0	+	0	0	0	0
	Gammastrahlen (120 rad)[1]	8,0	61	42	5,92[2]	0	0	+	0	+	0	+	+
Sa, Sb, Sc	DHMP (4 mM)	26,52	51,2	69	11,52[2]	—	0	0	+	0	—	—	—
	Gammastrahlen (120 rad)[1]	23,1	174	160	1,53	—	0	+	+	+	+	+	—
Sd, Se	DHMP (4 mM)	14,5	28,3	30	0,20	—	0	+	+	0	—	0	—
	Gammastrahlen (120 rad)[1]	13,1	99	141	18,98[2]	—	0	+	+	+	+	0	0

[1] ^{60}Co-Gammastrahlen-Versuch nach Evans und Bigger (1961)
[2] Signifikanz für $p<0{,}05$
[3] 0 = keine signifikante Abweichung gegenüber der Erwartung $p>0{,}05$
— = signifikantes Defizit gegenüber der Erwartung $p<0{,}05$
+ = signifikanter Überschuss gegenüber der Erwartung $p<0{,}05$

Der graphische Vergleich der intrachromosomalen Verteilung peroxyd- und strahleninduzierter Aberrationen ergibt nach Abbildung 17 zusammen mit der statistischen Auswertung nach Tabelle 8 folgenden Befund:

Übereinstimmungen: Für beide Induktionsarten besteht ein bevorzugter Aberrationseintritt in medianen Bereichen der langen Arme der S-Chromosomen mit Aberrationsdefiziten im Zentromer- und Telomerbereich derselben Chromosomenarme. Die kurzen Arme der S-Chromosomen – in der Arbeit von Evans und Bigger (1961) im ersten Segmentbereich liegend – sind nach Bestrahlung frei von Brüchen; das gleiche gilt nach Peroxydbehandlung (beachte: in DHMP-Versuch nur die langen Arme der S-Chromosomen in Segmente eingeteilt).

Unterschiede: Auf den S-Chromosomen ist die peroxydinduzierte intrachromosomale Aberrationsverteilung sehr viel ausgeprägter präferentiell als die strahleninduzierte, das heisst, die beiden Gruppen von S-Chromosomen zeigen bei der ersteren extrem lokalisierte Bruchhäufungen in 1 bzw. 2 medianen Segmenten und ausgesprochene Defizite gegenüber den Erwartungswerten in proximalen und vor allem distalen Chromosomenregionen, bei der letzteren dagegen geringere Bruchhäufungen mit einer viel breiteren Verteilung über eine mediane Region von 4 bzw. 5 Segmenten und Aberrationsdefiziten nur im unmittelbaren Zentromer- und Telomerbereich. Auf dem M-Chromosom verteilt sich nach Peroxydbehandlung die dem Erwartungswert entsprechende totale Aberrationsfrequenz ungleich über die Chromosomenarme M_1 und M_2, ersichtlich an einem signifikanten Aberrationsüberschuss in 1 proximalen Segment des M_1-Arms, einem ebensolchen in 1 medianen Segment des M_2-Arms sowie am völligen Fehlen von Aberrationen auf der Satellitenregion. Nach Bestrahlung ist die totale Aberrationsfrequenz auf dem M_2-Arm des M-Chromosoms gegenüber dem Erwartungswert leicht vermindert. Die intrachromosomale Bruchlokalisation ist im Vergleich zur Peroxydwirkung weniger ausgeprägt und auf anderen Chromosomenregionen bevorzugt gehäuft, nämlich im M_1-Arm auf 1 medianen Segment und im M_2-Arm auf 2 medianen Segmenten sowie der Satellitenregion.

Da Bruch- und Reunionspunkte nicht getrennt erfasst worden sind, bleibt die Aussage auf die in der Metaphase sichtbaren Aberrationen beschränkt, ohne dass auf eine ähnliche nicht längenproportionale Verteilung der induzierten Primärläsionen im Interphasechromosom geschlossen werden könnte. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass einer bevorzugten Aberrationshäufung in bestimmten Chromosomenregionen eine zufallsgemässe Bruchpunktverteilung mit nicht zufallsgemässer Reunionsverteilung zugrunde liegt (Michaelis und Rieger, 1958). Auch bei getrennter Erfassung der Bruch- und Reunionspunkte wären allerdings Rückschlüsse auf die Verteilung der induzierten Primärläsionen aufgrund der schwer abschätzbaren Beeinflussung durch das Restitutionssystem nur sehr ungenau, weshalb ich auf diese Untersuchungsart verzichtet habe. Aus Abbildung 17 und Tabelle 8 geht eindeutig hervor, dass bei beiden Induktionsarten die interchromosomale nicht längenproportionale Aberrationsverteilung auf einer präferentiellen Aberrationssensibilität bestimmter Regionen der S-Chromosomen und in geringerem Mass auch der M-Chromosomen beruht. Nach DHMP-Behandlung ist in Analogie zu vielen chemischen Agenzien die Tendenz zur lokalisierten Bruchwirkung sehr viel eindeutiger als nach Bestrahlung. Das Verteilungsmuster der Brüche weicht von demjenigen nach Anwendung von Gamma- (Evans und Bigger, 1961), Röntgenstrahlen (Rieger und Michaelis, 1959b), Äthoxycoffein (Kihlman, 1961; Scott und Evans, 1964), Desoxyadenosin (Kihlman, 1963) und Maleinsäurehydrazid (McLeish, 1953) ab, gleicht aber demjenigen nach Anwendung von Äthylalkohol bzw. Anaerobiose (Michaelis und Rieger, 1958; Rieger und Michaelis, 1958, 1959b, 1960a, 1967), Nitrosomethylharnstoff

(Michaelis et al., 1965), Hydroxylamin (Natarajan und Upadhya, 1964) und insbesondere von alkylierenden Agenzien wie Acetyläthylenimin, Triäthylenmelamin (Ockey, 1957, 1960), Äthylmethansulfonat (Rieger und Michaelis, 1960b; Natarajan und Upadhya, 1964), Stickstofflost, Di-(2,3-Epoxypropyl-)Äther (Revell, 1953), β-Propiolacton (Swanson und Merz, 1959), Endoxan (Michaelis und Rieger, 1960) sowie Myleran (Moutschen, 1958; Michaelis und Rieger, 1960). Die bevorzugt bruchlabilen Zonen sollen nach Angaben verschiedener Autoren heterochromatischen Chromosomenabschnitten entsprechen (LaCour, 1951; McLeish, 1953; Glaess, 1956; Ockey, 1960; Evans und Bigger, 1961; Merz, 1961).

Eu- und Heterochromatin (Heitz, 1929) werden als Zustandsunterschiede, aber nicht grundsätzlich verschiedene Chromatintypen angesehen, die sich «allozyklisch» verhalten, das heisst sich in ihrem Spiralisationsgrad voneinander unterscheiden (Rieger und Michaelis, 1967). Allozyklische Chromosomen oder Chromosomensegmente können in einem bestimmten Zellzyklusstadium mehr (= positiv heteropyknotisch) oder weniger (= negativ heteropyknotisch) kompakt sein wie euzyklische, so dass sie durch unterschiedliche Färbeintensität nachweisbar werden (Rieger et al., 1968). Eine Erfassung der in der Interphase Chromozentren bildenden, positiv heteropyknotischen Chromosomenregionen ist für *Vicia faba* in Prophasechromosomen und nach Behandlung mit Oxychinolin, Hydroxychinolin (Ockey, 1960) oder Nitrosoäthylurethan (Grant und Heslot, 1966) in Metaphasechromosomen möglich, wobei nach chemischer Behandlung neben den positiv heteropyknotischen eng benachbart auch die im allgemeinen vorwiegend kälteinduzierten (LaCour, 1951) negativ heteropyknotischen Zonen gleichzeitig sichtbar werden (Ockey, 1960; Grant und Heslot, 1966). Für beide – sehr wahrscheinlich als heterochromatisch zu bezeichnenden Chromatinzustandsformen – liegt eine ähnliche Verteilung vor, nämlich auf dem M-Chromosom zu beiden Seiten des Zentromers und auf den S-Chromosomen grössere Abschnitte etwa in der Mitte der langen Arme. Daneben gibt es noch eine Reihe weiterer heterochromatischer Regionen geringeren Umfangs, die nur sehr schwer zu erkennen sind (Michaelis und Rieger, 1958; Ockey, 1960; Evans und Bigger, 1961; Grant und Heslot, 1966). Die nach Peroxydbehandlung bevorzugt an den Aberrationen beteiligten Chromosomenregionen dürften dem Verteilungsmuster des Heterochromatins auf den S-Chromosomen und dem proximalen Bereich des M_1-Arms (M-Chromosom) in etwa entsprechen, während im verglichenen Bestrahlungsversuch dies nur für die S-Chromosomen beschränkt Geltung haben könnte (Evans und Bigger, 1961). Die erwähnte Beziehung bleibt eine Vermutung, gewinnt aber an Wahrscheinlichkeit unter Berücksichtigung des folgenden autoradiographischen Befunds: Die chromosomale DNS repliziert in den meisten untersuchten pflanzlichen und tierischen Objekten asynchron, das heisst nicht gleichzeitig für alle euchromatischen Chromosomen und Chromosomenabschnitte (Taylor, 1958, 1960 und 1963; Lima-de-Faria, 1959; Pelc und LaCour, 1959; Wimber, 1961; Morishima et al., 1962) oder zumindest nicht gleichzeitig für eu- und heterochromatische Chromosomenabschnitte (Haque, 1963; Schmid, 1963; Evans, 1964; Darlington und Haque, 1966; Grant und Heslot, 1966; Lima-de-Faria und Jaworska, 1968; Schmid und Leppert, 1968; Pera, 1968; Barlow und Vosa, 1969; Citoler und Gropp, 1969). Das letztere wird insbesondere auch in Chromosomen von *Vicia faba* gefunden, deren DNS-Replikation zwar in euchromatischen Regionen in der frühen und mittleren S-Phase an mehreren Stellen gleichzeitig erfolgt (Evans, 1964), in der späten S-Phase

aber keinen autoradiographisch nachweisbaren ^{3}H-TdR-Einbau mehr zeigt und damit in der späten S-Phase im Euchromatin abgeschlossen sein dürfte (Evans, 1964; Grant und Heslot, 1966). Umgekehrt tritt zu diesem Zeitpunkt ein eng begrenztes Markierungsmuster in Chromosomenregionen auf, die ungefähr den grössten Heterochromatinblöcken entsprechen. Dieser Befund wird von Evans (1964) sowie Grant und Heslot (1966) dahingehend interpretiert, dass die DNS-Replikation von Eu- und Heterochromatin bei *Vicia faba* asynchron verläuft, das heisst Euchromatin repliziert in der frühen und mittleren S-Phase, Heterochromatin dagegen erst in der späten S-Phase. Zumindest für die grösseren Heterochromatinblöcke in medianen Bereichen der langen S-Chromosomen-Arme sowie auf beiden Seiten des Zentromers vom M-Chromosom besteht nach den genannten Autoren Identität zwischen spätreplizierendem und heterochromatischem Chromatinzustand. Bestimmung der spätreplizierenden Chromosomenregionen und Vergleich dieser Regionen mit dem intrachromosomalen Verteilungsmuster der induzierten Aberrationen klären demzufolge die Frage nach der Bruchsensibilität der grösseren Heterochromatinblöcke. In meinen Untersuchungen an *Vicia faba* hat diese Methode gegenüber dem Heterochromatinnachweis durch Kältebehandlung (z.B. Evans und Bigger, 1961) den Vorteil, dass eine Bestimmung der spätreplizierenden bzw. heterochromatischen sowie bruchsensiblen Chromosomenabschnitte an Zellen erfolgen kann, die aus ähnlichen Zyklusphasen stammen (S-Phase für Heterochromatin; S-Phase und späte G_1-Phase für peroxydinduzierte Brüche) sowie bei gleicher Temperatur und Beeinflussung durch DHMP bis zum Zeitpunkt der Fixierung im Zellzyklus proliferieren, so dass die Zyklusdauer bis zur Fixierung und damit Erfassung der Chromosomenregionen für beide Untersuchungsarten ungefähr gleich lang ist und deshalb kaum mit grösseren Verschiebungen des spätreplizierenden bzw. heterochromatischen sowie bruchsensiblen Bereichs durch differentielle Chromosomenkontraktion zu rechnen ist. Die asynchron replizierenden Chromosomenregionen einer nicht aberranten Metaphasenzelle (Abb. 18, B), die zum Zeitpunkt der Peroxydbehandlung und ^{3}H-TdR-Fütterung in später S-Phase war (Erholungszeit: 15 h; siehe Abb. 13), decken sich ungefähr mit den von Evans 1964 für unbehandelte Chromosomen (^{3}H-TdR allein) gefundenen spätreplizierenden Regionen. Zweifellos handelt es sich deshalb beim asynchronen Replikationsmuster nach Abb. 18 (B) um spätreplizierende bzw. heterochromatische Chromosomenregionen. Eine durch Ausmessung ermittelte Lokalisierung dieser spätreplizierenden Abschnitte dürfte in den vorliegenden autoradiographischen Versuchen aufgrund der beträchtlichen Korngrösse und -streuung der Markierung kaum wesentlich exakter sein als eine bloss visuelle Abschätzung der Markierungslage (proximale, mediane oder distale Chromosomenregionen). Ein Vergleich mit der intrachromosomalen Bruchverteilung nach Peroxydbehandlung (Abb. 17) zeigt, dass sich die spätreplizierenden Regionen in etwa mit den bevorzugt aberrationssensiblen Regionen decken, mit Ausnahme der proximalen spätreplizierenden Zonen auf dem M_2-Arm (M-Chromosom), wo keine erhöhte Aberrationssensibilität nachgewiesen werden konnte. Es ergeben sich somit für DHMP – in Übereinstimmung mit sehr vielen chemischen, insbesondere alkylierenden Agenzien (Revell, 1953; Swanson und Merz, 1959; Michaelis und Rieger, 1960 und 1963; Ockey, 1960; Natarajan und Upadhya, 1964; Evans und Scott, 1969) – deutliche Hinweise auf eine bevorzugte Bruchinduktion in heterochromatischen Zonen oder in deren Nachbarschaft; dies gilt vor allem für die häufiger am Bruchgeschehen

beteiligten S-Chromosomen (Abb. 18, A und B). Bei Anwendung energiereicher Strahlen (Evans und Bigger, 1961; siehe Abb. 17) folgt die Aberrationsverteilung

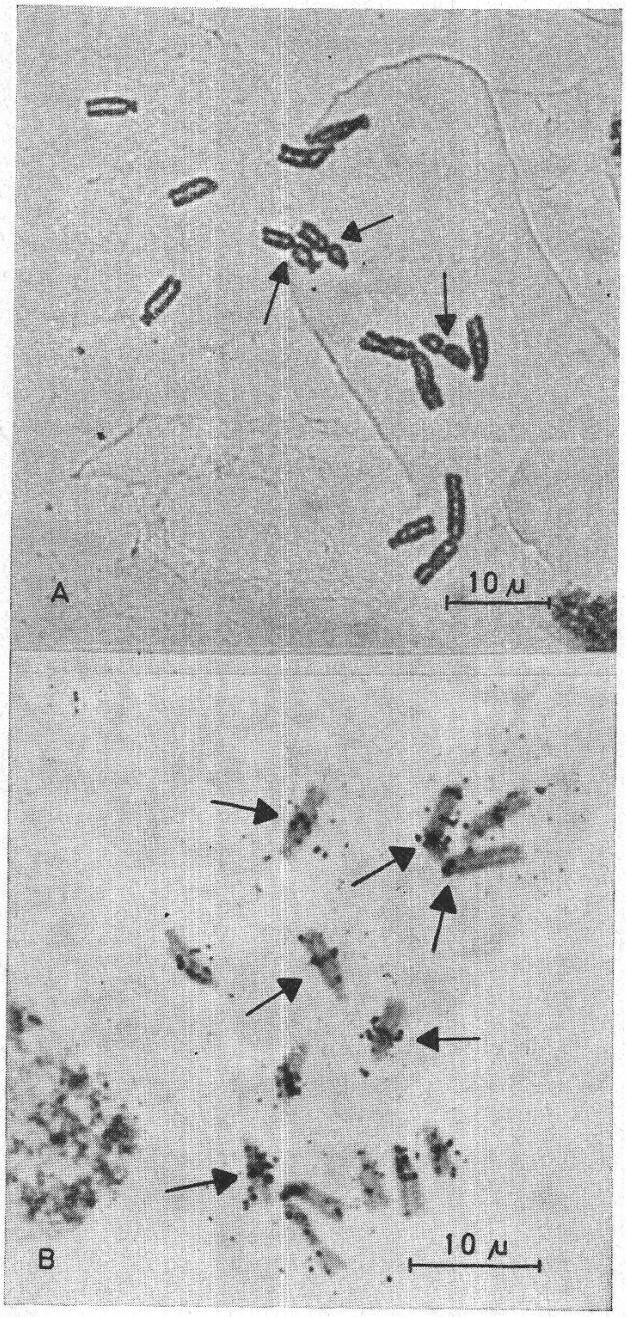


Abbildung 18

Metaphasen von *Vicia faba* (2 n = 12) mit peroxydinduzierten Aberrationen bzw. spätreplizierenden Chromosomenregionen nach Behandlung mit KCN+DHMP bzw. KCN+DHMP+^{3}H-TdR

A: Metaphase mit drei ungefähr medianen Isochromatidendeletionen mit Schwesterchromatidenreunion im proximalen und distalen Fragment (→)

B: Autoradiographie einer Metaphase mit asynchronem Replikationsmuster bei Markierung mit ^{3}H-TdR in der späten S-Phase. Die Markierung beschränkt sich in den meisten S-Chromosomen auf ungefähr mediane Zonen des langen Arms und in den M-Chromosomen auf proximale Zonen des M_1- und M_2-Arms (→). Diese Zonen entsprechen Heterochromatinblöcken (Evans, 1964; Grant und Heslot, 1966)

weniger streng dem spätreplizierenden Replikationsmuster nach Abbildung 18 (B) bzw. der Heterochromatinverteilung oder deren Nachbarschaftsbereichen.

III. Chromosomenmutagene Wirkung bei Ascitestumoren der Maus

1. Einleitung

Versuchsansatz: Zirka 4 Tage nach Implantation des Tumors (siehe Kapitel Material, Methode und Terminologie) wurde den Tieren eine einzelne Injektion von 20 mg DHMP/kg Körpergewicht (0,4 mg DHMP/Maus) in wässeriger Lösung i.p. injiziert. 1 h vor Tötung der Tiere nach den Zeitabständen 2, 6, 12, 24, 36 und 48 h wurden sie mit 1 ml 0,01prozentiger Colcemidlösung (Ciba, Basel) zwecks Metaphasenanreicherung behandelt. Dasselbe galt für die Kontrolle (keine DHMP-Behandlung). Pro Versuchsbedingung wurden 3 Tiere eingesetzt. Nach Abtötung der Tiere erfolgte sofort die Fixierung und Weiterverarbeitung zu zytologischen Präparaten. Anhand von total 653 Aberrationen wurden zeichnerisch die einzelnen Aberrationstypen B′, Iso-B′ ohne SU, T′ (inkl. Triradial und DD) in den verschiedenen Zeitabständen nach Behandlungsbeginn sowie im Kontrollversuch erfasst und in die Bruch- und Reunionspunkte zerlegt, die den chromosomalen Strukturveränderungen zugrunde liegen. Iso-B′ mit SU wurden nicht analysiert, da dieser Aberrationstyp nicht von kurzen telozentrischen Chromosomen sowie den Stamm A charakterisierenden aberranten m-Markierungschromosomen des Normalkaryogramms (Rutishauser, 1963) eindeutig unterschieden werden kann. Die gefundenen Frequenzen der Aberrationen total, einzelner Aberrationstypen sowie der Bruch- und Reunionsereignisse wurden auf je 100 Ehrlich-*Ascites*carcinom-Zellen (= EAC-Zellen) bezogen.

Das Vermögen zur Aberrationsinduktion physikalischer und chemischer Agenzien variiert nicht nur zelltypspezifisch (Sax und Swanson, 1941) und stadienspezifisch im Mitosezyklus (Evans und Savage, 1963; Evans und Scott, 1964) innerhalb einer Spezies, sondern auch stark objektspezifisch zwischen verschiedenen Spezies (Rieger und Michaelis, 1967). Eine Abklärung der Frage, ob die Aberrationsinduktion durch das organische Peroxyd DHMP auf die getesteten *Vicia*-Zellen als Vertreter pflanzlicher Zellen beschränkt bleibt oder auch in einem grundsätzlich verschiedenen Objekt wie den gewählten tierischen Zellen von Ehrlich-*Ascites*tumoren der Maus erfolgen kann, gibt grobe Hinweise auf eine eng objektspezifische oder einigermassen objektunspezifische Fähigkeit zur Aberrationsinduktion. Die Wahl von EAC-Zellen als tierisches Testsystem erscheint deshalb besonders günstig, weil diese Zellen zytogenetisch gut durchanalysiert sind und als einige der wenigen tierischen Zellen bei In-vivo-Behandlung eine zytologische Erfassung der induzierten Aberrationen noch im gleichen Mitosezyklus erlauben und damit wie bei den meisten pflanzlichen Objekten den Nachweis aller möglichen Aberrationstypen gewährleisten (Rieger und Michaelis, 1967). In Anlehnung an einen Versuch von Michaelis et al. (1965) mit Nitrosomethylharnstoff an den beiden Testsystemen *Vicia faba* und *Ascites*tumoren der Maus habe ich die – an Wurzelmeristemzellen von *Vicia faba* genauer ermittelte – chromosomenmutagene Wirkung von DHMP ebenfalls an *Ascites*tumorzellen der Maus überprüft.

2. *Chromosomenbrüche nach DHMP-Behandlung*

Eine zweifelsfreie Analyse induzierter Aberrationen setzt die genaue Kenntnis des Normalkaryogramms sowie der Spontanmutationsrate in bezug auf Chromosomenaberrationen voraus. Tumorzellen sind zytologisch vor allem charakterisiert durch eine zwischenzellige Variation in der Chromosomenzahl und durch Aberrationen, das heisst Chromosomen, die strukturell von den entsprechenden Chromosomen gesunder Zellen abweichen; so unterscheiden sich auch die Zellen von Ehrlich-*Ascites*carcinom-Stämmen der Maus zytogenetisch beträchtlich von Zellen aus normalem Mausgewebe, indem die Tumorzellen grosse intraindividuelle Variation der Chromosomenzahlen zeigen mit Mittelwerten (= «stemline-number» oder s-Zahl), die nie der für die Maus typischen somatischen Chromosomenzahl entsprechen. Zudem besteht eine durch Chromosomenmutationen entstandene, zytologisch leicht erfassbare strukturelle Variation bestimmter Chromosomen (sog. Markierungschromosomen), deren Zahl je nach Stamm unterschiedlich sein kann (Rutishauser, 1963). Numerische und strukturelle Variation der Chromosomen sind somit Charakteristika jedes EAC-Stammes. Für die in meinen Versuchen verwendete hyperdiploide Form des EAC, nach Rutishauser (1963) als Stamm A bezeichnet, gilt folgende Karyotypbeschreibung:

Chromosomenzahl: Der Stamm A stellt eine heterogene Zellpopulation dar, bestehend aus Zellen verschiedener chromosomaler Zusammensetzung. Die am häufigsten gefundene Chromosomenzahl (= s-Zahl) ist gegenüber der somatischen Chromosomenzahl der Maus 2 n = 40 hyperdiploid, nämlich zirka 30 % s-Zellen mit einer mittleren Chromosomenzahl von 45/46. Dieser Wert entspricht den von Bayreuther (1952) und Rutishauser (1963) gemachten Angaben. Der relativ niedrige Prozentsatz von s-Zellen weist auf eine grosse Variationsbreite aneuploider Plus- und Minusabweicher.

Chromosomenmorphologie: Die meisten Chromosomen des hyperdiploiden EAC, Stamm A, entsprechen der für gesundes Mausgewebe typischen telozentrischen Chromosomenstruktur, das heisst terminaler Lage des Zentromers. Einige wenige strukturell abweichende Chromosomentypen «markieren» den Stamm. In Übereinstimmung mit Angaben von Rutishauser (1963) habe ich im Stamm A folgende 3 Typen von Markierungschromosomen gefunden:

Chromosom A: telozentrisches Chromosom, charakterisiert durch eine grosse sekundäre Einschnürung (1mal);

Chromosom D: akrozentrisches Chromosom mit subterminaler Lage des Zentromers (1mal);

«minute»-Chromosom (m): Chromosom, das kürzer als das kürzeste telozentrische Chromosom des normalen Maussatzes ist (1 bis mehrere).

Der Mitoseindex der EAC-Stämme scheint grösseren Schwankungen zu unterliegen; so fanden Edwards et al. 1960 zirka 3 %, Rutishauser und Bollag 1967 dagegen bloss Werte um 1–2 %. Die Spontanmutationsrate – gemessen an der Aberrationsfrequenz im Kontrollversuch – beträgt rund 12 % (Abb. 19 und Tab. 9) und wird ausschliesslich durch freie Chromatidbrüche (B′), aber nie Iso-B′ ohne SU und durch Reunionen entstandene Strukturumbauten bestimmt. *Ascites*tumoren stellen offensichtlich ein sehr sensibles Testsystem dar, das bereits unter natürlichen Bedingungen in vivo eine recht hohe Zahl von chromosomalen Abweichungen toleriert (Rutis-

hauser, 1963). Nach Behandlung mit DHMP ist am *Ascites*tumor neben der von Weitzel et al. 1961 beschriebenen – gemessen an der Senkung der Zellzahl pro ml *Ascites* – stark zytostatischen Wirkung im eigenen Versuch eine ausgeprägte chromosomenmutagene Wirkung festzustellen (Abb. 19 und Tab. 9). Zur Verhinderung des enzymatischen Abbaus von DHMP und damit der Erhaltung der applizierten Substanz als aktives, zur Aberrationsentstehung führendes Mutagen (siehe Kapitel II, 1) war in den *Vicia*-Versuchen eine Peroxydasehemmung nötig, nicht aber im EAC-

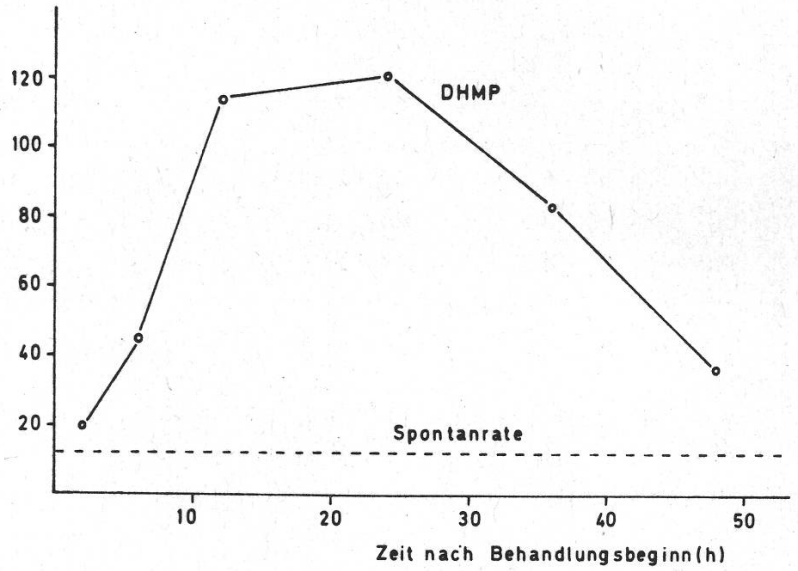


Abbildung 19

Ehrlich-*Ascites*carcinom (EAC), Stamm A, Chromosomenaberrationsfrequenz (B′, Iso-B′, T′) zu verschiedenen Zeitabständen nach Beginn der DHMP-Behandlung. Ordinate: Aberrationen auf 100 EAC-Zellen

Tabelle 9

Ehrlich-*Ascites*carcinom, Stamm A, Chromosomenaberrationsfrequenz zu verschiedenen Zeitabständen nach Beginn der DHMP-Behandlung

Dosis mg/kg	Zeit h	Aberrationen auf 100 Zellen B′, Iso-B′, T′	B′, Iso-B′	T′	Chromatidbrüche total aus B′, Iso-B′, T′)	Reunionen total (aus T′)
20	2	20,0	20,0	0,0	20,0	0,0
20	6	44,8	44,8	0,0	44,8	0,0
20	12	113,3	32,6	80,6	248,0	155,0
20	24	119,7	34,2	85,5	220,0	139,0
20	36	82,8	28,8	54,0	150,0	87,0
20	48	35,4	22,7	12,7	57,0	24,0
Kontrolle		12,0	12,0	0,0	12,0	0,0

Ergänzung: Reunionsverhältnis offener Brüche (B′, Iso-B′ ohne SU) zu Aberrationen mit Reunionen (T′):
1:2,2 für EAC
1:1,8 für *Vicia faba* (inkl. intrachromosomaler Reunionen siehe Tab. 6)

Versuch. Alleinige Injektion von DHMP genügt zur Induktion eines vielfältigen Umbaus des Erbmaterials der Tumorzelle (Beispiele für einige Aberrationstypen siehe Abb. 20). Ein peroxydatischer Abbau von DHMP durch eine aktive Peroxydase erscheint deshalb unwahrscheinlich, so dass unter zusätzlicher Berücksichtigung der von Weitzel et al. 1961 gefundenen Katalaseresistenz – in bezug auf peroxydatischen Abbau von DHMP (in vitro) – das Testagens vermutlich auch hier in der applizierten Form oder höchstens als Umbauprodukt zur Wirkung kommt.

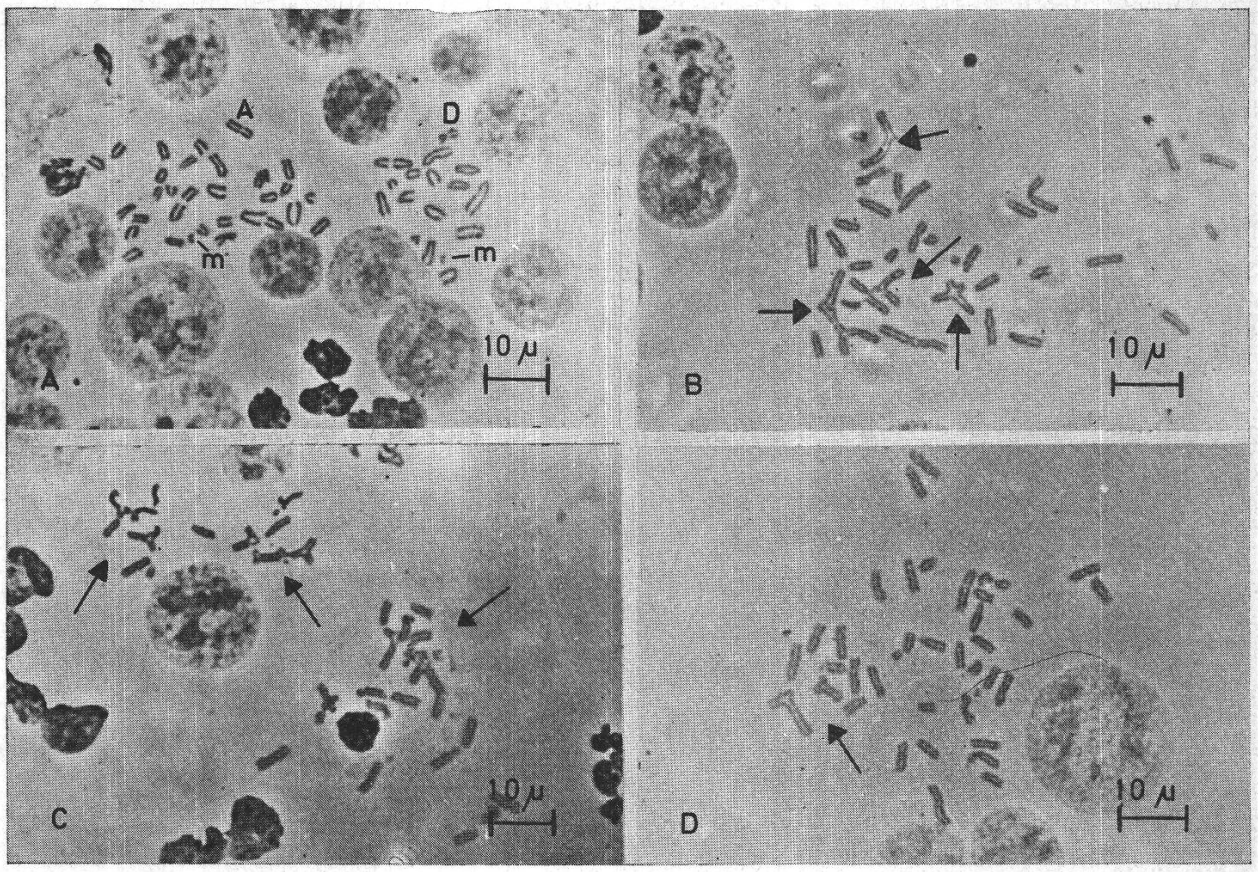


Abbildung 20

Metaphasen vom Ehrlich-*Ascites*carcinom, Stamm A, mit Chromatidtypaberrationen nach DHMP-Behandlung

A: Metaphase, Normalkaryotyp, Zelle mit 49 Chromosomen mit den Markierungschromosomen A, D, m

B, C, D: Metaphasen mit verschiedenen vollständigen und unvollständigen Chromatidentranslokationen (→)

Nach Tabelle 9 und Abbildung 19 treten 2 bis 48 h nach Behandlungsbeginn zum Teil ausserordentlich viele Chromosomenaberrationen auf, die wie bei *Vicia faba* praktisch ausschliesslich auf chromatidaler Basis entstanden sind, nämlich B′, Iso-B′ ohne SU und T′ (inkl. Triradial und DD), daneben in geringerer Zahl – etwa im Verhältnis 1:10 zu den echten Chromosomenaberrationen – sogenannte «gaps», die nicht als echte Chromatidbrüche mitgezählt worden sind. Die Iso-B′ ohne SU für grössere Zeitabstände vom Behandlungsbeginn bis zur zytologischen Erfassung können wie bei den bereits geschilderten *Vicia*-Versuchen (siehe Kapitel II, 5, b)

im Sinne von Chromatid- oder aber Chromosomentypaberrationen (B″) gedeutet werden. Da diese Iso-B′ ohne SU im Vergleich zu den eindeutigen Chromatidtypaberrationen äusserst selten auftreten, geben sie keinen Anlass, die bevorzugte Aberrationsinduktion nicht in der Einzelchromatide zu sehen. Auffallend ist die hohe Rate von T′ (Tab. 9) mit zumeist 2, in einigen Fällen mehr als 2 beteiligten Chromosomen. Bei Auflösung der Strukturumbauten in Bruch- und Reunionspunkte (Chromatidbrüche aus B′, Iso-B′, T′; Reunionen aus T′) und Ermittlung des Reunionsverhältnisses offener Brüche zu Aberrationen mit Reunionen ergibt sich im Vergleich zum entsprechenden Verhältnis bei *Vicia faba* (ohne Berücksichtigung der intrachromosomalen Reunionen) eine etwa gleich hohe Reunionsbereitschaft der induzierten Brüche (Tab. 9), was auf eine ungefähr gleich starke Hemmung des Reunionssystems in beiden Testsystemen schliessen lässt (siehe auch Kapitel II, 5, d). Im Vergleich zu *Vicia faba* werden pro Zelle mehr Aberrationen induziert, treten doch in jeder Zelle maximal 1,2 Aberrationen auf (24 h nach Behandlungsbeginn) gegenüber 0,66 Aberrationen für *Vicia faba* (12 h nach Behandlungsbeginn). Die bei EAC erhöhte Aberrationssensibilität pro Zelle dürfte auf der im Vergleich zu *Vicia faba* zirka 4mal höheren Chromosomenzahl mit einem wahrscheinlich grösseren totalen DNS-Gehalt pro Zelle beruhen. Unter Bezug der Aberrationsraten von *Vicia faba* und EAC auf identische DNS-Mengen wäre die Aberrationssensibilität im EAC vermutlich stark vermindert und möglicherweise sogar geringer als im *Vicia*-System. Der für *Vicia faba* genauer ermittelte Zeitpunkt der Aberrationsinduktion im Mitosezyklus lässt sich mangels autoradiographischer Versuche im EAC nur ungenau festlegen. Nach Abbildung 19 werden die ersten Aberrationen 2 h nach Behandlungsbeginn nachweisbar, zeigen die grösste Häufung zwischen 10 und 30 h und treten nach zirka 48 h nur noch vereinzelt in Erscheinung. Ein Vergleich mit der Mitosezyklusdauer von EAC-Zellen in vivo, nämlich T = 16–18 h nach Rutishauser und Bollag (1967) sowie T = 18 h, G_1 = 3 h, S = 8,4 h, G_2 = 1,5 h (!) und M = 5,1 h nach Edwards et al. (1960), vermag die Frage nach den bevorzugt aberrationssensiblen Phasenabschnitten der Interphase nicht zu klären, denn nach DHMP-Behandlung ist wie bei *Vicia faba* mit einer drastischen Verlängerung der Zyklusdauer sowie phasenabhängig unterschiedlichen Verzögerungen der Zellproliferation zu rechnen. Immerhin weist das praktisch ausschliessliche Auftreten von Chromatidtypaberrationen auf eine chromosomenmutagene Wirkung, die beschränkt bleibt auf die späte G_1-, S- und eventuell G_2-Phase. Auch eine durch das Agens eventuell verlängerte G_2-Phasen-Dauer dürfte im Vergleich zu den übrigen Phasen (späte G_1 und S) immer noch sehr kurz sein und deshalb nur unwesentlich oder überhaupt nicht an der gefundenen Aberrationsausbeute beteiligt sein. Unter Berücksichtigung (1) der Versuche an *Vicia faba*, die eine bevorzugte Aberrationsinduktion in der S- und späten G_1-Phase ergaben, (2) der von Edwards et al. 1960 beschriebenen relativ langen S-Phasen-Dauer unbehandelter EAC-Zellen, die etwa 66 % der Gesamtinterphasendauer ausmacht und vermutlich nach Behandlung noch einen höheren Prozentsatz ergibt, sowie (3) der relativ geringen Strahlensensibilität von EAC-Zellen in der G_2-Phase (Deschner und Gray, 1959; Dewey und Humphrey, 1962), die andererseits für die meisten pflanzlichen und tierischen Objekte die höchste Strahlensensibilität zeigt (Sparrow et al., 1952; Read, 1961; Hsu et al., 1962; Evans und Savage, 1963), erscheint auch nach DHMP-Behandlung von EAC-Zellen eine bevorzugte Aberrationsinduktion in der S- und späten G_1-Phase am wahrscheinlichsten.

Diskussion

I. Objektspezifität der Aberrationsinduktion

Wenn ein physikalisches oder chemisches Agens in Pflanzenzellen die Fähigkeit zur Induktion von chromosomalen Strukturveränderungen besitzt, so bedeutet dies nicht notwendigerweise, dass dasselbe Agens auch in tierischen Zellen wirksam ist und umgekehrt. Die Spezifität der Wirkung kann nicht vorhanden sein, sich auf pflanzliche bzw. tierische Zellen beschränken oder eng begrenzt sein auf bestimmte Pflanzen- und/oder Tierspezies. Obwohl die Anwendung von energiereichen Strahlen bei verschiedenen Pflanzenspezies zu stark unterschiedlichen Aberrationsraten führt (Evans und Sparrow, 1961; Sparrow et al., 1961), während bei Zellen verschiedener Säugerspezies (in vitro) nur schwache Variation besteht (Bender und Wolff, 1961; Schindler, 1965), werden grundsätzlich in allen Testsystemen Chromosomenmutationen erzeugt (Rieger und Michaelis, 1967). Im Bereich der chemischen Mutagene reagiert die Gruppe der alkylierenden Agenzien, zum Beispiel Stickstofflost, Triäthylenmelamin und Diepoxybutan, ebenfalls objektunspezifisch (Kihlman, 1966). Für viele der nicht dieser Gruppe zugehörigen radiomimetischen Agenzien besteht hingegen eine eng objektgebundene chromosomenmutagene Wirkung, so bei Maleinsäurehydrazid, Äthoxycoffein, Äthylalkohol, Cytosinarabinosid, 2,6-Diaminopurin, Purinribosid und Bromdesoxyuridin (Kihlman, 1966). Maleinsäurehydrazid induziert nur in bestimmten Pflanzenzellen, wie *Vicia faba*, *Zea mays* und *Trillium grandiflorum*, nicht aber bei *Rhoeo discolor*, *Allium cepa* und *Hyacinthus orientalis* (McLeish, 1953; Kihlman, 1966; Rieger und Michaelis, 1967) Chromosomenmutationen. Nach Barnes et al. (1957) ist Maleinsäurehydrazid in Säugerzellen unwirksam. Äthylalkohol ist radiomimetisch aktiv bei *Vicia faba* (Michaelis et al., 1959; Rieger und Michaelis, 1960a), während er bei *Allium cepa*, *Bellevalia romana* und *Ascites*tumoren der Maus keine Chromosomenaberrationen zu induzieren vermag (Schoeneich, 1966; Rieger und Michaelis, 1967). Cytosinarabinosid, 2,6-Diaminopurin, Bromdesoxyuridin und Purinribosid verhalten sich bei Säugerzellen in Gewebekultur chromosomenmutagen (Biesele et al., 1955; Hsu und Somers, 1961; Kihlman et al., 1963), während in pflanzlichen Zellen praktisch keine Aberrationen erzeugt werden (Rieger und Michaelis, 1962; Kihlman, 1966). Die stark variierende Objektspezifität vieler chemischer Agenzien beruht auf systemspezifischen Faktoren wie beispielsweise unterschiedlicher Drogenresistenz in verschiedenen Testobjekten (Drogenresistenz zum Beispiel durch enzymatischen Abbau des Mutagens oder Inaktivierung durch spezifische Schutzstoffe) oder unterschiedlichen Permeabilitätsbarrieren sowie Stoffwechselleistungen, welch letztere vielleicht erst ein radiomimetisch aktives Umbauprodukt entstehen lassen (Kihlman, 1966; Rieger und Michaelis, 1967).

Wie aus den experimentellen Ergebnissen hervorgeht, induziert DHMP chromosomale Strukturveränderungen bei den pflanzlichen Zellen von *Vicia faba* und den tierischen Zellen von *Ascites*tumoren der Maus. Dies deutet eine objektunspezifische chromosomenmutagene Wirkung an, wie sie für energiereiche Strahlen, alkylierende Agenzien mit radiomimetischer Wirkung (Rieger und Michaelis, 1967) und Nitrosomethylharnstoff (Michaelis et al., 1965) typisch ist. Für das von mir getestete DHMP sowie den von Michaelis et al. 1965 beschriebenen Nitrosomethylharnstoff bleibt die Aussage allerdings beschränkt auf die Testsysteme *Vicia faba* und EAC. Erst weitere Versuche mit unterschiedlichsten pflanzlichen und tierischen Organismen

könnten die Frage nach einer allgemeingültigen objektunspezifischen Wirkung von DHMP befriedigend klären, wobei zu beachten wäre, dass ein nur in bestimmten Objekten wirksames Agens erst dann als objektspezifisch wirksam zu bezeichnen ist, wenn der experimentelle Nachweis erbracht werden kann, dass das Agens in die Zellen des als nicht aberrationssensibel gefundenen Testsystems eindringt.

II. Zeitpunkt der Wirkung im Mitosezyklus

Autoradiographisch exakt ermittelte Angaben zur Aberrationssensibilität in verschiedenen Phasenabschnitten des Mitosezyklus geben Anhaltspunkte über den möglichen Wirkungsmechanismus der geprüften chemischen oder physikalischen Mutagene (Evans und Scott, 1969; Matagne, 1969) sowie Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen den Mutagenen, insbesondere zwischen chemischen Agenzien und energiereichen Strahlenarten (Scott, 1968). Es gilt als experimentell bewiesen, dass der Eintritt von Aberrationen auf chromosomaler, chromatidaler und subchromatidaler Basis in qualitativer und quantitativer Hinsicht an bestimmte Abschnitte des Zellzyklus gebunden ist (Evans, 1962; Rieger und Michaelis, 1962; Evans und Savage, 1963).

DHMP induziert bei *Vicia faba* und EAC in je unterschiedlicher Häufigkeit praktisch ausschliesslich Chromatidtypaberrationen. Ein Sensibilitätsvergleich zwischen den beiden Testsystemen ist qualitativ möglich, nicht aber quantitativ, denn in jedem Testsystem hängt die Aberrationsausbeute von verschiedenen Faktoren ab, die bei *Vicia faba* und beim EAC vermutlich den Mutationsprozess recht unterschiedlich beeinflussen. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem Zellkernvolumen bzw. DNS-Gehalt, Heterochromatinmenge, Chromosomenzahl und -grösse, Zellteilungsrate (lange oder kurze Zyklusdauer) sowie mannigfache physikalische und chemische Faktoren (Evans und Sparrow, 1961; Evans, 1962; Kihlman, 1966; Rieger und Michaelis, 1967). Bei *Vicia faba* ist die Induktion praktisch aller Chromatidtypaberrationen nach DHMP-Behandlung experimentell gesichert auf die S- und späte G_1-Phase beschränkt, während dies beim EAC wahrscheinlich, aber nicht bewiesen ist, da keine Zyklusbestimmung mit der autoradiographischen ^{3}H-TdR-Methode erfolgte. Die sonst weitgehende Übereinstimmung des chromosomenmutagenen Effektes in beiden Testobjekten lässt zusammen mit der Feststellung nach Kihlman (1961) sowie Rieger und Michaelis (1962), wonach die meisten chemischen Mutagene in der G_2-Phase keine in X_1 nachweisbaren Aberrationen induzieren, hingegen kaum annehmen, dass die chromosomenmutagene Wirkung im EAC einer anderen Phasenspezifität folgt.

Ein Vergleich der aberrationssensiblen Phasen des Zellzyklus nach DHMP-Behandlung bzw. anderen Bruchagenzien, insbesondere energiereichen Strahlen und alkylierenden Radiomimetika ergibt für *Vicia faba* folgende Beziehungen: Die Sensibilität verschiedener Zellstadien bei der Aberrationsinduktion durch DHMP unterscheidet sich grundlegend von derjenigen nach Bestrahlung. Energiereiche Strahlen liefern ganz allgemein für pflanzliche und tierische Objekte höchste Aberrationsraten in mitotischen und meiotischen Kernteilungsstadien – zeitlich spät realisiert – und geringere in Interphase-Kernteilungsstadien (Sparrow, 1951; Evans, 1962). Die Interphase ist in allen Phasenabschnitten aberrationssensibel, charakterisiert durch

ansteigende Strahlensensibilität mit fortschreitender Interphase – $G_1 < S < G_2$ – (Hsu et al., 1962; Evans und Savage, 1963; Brewen, 1964; Evans und Scott, 1964). Einige Ausnahmen hierzu wurden für Säugerzellen gefunden, nämlich Mäusefibroblasten und *Ascites*tumorzellen, die in der S-Phase am strahlensensibelsten reagierten (Deschner und Gray, 1959; Dewey und Humphrey, 1962). In Übereinstimmung mit der für chemische Agenzien typischen Sensibilitätsverteilung reagiert auch nach Anwendung von DHMP die Interphase am sensibelsten, wobei Subchromatidaberrationen – durch sehr wenige chemische Mutagene in der frühen Prophase induziert (Kihlman, 1961 und 1964) – nie auftraten. Wie die meisten Radiomimetika ist DHMP durch sogenannte verzögerte zytologische Effekte gekennzeichnet (Kihlman, 1961; Rieger und Michaelis, 1962), das heisst, es liegt ein frühes oder mittleres interphasisches Sensibilitätsmuster vor (DHMP: späte G_1- und S-Phase). Durch dieses Wirkcharakteristikum unterscheidet sich DHMP zusammen mit sehr vielen anderen Radiomimetika entscheidend von den – durch energiereiche Strahlenarten, Äthoxycoffein und Streptonigrin erzeugten – unverzögerten und verzögerten Mutationseffekten mit Reunionsprodukten in beiden Wirkungsanteilen (Evans und Savage, 1963; Wolff und Luippold, 1964; Kihlman, 1966) sowie von den chromosomenmutagen wirkenden DNS-Synthese-Inhibitoren Fluordesoxyuridin und Desoxyadenosin, die ebenfalls unverzögerte und verzögerte Wirkung besitzen, aber im unverzögerten Anteil nie Reunionsprodukte induzieren (Kihlman, 1966).

Nach DHMP-Behandlung entstehen neben der S- bereits in der späten G_1-Phase Chromatidtypaberrationen, das heisst, die Chromosomen reagieren unmittelbar vor der nachweislichen DNS-Replikation bereits funktionell doppelsträngig auf das Bruchagens; dasselbe gilt nach Anwendung von Röntgenstrahlen, Maleinsäurehydrazid sowie den bifunktionell alkylierenden Agenzien L-Diepoxybutan und Stickstofflost bei *Vicia*-Chromosomen (Evans und Savage, 1963; Wolff und Luippold, 1964; Evans und Scott, 1964 und 1969; Scott, 1968; Matagne, 1969) sowie Röntgenstrahlen bei tierischen und menschlichen Chromosomen (Hsu et al., 1962; Monesi et al., 1967; Wolff, 1969). Es kann angenommen werden, dass die Chromosomen gegen Ende der G_1-Phase – in Abwesenheit der DNS-Synthese – bereits in Chromatiden aufspalten, so dass vielleicht der Wechsel von Aberrationen auf chromosomaler zu solchen auf chromatidaler Basis nicht allein in Korrelation zur chromosomalen DNS-Synthese, sondern vielmehr zur Chromosomenreduplikation steht, welch letztere sehr wohl bereits in der späten G_1-Phase beginnen könnte. So vermutet Wolff (1969), dass in Vorbereitung zur DNS-Synthese die DNS-Doppelhelix bereits in später G_1 teilweise in Einzelstränge aufgetrennt ist und die Einzelstränge deshalb als unabhängige Einheiten der Bruchentstehung unterliegen. Durch Replikation in der folgenden S-Phase würden dabei die Molekularläsionen im Einzelstrang zum Chromatidbruch umgewandelt. Auf diese Weise wäre erklärbar, wieso in später G_1 Chromatidaberrationen induziert werden. Nach Evans und Savage (1963) könnten indes die Chromatidaberrationen in späten G_1-Zellen auf einen methodischen Fehler der Autoradiographie zurückzuführen sein, ist es doch bis heute unmöglich, mit der autoradiographischen ^{3}H-TdR-Methode das Ende der G_1-Phase bzw. den Beginn der S-Phase genau zu bestimmen. Das relativ geringe Auflösungsvermögen der autoradiographischen Technik vermag S-Zellen mit niedriger ^{3}H-TdR-Einbaurate nicht zu erfassen, wie diesbezügliche Berechnungen von Evans und Savage (1963) gezeigt haben. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache schliesst eine Induktion chromatidaler

Aberrationen in autoradiographisch nicht nachweisbar DNS-synthetisierenden Zellen eine Beteiligung der DNS-Replikation an der Aberrationsentstehung nicht aus.

Die Frage, ob molekulare Schäden an der chromosomalen DNS (siehe Kapitel Einleitung und Problemstellung) auf Veränderungen der Struktur und des Replikationsverhaltens der DNS beschränkt bleiben oder zur Entstehung von chromosomalen Strukturveränderungen führen können, bleibt für energiereiche Strahlen bis heute ungeklärt (Rieger und Boehme, 1962; Wolff und Scott, 1969). Neben der immer noch bestehenden Unkenntnis über die Zahl der im Chromosom enthaltenen fibrillären Längselemente sowie der linearen Differenzierung – Bedeutung der DNS- bzw. Proteinkomponente für die Aufrechterhaltung der chromosomalen Längsstruktur – besteht für die mannigfaltigen strahleninduzierten Aberrationstypen keine gültige Arbeitshypothese, die die Lücke zwischen Molekularschäden an der DNS und zytologisch erfassbaren chromosomalen Strukturveränderungen ausfüllen könnte (Rieger und Michaelis, 1967). Wenigstens im Sinne einer Arbeitshypothese erklärbar liegen die Verhältnisse für solche Agenzien, deren Aberrationsentstehung streng an den Prozess der chromosomalen DNS-Replikation sowie eventuell das Stadium der unmittelbaren Replikationsvorbereitungen gebunden ist, indem molekulare Veränderungen an der DNS (für Alkylierungsmittel: siehe Kapitel Einleitung und Problemstellung) durch den Prozess der DNS-Replikation zur Entstehung von chromosomalen Strukturveränderungen führen könnten, zum Beispiel durch vermehrte Replikationsfehler oder verändertes Replikationsverhalten der DNS. Dies gilt für Alkylierungsmittel (Grant und Heslot, 1966; Evans und Scott, 1969; Matagne, 1969) und Maleinsäurehydrazid (Evans und Scott, 1964), nicht aber für die radiomimetisch wirksamen DNS-Antimetaboliten, die zwar durch Hemmung der DNS-Synthese in vielfältiger Art Einfluss auf den Replikationsprozess der DNS nehmen, deren Aberrationsinduktion aber in der S-Phase unter Bedingungen normaler DNS-Synthese sowie auch in der postsynthetischen G_2-Phase erfolgt, so dass eine Kausalbeziehung zwischen gestörter DNS-Synthese und Aberrationsrealisierung als unbegründet angesehen wird (Bell und Wolff, 1964; Brewen, 1965; Odmark und Kihlman, 1965).

DHMP entspricht in seiner Wirkung am ehesten dem für bifunktionell alkylierende Agenzien und Maleinsäurehydrazid-induzierten Aberrationsmodus. Die aktive chromosomenmutagene Substanz kann DHMP selbst oder ein Umbauprodukt sein, kaum aber ein Abbauprodukt, denn die wahrscheinlichste Abbaumöglichkeit – enzymatischer Abbau durch Peroxydase – ist aufgrund der gewählten Versuchsbedingung bei *Vicia faba* auszuschliessen und beim EAC kaum anzunehmen. Die radiomimetische Wirkung von DHMP dürfte auf denselben chemischen Primärreaktionen beruhen, die Weitzel et al. (1961) für die zytostatische Wirkung bei EAC-Zellen postuliert haben, nämlich Alkylierung und Oxydation. Es ist anzunehmen, dass die Aberrationsinduktion zumindest teilweise durch DHMP-induzierte Alkylierung zustande kommt, was in Analogie zu typischen Alkylierungsmitteln zu Molekularläsionen an der DNS führen könnte und zusammen mit der gefundenen DNS-Synthese-Hemmung sowie der ausschliesslich an die späte G_1- und S-Phase gebundenen Aberrationsentstehung eine ursächliche Beteiligung von Primärläsionen, das heisst sehr wahrscheinlich Molekularläsionen und DNS-Replikation an der Aberrationsrealisierung durchaus zum Gegenstand einer Arbeitshypothese machen könnte.

Abschliessend kann festgestellt werden, dass der Zeitpunkt der Aberrationsinduktion im Mitosezyklus nach DHMP-Behandlung bei *Vicia faba* mit Sicherheit und beim

EAC mit grosser Wahrscheinlichkeit nur im Bereich der Chromosomenreduplikation erfolgen kann. Weder für DHMP noch für irgendein anderes chromosomenmutagenes Agens (Rieger und Michaelis, 1967) kann der Mechanismus der Aberrationsentstehung in einer lückenlosen Kausalkette zweifelsfrei beschrieben werden.

III. Verteilung der Brüche über das Genom

Die inter- und intrachromosomale Aberrationsverteilung nach DHMP-Behandlung entsprechen bei *Vicia faba* in etwa den bevorzugt bruchlabilen Chromosomen bzw. Chromosomenregionen nach Anwendung von Anaerobiose bzw. Äthylalkohol (Michaelis und Rieger, 1958; Rieger und Michaelis, 1958, 1959b, 1960a, 1967), Nitrosomethylharnstoff (Michaelis et al., 1965) und insbesondere von alkylierenden Agenzien (Revell, 1953; Ockey, 1957 und 1960; Moutschen, 1958; Swanson und Merz, 1959; Michaelis und Rieger, 1960; Rieger und Michaelis, 1960b; Natarajan und Upadhya, 1964), während nach Anwendung von energiereichen Strahlen das Verteilungsmuster intrachromosomaler Aberrationen bedeutend weniger ausgeprägt bevorzugte Häufungen in einzelnen Chromosomenregionen zeigt (Rieger und Michaelis, 1959b; Evans und Bigger, 1961). Die präferentiell bruchlabilen Chromosomenregionen nach DHMP-Behandlung stehen in Beziehung zu den meisten grösseren, von verschiedenen Autoren als heterochromatisch bezeichneten positiv und/oder negativ heteropyknotischen Chromatinzuständen (LaCour, 1951; McLeish, 1953; Glaess, 1956; Ockey, 1960; Evans und Bigger, 1961; Merz, 1961) sowie – in Übereinstimmung mit einem Versuch von Evans 1964 – in Beziehung zu spätreplizierenden Chromosomenregionen, ausgenommen eine proximale Region des M_2-Arms (M-Chromosom), die spätreplizierend, nicht aber erhöht bruchlabil ist. In Analogie zu vielen pflanzlichen und tierischen Chromosomen (Haque, 1963; Schmid, 1963; Darlington und Haque, 1966; Pera, 1968; Schmid und Leppert, 1968; Barlow und Vosa, 1969) replizieren zweifellos die grösseren Heterochromatinblöcke der *Vicia*-Chromosomen ihre DNS im Vergleich zum Euchromatin verspätet, so dass der von mir getroffene Vergleich spätreplizierender Regionen mit Chromosomenabschnitten bevorzugter Bruchhäufigkeiten als Mass der Aberrationssensibilität im Heterochromatin Gültigkeit besitzt. Die weitgehende Identität zwischen spätreplizierenden, positiv und/oder negativ heteropyknotischen (Evans, 1964; Grant und Heslot, 1966) sowie bevorzugt bruchsensiblen Chromosomenregionen nach DHMP-Behandlung entspricht einem für die meisten chemischen Agenzien typischen chromosomenmutagenen Wirkungsmodus. So wurde für *Vicia faba* eine bevorzugte Bruchlokalisation im Bereich einzelner oder mehrerer heterochromatischer Chromosomenabschnitte nach Anwendung folgender Radiomimetika gefunden: Äthoxycoffein (Scott und Evans, 1964), Desoxyadenosin (Kihlman, 1963), Maleinsäurehydrazid (McLeish, 1953), Anaerobiose bzw. Äthylalkohol (Rieger und Michaelis, 1958 und 1967), tertiäres Butylhydroperoxyd, Diepoxyd, Stickstofflost (Revell, 1953), Triäthylenmelamin (Ockey, 1957 und 1960), Nitrosomethylharnstoff (Michaelis et al., 1965), Nitrosomethylurethan, Nitrosoäthylurethan (Grant und Heslot, 1966), Äthylmethansulfonat, Hydroxylamin (Rieger und Michaelis, 1960b; Natarajan und Upadhya, 1964; Rao und Natarajan, 1967) und Mitomycin C (Merz, 1961). Die Bruchmaxima

in den individuellen menschlichen Chromosomen liegen für Thioguanin, Hydroxylamin und Bromdesoxyuridin nach Engel et al. (1967) fast immer in identischen Chromosomenregionen; diese sind charakterisiert durch späte Replikationsmuster (Schmid, 1963) und/oder sekundäre Konstriktionen (Ferguson-Smith et al., 1962). Ähnliche Bruchlokalisationen bestehen in menschlichen Chromosomen nach Behandlung mit Triäthylenmelamin (Hampel und Gerhartz, 1965), Mitomycin C (Cohen und Shaw, 1964) sowie Myleran (Gebhart, 1970). Während für DHMP zusammen mit vielen anderen Radiomimetika, vor allem Alkylierungsmitteln (Kihlman, 1966) die nicht zufallsgemässe interchromosomale Aberrationsverteilung auf grösste Sensibilität medianer spätreplizierender bzw. heterochromatischer Bereiche in S-Chromosomen zurückzuführen ist, gilt für Maleinsäurehydrazid die umgekehrte Beziehung, nämlich grösste Sensibilität im M-Chromosom, wobei die meisten Aberrationen im Bereich einer proximalen heterochromatischen Chromosomenregion des M_2-Arms (M-Chromosom) lokalisiert sind (McLeish, 1953). Da das M-Chromosom bezogen auf seine Metaphasenlänge weniger Heterochromatin enthält als die S-Chromosomen (Ockey, 1960) – Grant und Heslot (1966) geben ein ungefähres Verhältnis von 1:3 an –, müsste das ungefähre interchromosomale Bruchverhältnis (M:S) bei gleich stark bevorzugter Labilität des Heterochromatins ebenfalls bei 1:3 liegen. Das Verhältnis ist bei Anwendung von DHMP und anderen Radiomimetika, insbesondere Alkylierungsmitteln, grösser als 1:3, das heisst, heterochromatische Bereiche von S-Chromosomen brechen häufiger, bei Anwendung beispielsweise von Maleinsäurehydrazid dagegen kleiner als 1:3, das heisst, heterochromatische Bereiche vom M-Chromosom brechen häufiger. M:S-Verhältnisse grösser oder kleiner als 1:3 können nicht aufgrund ungleicher Heterochromatinverteilung zwischen dem M- und den S-Chromosomen sowie gleich starker Aberrationssensibilität in allen Heterochromatinzonen erklärt werden, wohl aber bei Annahme je nach Chromosomentyp unterschiedlich aberrationssensibler Heterochromatinzonen. Vermutlich kommen im Genom verschiedene autosomale Heterochromatinarten vor, die nach DHMP-Behandlung in der S-Chromosomen-Gruppe stärker, in den beiden M-Chromosomen des diploiden Satzes schwächer bevorzugte Aberrationssensibilität besitzen (siehe auch Grant und Heslot, 1966, für Nitrosoäthylurethan-induzierte Aberrationen).

Heterochromatin reagiert im allgemeinen auf die Einwirkung fast aller Chromosomenmutagene, insbesondere chemischer Agenzien aberrationssensibler als Euchromatin (Rieger und Michaelis, 1962 und 1967). Folgende weitere Hinweise stützen diesen Befund:

1. Die Frequenz struktureller Chromosomenveränderungen nach Behandlung mit Maleinsäurehydrazid und in gewissem Grad auch nach Bestrahlung mit energiereichen Strahlen steht in Beziehung zur Zahl der heterochromatischen «knobs» in verschiedenen Varietäten von *Zea mays;* je grösser die Anzahl «knobs», desto mehr Aberrationen werden induziert (Graf, 1957).

2. Maleinsäurehydrazid induziert keine Aberrationen in Pflanzen ohne sichtbares Heterochromatin wie *Allium cepa*, *Hyacinthus orientalis*, wohl aber bei *Vicia faba*, *Zea mays* und *Trillium grandiflorum* mit sichtbarem Heterochromatin (McLeish, 1953; Kihlman, 1966; Rieger und Michaelis, 1967).

3. Versuche von Casperson et al. (1968) mit einem bifunktionell alkylierenden Radiomimetikum mit Fluoreszenz im sichtbaren Bereich zeigten bei Behandlung von *Vicia*- und vor allem *Trillium*-Chromosomen anhand mikrofluorometrischer Unter-

suchungen eine starke Fluoreszenz in Chromosomenregionen, die als heterochromatisch bekannt sind und sich gegenüber dem verwendeten Agens als bevorzugt bruchsensibel erwiesen. Die Autoren vermuten eine direkte Beziehung zwischen präferentiellem chemischem Angriff (Alkylierung) und präferentieller Bruchverteilung bestimmter heterochromatischer Chromosomenabschnitte.

In Anlehnung an Vorstellungen von Engel et al. (1967) könnten unter anderem folgende Hypothesen die bevorzugte Aberrationssensibilität im Heterochromatin erklären:

1. Heterochromatin ist besonders bruchlabil, das heisst, die Induktion von Primärläsionen und die folgenden Reunions- und Restitutionsereignisse geschehen bevorzugt in heterochromatischen Chromosomenabschnitten.
2. Die Bruchverteilung basiert auf einer zufallsgemässen Induktion von Primärläsionen. Die Reunions- und Restitutionsereignisse erfolgen ebenfalls zufallsgemäss, sind aber an die DNS-Replikation der jeweiligen Chromosomenabschnitte gebunden. Da heterochromatische Abschnitte später replizieren als euchromatische, könnte deshalb Brüchen in spätreplizierenden Abschnitten bis zum Abschluss der Replikation nicht mehr genügend Zeit zur Restitution zur Verfügung stehen, so dass sie vermehrt reunieren oder als freie Brüche stabilisiert werden, während umgekehrt im Euchromatin aufgetretenen Brüchen der grösste Teil der Synthesezeit zur Restitution offenstehen könnte, so dass nur noch wenig Primärläsionen dem Reunionsprozess oder der Stabilisierung zu freien Brüchen unterliegen.
3. Es werden zufallsgemäss Primärläsionen induziert. Unabhängig von der Replikation sind im Euchromatin Restitutionen begünstigt, im Heterochromatin dagegen Reunionen und Stabilisierungen zu freien Brüchen.

Die DHMP-induzierte Aberrationsverteilung in Chromosomen von *Vicia faba* bestätigt in etwa den heute allgemein anerkannten Sachverhalt einer Begünstigung von Karyotypumstrukturierungen durch das Heterochromatin. Es gibt bis heute keine experimentell fundierte Erklärung für die bevorzugte Aberrationssensibilität im Heterochromatin (Rieger und Michaelis, 1962 und 1967). Voraussetzungen dazu sind bessere Kenntnisse über den Wirkungsmechanismus der eingesetzten Mutagene, genauere Lokalisierung des Heterochromatins sowie präzisere Angaben über eventuelle chemische Unterschiede zwischen den vorläufig nur funktionell und morphologisch definierten eu- und heterochromatischen Chromatinzuständen.

IV. Chromosomenmutagene Wirkung von DHMP zur Prüfung der Peroxydhypothese der indirekten Strahlenwirkung

Zu den vielfältigen biologischen Effekten nach Anwendung energiereicher Strahlen gehören unter anderem Chromosomenaberrationen (Read, 1959; Rieger und Boehme, 1962; Rieger und Michaelis, 1967). Die für die einzuleitenden biologischen Reaktionen entscheidende Primärwirkung energiereicher Strahlen ist Gegenstand von 2 Arbeitshypothesen, nämlich der sogenannten direkten und indirekten Strahlenwirkungshypothese (siehe Kapitel Einleitung und Problemstellung). Viele biologische Strahleneffekte lassen sich in quantitativer Hinsicht (lineare bzw. exponentielle Dosis-Effekt-Beziehungen für Eintreffer- bzw. Zweitrefferaberrationen, Einfluss der Dosisrate und

der Ionendichte der Strahlung) am eindeutigsten als Ergebnis direkter Strahlenwirkung erklären (Zimmer, 1960; Rieger und Boehme, 1962), während radiochemische Befunde sowie die modifikatorische Beeinflussung der biologischen Strahleneffekte (z.B. der Aberrationsausbeute) durch Veränderungen des physiologischen Zustandes der Zelle zweifelsohne auf eine indirekte Wirkungsweise hindeuten (Alexander, 1960; Bacq und Alexander, 1961; Conger, 1961 und 1963; Michaelis und Rieger, 1962; Rieger und Boehme, 1962; Rieger und Michaelis, 1967). Es wird zurzeit allgemein angenommen, dass die primäre Veränderung des genetischen Materials direkt und indirekt erfolgt, dass beide Mechanismen nebeneinander gleichzeitig ablaufen können und im Fall der indirekten Wirkung freien Radikalen vom Typus $H^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$ und $HO_2^{\bullet}$ sowie dem Wasserstoffperoxyd kaum eine Bedeutung bei der Induktion von Chromosomenaberrationen zukommen dürfte (Zimmer, 1960; Michaelis und Rieger, 1962; Rieger und Michaelis, 1967), so dass die genannten freien Radikale und Wasserstoffperoxyd wohl eher bei der direkten Strahlenwirkung in kausaler Beziehung zur Aberrationsinduktion stehen (Ehrenberg, 1959; Alexander, 1960; Michaelis und Rieger, 1962). Im Vordergrund der Diskussion diffusibler strahleninduzierter Agenzien als wirksame Mutagene der indirekten Strahlenreaktionskette stehen heute vor allem langlebige organische Radikale sowie indirekt oder direkt entstandene organische Peroxyde (Scholes und Weiss, 1959 und 1962; Conger, 1961 und 1963; Wacker, 1962; Sobels, 1963; Walling, 1963; Cook, 1964; Loefroth et al., 1964; Swartz et al., 1965; Rieger und Michaelis, 1967). Indirekte Hinweise wie positive Korrelation zwischen der Strahlensensibilität und Lebensdauer der Radikale nach Samenbestrahlung (Conger und Randolph, 1959; Zimmer, 1959), Strahlenschutzeffekte durch sogenannte Radikalfänger (Sparrman et al., 1959; Pennington und Meloan, 1968), Bildung von organischen Peroxyden nach Bestrahlung (Okada, 1958; Weiss, 1958; Butler, 1959; Scholes und Weiss, 1960; Latarjet, 1963; Walling, 1963) sowie allgemein radiomimetische Wirkung verschiedener organischer Peroxyde (Dickey et al., 1949; Loveless, 1951; Revell, 1953; Altenburg, 1954; Sobels, 1954 und 1956; Kihlman, 1957; Weitzel et al., 1961) stützen diese Vermutung. Folgende Argumente mahnen indes zur Zurückhaltung, insbesondere in bezug auf einen möglichen Kausalzusammenhang zwischen strahleninduzierten organischen Peroxyden und der Entstehung von strahleninduzierten Chromosomenmutationen:

1. Die meistens in vitro am Modellsystem erarbeiteten radiochemischen Befunde sind nur mit gebührender Vorsicht auf biologische Objekte in vivo übertragbar.

2. Die von den genannten Autoren beschriebenen radiomimetischen Effekte organischer Peroxyde beziehen sich zumeist auf Wachstumshemmungen und Letaleffekte des biologischen Testsystems, nur in wenigen Fällen aber auf Chromosomenmutationen als Reaktionsindikator.

3. Die Autoren Loveless (1951), Revell (1953) und Kihlman (1957) beschreiben zwar für verschiedene organische Peroxyde unterschiedlicher chemischer Natur eine chromosomenmutagene Wirkung bei *Vicia faba;* da hingegen diese Substanzen zu wenig umfassend getestet worden sind, als dass Vergleiche mit den wichtigsten strahleninduzierten Aberrationscharakteristika möglich wären, die Fähigkeit zur Induktion von chromosomalen Strukturveränderungen aber ganz allgemein für eine sehr grosse Zahl verschiedenster chemischer Stoffklassen gilt, sind positive Ergebnisse im Sinne einer bloss ungenau erfassten Fähigkeit zur Aberrationsinduktion noch

keineswegs Beweise für eine kausale Beteiligung organischer Peroxyde am strahleninduzierten Chromosomenmutationsprozess.

4. Ein Vergleich der Aberrationscharakteristika von DHMP mit denjenigen energiereicher Strahlen ergibt mehr Unterschiede als Übereinstimmungen (siehe nächster Abschnitt).

DHMP, bei EAC als zytostatisch (Weitzel et al., 1961), bei *Neurospora* und *Drosophila* als genmutagen (Dickey et al., 1949; Sobels, 1954a) sowie bei EAC und *Drosophila* als radiomimetisch im Sinne einer allgemein strahlensensibilisierenden Wirkung (Sobels, 1963) beschrieben, erwies sich in meinen Versuchen bei *Vicia faba* und EAC als chromosomenmutagen. Ein Gemisch von Formaldehyd und Wasserstoffperoxyd zeigte in einem Kurztest nach Loveless (1951) die Fähigkeit zur Aberrationsinduktion bei *Vicia faba*, während weder Formaldehyd noch Wasserstoffperoxyd allein diese Wirkung besassen (Loveless, 1951; Kihlman, 1957; Michaelis und Rieger, 1962). Ähnliche Verhältnisse wurden von Dickey et al. 1949 sowie Jensen et al. 1951 in bezug auf genmutagene Wirkung bei *Neurospora* gefunden. Die genannten Autoren sehen übereinstimmend die mutagene Substanz des Gemisches in dessen spontan sich bildendem Syntheseprodukt DHMP, welch letzteres auch in meinen Versuchen dieselben Ausgangsstoffe zur Synthese benötigte. Die von Loveless 1951 nicht näher beschriebene chromosomenmutagene Wirkung dürfte etwa dem von mir beobachteten Fragmentierungseffekt bei Anwendung von DHMP ohne Peroxydasehemmung entsprechen und hätte bei Vorbehandlung mit einem Peroxydaseinhibitor sicher eine vergleichbare Aberrationsinduktion bewirkt. Die zytologische Wirkung von DHMP im Vergleich zu derjenigen energiereicher Strahlen (Neary et al., 1959; Read, 1959; Revell, 1959; Rieger und Michaelis, 1959b und 1967; Swanson, 1960; Evans und Bigger, 1961; Rieger und Boehme, 1962; Scott und Evans, 1967) ergibt für *Vicia faba* folgende Übereinstimmungen und Unterschiede:

Übereinstimmungen:

1. Fähigkeit zur Induktion von Chromosomenmutationen.
2. Mitoseindexabfall mit anschliessendem kompensatorischem Mitoseindexanstieg (Teilsynchronisierung).
3. Bevorzugte Verlängerung der DNS-Synthese (S-Phase).
4. Wechselwirkung zwischen induzierten Primärläsionen auf der Basis von Reunionen (Bruch-Reunions-Hypothese) bevorzugt innerhalb der Chromosomen zwischen Schwesterchromatiden.

Unterschiede:

1. *DHMP:* Eindeutige chromosomenmutagene Wirkung nur unter Peroxydasehemmung.

Energiereiche Strahlen: Chromosomenmutagene Wirkung unabhängig von der Peroxydasehemmung.

2. *DHMP:* Praktisch ausschliessliche Induktion von Chromatidtypaberrationen.

Energiereiche Strahlen: Induktion aller bekannten Aberrationstypen.

3. *DHMP:* Nur mittlere Phasen des Zellzyklus (S- und späte G_1-Phase) aberrationssensibel (Aberrationsinduktion an Chromosomenreduplikation gebunden).

Energiereiche Strahlen: Alle Phasen des Zellzyklus – mit Bevorzugung der Mitose und der G_2-Phase – aberrationssensibel (Aberrationsinduktion nicht an Chromosomenreduplikation gebunden).

4. *DHMP:* Intrachromosomale Aberrationsverteilung deutlich präferentiell in einzelnen Chromosomenregionen (stark heterochromatinbegünstigte Aberrationsinduktion).

Energiereiche Strahlen: Intrachromosomale Aberrationsverteilung nur schwach präferentiell in einzelnen Chromosomenregionen (schwach heterochromatinbegünstigte Aberrationsinduktion).

5. *DHMP:* Reunionssystem (Bruch-Reunions-Hypothese) gehemmt.

Energiereiche Strahlen: Reunionssystem vergleichsweise schwach gehemmt.

Wie der Vergleich zeigt, unterscheidet sich die zytologische Wirkung der beiden Chromosomenmutagene in entscheidenden Punkten. Die chromosomenmutagene Wirkung von DHMP entspricht dem typischen Wirkungsmodus vieler chemischen Mutagene, insbesondere alkylierender sowie eventuell einiger nicht alkylierender (KCN, Urethan, Akridinorange-Licht-System) und potentiell alkylierender (verschiedene Nitrosoverbindungen) Agenzien, deren Wirkung vermutlich erst über Umbauprodukte – in Diskussion stehen freie Radikale, Peroxyde mit und ohne Alkylierungsfähigkeit sowie nicht peroxydische Alkylierungsmittel – zustande kommt (Lilly und Thoday, 1956; Kihlman, 1957, 1959, 1960 und 1961; Michaelis et al., 1965; Bautz-Freese, 1967; Rieger und Michaelis, 1967). Aus folgenden Gründen darf aus diesem Befund bei weitem keine allgemeingültige Schlussfolgerung zum Thema «Peroxydhypothese der indirekten Strahlenwirkung» abgeleitet werden:

1. Der Befund beschränkt sich aus der Vielzahl möglicher strahleninduzierter organischer Peroxyde bloss auf einen Vertreter, nämlich DHMP.

2. Es sind nur wenige Anhaltspunkte aus der Literatur bekannt, ob dieser oder ein ähnlicher Peroxydtyp (Dihydroxyalkylperoxyde, Hydroxyhydroperoxyde) tatsächlich im Verlauf strahlenchemischer Reaktionen intrazellulär gebildet wird. Einzig Latarjet et al. (1963) sowie Scholes und Weiss (1960) wiesen nach, dass nach Bestrahlung Pyrimidine sowie deren Nukleoside und Nukleotide in wässeriger Lösung peroxydiert werden unter Bildung von Hydroxyhydroperoxyden.

3. Die angewandte Testmethode bedingt einen langen Diffusionsweg des Agens bis zum Chromosom als Reaktionsort, so dass die Substanz trotz Verhinderung des enzymatischen Abbaus durch Peroxydasehemmung mannigfachen zellulären Einflüssen ausgesetzt sein dürfte, die unter anderem das Diffusionsvermögen oder die Stabilität beeinflussen könnten. Es bleibt deshalb offen, ob die gefundene Wirkung der Substanz selbst oder einem Umbauprojekt zuzuordnen ist und ob das Agens nur einen geringen Teil seiner potentiellen Reaktionsfähigkeit entfalten kann oder nicht. Das Testverfahren vermag aus diesen Gründen bloss solche mögliche reaktive Strahlenprodukte nachzuahmen, die als diffusible Substanzen ähnlichen zellulären Bedingungen ausgesetzt sind wie ein von aussen zugegebenes Agens.

Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen dürften die Ergebnisse wie folgt zu interpretieren sein: Es ist unwahrscheinlich, dass organische Peroxyde gleicher oder ähnlicher chemischer Struktur wie das getestete DHMP als Induktoren der strahleninduzierten Chromosomenaberrationen wirken, wenn sie nicht am Reaktionsort selbst oder in dessen unmittelbarer Nachbarschaft gebildet werden, das heisst einem längeren Diffusionsweg – vom strahleninduzierten Entstehungsort bis zum Wirkungsort – unterliegen. Spekulativ könnte dieser Befund dahingehend gedeutet werden, dass nur strahleninduzierte organische Peroxyde, die vorwiegend in unmittelbarer Nähe des Reaktionsortes oder am Reaktionsort selbst gebildet werden, in

Kausalbeziehung zu den strahleninduzierten Aberrationen stehen könnten und damit indirekten Strahlenwirkungen in unmittelbarer Nähe des physikalischen Treffbereichs oder direkten Wirkungen im Treffbereich selbst eine Hauptbedeutung zukäme. So fanden Latarjet et al. 1963 in strahlenchemischen Experimenten eine direkte Peroxydierung von DNS sowie eine indirekte durch Peroxyde, die nach Bestrahlung in der Umgebung von DNS gebildet werden und sekundär Pyrimidine der DNS peroxydieren. Der Autor vermutet, dass diese Ereignisse unmittelbar zu Primärläsionen in der DNS führen.

Viele experimentelle Befunde geben eindeutige Hinweise, dass neben strahleninduzierten physikalischen Wechselwirkungen (Zimmer, 1960; Rieger und Boehme, 1962) chemische und biochemische Vorgänge an der Strahlenreaktionskette beteiligt sind (Alexander, 1960; Conger, 1963; Michaelis und Rieger, 1962; Rieger und Boehme, 1962; Pennington und Meloan, 1968). Die Art dieser Reaktionen ist zurzeit nur mehr oder weniger spekulativ zu deuten, ein Grund, weshalb bis heute für kein biologisches Objekt eine lückenlose Ablaufform des strahleninduzierten Mutationsprozesses von der Energieabsorption bis zur Mutationsfixierung beschrieben werden kann (Rieger und Boehme, 1962). Eingeschränkt auf die vieldiskutierte Frage nach der möglichen biologischen Bedeutung strahleninduzierter organischer Peroxyde ist festzustellen, dass je nach Fragestellung, die den diesbezüglich beschriebenen Versuchen zugrunde liegt, zum Teil ganz unterschiedliche Aussagen vorliegen. Entweder wird den organischen Peroxyden eine direkte Induktorwirkung strahleninduzierter biologischer Endeffekte eingeräumt (Horgan et al., 1957; Latarjet et al., 1963), oder aber es wird ihnen eine Beteiligung an Reaktionsschritten, die zu den typischen biologischen Strahleneffekten führen, überhaupt abgesprochen (Sommermeyer und Magnus, 1962; Sobels, 1963). Das letztere scheinen auch meine Versuche zu bestätigen, eingeschränkt auf den genannten Aussagegehalt.

Die Frage nach der möglichen Bedeutung organischer Peroxyde als Induktoren biologischer Strahleneffekte kann bis heute nicht spekulationsfrei beantwortet werden. Weitere Experimente an unterschiedlichen organischen Peroxyden mit verschiedenen biologischen Fragestellungen dürften unumgänglich sein, ehe die Peroxydhypothese im Fall indirekter Strahlenwirkungen nicht nur als Vermutung, sondern als experimentell bewiesen abgelehnt werden kann oder umgekehrt eventuell doch zu einer experimentell fundierten Theorie erhoben werden müsste.

Zusammenfassung

Es wurden verschiedene Aspekte der zytologischen, insbesondere chromosomenmutagenen Wirkung von Dihydroxymethylperoxyd (DHMP) an Wurzelmeristemzellen von *Vicia faba* untersucht und die chromosomenmutagene Wirkung an *Ascites*-tumorzellen der Maus (EAC) überprüft. Physiologische Vorversuche haben gezeigt, dass DHMP im Wurzelmeristem von *Vicia faba* peroxydatisch abgebaut wird, so dass die zytologische Wirkung des organischen Peroxyds nur unter Hemmung des enzymatischen Abbaus ermittelt werden konnte; im EAC war dies nicht nötig. Es wurden folgende Feststellungen an *Vicia faba* – in Punkt 2 an *Vicia faba* und EAC – gemacht:

1. DHMP wirkt ungefähr während der Dauer der G_2-Phase zytostatisch durch Mitosestörung. Die DNS-Synthese-Rate bleibt über längere Zeit vermindert. Die Dauer der S-Phase ist im Vergleich zu anderen Phasenabschnitten bevorzugt verlängert; dies führt allmählich zu einer Teilsynchronisierung der Zellpopulation, ersichtlich am kompensatorischen Anstieg des nach Behandlungsbeginn stark abgesunkenen Mitoseindex.

2. DHMP wirkt chromosomenmutagen bei *Vicia faba* und beim EAC. In beiden Testsystemen entstehen praktisch ausschliesslich Chromatidtypaberrationen.

3. Die chromosomenmutagene Wirkung wird in X_1 als sogenannter verzögerter zytologischer Effekt nachweisbar. Die Induktion von chromosomalen Strukturveränderungen erfolgt ausschliesslich in der mittleren Interphase (S- und späte G_1-Phase). Bereits in der späten G_1-Phase werden Chromatidtypaberrationen induziert. In der Interphase nach X_1 werden keine neuen Chromosomenaberrationen mehr erzeugt.

4. Die akrozentrischen S-Chromosomen sind im Vergleich zu den metazentrischen M-Chromosomen bevorzugt aberrationssensibel. Auf den M-Chromosomen bzw. den 2 eindeutig unterscheidbaren Gruppen von S-Chromosomen ist die intrachromosomale Aberrationssensibilität deutlich erhöht in den meisten grösseren spätreplizierenden Regionen oder in deren Nachbarschaft; dies gilt insbesondere für die medianen Bereiche der langen S-Chromosomen-Arme.

5. Das quantitative gegenseitige Verhältnis der Chromatidenumbauten zwischen verschiedenen Chromosomen und innerhalb der Chromosomen entspricht nicht der Zufallserwartung; die Entstehung von Chromatidenumbauten innerhalb der Chromosomen ist begünstigt. Chromatidenumbauten zwischen verschiedenen Chromosomen erfolgen bevorzugt zwischen homologen Chromosomen (nur für M-Chromosomen-Typ experimentell bewiesen). Die unterschiedliche Frequenz von Chromatidenumbauten in der späten G_1- bzw. S-Phase ist die Folge ungleicher Reunionsbereitschaft DHMP-induzierter Primärläsionen (Bruch-Reunions-Hypothese); das Reunionssystem wird in beiden Phasenanteilen unterschiedlich stark gehemmt.

Die zytologische, insbesondere chromosomenmutagene Wirkung von DHMP wurde zwecks Prüfung der Peroxydhypothese der indirekten Strahlenwirkung mit derjenigen energiereicher Strahlen verglichen und mögliche Schlussfolgerungen diskutiert.

Summary

We have examined different aspects of the cytological, especially the chromosome-breaking effect of Dihydroxymethylperoxide (DHMP) on root-tip meristem cells of *Vicia faba* and the chromosome-breaking effect on *ascites* tumour cells of mice. Preliminary physiological experiments have shown that DHMP is destroyed by a peroxidase reaction in the root meristem of *Vicia faba*, so that the cytological effect of the organic peroxide was always tested under conditions inhibiting the enzymatic breakdown with the exception of EAC, where this procedure was not necessary. With *Vicia faba*—in point 2 with *Vicia faba* and EAC—the following results were obtained:

1. DHMP acts cytostatically by disturbing mitosis approximately during the G_2-phase. The rate of DNA synthesis is diminished for a prolonged period of time. The S-phase is preferentially extended in comparison to the other periods of the

mitotic cycle; this gradually leads to a partial synchronisation of the cell population, which can be recognized by an immediate depression of the mitotic index followed by a compensatory ascent.

2. DHMP induces chromosome mutations in *Vicia faba* and EAC. Chromatid type aberrations are almost exclusively produced in both test systems.

3. The chromosome-breaking effect was shown to be a delayed cytological effect in X_1. The induction of chromosomal structural changes takes place in the middle section of the interphase (S- and late G_1-phase). In the late G_1-phase chromatid type aberrations are already induced. In the interphase after X_1 no new chromosome aberrations are produced.

4. The acrocentric S-chromosomes display a greater sensitivity to aberration induction than metacentric M-chromosomes. In the M-chromosomes and in the two groups of S-chromosomes that can clearly be distinguished, the intrachromosomal sensitivity to aberration is evidently intensified in most of the larger late replicating regions or in their neighbouring sphere; this mainly concerns the mid-zones of the long arm of the S-chromosomes.

5. The quantitative reciprocal proportion of interchromosomal and intrachromosomal rearrangements does not fit a random expectation; the origin of intrachromosomal chromatid rearrangements is increased. Interchromosomal chromatid rearrangements mostly occur between homologous chromosomes. This fact has been demonstrated experimentally only for the M-chromosome type. The different frequency of chromatid rearrangements in the late G_1- and S-phase is due to unequal reunion of DHMP induced primary lesions (breakage-reunion hypothesis); in both phases the reunion system is inhibited to a different degree.

The cytological, especially the chromosome-breaking effect of DHMP has been compared with high energy radiation for examining the peroxide hypothesis of the indirect mode of action of radiation, and possible conclusions have been discussed.

Verdankungen

Die vorliegende Arbeit, vom Schweizerischen Nationalfonds (Fonds-Nr. 4404) finanziell unterstützt, entstand unter Führung von Herrn Prof. Dr. A. Rutishauser und nach dessen Tod von Herrn Prof. Dr. H. Wanner. Für die in spontaner Bereitwilligkeit übernommene weitere Leitung und Unterstützung der Arbeit sowie das wohlwollende Verständnis in besonderen Anliegen bin ich Herrn Prof. Wanner zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Literatur

Aebi H.E. 1963. Detection and fixation of radiation-produced peroxide by enzymes. Radiat. Res., Suppl. *3*, 130–152.

Alexander P. 1960. Protection of macromolecules in vitro against damage by ionizing radiations. In: Hollaender A. (Ed.): Radiation protection and recovery, 3–44. Pergamon Press, Oxford.

Altenburg L.S. 1954. The production of mutation in *Drosophila* by tertiary butyl hydroperoxide. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. *40*, 1037–1040.

Atwood K.C. 1963. Number of nuclear sites for aberration formation and the distribution of aberrations. In: Wolff S. (Ed.): Radiation-induced chromosome aberrations, 73–86. Columbia Univ. Press, New York.

Bacq Z.M. und P.Alexander. 1961. Fundamentals of radiobiology. Pergamon Press, Oxford.

Bailey P.C. und S.Wolff. 1964. A comparison of X-ray- and ultraviolet-induced aberrations in pollen tube chromosomes of *Tradescantia*. II. Influence of protein synthesis inhibitors. Radiat. Bot. *4*, 121–125.

Bajer A. 1965. Subchromatid structure of chromosomes in the living state. Chromosoma *17*, 291–302.

Bard A.J. 1966. Chemical equilibrium. A Harper Internat. Ed. Harper & Row, New York.

Barlow P.W. und C.G.Vosa. 1969. The pattern of DNA replication in the chromosomes of *Puschkinia libanotica*. Chromosoma *28*, 457–467.

Barnes J.M., P.N.Magee, E.Boyland, A.Haddow, R.D.Passey, W.S.Bullough, C.N.D.Cruickshank, M.H.Salaman und R.T.Williams. 1957. The non-toxicity of maleic hydrazide for mammalian tissue. Nature *180*, 62–64.

Bautz-Freese E. 1967. Der Chemismus der urethaninduzierten Mutationen, 25 Jahre nach ihrer Entdeckung. Molec. Gen. Genetics *100*, 150–158.

Bayreuther K. 1952. Der Chromosomenbestand des Ehrlich-*Ascites*-Tumors der Maus. Z. Naturforschg. *7*, 554–557.

Beermann W. 1961. Neue Wege der Chromosomenforschung. Bericht über 7.Tagung der Dtsch. Ges. f. Anthropol., 13–35. Musterschmidt, Göttingen.

Bell S. und S.Wolff. 1964. Studies on the mechanism of the effect of fluorodeoxyuridine on chromosomes. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. *51*, 195–202.

Bender M.A. und P.C.Gooch. 1962. Types and frequencies of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. *48*, 522–532.

— und D.M.Prescott. 1962. Aberrations induced in human leukocyte chromosomes by ^{3}H-labelled nucleosides. Cytogenetics *1*, 65–74.

— und S.Wolff. 1961. X-ray-induced chromosome aberrations and reproductive death in mammalian cells. Amer. Nat. *95*, 39–52.

Biesele J.J., M.Clarke und M.Margolis. 1955. Unsubstituted purine and its riboside as toxic antimetabolites in mouse tissue cultures. Cancer *8*, 87–96.

Brauer J. 1949. Experimentelle Untersuchungen an Wurzelspitzenmitosen von *Vicia faba*. I. Normalverhalten. Planta *36*, 411–423.

Brewen J.G. 1964. Studies on the frequencies of chromatid aberrations induced by X-rays at different times of the cell cycle of *Vicia faba*. Genetics *50*, 101–107.

— 1965. The induction of chromatid lesions by cytosine arabinoside in post-DNA-synthetic human leukocytes. Cytogenetics *4*, 28–36.

Bryant T.R. 1969. Hydrolysis in Feulgen autoradiography. I. Loss of label from S-period nuclei and its subsequent association with non-S chromatin. Exp. Cell Res. *56*, 127–133.

Buder E. 1967. Der anaerobe Anteil der meristematischen Gärung im Wurzelmeristem von *Vicia faba*. Flora, Abt. A, *158*, 298–324.

Burton M. und J.L.Magee. 1956. Einige chemische Aspekte der Strahlenbiologie. Naturwissenschaften *43*, 433–442.

Butler J.A.V. 1959. Changes induced in nucleic acids by ionizing radiations and chemicals. Radiat. Res., Suppl. *1*, 403–416.

Caspersson T., S.Farber, G.E.Foley, J.Kudynowski, E.J.Modest, E.Simonsson, U.Wagh und L.Zech. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Exp. Cell Res. *49*, 219–222.

Chu E.H.Y., N.H.Giles und K.Passano. 1961. Types and frequencies of human chromosome aberrations induced by X-rays. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. *47*, 830–839.

Citoler P. und A.Gropp. 1969. DNS-Replikation von autosomalem Heterochromatin. Exp. Cell Res. *54*, 337–346.

Cleaver J.E. 1967. Thymidine metabolism and cell kinetics. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
Clowes F.A.L. und E.J.Hall. 1963. The quiescent centre in root meristems of *Vicia faba* and its behaviour after acute X-irradiation and chronic gamma irradiation. Radiat. Bot. *3*, 45–53.
Cohen M.M. und M.W.Shaw. 1964. Effects of mitomycin C on human chromosomes. J. Cell Biol. *23*, 386–395.
Coleman L.C. 1938. Preparation of leucobasic fuchsin for use in the Feulgen reaction. Stain Technol. *13*, 123–124.
Conger A.D. 1961. Biological after-effect and long-lived free radicals in irradiated seeds. J. cellular comp. Physiol. *58*, Suppl. 1, 27–32.
— 1963. Chromosome aberrations and free radicals. In: Wolff S. (Ed.): Radiation-induced chromosome aberrations, 167–203. Columbia Univ. Press, New York.
— und M.C.Randolph. 1959. Magnetic centers (free radicals) produced in cereal embryos by ionizing radiations. Radiat. Res. *11*, 54–66.
Cook R.F. 1964. The effects of water and a protective agent on gamma-ray induced free radicals in mustard seeds. Intern. J. Radiat. Biol. *7*, 497–504.
Dainton F.S. 1959. Chemical effects of radiation. Radiat. Res., Suppl. *1*, 1–25.
Darlington C.D. und A.Haque. 1966. Organisation of DNA synthesis in rye chromosomes. In: Darlington C.D. und K.R.Lewis (Ed.): Chromosomes today, Vol. 1, 102–107. Oliver and Boyd, Edinburgh.
— und M.B.Upcott. 1941. Spontaneous chromosome change. J. Genet. *41*, 297–338.
Deane H.W., R.J.Barnett und A.M.Seligman. 1960. Handbuch der Histochemie. Enzyme VII/I, Histochemische Methoden zum Nachweis der Enzymaktivität. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.
Deschner E.E. und L.H.Gray. 1959. Influence of oxygen tension on X-ray-induced chromosome damage in Ehrlich *ascites* tumour cells irradiated in vitro and in vivo. Radiat. Res. *11*, 115–146.
de Tomasi J.A. 1936. Improving the technic of the Feulgen stain. Stain Technol. *11*, 137–144.
Dewey D.L. und R.M.Humphrey. 1962. Relative radiosensitivity of different phases in the life cycle of L-P 59 mouse fibroblasts and *ascites* tumour cells. Radiat. Res. *16*, 503–530.
— — 1964. Restitution of radiation-induced chromosomal damage in Chinese Hamster cells related to the cell's life cycle. Exp. Cell Res. *35*, 262–276.
Dickey F.H., G.H.Cleland und C.Lotz. 1949. The role of organic peroxides in the induction of mutations. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. *35*, 581–586.
Edwards J.L., A.L.Koch, P.Youcis, H.L.Freese, M.B.Laite und J.T.Donalson. 1960. Some characteristics of DNA synthesis and the mitotic cycle in Ehrlich *ascites* tumour cells. J. Biophysic. and Biochem. Cytol. *7*, 273–280.
Ehrenberg L. 1959. Radiobiological mechanisms of genetic effects. A review of some current lines of research. Rad. Res., Suppl. *1*, 102–123.
Engel W., W.Krone und U.Wolf. 1967. Die Wirkung von Thioguanin, Hydroxylamin und 5-Bromdesoxyuridin auf menschliche Chromosomen in vitro. Mutation Res. *4*, 353–368.
Evans H.J. 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.
— 1962. Chromosome aberrations induced by ionizing radiation. Int. Rev. Cytol. *13*, 221–321.
— 1964. Uptake of ^{3}H-thymidine and patterns of DNA synthesis in nuclei and chromosomes of *Vicia faba*. Exp. Cell Res. *35*, 381–391.
— und T.R.L.Bigger. 1961. Chromatid aberrations induced by gamma irradiation. II. Non-randomness in the distribution of chromatid aberrations in relation to chromosome length in *Vicia faba* root-tip cells. Genetics *46*, 277–289.
— und J.R.K.Savage. 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.
— 1963. The relation between DNA synthesis and chromosome structure as resolved by X-ray damage. J. Cell Biol. *18*, 525–540.
— und D.Scott. 1964. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. Genetics *49*, 17–38.
— — 1969. The induction of chromosome aberrations by nitrogen mustard and its dependence on DNA synthesis. Proc. Roy. Soc., Ser. B, *173*, 491–512.
— und A.H.Sparrow. 1961. Nuclear factors affecting radiosensitivity. II. Dependence on

nuclear and chromosome structure and organization. Brookhaven Symp. in Biol. *14*, 101–124.
Fabergé A.C. 1958. Relation between chromatid-type and chromosome-type breakage-fusion-bridge cycles in maize endosperm. Genetics *43*, 737–749.
Ferguson-Smith M.A., M.E. Ferguson-Smith, P.M. Ellis und M. Dickson. 1962. The sites and relative frequencies of secondary constrictions in human somatic chromosomes. Cytogenetics *1*, 325–343.
Feulgen R. und H. Rossenbeck. 1924. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *135*, 203–248.
Freese E. 1958. The arrangement of DNA in the chromosome. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. *23*, 13–18.
Gaul H. 1963. Mutationen in der Pflanzenzüchtung. Z. Pflanzenzüchtg. *50*, 194–307.
Gebhart E. 1970. Aberrationsverteilung nach Einwirkung von Myleran auf menschliche Chromosomen in vitro. Chromosoma *29*, 336–348.
Giles N.H. 1940. Spontaneous chromosome aberrations in *Tradescantia*. Genetics *25*, 69–87.
Glaess E. 1956. Die Verteilung von Fragmentationen und achromatischen Stellen auf den Chromosomen von *Vicia faba* nach Behandlung mit Schwermetallsalzen. Chromosoma *8*, 260–284.
Graf G.E. 1957. Chromosome breakage induced by X-rays, maleic hydrazide, and its derivatives in relation to knob number in maize. J. Hered. *48*, 155–159.
Graham R.C., jr., U. Lundholm und M.J. Karnovsky. 1965. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. J. Histochem. Cytochem. *13*, 150–152.
Grant C.J. 1965. Chromosome aberrations and the mitotic cycle in *Trillium* root tips after X-irradiation. Mutation Res. *2*, 247–262.
— und H. Heslot. 1966. Chromosome aberrations and the chromosome cycle in *Vicia faba* after treatments with nitroso-methyl urethane and nitroso-ethyl urethane. In: Darlington C.D. und K.R. Lewis (Ed.): Chromosomes today, Vol. 1, 118–127. Oliver and Boyd, Edinburgh.
Hampel K.E. und H. Gerhartz. 1965. Strukturanomalien der Chromosomen menschlicher Leukozyten in vitro durch Triäthylenmelamin. Exp. Cell Res. *37*, 251–258.
Haque A. 1963. Differential labelling of *Trillium* chromosomes by ^{3}H-thymidine at low temperature. Heredity *18*, 129–133.
Hart R.C. 1968. A model of the chromosome. In: Lawrence J.H. und J.W. Gofman (Ed.): Advances in biological and medical physics, Vol. *12*, 139–161. Academic Press.
Harte C. und J. Zinecker-Brauer. 1960. Über das Mitoseverhalten in den Wurzelspitzen von *Vicia faba*. II. Analyse der Variabilität der Mitosehäufigkeit. Chromosoma *11*, 463–478.
Heinen W. 1963. Über den enzymatischen Cutinabbau. Acta Bot. Neerlandica *12*, 51–57.
Heitz E. 1929. Heterochromatin, Chromozentren, Chromomeren. Ber. Dtsch. Bot. Ges. *47*, 274–284.
Herskowitz I.H. 1965. Genetics, 2nd ed. Little, Brown & Co., Boston.
Heslot H. 1965. Les mécanismes moléculaires de la mutagenèse et la moture des mutations. Ann. amélior. plantes *15*, 111–157.
Hess D. 1968. Biochemische Genetik. Springer-Verlag.
Hillary B.B. 1940. Uses of the Feulgen reaction in cytology, II. Bot. Gaz. *102*, 225–235.
Horgan V., J. Philpot, B. Porter und D. Roodyn. 1957. Toxicity of autoxidized aqualene and linoleic acid and of simpler peroxides in relation to toxicity of radiation. Biochem. J. *67*, 551–558.
Howard A. und D.L. Dewey. 1962. Non-uniformity of labelling rate during DNA synthesis. Exp. Cell Res. *24*, 623–624.
Hsu T.C. und C.E. Somers. 1961. Effect of 5-bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. *47*, 396–403.
— W.C. Dewey und R.M. Humphrey. 1962. Radiosensitivity of cells of Chinese Hamster in vitro in relation to the cell cycle. Exp. Cell Res. *27*, 441–452.
Jensen K.A., J. Kirk, G. Kolmark und M. Westergaard. 1951. Chemically induced mutations in *Neurospora*. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. *16*, 245–261.
Jensen W.A. 1955. The histochemical localization of peroxidase in roots and its induction by indoleacetic acid. Plant Physiol. *30*, 426–432.
Kaufmann B.P., H. Gay und M.R. McDonald. 1960. Organizational patterns within chromosomes. Int. Rev. Cytol. *9*, 77–127.
Keller R. 1963. Untersuchungen über die radiomimetische Wirkung von 2-Acetylaminofluoren auf die Wurzelspitzenchromosomen von *Vicia faba*. Ber. Schweiz. Bot. Ges. *73*, 93–152.

Kihlman B.A. 1955. Chromosome breakage in *Allium* by 8-ethoxy-caffeine and X-rays. Exp. Cell Res. *8*, 345–368.
— 1956. Factors affecting the production of chromosome aberrations by chemicals. J. Biophys. Biochem. Cytol. *2*, 543–555.
— 1957. Experimentally induced chromosome aberrations in plants. I. The production of chromosome aberrations by cyanide and other heavy metal complexing agents. J. Biophys. Biochem. Cytol. *3*, 363–380.
— 1959. On the radiomimetic effects of cupferron and potassium cyanide. J. Biophys. Biochem. Cytol. *5*, 351–353.
— 1960. The radiomimetic effect of N-nitroso-N-methyl urethane in *Vicia faba*. Exp. Cell Res. *20*, 657–659.
— 1961. Biochemical aspects of chromosome breakage. Adv. Genet. *10*, 1–59.
— 1962a. Different effects of 5-fluorodeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine on the frequencies of chromatid aberrations obtained in *Vicia faba* after irradiation with X-rays. Exp. Cell Res. *27*, 604–607.
— 1962b. The production of chromatid aberrations by 5-fluorodeoxyuridine alone and in combination with X-rays and 8-ethoxycaffeine. Caryologia *15*, 261–277.
— 1963. Deoxyadenosine as an inducer of chromosomal aberrations in *Vicia faba*. J. cellular comp. Physiol. *62*, 267–272.
— 1964. The production of chromosomal aberrations by streptonigrin in *Vicia faba*. Mutation Res. *1*, 54–62.
— 1966. Actions of chemicals on dividing cells. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
— T. Merz und C.P. Swanson. 1957. Experimentally induced chromosome aberrations in plants. II. The effect of cyanide and other heavy metal complexing agents on the production of chromosome aberrations by X-rays. J. Biophys. Biochem. Cytol. *3*, 381–390.
— W.W. Nichols und A. Levan. 1963. The effect of deoxyadenosine and cytosine arabinoside on the chromosomes of human leukocytes in vitro. Hereditas *50*, 139–143.
Kirby-Smith J.S. und M.L. Randolph. 1961. Modification of radiation-induced electron spin resonances in dry materials. J. cell. comp. Physiol. *58* (Suppl. 1961), 1–11.
Koburg E. und W. Maurer. 1962. Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin über die Dauer der Desoxyribonukleinsäure-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus. Biochem. Biophys. Acta *61*, 229–242.
Koller P.C. 1954. Chromosome breakage. Prog. Biophysics biophys. Chem. *4*, 195–243.
Krone W., A. Bustoni und U. Wolf. 1965. Über die Einwirkung von Nucleasen und Proteasen auf die Morphologie menschlicher Chromosomen. Humangenetik *1*, 587–601.
La Cour L.F. 1951. Heterochromatin and the organization of nucleoli in plants. Heredity *5*, 37–50.
— und A. Rutishauser. 1954. X-ray breakage experiments with endosperm. I. Subchromatid breakage. Chromosoma *6*, 696–709.
Latarjet R., B. Ekert und P. Demerseman. 1963. Peroxidation of nucleic acids by radiation: biological implications. Rad. Res., Suppl. *3*, 247–256.
Leuthardt F. 1963. Lehrbuch der physiologischen Chemie, 15. Auflage. Walter De Gruyter & Co., Berlin.
Levan A. 1938. The effect of colchicine on root meristems in *Allium*. Hereditas *24*, 471–486.
— und J.H. Tjio. 1948. Induction of chromosome fragmentation by phenols. Hereditas *34*, 453–480.
Lilly L.J. 1958. Effects of cyanide and ionizing radiation on the roots of *Vicia faba*. Exp. Cell Res. *14*, 257–267.
— und J.M. Thoday. 1956. Effects of cyanide on the roots of *Vicia faba*. Nature *177*, 338–339.
Lima-de-Faria A. 1959. Differential uptake of tritiated thymidine into hetero- and euchromatin in *Melanoplus* and *Secale*. J. Biochem. Biophys. Cytol. *6*, 457–466.
— und H. Jaworska. 1968. Late DNA synthesis in heterochromatin. Nature *217*, 138–142.
Loefroth G., A. Ehrenberg und L. Ehrenberg. 1964. Analysis of radiation-induced electron spin resonance spectra in plant seeds. Radiat. Bot. *4*, 455–467.
Loveless A. 1951. Qualitative aspects of the chemistry and biology of radiomimetic (mutagenic) substances. Nature *167*, 338–342.
Maekinen Y. 1963. The effect of some carboxylic acids and hydrogen peroxide on onion chromosomes. Ann. Bot. Soc. fenn. Vanamo *34*, 1–39.
Mahler H.R. und E.H. Cordes. 1961. Biological chemistry. Harper & Row, New York.

Marquardt H. 1938. Die Röntgenpathologie der Mitose. I. Der Primäreffekt weicher Röntgenstrahlen auf die Mitose von *Scilla campanulata*. Z. Bot. *32*, 401–429.
Matagne R. 1969. Aberrations de structure chromosomique induites par le L-diépoxybutane chez *Vicia faba* en relation avec le cycle mitotique. Caryologia *22*, 169–176.
McLeish J. 1953. The action of maleic hydrazide in *Vicia*. Heredity *6*, Suppl., 125–148.
— 1954. The consequences of localized chromosome breakage. Heredity *8*, 385–407.
Merz T. 1959. The effect of extended anaerobic treatments on the chromosomes of *Vicia faba*. J. Biophys. Biochem. Cytol. *5*, 135–142.
— 1961. Effect of mitomycin C on lateral root-tip chromosomes of *Vicia faba*. Science *133*, 329–330.
Michaelis A. und R. Rieger. 1958. Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem der Wurzelspitze von *Vicia faba* L. II. Präferentielle Verteilung der chromosomalen Bruch- und Reunionspunkte nach anaerober Quellung der Samen. Chromosoma *9*, 514–536.
— — 1959. Strukturheterozygotie bei *Vicia faba*. Züchter *29*, 354–361.
— — 1960. Einige experimentelle Ergebnisse zur Wirkung von Myleran auf die Chromosomen von *Vicia faba* L. Züchter *30*, 150–163.
— — 1962. Zur Frage der Auslösung von Chromosomenaberrationen durch freie Radikale des Wassers bei *Vicia faba* L. In: Stubbe H. (Hrsg.): Strahleninduzierte Mutagenese. Abh. Dtsch. Wiss. Akad. Berlin, Kl. Med., 106–112.
— — 1963. Interaction of chromatid breaks induced by three different radiomimetic compounds. Nature *199*, 1014–1015.
— K. Ramshorn und R. Rieger. 1959. Äthylalkohol-radiomimetisches Agens bei *Vicia faba* L. Naturwissenschaften *46*, 381–382.
— J. Schoeneich und R. Rieger. 1965. Chromosomenaberrationen bei *Vicia faba* und *Ascites*-tumoren der Maus nach Einwirkung von N-Nitroso-N-Methylharnstoff. Chromosoma *16*, 101–123.
Molé-Bajer J. 1958. Cine-micrographic analysis of C-mitosis in endosperm. Chromosoma *9*, 332–358.
Monesi V., M. Crippa und R. Zito-Bignami. 1967. The stage of chromosome duplication as revealed by X-ray breakage and ^{3}H-thymidine labelling. Chromosoma *21*, 369–386.
Morishima A., M. M. Grumbach und J. H. Taylor. 1962. Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. *48*, 756–763.
Moutschen-Dahmen J. und M. 1958. L'action du Myleran sur les chromosomes chez *Hordeum sativum* et chez *Vicia faba*. Hereditas *44*, 415–446.
Murin A. 1964. Der Mitosezyklus und seine Zeitparameter in den Wurzelspitzen von *Vicia faba*. Chromosoma *15*, 457–468.
Natarajan A. T. 1961. Chromosome breakage and mitotic inhibition induced by tritiated thymidine in root meristems of *Vicia faba*. Exp. Cell Res. *22*, 275–281.
— und M. D. Upadhya. 1964. Localized chromosome breakage induced by ethylmethanesulfonate and hydroxylamine in *Vicia faba*. Chromosoma *15*, 156–169.
Neary G. J., H. J. Evans und S. M. Tonkinson. 1959. A quantitative determination of the mitotic delay induced by gamma radiation in broad bean root meristems. J. Genet. *56*, 363–394.
Nichols C. 1941. Spontaneous chromosome aberrations in *Allium*. Genetics *26*, 89–100.
Nuotclà J. 1969. Histochemische Untersuchungen über Cytochromoxydase und Peroxydase in Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung von Äpfeln verschiedener Entwicklungsstufen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. *79*, 93–175.
Ockey C. H. 1957. A quantitative comparison between the cytotoxic effects produced by proflavine, acethyleneimine and triethylene melamine on root-tips of *Vicia faba*. J. Genet. *55*, 525–549.
— 1960. Chromatid aberrations by ethyleneimines. In Stubbe H. (Hrsg.): Chemische Mutagenese. Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med., 47–53.
Odmark G. und B. A. Kihlman. 1965. Effects of chromosome-breaking purine derivatives on nucleic acid synthesis and on the levels of adenosin 5′-triphosphate and deoxyadenosine 5′-triphosphate in bean root tips. Mutation Res. *2*, 274–286.
Okada S. 1958. Formation of hydroperoxides from certain amino acids and peptides in aqueous solutions by irradiation in the presence of oxygen. In: Latarjet R. (Ed.): Organic peroxides in radiobiology, 46–49. Pergamon Press, London.
Pelc S. R. und L. F. La Cour. 1959. Some aspects of replication of chromosomes. In: The cell nucleus. Proc. Faraday Soc. 1959, 232–237. Butterworth & Co. Ltd., London.

Pennington S.N. und C.E.Meloan. 1968. A study of radiation protection by sulfur compounds. Radiat. Bot. *8*, 345–353.

Pera F. 1968. Dauer der DNS-Replikation von Eu- und Heterochromatin bei *Microtus agrestis*. Chromosoma *25*, 21–29.

Perry R.P. 1964. In: Prescott D.M. (Ed.): Methods in cell physiology, Vol. 1, 305. Academic Press.

Peveling E. 1968. Der gegenwärtige Stand der Untersuchungen zur Aufklärung der Chromosomenstruktur. Cytologia *33*, 287–317.

Purr A. 1950. Zur Bestimmung pflanzlicher Peroxydasen. Biochem. Z. *321*, 1–18.

Quastler H. und F.G.Sherman. 1959. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Exp. Cell Res. *17*, 420–438.

Rao R.N. und A.T.Natarajan. 1967. Somatic association in relation to chemically induced chromosome aberrations in *Vicia faba*. Genetics *57*, 821–835.

Rapoport S.M. und H.J.Raderecht. 1962. Physiologisch-chemisches Praktikum. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin.

Read J. 1959. Radiation biology of *Vicia faba* in relation to the general problem. Blackwell, Oxford.

— 1961. Chromosome size, structure, and radiation damage. In: Effects of ionizing radiations on seeds, 217–226. Intern. Atomic Energy Agency, Vienna.

— und B.A.Kihlman. 1956. Comparison of the effects of 8-ethoxycaffeine and X-rays on the cytology and growth of roots of *Vicia faba*. Hereditas *42*, 487–507.

Reiss J. 1967. Prinzipien der histochemischen Lokalisation von Cytochromoxydase und Peroxydase. Mikroskopie *22*, 1–10.

Rensing L. 1969. Tagesperiodik von Zellfunktionen und Strahlenempfindlichkeit in Normal- und Tumorgewebe. Naturw. Rdsch. *22*, 390–396.

Revell S.H. 1953. Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in *Vicia*. Heredity *6*, Suppl., 107–124.

— 1959. The accurate estimation of chromatid breakage, and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations. Proc. Roy. Soc., Ser. B, *150*, 563–589.

— 1963. Chromatid aberrations; the generalized theory. In: Wolff S. (Ed.): Radiation-induced chromosome aberrations, 41–72. Columbia Univ. Press, New York.

Rieger R. 1966. Alternative Interpretationsversuche zur Entstehung chromosomaler Strukturumbauten: Bruchreunions- und Austauschhypothese. Biol. Zbl. *85*, 29–46.

— und H.Boehme. 1962. Strahleninduzierte Mutagenese: Gesichtspunkte des Genetikers. In: Stubbe H. (Hrsg.): Strahleninduzierte Mutagenese. Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med., 38–62.

— und A.Michaelis. 1958. Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem von *Vicia faba* L. I. Der Einfluss der Unterwasserquellung der Samen auf die chromosomale Aberrationsrate. Chromosoma *9*, 238–257.

— — 1959a. Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem von *Vicia faba* L. III. Weitere Befunde zur Entstehung und Wirkung «automutagener» Stoffwechselprodukte. Biol. Zbl. *78*, 291–307.

— — 1959b. Vergleichende Untersuchungen zur Verteilung durch verschiedene Mutagene induzierter Brüche über den Chromosomensatz von *Vicia faba* L. Chromosoma *10*, 163–178.

— — 1960a. Über die radiomimetische Wirkung von Äthylalkohol bei *Vicia faba*. In: Stubbe H. (Hrsg.): Chemische Mutagenese. Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med., 54–65.

— — 1960b. Chromatidenaberrationen nach Einwirkung von Äthylmethansulfonat (Methansulfonsäureäthylester) auf Primärwurzeln von *Vicia faba* L. Kulturpflanze *8*, 230–243.

— — 1962. Die Auslösung von Chromosomenaberrationen bei *Vicia faba* durch chemische Agenzien: Eine Übersicht. Kulturpflanze *10*, 212–292.

— — 1963. On the time period during which chemically induced chromatid breaks are available for interaction. Exp. Cell Res. *31*, 202–205.

— — 1967. Chromosomenmutationen. Gustav-Fischer-Verlag, Jena.

— — und M.M.Green. 1968. A glossary of genetics and cytogenetics, classical and molecular. Springer-Verlag.

Ruthmann A. 1966. Methoden der Zellforschung. Kosmos, Franckhsche Verlagshandlung, Stuttgart.

Rutishauser A. 1963. Cytogenetik transplantabler tierischer und menschlicher Tumoren. Neujahrsbl. Naturf. Ges. Zürich 1.

Rutishauser A. und W. Bollag. 1967. Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Procarbazin (Natulan). Experientia *23*, 222–223.
Sax K. 1940. Analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. Genetics *25*, 41–68.
— und C. P. Swanson. 1941. Differential sensitivity of cells to X-rays. Amer. J. Bot. *28*, 52–59.
Schindler R. 1965. Die tierische Zelle in Zellkultur. Springer-Verlag.
Schmid W. 1963. DNA replication patterns of human chromosomes. Cytogenetics *2*, 175–193.
— und M. F. Leppert. 1968. Mammalian X-chromosomes: A new kind of composite-type X in the vole *Arvicola scherman* exitus Miller. Experientia *24*, 277–279.
Schoeneich J. 1966. Zur Frage der mutagenen Wirkung von Äthylalkohol. Humangenetik *3*, 84–85.
— 1967. The induction of chromosomal aberrations by hydrogen peroxide in strains of *ascites* tumours in mice. Mutation Res. *4*, 384–388.
Scholes G. 1963. The radiation chemistry of aqueous solutions of nucleic acids and nucleoproteins. Progr. Biophys. *13*, 60–104.
— und J. J. Weiss. 1959. Oxygen effects and formation of peroxides in aqueous solutions. Radiat. Res., Suppl. *1*, 177–189.
— — 1960. Organic hydroxyhydroperoxides: A class of hydroperoxides formed under the influence of ionizing radiations. Nature *185*, 305–306.
— — 1962. Effects of ionizing radiations on nucleic acids and nucleoproteins. In: Stubbe H. (Hrsg.): Strahleninduzierte Mutagenese. Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med., 94–101.
Schwarz H. A. 1964. Recent research on the radiation chemistry of aqueous solutions. Advanc. Radiat. Biol. *1*, 1–32.
Scott D. 1968. The additive effect of X-rays and maleic hydrazide in inducing chromosomal aberrations at different stages of the mitotic cycle in *Vicia faba*. Mutation Res. *5*, 65–92.
— und H. J. Evans. 1964. On the non-requirement for DNA-synthesis in the production of chromosome aberrations by 8-ethoxycaffeine. Mutation Res. *1*, 146–156.
— — 1967. X-ray-induced chromosomal aberrations in *Vicia faba:* Changes in response during the cell cycle. Mutation Res. *4*, 579–599.
Shaw M. W. und M. M. Cohen. 1965. Chromosome exchanges in human leukocytes induced by mitomycin C. Genetics *51*, 181–190.
Sobels F. H. 1954a. Mutagenicity of dihydroxymethylperoxide. Drosophila Inform. Serv. *28* 156–157.
— 1954b. Mutation tests with a formaldehyde-hydrogen peroxide mixture in *Drosophila*. Amer. Nat. *88*, 109–112.
— 1956. Organic peroxides and mutagenic effects in *Drosophila*. Nature *177*, 979–980.
— 1958. Presumptive indication of radiation-produced peroxide as shown by its genetic effects in *Drosophila*. In: Latarjet R. (Ed.): Organic peroxides in radiobiology, 74–85. Pergamon Press, London.
— 1963. Peroxides and the induction of mutations by X-rays, ultraviolet, and formaldehyde. Radiat. Res., Suppl. *3*, 171–183.
Sommermeyer K. und H. Magnus. 1962. Die Erzeugung von organischen Peroxyden hoher biologischer Wirksamkeit durch Bestrahlung von Agar mit hohen Dosisleistungen. In: Stubbe H. (Hrsg.): Strahleninduzierte Mutagenese. Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med., 102–105.
Sparrman B., L. Ehrenberg und A. Ehrenberg. 1959. Scavenging of free radicals and radiation by nitric oxide in plant seeds. Acta Chem. Scand. *13*, 199–200.
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.
— M. J. Moses und R. Steele. 1952. A cytological and cytochemical approach to an understanding of radiation damage in dividing cells. Brit. J. Radiol. *25*, 182–188.
— R. L. Cuany, J. P. Miksche und L. A. Schairer. 1961. Some factors affecting the responses of plants to acute and chronic radiation exposures. Radiat. Bot. *1*, 10–34.
Sumner J. B. und K. Myrbaeck. 1951. The enzymes, chemistry and mechanism of action. Vol. II, part I. New York.
Swanson C. P. 1960. Cytologie und Cytogenetik. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.
— und T. Merz. 1959. Factors influencing the effect of β-propiolactone on chromosomes of *Vicia faba*. Science *129*, 1364–1365.
Swartz H. M., R. P. Molenda und R. T. Lofberg. 1965. Long-lived radiation-induced electron spin resonances in an aqueous biological system. Biochem. Biophys. Res. Commun. *21*, 61–65.

Taylor J.H. 1958. The organization and duplication of genetic material. Proc. X. Int. Congr. Genet. *1*, 63–78.
— 1960. Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese Hamster. J. Biochem. Biophys. Cytol. *7*, 455–464.
— 1963. The replication and organization of DNA in chromosomes. In: Taylor J.H. (Ed.): Molecular genetics, part I, 65–111. Academic Press.
— 1966. The duplication of chromosomes; 3. Symp. der Naturforscher, 9–26.
— W.F. Haut und J. Tung. 1962. Effects of fluorodeoxyuridine on DNA replication, chromosome breakage, and reunion. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. *48*, 190–198.
Thoday J.M. 1951. The effect of ionizing radiations on the broad bean root. IX. Chromosome breakage and the lethality of ionizing radiations to the root meristem. Brit. J. Radiol. *24*, 572–576 und 622–628.
— 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, deoxyribose-nucleic acid synthesis and the mitotic cycle in root-meristem cells of *Vicia faba*. New Phytologist *53*, 511–516.
— und J. Read. 1947. Effect of oxygen on the frequency of chr. mosome aberrations produced by X-rays. Nature *160*, 608.
— — 1949. Effect of oxygen on the frequency of chromosome aberrations produced by alpha-rays. Nature *163*, 133–134.
Trosko J.F. und S. Wolff. 1965. Strandedness of *Vicia faba* chromosomes as revealed by enzyme digestion studies. J. Cell Biol. *26*, 125–136.
van Fleet D.S. 1947. The distribution of peroxidase in differentiating tissues of vascular plants. Biodynamica *6*, 125–140.
— 1959. Analysis of the histochemical localization of peroxidase related to the differentiation of plant tissues. Can. J. Bot. *37*, 449–458.
— 1962. In: Handbuch der Histochemie VII/2, Enzyme. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.
van't Hof J. 1965. Discrepancies in mitotic cycle time when measured with tritiated thymidine and colchicine. Exp. Cell Res. *37*, 292–299.
— G.B. Wilson und A. Colon. 1960. Studies on the control of mitotic activity. Chromosoma *11*, 313–321.
Wacker A. 1962. Strahlenchemische Veränderungen der Nukleinsäuren in vivo und in vitro. In: Stubbe H. (Hrsg.): Strahleninduzierte Mutagenese. Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med., 84–93.
Walling Ch. 1963. Chemistry of the organic peroxides. Radiat. Res., Suppl. 3, 3–16.
Wanner H. 1950. Histologische und physiologische Gradienten in der Wurzelspitze. Ber. Schweiz. Bot. Ges. *60*, 404–425.
Warburg O. 1964. The mechanism of biological X-rays action. Naturwissenschaften *51*, 373–376.
Weiss J.J. 1958. Some effects of oxygen and the radiation-induced formation of hydroperoxides from nucleic acids and related compounds. In: Latarjet R. (Ed.): Organic peroxides in radiobiology, 42–45. Pergamon Press, London.
Weitzel G., E. Buddecke und F. Schneider. 1961. Cytostatische Effekte organischer Persauerstoffverbindungen gegenüber *Ascites*-Krebszellen. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *323*, 211–235.
— — — und H. Pfeil. 1961. Einwirkung organischer Persauerstoffverbindungen auf das Mäuse-*Ascites*carcinom in vivo. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *325*, 65–90.
Wieland H. und H. Sutter. 1930. Beiträge zur Wirkungsweise von Oxydasen und Peroxydasen. XXII. Mitteilung über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. Ber. Dtsch. Chem. Ges. *63*, 66–75.
— und A. Wingler. 1923. Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. V. Zur Oxydation der Aldehyde. Liebigs Ann. Chem. *431*, 301–322.
Wimber D.E. 1959. Chromosome breakage produced by tritium-labelled thymidine in *Tradescantia paludosa*. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. *45*, 839–846.
— 1960. Duration of the nuclear cycle in *Tradescantia paludosa* root tips as measured with ^{3}H-thymidine. Amer. J. Bot. *47*, 828–834.
— 1961. Asynchronous replication of deoxyribonucleic acid in root tip chromosomes of *Tradescantia paludosa*. Exp. Cell Res. *23*, 402–407.
— und H. Quastler. 1963. A ^{14}C- and ^{3}H-thymidine double labelling technique in the study of cell proliferation in *Tradescantia* root tips. Exp. Cell Res. *30*, 8–22.

Wolfe S.L. und P.G. Martin. 1968. The ultrastructure and strandedness of chromosomes from 2 species of *Vicia*. Exp. Cell Res. *50*, 140–150.
Wolff S. 1954. Delay of chromosome rejoining in *Vicia faba* induced by irradiation. Nature *173*, 501.
— 1959. Interpretation of induced chromosome breakage and rejoining. Radiat. Res., Suppl. *1*, 453–462.
— 1969. The splitting of human chromosomes into chromatids in the absence of either DNA or protein synthesis. Mutation Res. *8*, 207–214.
— und K.C. Atwood. 1954. Independent X-ray effects on chromosome breakage and reunion. Proc. nat. Acad. Sci. Wash. *40*, 187–192.
— und H.E. Luippold. 1964. Chromosome splitting as revealed by combined X-ray and labelling experiments. Exp. Cell Res. *34*, 548–556.
— und D. Scott. 1969. Repair of radiation-induced damage to chromosomes. Independence of known DNA dark repair mechanisms. Exp. Cell Res. *55*, 9–16.
Woll E. 1953. Einwirkung von Nukleinsäuren und ihren Baustoffen auf die Wurzelspitzenmitosen. Chromosoma *5*, 391–427.
Zimmer K.G. 1959. Evidence for free-radical production in living cells exposed to ionizing radiations. Radiat. Res., Suppl. *1*, 519–529.
— 1960. Studien zur quantitativen Strahlenbiologie. Akad. Wiss. u. Lit. in Mainz, Abh. math.-naturwiss. Kl., Jg. 1960, Nr. 3.
Zweidler A. 1965. Struktur und Replikation der Chromosomen; autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin, ^{3}H-Arginin und ^{3}H-Lysin an Wurzelspitzen von *Allium cepa*. Diss. Universität Zürich.

Felix Keusch,
Strahlenbiologisches Institut der Universität Zürich,
August-Forel-Strasse 7, 8008 Zürich