

KFK-34

# KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

OKTOBER 1960

KFK 34

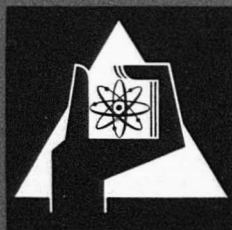
INSTITUT FÜR STRAHLENBIOLOGIE

ÜBER DIE ABHÄNGIGKEIT DER RATE STRAHLENINDUZIERTER TRANSLOKATIONEN  
UND REZESSIV-GESCHLECHTSGEBUNDENER LETALFAKTOREN VOM STADIUM DER  
SPERMATOGENESE BEI DROSOPHILA MELANOGASTER

H. TRAUT

5. DEZ. 1960

**KERNREAKTOR**  
Bau- und Betriebs-Gesellschaft m. b. H.  
Zentralbücherei



KERNREAKTOR

BAU- UND BETRIEBS-GESELLSCHAFT M. B. H.

KARLSRUHE

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

ÜBER DIE ABHÄNGIGKEIT DER RATE STRAHLENINDUZIERTER  
TRANSLOKATIONEN UND REZESSIV GESCHLECHTSGEBUNDENER  
LETALFAKTOREN VOM STADIUM DER SPERMATOGENESE  
BEI *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Von

H. TRAUT

(Eingegangen am 29. März 1960)

Untersuchungen über die Abhängigkeit strahleninduzierter Mutationen vom Reifegrad der bestrahlten Keimzellen bei *Drosophila* erscheinen — von den theoretischen Folgerungen abgesehen, die man aus ihnen ziehen kann — schon deshalb erforderlich, weil die Reifegradabhängigkeit einen wesentlichen *methodischen* Faktor bei strahlengenetischen Experimenten darstellt.

Im folgenden sollen unsere Ergebnisse zu diesem Thema mitgeteilt und betrachtet werden. Insbesondere wird versucht, eine bis heute bestehende Unklarheit über die Reifegradabhängigkeit der Rate strahleninduzierter Translokationen zu klären: CATSCH und RADU (1943) weisen im Gegensatz zu anderen Autoren<sup>1</sup> (AUERBACH 1954, CLARK 1954, MULLER 1954, GLASS 1955, SCHACHT 1958, STROMNAES 1959) in unreifen Keimzellen *kein* Sensibilitätsmaximum nach, obwohl ihren Untersuchungen das vergleichsweise größte Zahlenmaterial zugrunde liegt. Hierauf haben GLASS (1955, 1956) und FRITZ-NIGGLI (1958, 1959) wiederholt hingewiesen.

#### Methodik

Für unsere Reifegraduntersuchungen verwendeten wir einen „Zweizweckstamm“, der die Erfassung von Translokationen und rezessiv geschlechtsgebundenen Letalfaktoren aus den Nachkommen der gleichen bestrahlten Väter erlaubt. Bestrahlte  $B \delta\delta$  wurden hierzu mit  $y sc^{81} In 49 sc^8; bw; st \varphi\varphi$  gekreuzt<sup>2</sup>. Wegen Einzelheiten dieser Technik sei auf OSTER (1958) verwiesen. Brutmuster: A = 1. Tag, B = 2. bis 3. Tag, C = 4. bis 5. Tag, D = 6. bis 8. Tag, E = 9. bis 11. Tag. (Von einer feineren Unterteilung des Brutmusters, etwa wie bei MOSSIGE in eintägige Perioden, wurde abgesehen, da die Untersuchungen nicht nur dem Gesichtspunkt der Reifegradabhängigkeit, sondern — als Kontrollen — einer anderen, hier nicht interessierenden Fragestellung untergeordnet waren. Das Entsprechende gilt für die folgenden 4000 r-Versuche.) Geschlechtsverhältnis  $P \varphi\varphi: P \delta\delta = 3:1$ . Alter der  $P \delta\delta$ : 4 bis 6 Tage. Temperatur:  $25 \pm 1^\circ C$ . Als Futter diente das übliche Medium aus Maismehl, Sirup, Agar-Agar und Hefe. P-Kulturgläser etwa 50 cm<sup>3</sup> Futter enthaltend. Es wurden nur Translokationen zwischen dem 2. und 3. Chromosom ausgewertet; auf die Erfassung von Y-Translokationen wurde verzichtet aus Gründen, die MULLER (1954) anführt. Bestrahlungsbedingungen: 3000 r, 20 r/min, 150 kV, 10 mA, HWS = 1,3 mm Cu + 1,0 mm Al. (Die niedrige Dosisrate aus einem hier unwesentlichen Grund.)

Bei der Nachprüfung der Ergebnisse von CATSCH und RADU dienten wie dort als rezessive markers des 2. bzw. 3. Chromosoms *cn* und *ss*. Um jedoch auch Translokationen mit dem X-Chromosom erfassen zu können, wurden  $P \varphi\varphi$  mit  $\overline{XX}$  verwendet. Geschlechtsverhältnis

<sup>1</sup> Zur besseren Vergleichbarkeit werden nur an *Drosophila melanogaster* bei Röntgenbestrahlung in Luft mit Hilfe der Brutmustertechnik durchgeführte Untersuchungen zitiert.

<sup>2</sup> Dieser von Herrn Dr. I. OSTER (Philadelphia) konstruierte Stamm wurde uns von Frau Dr. CH. AUERBACH (Edinburgh) zur Verfügung gestellt. Beiden sei hier bestens gedankt.

P ♀♀: P ♂♂ = 3:1 bzw. 1:1. Alter der P ♂♂ (Berlin wild) durchschnittlich 5 Tage. Temperatur  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ . Brutmuster: A = 1. Tag, B = 2. bis 4. Tag, C = 5. bis 8. Tag. Bestrahlungsbedingungen: 4000 r, meist etwa 500 r/min, 150 kV, 20 mA, HWS = 6 mm Al. Mehrere kleinere Versuche wurden hier, nachdem die Prüfung auf Heterogenität in den einzelnen Bruten negativ ausgefallen war, zusammengefaßt.

### Ergebnisse und Diskussion

Ein Vergleich mit dem bisher von einer Reihe anderer Autoren erarbeiteten Bild läßt eine Diskussion der in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse in den folgenden Punkten wünschenswert erscheinen:

Tabelle 1. Die mit Hilfe eines Zweizweckstammes ermittelten Raten von II—III-Translokationen und rezessiv geschlechtsgebundenen Letalfaktoren in Abhängigkeit vom Reifegrad

Im Zähler: Zahl der gefundenen Translokationen bzw. Letalen; im Nenner: Zahl der geprüften Gameten. 3000 r. GVP = 3 ♀♀:1 ♂. (Für die außerordentlich geringe Nachkommenzahl in Brut D sind verschiedene Ursachen denkbar: Dominant—Letale, Spermienmangel, Mitoseverzögerung.)

Brutmuster	II—III- Translokationen	Letalfaktoren	Statistische Prüfung der Unterschiede ( $\chi^2$ -Methode)	
			Translokationen	Letale
A (1. Tag) . . . .	7,9% (31/392)	7,7% (38/495)	$P_{A/B} < 0,001$	$P_{A/B} = 0,11$
B (2.— 3. Tag) . .	2,3% (11/483)	5,4% (38/703)	$P_{B/C} < 0,001$	$P_{B/C} = 0,05$
C (4.— 5. Tag) . .	8,2% (23/279)	8,4% (37/441)		
D (6.— 8. Tag) . .	— (0/6)	— (3/9)	$P_{C/E} < 0,01$	$P_{C/E} = 0,01$
E (9.—11. Tag) . .	2,9% (9/310)	4,3% (18/423)		

1. Nach MOSSIGE (1956, 1959, sowie persönl. Mitteilung) ergeben kleine Dosen (etwa bis 2000 r) *kein* Absinken der Empfindlichkeit vom 1. Tag auf den (die) folgenden. Als Erklärung kommen wohl folgende Möglichkeiten in Frage: a) Mit kleiner werdenden Mutationsraten bzw. Dosen bleibt das Empfindlichkeitsverhältnis des 1. und 2. (+ 3.) Tages zwar konstant, doch nimmt die Empfindlichkeitsdifferenz zwangsläufig ab, so daß diese bei kleinen Dosen nur noch an sehr großem Zahlenmaterial nachzuweisen sein wird. b) Das geringe Alter (0—4 Std) der von MOSSIGE bestrahlten ♂♂ verhindert eine Erhöhung der Rate des 1. Tages, da zur Zeit der Bestrahlung zu wenig reife (= relativ sensible) Spermatozoen vorhanden sind. c) Der Effekt ist dosisabhängig, derart, daß er mit kleiner werdender Dosis abnimmt.

2. Die relativ niedrig erscheinende Rate von Brut B (2. bis 3. Tag) könnte mit *recovery* in reifen Spermatozoen erklärt werden, eine Erklärung, wie sie NORDBACK und AUERBACH (1956) dem Ergebnis ihrer Untersuchungen über die Reduktion genetischer Schäden am 2., verglichen mit dem 1., Tag zugrunde legen. Dies setzt voraus, daß nicht alle zur Zeit der Bestrahlung reifen Spermien bereits in den ersten 24 Std (Brut A) verbraucht werden, sondern zum Teil erst in Brut B (2. bis 3. bzw. 4. Tag), um hier — infolge *recovery* — die Rate zu erniedrigen. Andererseits wäre auch folgendes denkbar: Dem sich in Brut B manifestierenden postmeiotischen Sensibilitätsminimum dürften zum Teil *Spermatiden* zugrunde liegen, da nach BATEMAN (1958) bei entsprechender Brutmuster-technik postmeiotische Stadien nicht länger als 5 Tage nach der Bestrahlung analysiert werden. Nimmt man nun an, daß die in Brut B analysierten Spermatiden relativ unempfindlich sind, so ergäbe sich hieraus ein Hinweis für die Ursache

dieses Minimums. Zur Rechtfertigung dieser Annahme sei auf die Interphasenstruktur typischer Spermatidenkerne (u. a. RIS 1958) hingewiesen, wie sie deren besonders intensivem Stoffwechsel entspricht (ALFERT 1958): Sowohl große Stoffwechselaktivität (falls diese geringen intrazellulären Gehalt an freiem Sauerstoff zur Folge hat), wie Interphasenstruktur (mit diffusen Chromosomen) werden aber zur Interpretierung geringer Empfindlichkeit von Chromosomen gegenüber Strahlenwirkung herangezogen; auch sind verschiedene Gründe für eine relativ hohe Restitutionshäufigkeit von Chromosomenbrüchen in der Interphase denkbar.

3. Das Verhältnis Letalenrate/Translokationsrate ist offensichtlich reifegradabhängig; Betrachtungen hierüber sollen aber nicht vor weiteren Untersuchungen dieser Art erfolgen (vgl. auch AUERBACH 1954 und NORDBACK u. AUERBACH 1956).

Unseren Befunden zur eingangs erwähnten Diskrepanz bei den Translokationsuntersuchungen seien die Werte von CATSCH und RADU vorangestellt.

Vergleicht man die Tabellen 1 und 2, so erkennt man, daß das gegen Ende der Brut B<sub>1</sub> zu erwartende Sensibilitätsmaximum fehlt. Als Erklärung sind 2 Möglichkeiten denkbar: Die für B<sub>1</sub> ermittelte Rate kann erstens das Ergebnis der „Kompensation“ einer niedrigen Rate am Anfang (vgl. Tabelle 1, Brut B) und der sehr hohen Rate gegen

Ende dieser Brut sein (eigentliches Sensibilitätsmaximum, vgl. Tabelle 1, Brut C). Zweitens könnte das Geschlechtsverhältnis ♀:♂ der Eltern (fortan mit GVP abgekürzt) von Einfluß sein, indem eine zu niedrige Zahl von P ♀♀ pro P ♂♂ den völligen Verbrauch der in der betreffenden Brut befruchtungsfähigen Spermien verhindert, so daß ein Teil davon erst in der nächsten Brut abgesetzt wird. Dadurch würden aber Unterschiede der aufeinanderfolgenden Raten verwischt. Beide Möglichkeiten sollen im folgenden geprüft werden.

Zunächst wird untersucht, ob die erste der beiden Möglichkeiten *allein* zur Erklärung genügt. Hierzu wurde die große Brut B<sub>1</sub> zwar in zwei kleinere (B<sub>2</sub> + C<sub>2</sub><sup>1</sup>) zerlegt, jedoch ein GVP zugrunde gelegt, das dem von CATSCH und RADU verwendeten entspricht: 1:1. (Wahrscheinlich betrug das damalige GVP sogar nur 1 ♀ pro 3 ♂♂, CATSCH mündl. Mitteilung.)

Wie Tabelle 3 zeigt, tritt zwar zwischen B<sub>2</sub> und C<sub>2</sub> ein Unterschied in der erwarteten Richtung auf, jedoch schwach und statistisch ungesichert. Doch erhält man, wie zu fordern, durch „Zusammenlegen“ von B<sub>2</sub> und C<sub>2</sub> eine II—III-Translokationsrate (56/888 = 6,3%), die dem von CATSCH und RADU für Brut B<sub>1</sub> ermittelten Wert (6,2%) gut entspricht.

Als nächstes soll daher untersucht werden, ob sich bei zusätzlicher Berücksichtigung der anderen Möglichkeit (GVP) das in Brut C zu vermutende Sensibilitätsmaximum deutlicher manifestiert.

Tabelle 2. Die von CATSCH und RADU (1943) festgestellte Abhängigkeit der Translokationsrate vom Reifegrad

4000 r, 70 kV, 0,5 mm Al-Filter, 66,7 r/min. (Die Indizes an den Brutbezeichnungen aus Vergleichsgründen.) GVP ≤ 1 ♀: 1 ♂.

Brutmuster	II—III-Translokationen
A <sub>1</sub> (1. Tag) . . .	11,96 % (306/2559)
B <sub>1</sub> ( 2.— 7. Tag) .	6,21 % (92/1483)
C <sub>1</sub> ( 8.—13. Tag) .	6,89 % (78/1133)
D <sub>1</sub> (14.—19. Tag) .	1,37 % (21/1532)
E <sub>1</sub> (20.—25. Tag) .	0,10 % (1/1028)
F <sub>1</sub> (26.—31. Tag) .	— (0/629)

<sup>1</sup> Die Einbeziehung des 8. Tages in Brut C<sub>2</sub> ist wegen der hohen ♂-Sterilität zu dieser Zeit ohne Einfluß.

Tabelle 3. Die Translokationsrate in Abhängigkeit vom Reifegrad  
Gesamttranslokationen = II—III, X—II, X—III, X—II—III. 4000 r. GVP = 1 ♀: 1 ♂.

Brutmuster	II—III- Translokationen	Gesamt- Translokationen	Statistische Prüfung der Unterschiede ( $\chi^2$ -Methode)	
			Translokationen	Gesamt- Translokationen
A <sub>2</sub> (1. Tag) . . . .	9,0% (41/455)	11,9% (54/455)	$P_{A/B} = 0,05$	$P_{A/B} = 0,04$
B <sub>2</sub> (2.—4. Tag) . . .	5,8% (37/634)	8,2% (52/634)	$P_{B/C} = 0,36$	$P_{B/C} = 0,14$
C <sub>2</sub> (5.—8. Tag) . . .	7,5% (19/254)	11,4% (29/254)		

Wie Tabelle 4 zeigt, hat die relativ größere P ♀♀-Zahl tatsächlich eine deutlichere Ausprägung des Sensibilitätsmaximums (C<sub>3</sub>) zufolge. Auch hier stimmt die durch „Zusammenlegen“ von B<sub>3</sub> und C<sub>3</sub> errechnete II—III-Translokationsrate (118/1799 = 6,6%) gut mit dem entsprechenden von CATSCH und RADU gefundenen Wert (6,2%) überein.

Tabelle 4. Wie Tabelle 3, jedoch GVP = 3 ♀♀: 1 ♂

Brutmuster	II—III- Translokationen	Gesamt- Translokationen	Statistische Prüfung der Unterschiede ( $\chi^2$ -Methode)	
			Translokationen	Gesamt- Translokationen
A <sub>3</sub> (1. Tag) . . . .	10,1% (79/784)	12,2% (96/784)	$P_{A/B} < 0,001$	$P_{A/B} < 0,001$
B <sub>3</sub> (2.—4. Tag)	5,9% (100/1683)	7,2% (121/1683)	$P_{B/C} < 0,001$	$P_{B/C} < 0,001$
C <sub>3</sub> (5.—8. Tag)	15,5% (18/116)	18,1% (21/116)		

Vergleicht man die Tabellen 3 und 4, so erkennt man den Zusammenhang zwischen GVP, Nachkommenzahl pro Brut und Mutationsrate pro Brut: Je weniger P ♀♀ pro P ♂ (z.B. 1:1), desto mehr bereits in B befruchtungsfähige Spermatozoen werden erst in C verbraucht, desto größer die relative Nachkommenzahl und desto niedriger (wegen der relativ niedrigen B-Rate) die Rate in C. Entsprechend das Umgekehrte gilt bei relativer großer P ♀♀-Zahl (z.B. 3:1).

Somit dürfte der Widerspruch, in dem die Ergebnisse von CATSCH und RADU zu denen anderer Autoren stehen, insofern nur ein scheinbarer sein, als er sich auf verschiedene Versuchsbedingungen (Brutmustereinteilung, GVP) zurückführen läßt.

#### Zusammenfassung

1. Mittels eines Zweizweckstammes wurde die Abhängigkeit strahleninduzierter Translokationen und rezessiv geschlechtsgebundener Letalfaktoren vom Reifegrad der bestrahlten Keimzellen bei *Drosophila melanogaster* untersucht und diskutiert.

2. Ein bisher bestehender Widerspruch in der Reifegradabhängigkeit strahleninduzierter Translokationen ließ sich auf Unterschiede in der Versuchsanordnung zurückführen: Neben entsprechender Brutmustereinteilung erwies sich ein P ♀♀-Überschuß im Verhältnis 3:1 als notwendig zur Erfassung des im Bereich unreifer Keimzellen zu erwartenden Sensibilitätsmaximums.

#### Summary

1. Utilizing a dual-purpose stock of *Drosophila melanogaster* the dependence of radiation induced translocations and recessive sex-linked lethals on the stage of spermatogenesis was investigated and is discussed.

2. A formerly existing discrepancy in the dependence of radiation induced translocations on the stage of maturity of the irradiated germ cells is explained by differences in experimental procedure: Besides an adequate subdivision of the brood pattern an excess of P-females in the ratio of 3:1 was necessary for obtaining maximum sensibility expected in the region of immature germ cells.

Fräulein U. APITZSCH danke ich für ihre Hilfe bei der technischen Durchführung der Untersuchungen.

#### Literatur

- ALFERT, M.: Cytochemische Untersuchungen an basischen Kernproteinen während der Gametenbildung, Befruchtung und Entwicklung. 9. Coll. Ges. physiol. Chemie, 17. bis 19. April 1958, Mosbach (Baden). Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer.
- AUERBACH, C.: The brood pattern of X-ray-induced rearrangements. Dros. Inform. Serv. 28, 101 (1954).
- BATEMAN, A. J.: Mutations in irradiated spermatocytes. Dros. Inform. Serv. 32, 113 (1958).
- CATSCH, A., u. G. RADU: Über die Abhängigkeit der röntgeninduzierten Translokationsrate vom Reifezustand der bestrahlten Gameten bei *Drosophila melanogaster*-♂♂. Naturwissenschaften 31, 368 (1943).
- CLARK, A. M.: Sensitive periods and apparent fractionation effects in irradiated *Drosophila*. Amer. Naturalist 89, 179 (1955).
- FRITZ-NIGGLI, H.: Mögliche Ursachen der verschiedenen Strahlenempfindlichkeit des Erbmaterials in Keimzellen unterschiedlichen Alters. Naturwissenschaften 45, 557 (1958).
- FRITZ-NIGGLI, H.: Strahlenbiologie. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- GLASS, B.: A comparative study of induced mutation in the oocytes and spermatozoa of *Drosophila melanogaster*. I. Translocation and inversions. Genetics 40, 252 (1955).
- GLASS, B.: Differences in the mutability during different stages of gametogenesis in *Drosophila*. "Mutation", Brookhaven Symp. Biol. 8, 148 (1956).
- MOSSIGE, J. C.: The relative biological efficiency of 31 MeV betatron X-irradiation and 175 keV X-rays as measured by recessive sex-linked lethals in *Drosophila melanogaster*. Progr. Radiobiol. 137 (1956).
- MOSSIGE, J. C.: Studies on linearity and RBE in *Drosophila* sperm. Second report from Norsk Hydro's Institute for Cancer Res. 18 (1959).
- MULLER, H. J.: The relation of neutron dose to chromosome changes and point mutations in *Drosophila*. I. Translocations. Amer. Naturalist 88, 437 (1954).
- NORDBACK, K., and C. AUERBACH: Recovery of chromosomes from X-ray damage. Advances in radiobiology, Stockholm 1956, pp. 481—485. Edinburgh u. London: Oliver & Boyd.
- OSTER, I.: Radiosensitivity. Genen en Phaenen 3, 53 (1958).
- RIS, H.: Die Feinstruktur des Kerns während der Spermiogenese. 9. Coll. Ges. physiol. Chemie, 17.—19. April 1958, Mosbach (Baden). Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer.
- SCHACHT, L. E.: The time of X-ray induction of crossovers and of translocations in *Drosophila melanogaster* males. Genetics 43, 665 (1958).
- STROMNAES, O.: Stock differences in X-ray mutational sensitivity pattern of *Drosophila melanogaster*. Hereditas (Lund) 45, 221 (1959).

Dr. H. TRAUT,  
Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe,  
Karlsruhe, Weberstr. 5