

A. Ex.

KFK-192

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM  
KARLSRUHE**

Oktober 1963

KFK 192

Institut für Strahlenbiologie

*Gesellschaft für Kernforschung m. B. H.  
Zentralbücherei*

Genomveränderungen bei erworbener Strahlenresistenz

Sridhara Bhaskaran, Wolfgang Dittrich



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.  
KARLSRUHE

*Sonderdruck aus*

**STRAHLENTHERAPIE Band 122, Heft 2 (1963)**

Herausgegeben von J. Becker, R. Birkner, H. Langendorff, H. Meyer

VERLAG URBAN & SCHWARZENBERG / MÜNCHEN UND BERLIN

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung vorbehalten

**DUROKOPPIERT**

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H. Karlsruhe

2

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

## **Genomveränderungen bei erworbener Strahlenresistenz**

Von

**Sridhara Bhaskaran und Wolfgang Dittrich**

Mit 9 Abbildungen

Durch Serienbestrahlung mit subletalen Röntgendosen kann beim Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus eine Strahlenresistenz induziert werden, und zwar ebenso bei Bestrahlung der Tumorzellen *in vivo* [2] wie auch *in vitro* [1, 5]. Die *in vivo* unter relativem O<sub>2</sub>-Mangel induzierte Strahlenresistenz erweist sich als stabiles, noch nach zahlreichen Tierpassagen nachweisbares Merkmal [2]. Es erhebt sich nun die Frage, ob das gleiche für eine *in vitro* bei O<sub>2</sub>-Sättigung induzierte Strahlenresistenz gilt. Zur Klärung dieser Frage besonders geeignet erschien eine Linie des Ehrlich-Tumors, welche durch Serienbestrahlung von Aszitesflüssigkeit in O<sub>2</sub>-Atmosphäre aus der Ausgangslinie gewonnen worden war. Diese Linie verhielt sich in früheren Versuchen unter aeroben Bedingungen strahlenresistenter als die Ausgangslinie [1] — eine insofern bemerkenswerte Beobachtung, als einige Autoren [4, 7, 9] die „Maskierung“ von Resistenzunterschieden durch Sauerstoff beschrieben haben. Weiterhin war es von Interesse zu prüfen, ob eine etwa beobachtete, bleibende Resistenzänderung mit einer vielleicht geringen, jedoch bleibenden Änderung von Chromosomenzahl und Chromosomenmorphologie einhergeht, zumal ja verschiedentlich schon nach einmaliger, akuter Einwirkung von Röntgenstrahlen auf maligne Tumoren eine beträchtliche, allerdings reversible Zunahme der mittleren Chromosomenzahl pro Tumorzelle beschrieben worden ist.

### *Material und Methode*

Zur Verfügung standen 3 hyperdiploide Linien des Ehrlich-Aszites-Tumors (ELD, SOELD 1, SOELD 2) und eine hypertetraploide Linie (ET). Bei den hyperdiploiden Linien handelte es sich um die nicht serienbestrahlte Lettrésche Form des Ehrlich-Tumors (ELD) und um 2 aus dieser Ausgangsform durch Serienbestrahlung mit einer Gesamtdosis von 15 kR (SOELD 1) und von 17 kR (SOELD 2) unter aeroben Bedingungen hervorgegangene neue Linien. Als Wirtstiere benutzt wurden 25 bis 30 g schwere männliche Mäuse des Inzuchtstammes NMRI des Zentralinstituts für Versuchstierzucht. Sie wurden mindestens schon 10 Tage vor Beginn des Überlebensversuchs zu je 3 in Plastik Käfige gesetzt, wo sie bis zu ihrem Tode bzw. bis zum Ende des Versuchs verblieben. Die Raumtemperatur betrug  $24 \pm 1^\circ \text{C}$ , die Luftfeuchtigkeit 60 bis 70%. Während der Überlebensversuche wurden sämtliche Käfige täglich 2mal inspiziert und tote

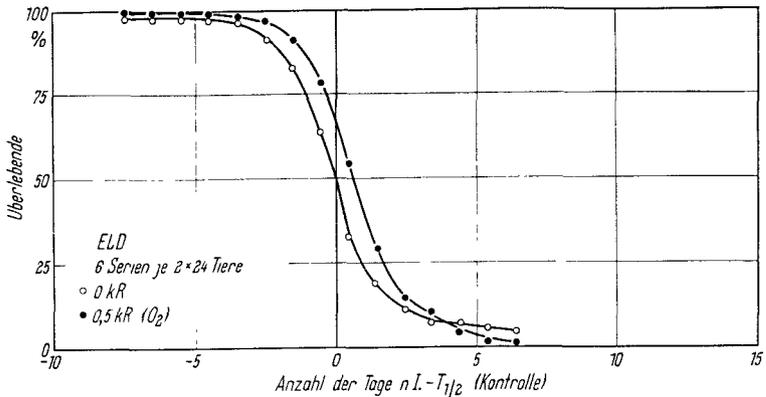


Abb. 1. Absterbeordnung von Mäusen nach Beimpfung mit  $2 \times 10^7$  Zellen der Linie ELD. Röntgenbestrahlung des Transplantats (0,5 kR in  $O_2$ -Atmosphäre). Ordinate: Überlebende in %. Abszisse: Anzahl der Tage nach Beimpfung, vermindert um Halbwertszeit  $T_{1/2}$  der Kontrolle.

Tiere sofort entfernt. Jede Serie der Überlebensversuche enthielt 2 Gruppen von je 24 Tieren, von denen die eine — die Kontrollgruppe — mit nicht bestrahlten und die andere — die Bestrahlungsgruppe — mit gleich vielen ( $2 \times 10^7$  Zellen/Tier), jedoch nunmehr röntgenbestrahlten (150 kV, 20 mA, 0,5 mm Cu, 500 R/min) Tumorasziteszellen beimpft worden war. Die gewaschenen Asziteszellen beider Gruppen entstammten einem für jede Serie stets frisch hergestellten Gemisch aus mehreren, nicht ikterisch verfärbten Asziten. Die Röntgenbestrahlung erfolgte in sterilen, geschlossenen, runden Plastikgefäßen, in denen die Aszitesflüssigkeit durch einen schräg auf ihre Oberfläche auftreffenden Sauerstoffstrom in Bewegung gehalten wurde. Durch Heparinzusatz wurde der Gerinnung vorgebeugt. Die Chromosomenanalysen erfolgten im nach Feulgen gefärbten Quetschpräparat (Hydrolyse für 18 min in 1 n HCl und Färbung mit basischem Fuchsin) nach Fixierung in Eisessig-Alkohol (1:3) für mindestens 24 Std. Um die Ausbeute an Metaphasezellen zu erhöhen, wurden den Versuchstieren  $2\frac{1}{2}$  Std. vor Entnahme des Aszites 0,5 ml 0,2%ige Colchicinlösung i.p. injiziert.

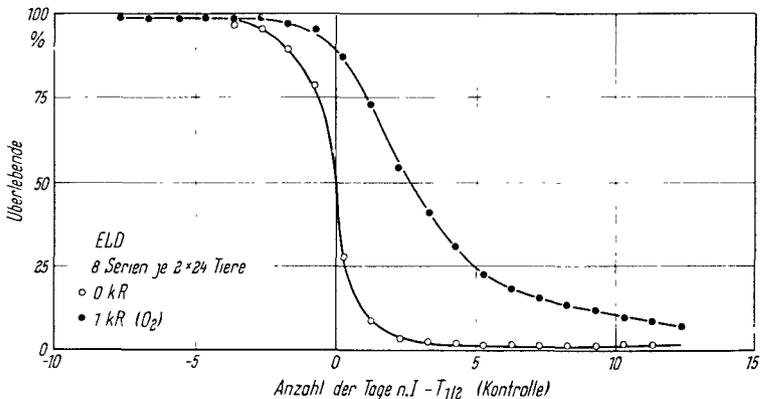


Abb. 2. Absterbeordnung von Mäusen nach Beimpfung mit  $2 \times 10^7$  Zellen der Linie ELD. Röntgenbestrahlung des Transplantats (1 kR in  $O_2$ -Atmosphäre). Ordinate: Überlebende in %. Abszisse: Anzahl der Tage nach Beimpfung, vermindert um Halbwertszeit  $T_{1/2}$  der Kontrolle.

## Ergebnisse

Bei der Linie ELD wurde, ähnlich wie schon früher [1], mit der Testdosis 1000 R eine deutliche Schädigung des Tumors erreicht, die sich in einem verlängerten Überleben der beimpften Tiere im Vergleich zur Kontrolle ausdrückte (Abb. 2). Eine Schädigung war auch nach einer Testdosis von 500 R noch deutlich zu erkennen (Abb. 1). In den Abbildungen 1 bis 5 wird als Ordinate jeweils der Prozentsatz überlebender Tiere und als Abszisse die Anzahl der Tage nach der Impfung, vermindert um  $T_{1/2}$  (Kontrolle), d. i. die Anzahl der Tage nach der Transplantation, wo 12 Tiere, d. h. genau die Hälfte der anfangs in der Kontrollgruppe vorhandenen 24 Tiere, verstorben waren, bezeichnet. Für die (unbestrahlte) Linie ELD hat  $T_{1/2}$  den Wert  $13,6 \pm 0,2$  Tage, für die Linie SOELD 1 den Wert  $16 \pm 1$  Tage und für die Linie ET den Wert  $22 \pm 0,9$  Tage. Nach der Dosis 1000 R ergab sich bei der Linie ELD in jeder der 8 Versuchsserien ein Wert von  $T_{1/2}$ , der über dem der Kontrolle lag. Dasselbe gilt für die tetraploide Linie ET (Abb. 3). Ganz anders verhielt sich die aus der Linie ELD durch Serienbestrahlung hervorgegangene Linie SOELD 1. Nach einer Testdosis von 1000 R lag die  $T_{1/2}$  dieser Linie ausnahmslos unter der der Kontrolle oder fiel mit ihr (in einer einzigen von 8 Serien) zusammen (Abb. 4). Dieser unerwartete Stimulierungseffekt einer Dosis von 1000 R auf die Linie SOELD 1, der in einer anderen Versuchsserie auch noch bei 3000 R beobachtet wurde, war der Anlaß, weitere Versuche mit einer Testdosis von 6000 R durchzuführen. Abbildung 5 zeigt, daß die Linie SOELD 1 auf diese Dosis nunmehr auch mit einer Malignitätsminderung reagiert, ähnlich wie die nicht serienbestrahlte Ausgangslinie ELD und die Linie ET schon auf sehr viel kleinere Dosen. Weitere Untersuchungen sind im Gange, in denen geprüft wird, ob Dosen unter 500 R auf die Ausgangslinie ELD in dem hier benutzten Test stimulierend wirken können.

Der Stimulierungseffekt einer Röntgeneinzeldosis auf die Linie SOELD 1 läßt sich statistisch sichern. Aus der Tabelle 1 errechnet sich für die Zeit  $T_{2/3}$  in Tagen, zu der zwei Drittel der Tiere verstorben sind, ein Mittelwert  $M_0$  der 8 Kontrollgruppen von

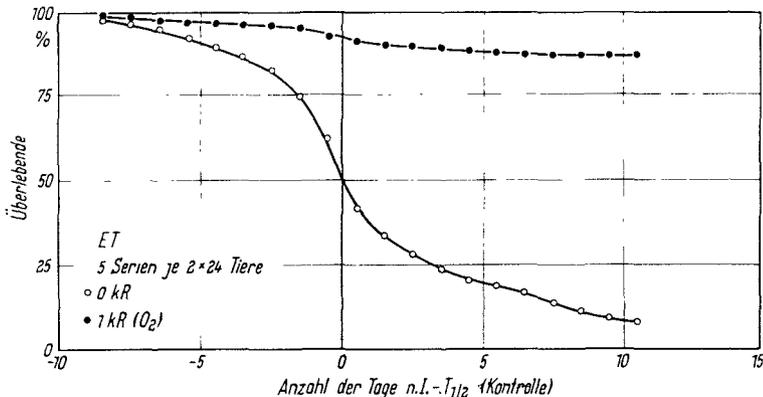


Abb. 3. Absterbeordnung von Mäusen nach Beimpfung mit  $2 \times 10^7$  Zellen der Linie ET. Röntgenbestrahlung des Transplantats (1 kR in  $O_2$ -Atmosphäre). Ordinate: Überlebende in %. Abszisse: Anzahl der Tage nach Beimpfung, vermindert um Halbwertszeit  $T_{1/2}$  der Kontrolle.

$M_0 = 17,1$  und  $M_1$  der 8 Bestrahlungsgruppen von  $M_1 = 12,6$ . Der Gesamtmittelwert  $M$  aller ( $N = 16$ ) Gruppen beträgt:  $M = 14,9$ . Für die mittlere Abweichung

$$\sigma^2 = \frac{1}{N-1} \sum_i (x_{0i} - M)^2$$

ergibt sich:  $\sigma^2 = 11,9$ ; für die Abweichung als Schätzung aus den Einzelwerten der beiden Gruppen ( $s = 2$ ) ergibt sich:

$$\sigma_2^2 = \frac{1}{N-s} [\sum_i (x_{0i} - M_0)^2 + \sum_i (x_{1i} - M_1)^2] = 6,96$$

und als Schätzung aus den beiden Gruppenmittelwerten:

$$\sigma_1^2 = \frac{n}{s-1} [(M_0 - M)^2 + (M_1 - M)^2] = 81,2 \quad (n = 8).$$

Es folgt dann aus  $\frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} = 10,8$  [6]  $P < 0,01$ .

Die 8 Versuchsserien können nicht als Stichproben eines homogenen Gesamtmaterials aufgefaßt werden. Dies zeigt eine Analyse der in Tabelle 2 zusammengefaßten Daten. In den Serien 4 und 6 ergeben sich sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die Bestrahlungsgruppe und in der Serie 5 für die Kontrollgruppe signifikante Abweichungen vom Gruppenmittelwert. Im einzelnen nicht bekannte Faktoren beeinflussen die Vitalität des Transplantates in beiden Gruppen ein und derselben Serie offenbar gleichsinnig. Es ist daher sinnvoll, wie in den Abbildungen 1 bis 5 geschehen, die Mittelwertbildung erst vorzunehmen, nachdem die Abszissenmaßstäbe der Serien so lange verschoben worden sind, bis die  $T_{1/2}$ -Werte aller Kontrollgruppen zusammenfallen. Wegen der großen Streuung zwischen den Serien wurde jede einzelne Serie für sich daraufhin geprüft, ob die in der Bestrahlungsgruppe gefundene kumulierte Mortalität 13 Tage nach Transplantation des Tumors signifikant von der der Kontrollgruppe abweicht. Das unter Benutzung des Vierfeldschemas [3] gewonnene Ergebnis ist in der letzten Spalte der Tabelle 2 angegeben. In 5 Serien, nämlich in den Serien 2, 3, 6, 7 und 8, findet sich eine hoch signifikant, in 2 Serien, nämlich in den Serien 1 und 5, eine schwach signifikant größere, kumulierte Mortalität nach Röntgenbestrahlung als ohne Bestrahlung des Transplantates. Nur in einer einzigen Serie, der Serie 4, blieb der Unterschied statistisch ungesichert.

Damit ist gezeigt, daß die Serienbestrahlung des Ehrlich-Aszites-Tumors in vitro unter aeroben Bedingungen zu einer über 100 Tierpassagen stabilen Resistenzsteigerung führen kann. Diese Strahlenresistenz wird durch Sauerstoff während der Testbestrahlung nicht „maskiert“.

War somit die durch Serienbestrahlung bei der Linie SOELD 1 induzierte Resistenz als außerordentlich stabiles Merkmal erwiesen, konnte nunmehr ge-

Tabelle 1.  $T_{2/3}$  ohne und mit Röntgenbestrahlung von Transplantaten ( $2 \times 10^7$  Zellen) der Linie SOELD 1.

Nummer der Serie		1	2	3	4	5	6	7	8
$T_{2/3}$ in Tagen nach Transplantation	Kontrollgruppe ( $x_{0i}$ )	21	23	18	14	14	14	19	15
	Bestrahlungsgruppe ( $x_{1i}$ ) (1 kR)	14	13	13	14	12	11	13	11

Tabelle 2. Kumulierte Mortalität 13 Tage nach Transplantation von  $2 \times 10^7$  Zellen der Linie SOELD 1.

Nummer der Serie	Anzahl Überlebender / Gesamtzahl der Tiere 13 Tage nach Transplantation		Wahrscheinlichkeit P für zufälligen Unterschied
	Kontrollgruppe	Bestrahlungsgruppe (1 kR)	
1	20/24	11/24	0,007
2	23/24	8/24	0,000
3	22/24	6/24	0,000
4	12/24	14/24	0,55
5	12/24	3/24	0,006
6	11/24	0/24	0,000
7	19/24	7/24	0,001
8	17/24	1/24	0,000
Mittelwert	0,75	0,26	

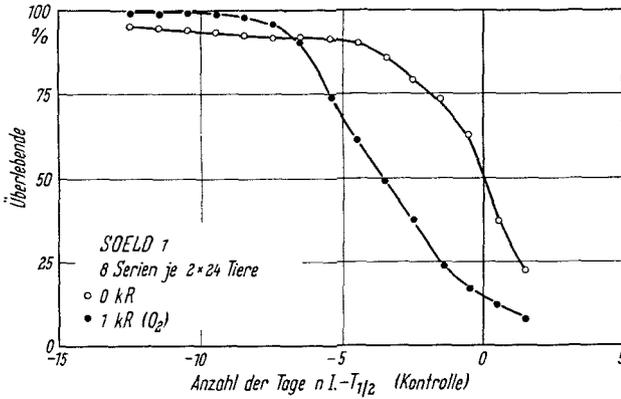


Abb. 4. Absterbeordnung von Mäusen nach Beimpfung mit  $2 \times 10^7$  Zellen der Linie SOELD 1. Röntgenbestrahlung des Transplantats (1 kR in O<sub>2</sub>-Atmosphäre). Ordinate: Überlebende in %. Abszisse: Anzahl der Tage nach Beimpfung, vermindert um Halbwertzeit  $T_{1/2}$  der Kontrolle.

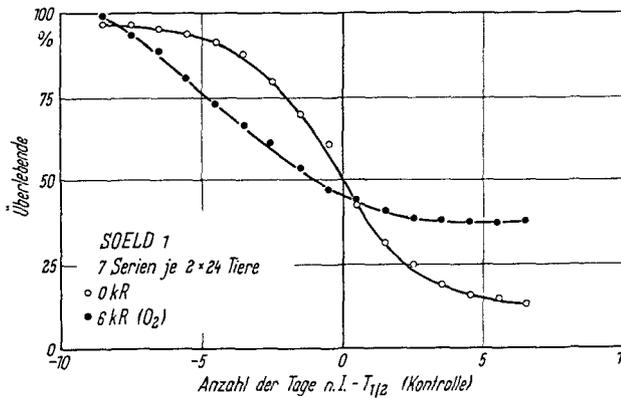


Abb. 5. Absterbeordnung von Mäusen nach Beimpfung mit  $2 \times 10^7$  Zellen der Linie SOELD 1. Röntgenbestrahlung des Transplantats (6 kR in O<sub>2</sub>-Atmosphäre). Ordinate: Überlebende in %. Abszisse: Anzahl der Tage nach Beimpfung, vermindert um Halbwertzeit  $T_{1/2}$  der Kontrolle.

prüft werden, ob dieser Resistenzsteigerung Genomveränderungen der Tumorzelle entsprechen. Die diploide Chromosomenzahl der normalen Somazelle der Maus beträgt 40. Alle Chromosomen sind telozentrisch, und ihre Länge variiert zwischen 2,5 und 5  $\mu$ . Bei Aszites-Tumorzellen der 4 Linien ELD, SOELD 1, SOELD 2 und ET hingegen finden sich charakteristische Abweichungen der Chromosomenzahl und Chromosomenmorphologie von der normalen Somazelle. Die Chromosomenzahl pro Zelle variiert zwischen den Werten 40 und etwa 130 bei den 3 hyperdiploiden Linien ELD, SOELD 1 und SOELD 2 und bei der hypertetraploiden Linie ET zwischen 75 und etwa 300 (Tab. 3). Der Häufigkeitsunterschied von Zellen mit Chromosomenzahlen über 50/Zelle bei der Linie ELD und bei den beiden Linien SOELD 1 und SOELD 2, offenbar Folge einer relativen Zunahme der Anzahl höher ploider Zellen, ist statistisch gut gesichert. Die modale Chromosomenzahl beträgt für die Linie ELD 42, für die Linien SOELD 1 und SOELD 2 44 und für die Linie ET 82. Diese modale Chromosomenzahl erwies sich über viele Tierpassagen als stabil. Die statistische Häufigkeitsverteilung der Chromosomenzahl war bei den 3 hyperdiploiden Linien, abgesehen von der unterschiedlichen Lage der Häufigkeitsmaxima, untereinander sehr ähnlich.

Die Chromosomen normaler Somazellen der Maus sind, wie bereits erwähnt, durchweg telozentrisch und stabförmig. Bei Tumorzellen auftretende Abweichungen in der Lage des Zentromers lassen sich daher leicht entdecken. Trotzdem bleibt es in der Regel schwierig, ein bestimmtes Chromosom allein auf Grund seiner Länge mit Sicherheit zu identifizieren, denn die Chromosomenlänge variiert im Idiogramm von Chromosom zu Chromosom nur geringfügig. Es wird daher hier darauf verzichtet anzugeben, wie viele Chromosomen einer Aszites-Tumor-Zelle insgesamt morphologisch abgewandelt sind im Vergleich zu einer normalen Somazelle. Lediglich grobe morphologische Abweichungen werden gewertet (Abb. 6 bis 9). Bei der Linie ELD läßt sich ein ziemlich regelmäßig

Tabelle 3. Chromosomenverteilung bei verschiedenen Tumorklinien.

Chromosomen- zahl / Zelle	Anzahl von Zellen der Linie			Chromosomen- zahl / Zelle	Anzahl von Zellen der Linie ET
	ELD	SOELDI	SOELD2		
40	28	18	30	80	33
41	42	10	19	81	72
42	240	65	36	82	268
43	66	82	56	83	48
44	60	303	260	84	62
45	28	75	61	85	25
46	19	39	28	86	15
47	15	26	31	87	9
48	12	11	25	88	5
49	12	16	7	89	10
50	10	7	13	90	9
> 50	30	76	96	> 90	27
Insgesamt:	562	728	662	Insgesamt:	583



Abb. 6



Abb. 7

Abb. 6. Metaphaseplatte der Linie ELD mit einem charakteristischen medianen Chromosom (→).  
 — Abb. 7. Metaphaseplatte der Linie SOELD 1 mit einem submedianen (↔) und kurzen (→) Chromosomen.

vorkommendes, besonders langes medianes stabförmiges „Markierungs“-Chromosom leicht identifizieren. Es ist stets das längste Chromosom. Die Zellen der Linie SOELD 1 besitzen an seiner Statt ein submedianes, besonders langes Chromosom und außerdem regelmäßig 3 sehr kurze „punktförmige“ Chromosomen. Auch in den Zellen der Linie SOELD 2 findet sich regelmäßig ein besonders langes submedianes Chromosom neben 2 sehr kurzen „punktförmigen“. Demgegenüber weist die Linie ET 2 mediane Markierungschromosomen mittlerer Länge auf. Die genannten Markierungschromosomen sind in der Mehrzahl der Zellen vorhanden.

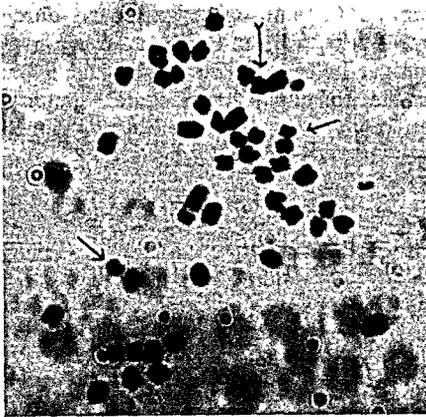


Abb. 8

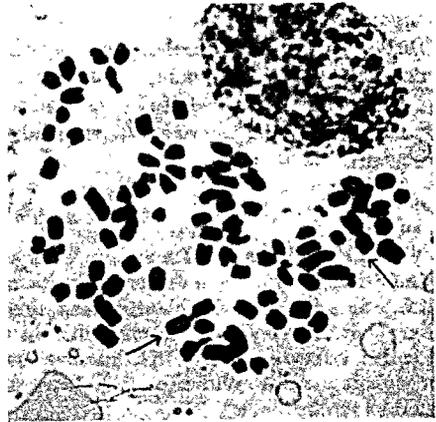


Abb. 9

Abb. 8. Metaphaseplatte der Linie SOELD 2 mit dem typischen submedianen (↔) und kurzen (→) Chromosomen. — Abb. 9. Metaphaseplatte der Linie ET mit 2 medianen Chromosomen (→).

### Diskussion

Ein Vergleich der beiden nicht serienbestrahlten Linien ELD und ET lehrt, daß sich diese beiden Linien zwar in ihrer  $T_{1/2}$  erheblich voneinander unterscheiden, daß aber eine Testdosis von 1000 R sowohl den diploiden als auch den tetraploiden Tumor stark schädigt und somit die Lebenserwartung der beimpften Tiere ansteigt. Demgegenüber liegt die  $T_{1/2}$  der serienbestrahlten Linie SOELD 1 etwas über der ihrer nicht serienbestrahlten Ausgangslinie ELD. Eine Testbestrahlung des Tumors mit der Dosis 1000 R verkürzt jedoch die Lebenserwartung der Versuchstiere so erheblich, daß sie nunmehr absolut unter der der nicht testbestrahlten Ausgangslinie ELD liegt. Die „Malignität“ der serienbestrahlten Linie SOELD 1 erhöht sich also durch die Testbestrahlung. Die Resistenzunterschiede wurden nach Bestrahlung in Sauerstoffatmosphäre beobachtet, sind also nicht durch Sauerstoff „maskiert“. Es ist vorläufig noch ungeklärt, ob sich in dieser Hinsicht anaerob von aerob serienbestrahlten Linien unterscheiden.

Die erworbene Strahlenresistenz der Linie SOELD 1, die schon in früheren Untersuchungen mit im Mittel 10 Transplantationen nach Abschluß der Serienbestrahlung nachgewiesen [1] worden war\*, erwies sich somit über einen Zeitraum von etwa 100 Tierpassagen des Tumors als stabil. Der stabilen Resistenzsteigerung ging bei dieser (SOELD 1) und bei einer anderen, ebenfalls serienbestrahlten Linie (SOELD 2) eine Erhöhung der modalen Chromosomenzahl um 2 parallel. Weiterhin fanden sich gröbere morphologische Veränderungen an den Chromosomen im Vergleich zur nicht serienbestrahlten Ausgangslinie ELD. Nach den Untersuchungen von Révész [4, 8] an einer anaerob serienbestrahlten Linie des Ehrlich-Aszites-Tumors (allerdings wurde eine andersartige Testreaktion benutzt) ist eine Korrelation zwischen der modalen Chromosomenzahl schlechthin und der Strahlenempfindlichkeit wenig wahrscheinlich geworden, wenn man von reinen Ploidieeffekten absieht. Auch von Till [10] wurde keine positive Korrelation zwischen Strahlenempfindlichkeit und Chromosomenzahl bei verschiedenen Tumoren der Maus beobachtet. Offenbar wird die Strahlenempfindlichkeit nur von wenigen bestimmten Chromosomen gesteuert, deren Verdoppelung bzw. Fehlen sich bemerkbar macht, während alle anderen Chromosomen zur Strahlenempfindlichkeit weniger beitragen. Ob es sich dabei um die bei der Linie SOELD 1 gefundenen Markierungs-Chromosomen handeln kann, ist das Ziel weiterer Untersuchungen an von uns isolierten Einzell-Klonen dieser Linie.\*\*

### Zusammenfassung

Beim Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus wurde durch aerobe Röntgenstrahlenbestrahlung eine Strahlenresistenz induziert, die sich noch nach etwa 100 Tierpassagen nachweisen ließ. Die erworbene Strahlenresistenz äußert sich u. a. darin, daß eine Einzelbestrahlung der Transplantate (in vitro und in  $O_2$ -Atmosphäre) die Malignität des Tumors für das Wirtstier erhöht. Die Chromosomen der serienbestrahlten Linien zeigen einige morphologische Abweichungen von denen der Ausgangslinie. Die modale Chromosomenzahl ist um 2 erhöht.

\* loc. cit. „Röntgen- $O_2$ -Linie“ genannt.

\*\* Zusatz bei der Korrektur: R. Berry hat kürzlich [Radiat Res. 18 (1963): 236] bei Mäuse-Leukämie-Zellen eine durch Serienbestrahlung erworbene Strahlenresistenz beobachtet, die er als Ploidieeffekt interpretiert.

*Summary*

Radiation resistant lines of Ehrlich ascites tumour were developed by serial X-irradiation of the stem line under aerobic conditions. This resistance remained even after 100 animal passages. The acquired radioresistance of the tumour following a single irradiation is expressed, among other ways, by an increase in malignancy of the tumour in the host animal. The chromosomes of the serially irradiated lines show some morphological changes as compared to the stem line. The modal chromosome number is increased by 2.

*Résumé*

Des rayons X en série et en aérobose induisent une radiorésistance de la tumeur ascite d'Ehrlich chez la souris; on peut encore démontrer la présence de cette radio-résistance après 100 transplantations. La radiorésistance acquise se traduit entre autre par le fait qu'une irradiation unique des transplants (in vitro et en atmosphère d'O<sub>2</sub>) augmente la malignité de la tumeur pour l'hôte. Les chromosomes des lignées irradiées en série présentent des déviations morphologiques par rapport à ceux de la lignée de départ. Le nombre modal des chromosomes est augmenté de 2.

*Schrifttum*

1. *Dittrich, W.*: Sdbd. zur Strahlentherapie 49 (1962): 112. — 2. *Dittrich, W.*, u. *G. Uhlmann*: Naturwissenschaften 41 (1954): 69; *Höhne, G.*, u. *G. Schubert*: Progress in Radiobiology, S. 381. Edinburgh 1956. — 3. *Fisher, R. A.*: Statistical Methods. 5th ed. Edinburgh, London 1934. — 4. *Glas, U.*, and *L. Révész*: Int. J. Radiat. Biol. 6 (1963): 69. — 5. *Klein, G.*, *L. Révész* and *E. Klein*: Transplant. Bull. 4 (1957): 31. — 6. *Koller, S.*: Handbuch der Erbbiologie des Menschen, Bd. II. Berlin 1940. — 7. *Révész, L.*, and *U. Norman*: J. Nat. Cancer Inst. 25 (1960): 1041. — 8. *Révész, L.*, *U. Glas* and *G. Hilding*: (im Druck). — 9. *Silini, G.*, and *S. Hornsey*: Int. J. Radiat. Biol. 5 (1962): 147. — 10. *Till, J. E.*: Radiat. Res. 15 (1961): 400.

Einer der Autoren (*S. B.*) ist der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Stipendium dankbar, welches ihm die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Wir danken *Frl. I. Möller* für ihre wertvolle Mitarbeit bei der technischen Durchführung der Tierversuche.