

treatment with NEM. Although it has been shown that NEM can react with other amino acids in high concentration, it is unlikely that such reactions would occur at appreciable rates under the conditions used in this work¹².

The growing reactivity of the synaptic vesicles when the temperature is increasing, could be explained by the appearance of new -SH groups by rupture of -S-S-bridges.

Experiments which are in progress in our laboratory show that ZIO may reveal -SH groups in other sites such as the synaptic vesicles of pineal nerves¹⁴ and the outer segments of rods. Our results seem to indicate that ZIO may be a useful tool to investigate -SH groups in tissues. However, the fact that ZIO reacts with many substances, makes a special study of each particular case necessary¹⁵.

Resumen. Se demuestra, en un estudio in vitro, que el ditioceritritol (DTE), agente reductor de grupos -S-S-aumenta, la reactividad de las vesículas sinápticas de las células fotorreceptoras de la rata para la mezcla de yoduro

de zinc-tetroxido de osmio (ZIO), a 4°C durante 2 h, mientras que la N-etil-maleimida, bloqueante de grupos -SH, bloquea la reacción en los testigos y en los tratados previamente con DTE. Se concluye que ZIO a 4°C durante 2 h revela grupos -SH en las vesículas sinápticas estudiadas.

AMANDA PELLEGRINO DE IRALDI¹⁶

Instituto di Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Buenos Aires, Paraguay 2155, Buenos Aires (Argentina), 3 March 1975.

¹⁴ A. PELLEGRINO DE IRALDI, *Brain Res.*, in press.

¹⁵ Acknowledgments. This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina, and the National Institutes of Health, USA.

¹⁶ I am grateful to Prof. G. JAIME ETCHEVERRY for stimulating discussions and to Miss MARGARITA LÓPEZ for her skilful technical assistance.

Induzierte Strahlenresistenz bei Zellkulturen des Chinesischen Hamsters: Entwicklung und Art der Resistenz

Induced Radiation Resistance in Cell Cultures of Chinese Hamster Cells: Induction and Manner of Resistance

Für verschiedene biophysikalische Untersuchungen sind Zell-Linien unterschiedlicher Strahlensensibilität nützlich, wie z. B. für die Analyse der biologischen Wirkung einer neuen Strahlenart und von Reparaturphänomenen. Vor allem im Hinblick auf vergleichende Untersuchungen mit hochenergetischen Betatronstrahlen und Pionen entwickelten wir aus einem Basisstamm von Dauerkulturen embryonaler fibroblastenähnlicher Zellen des Chinesischen Hamsters eine gegenüber 200 keV-Röntgenstrahlen resistenter Linie, wobei uns 3 Fragen interessierten: 1. Welche Methode der Resistenzinduktion ist für unser Zellmaterial geeignet? Zellen in vitro können genetisch heterogen sein^{1,2}, so dass unter Umständen bereits eine unterschiedliche Strahlensensibilität für verschiedene Zellunterpopulationen besteht. Trifft dies zu, dann wäre Selektion eine geeignete Methode zur Erreichung einer strahlenresistenteren Linie³. Ist die Zellpopulation in bezug auf Strahlensensibilität relativ homogen, dann sollte versucht werden, durch Mutationsinduktion resistenter Zellen zu erzeugen, und diese sekundär einem Selektionsdruck zu unterwerfen⁴. 2. Was für eine Resistenzart entwickelt sich? Es kommen z. B. folgende Resistenztypen in Frage: Zellen mit vorwiegender Resistenz für niedere Dosen und Zellen mit Resistenz für höhere Dosen⁴. 3. Besteht eine Beziehung zwischen Resistenz und zellulärer Reparaturleistung? SHAEFFER und MERZ⁵ sowie LITTLE et al.⁶ fanden bei verschiedenen Zell-Linien keine Beziehung zwischen Strahlensensibilität und Erholungsphänomenen.

Material und Methoden. Zellmaterial und Aufzucht: Wir verwendeten Dauerkulturen embryonaler fibroblastenähnlicher Zellen des Chinesischen Hamsters, kultiviert als Monolayerkultur in Eagle's Basalmedium (Gibco G-13) und 20% fötalem Rinderserum sowie Zusatz von Antibiotika-Mischung (1%); pro Woche wurde 2 mal subkultiert mit 0,2% Trypsin. Die Zellviabilität, gemessen mit der Trypanblau-Methode, betrug 95%. Für die Bestrahlung wurden die Zellen in T-30 Greiner Plastikkulturflaschen (Gr. 2) in Monolayerkultur gehalten, das Nährmedium wurde ersetzt durch phosphat-

gepufferte Salzlösung (PBS); das mediumfreie Intervall dauerte 2-4 h.

Bestrahlung: Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen erfolgte bei 20-22°C mit horizontaler Lage der Kulturflaschen: 200 kV, 12 mA, 1mm Al + 0,25 mm Cu, 46 rd/min, Fokus-Objekt-Abstand: 46 cm.

Bestimmung der Zellaktivierung: 2 d nach Kulturansatz wurden die Zellen bestrahlt, gleich anschließend trypsinisiert und pro Versuch ca. 1500 Zellen in je 2 Greiner - Plastikpetrischalen (Gr. 60/15) - mit eingezeichnetem Zählnetz am Schalenboden - ausgeplattet. 1 d nach Zellansatz Bestimmung der Zellzahl pro Netz und Zugabe von gereinigtem (dest. Wasser, Aceton) Bacto Agar (0,5%), 0,3 ml/ml Medium. Nach 10 d wurden die Klone mit Methanol: Eisessig (3:1) fixiert (10 min), luftgetrocknet und mit 0,1% Tolidinblau gefärbt (30 min). Bestimmt wurden die Anzahl Klone mit Zellzahlen ≥ 50 Zellen innerhalb des Zählnetzes, bezogen auf die ursprünglich angesetzte Zellzahl; die Werte wurden um die jeweilige «plating efficiency» korrigiert (für Se₁: 20,2 \pm 4,9 und für NMH₃: 42,7 \pm 13).

Studium von Erholungsphänomenen: Es wurden a) eine mögliche Reparatur von subletalen Schäden durch Dosisfraktionierung^{5,8} geschätzt, b) die Reparatur möglicher potentiell letaler Schäden nach WINANS et al.⁹ ermittelt und c) die beiden Erholungsarten beeinflusst,

¹ F. H. RUDDLE, *Cancer Res.* 21, 885 (1961).

² C. K. YU und W. K. SINCLAIR, *Can. J. Genet. Cytol.* 6, 109 (1964).

³ N. MATA und S. KOWAI, *Radiat. Res.* 43, 332 (1970).

⁴ V. D. COURTEMAY, *Radiat. Res.* 38, 186 (1969).

⁵ J. SHAEFFER und T. MERZ, *Radiat. Res.* 47, 426 (1971).

⁶ J. B. LITTLE, U. I. RICHARDSON und A. H. TASHJIAN JR., *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 69, 1363 (1972).

⁷ W. K. SINCLAIR, *Radiat. Res.* 27, 584 (1964).

⁸ M. M. ELKIND und G. F. WHITEMORE, *The Radiobiology of Cultured Mammalian Cells* (Gordon and Breach, New York 1967).

⁹ L. F. WINANS, W. C. DEWEY und C. M. DETTOR, *Radiat. Res.* 52, 333 (1972).

indem unmittelbar nach Bestrahlung mit 600 rd die Nachbestrahlungstemperatur für 4 h auf 4°C gehalten wurde¹⁰⁻¹³.

Resistenzinduktion: 1. Erhöhung des *Selektionsdrucks* durch fraktionierte Bestrahlung und Weiterkultivierung der überlebenden Zellen³. In Plastikflaschen wachsende Zellen wurden 2 d nach Kulturansatz mit total 1500 rd in 3 Fraktionierungsstufen von je 500 rd bestrahl; das Zeitintervall zwischen 1. und 2. Dosis betrug 7 h, zwischen 2. und 3. Dosis 16 h. 2. Mutationsinduktion durch chronische Bestrahlung mit niederen Dosen oder einem chemischen Mutagen, nach mehreren Kulturpassagen Selektionsdruck erhöhen.

Tabelle I. D_0 , n und D_q der Zell-Linie Se_1 sowie der strahlenresistenteren Linie NMH_3

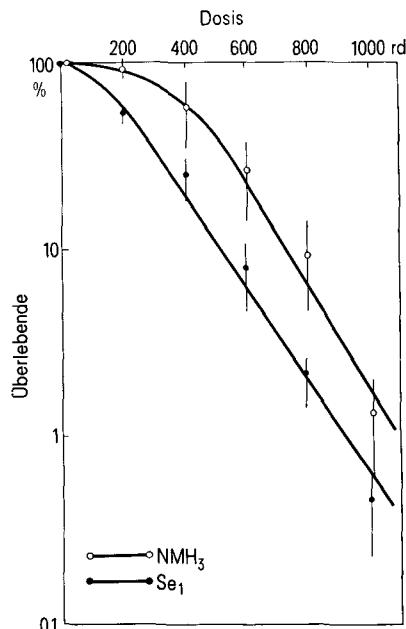
| Se ₁ | NMH ₃ (unmittelbar nach Resistenzinduktion) | NMH ₃ (2 Monate nach Resistenzinduktion) |
|---------------------|--|---|
| <i>n</i> | 1,5 ± 0,77 | 2,1 |
| D ₉ (rd) | 92,5 ± 12,8 | 120 |
| D ₄ (rd) | 37 ± 17,5 ^a | 75,5 |

* *t*-Test: $t = 4,0$; $f = 4$; $p < 0,05$.

Tabelle II. Dosismodifikationsfaktoren (DMF) für die 50% und 5% Überlebensraten

| | 50% Überlebende | 5% Überlebende |
|----------------------|-----------------|----------------|
| Dosis (rd) Se_1 | 210 | 640 |
| NMH_3 | 435 | 840 |
| DMF (NMH_3/Se_1) | 2,1 | 1,3 |

DMF, Dosis für bestimmte Überlebensrate bei Linie $NM\text{H}_3$ zu Dosis für gleiche Überlebensrate bei Se_1 .



Inaktivierungskurven für Zellen des Chinesischen Hamsters, Linien Se_1 und NMH_3 , nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, eingetragen die Streubereiche der Mittelwerte.

tion unter Beeinflussung fraktionierter Bestrahlung⁴. Für die Mutationsinduktion wählten wir Nitrosomethylharnstoff (NMH) in einer Konzentration von 200 µg/ml Medium durch Inkubation 4tägiger Kulturen für 90 min; Weiterkultivierung für 2 d, dann Rekultivieren; nach mehreren Kulturpassagen fraktionierte Bestrahlung wie bei der Selektionsmethode (total 1500 rd; eine 3. fraktionierte Bestrahlung mit der gleichen Enddosis führte zu einer strahlenresistenten Linie (NMH).

Karyotypanalyse: Wir fertigten Deckglaskulturen an; nach Colchicin-Anreicherung (0,002%, 0,1 ml/ml Medium) wurden die Zellen aufgearbeitet: 30 min hypotonische Behandlung mit 0,17% NaCl, Fixierung mit Methanol: Eisessig (3:1) für 10 min, Auftröpfpräparation, Lufttrocknen und Färben mit Giemsa für 20 min; bei der Linie Se₁ wurden 100 Metaphasen ausgewertet, bei NMH₃ 150.

Resultate. Die Selektionsmethode allein führte zu keinem Resistenzanstieg. Die Mutations-Selektionsmethode dagegen lieferte eine strahlenresistenter Zellpopulation mit Resistenzerhaltung über längere Zeit (Tabelle I). Die Ausgangslinie Se_1 und die abgeleitete Linie NMH_3 unterscheiden sich in den Dosiseffektkurven (Figur). Der Kurvenverlauf einer Dosiseffektkurve lässt sich durch die sog. D_0 - und D_q -Werte beschreiben⁴. D_0 ist die Dosis, die im exponentiellen Anteil der Inaktivierungskurve die Zahl von inaktivierten Zellen um den Faktor e^{-1} erniedrigt⁸; D_q , die Dosis aus der Berechnung $D_0 \times \ln n$ (n = Extrapolationszahl, erhalten durch Rückextrapolation des exponentiellen Anteils der Inaktivierungskurve auf Dosis 0), gibt an, ob und in welchem Ausmass eine Schulterkurve vorliegt⁸. D_0 allein kann, aber muss nicht ein Mass der Sensibilität sein; Resistenz kann auch bei gleichbleibendem D_0 vorliegen, wenn D_q grösser wird⁴; in diesem Fall sind die LD_{50} oder der sogenannte Dosismodifikationsfaktor DMF (Def. siehe Tabelle II) erhöht. Nach Tabelle I und II beruht die Resistenz von NMH_3 auf eben diesem Sachverhalt, nämlich einer signifikanten Vergrösserung von D_q bei etwa gleichbleibendem D_0 mit Dosismodifikationsfaktoren, die für niedere Dosen eine deutliche Resistenz anzeigen. Die beobachtete Resistenz ist statistisch gesichert. Gemessen an der Zellzahl ist der relative Wachstumsunterschied von NMH_3 gegenüber Se_1 (4 d nach Bestrahlung mit 500 rd) plus 67%; dies ergibt einen Dosismodifikationsfaktor von 3,3 gegenüber 2,07 für die 50% Inaktivierungsrate nach Tabelle II. Die beiden Linien zeigen keine eindeutigen Unterschiede für die sogenannte langsame Reparatur⁹, die sich während Minuten bis Stunden nach Bestrahlung abspielt. Die Reparatur von subletalen Schäden, gemessen nach der Dosisfraktionierungstechnik^{5,8} als 2 h - « Recovery » - Verhältnis (= Inaktivierungsrate für fraktionierte Bestrahlung - 300 rd + 300 rd - zu Inaktivierungsrate für Gesamtdosis, d.h. summierte fraktionierte Dosen als Einzeldosis ohne Intervall), beträgt für Se_1 1,5 und für NMH_3 1,6. Auch die eventuelle Reparatur von potentiell letalen Schäden (= Reparatur, gemessen am Anstieg der Inaktivierungsrate, wenn die Zellen nach Bestrahlung bei suboptimaler Temperatur gehalten werden⁹) ist in den beiden Linien

¹⁰ W. C. DEWEY, H. H. MILLER und D. B. LEEPER, Proc. natn. Acad. Sci. USA 68, 667 (1971).

¹¹ C. M. DETTOR, W. C. DEWEY, L. F. WINANS und J. S. NOEL, Radiat. Res. 52, 352 (1972).

¹² W. C. DEWEY, Int. J. Radiat. Biol. 22, 95 (1972).

¹⁸ M. M. ELKIND, in *Current Topics in Radiation Res.* (Eds. M. EBERT and A. HOWARD; North Holland Publ. Co., Amsterdam 1970), vol. 7, p. 1.

gemessen am Dosismodifikationsfaktor nicht wesentlich verschieden. Der DMF wurde ermittelt aus dem Verhältnis der Inaktivierungsrate nach 600 rd und 2 h Nachinkubation bei 17° gegenüber der für die gleiche Schädigungsrate benötigten Dosis bei 37°. Der DMF betrug bei Se₁ 1,3, bei NMH₃ 1,6. Der Sensibilitätsunterschied zwischen Se₁ und NMH₃ bleibt auch unter Beeinflussung von Erhöhungssphänomenen durch die niedere Nachbestrahlungstemperatur erhalten (prozentuale Inaktivierungsrate nach 600 rd bei NMH₃ rund doppelt so hoch wie bei der Linie Se₁). Karyotypuntersuchungen ergaben für NMH₃ eine gegenüber Se₁ erhöhte Karyotypunstabilität; es erfolgt eine «shift» der Chromosomenzahl von 22 zu hyperdiploid 23. Während bei Se₁ 52% der Zellen 22 Chromosomen besitzen, sind es bei NMH₃ bloss 10,9%, mit 23 Chromosomen dagegen 51%.

Diskussion. Da sich durch Selektion allein keine stabile Resistenz einstellt, wohl aber durch Mutations-Induktion und Selektion, ist es unwahrscheinlich, dass in der Ursprungspopulation bereits die resistenteren Zellen vorhanden waren, sondern vermutlich wurden durch die Applikation des Mutagens strahlenresistenter Mutanten erzeugt und durch Selektion eine resistenter Linie herausgezüchtet. Unser Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen von COURTEMAY⁴: Resistenz kann auch dann vorliegen, wenn D₀ nicht erhöht ist. Dabei wird der Sensibilitätsunterschied nur am D_q-Wert sowie in unserem Fall dem DMF ersichtlich; der DMF stellt zusammen mit der LD₅₀ das zuverlässigste Kriterium für vergleichende Sensibilitätsbestimmungen dar. Die von uns gefundene Resistenz bleibt auf konventionelle Röntgenstrahlen beschränkt. Untersuchungen im Zusammenhang mit der Bestimmung der relativen biologischen Wirksamkeit von Betatronstrahlen ergaben keine signifikante Resistenz von NMH₃ für 31-MeV Betatron-Photonen und Elektronen gegenüber Se₁^{14,15}. In Analogie zu Arbeiten von SHAEFFER und MERZ⁵ sowie LITTLE et al.⁶ scheint

auch in unserer Zell-Linie die vermehrte Resistenz nicht einherzugehen mit erhöhten «langsamem» Repairphänomenen, die mit den beschriebenen Methoden erfasst werden konnten. Möglich wäre es jedoch, dass andere Methoden zu anderen Schlüssen führen würden^{4,3,9}. Denkbar wäre eine herabgesetzte Strahlenempfindlichkeit des Repairsystems; in der resistenten Linie, die sich unmittelbar nach der Bestrahlung oder – entsprechend unseren negativen Resultaten für das 2 h – «Recovery» – Verhältnis – mehr als 4 h nach Bestrahlung bemerkbar macht¹⁶. Die Frage bleibt offen, ob in der resistenten Linie der hohe Anteil hyperdiploider Zellen mit Chromosomenzahl 23 in irgendeiner Beziehung zur Resistenz steht und ob vorwiegend Trisomie für ein bestimmtes Chromosom vorliegt (siehe auch BHASKAVAN und DITTRICH¹⁶). Es dürfte interessant sein durch Klonierung und Zuhilfenahme der Chromosomenbänderungs-Techniken diesen Fragen weiter nachzugehen.

Summary. Mutations-induction followed by selection is a suitable method for developing a cell line with resistance to low doses of X-rays. In comparison with the original cell line, the derived resistant line is characterized by an enhanced variability of the chromosome number, and no higher level of cellular repair, limited to the two repair types described.

F. KEUSCH, I. RIEHLE und H. FRITZ-NIGGLI

Strahlenbiologisches Institut der Universität Zürich,
August-Forel-Strasse 7, CH-8029 Zürich (Schweiz),
28. November 1974.

¹⁴ H. FRITZ-NIGGLI und F. KEUSCH, im Druck.

¹⁵ H. FRITZ-NIGGLI, Strahlentherapie 135, 202 (1968).

¹⁶ S. BHASKAVAN und W. DITTRICH, Strahlentherapie 122, 270 (1963).

Localization of ATPase in the Choroid and Retina of the Developing Chick

The ultrastructural localization of phosphatase in adult retinas has been reported by a number of authors¹⁻⁶ and ATPase in particular has been associated with photoreceptive processes⁷. Although maximum concentrations of acid and alkaline phosphatases have been observed in differentiating organs^{8,9}, the pattern of ATPase in embryonic retina remains unknown. The aim of the present study is therefore to determine the distribution of ATPase in the chick retina at approximately the time when the first adult form of ERG first appears, i.e. stage 45¹⁰⁻¹², and to compare this distribution with that of the hatching chicken.

Materials and methods. Fertile white leghorn eggs were incubated at standard conditions and staged according to HAMBURGER and HAMILTON¹³. The posterior halves of stages 45 and hatching chick embryonic eyes were dissected out and fixed in cold neutral buffered 5% formalin, and then small pieces were incubated in bulk in the Wachstein-Meisel medium¹⁴ for 60 min at 37°C and afterwards reacted with (NH₄)₂S. The tissues were then postfixed in 1% OsO₄ and subsequently dehydrated, cleared and embedded in Epon. 3 controls were utilized 1. the WACHSTEIN-MEISEL¹⁴ medium minus lead, 2. medium minus ATP and 3. medium minus magnesium.

Results. In the choroid of both stage 45 (approximately 19-20 days of incubation) and stage hatching (appro-

ximately 21 days of incubation), the ATPase positive sites are located at the polar ends of the endothelial cells of the choriocapillaris (Figures 1 and 2) and exhibit a zigzag pattern.

Bruch's membrane is an important cellular barrier for nutrient and metabolite transport^{15,16} it separates the retina proper from the choriocapillaris. At stage 45,

- 1 D. G. SCARPELLI and E. I. CRAIG, J. Cell Biol. 17, 279 (1963).
- 2 S. LESSEL and T. KUWABARA, Arch. Ophthal. 71, 851 (1964).
- 3 T. MAZIMA, Folia ophthal. Jap. 17, 307 (1966).
- 4 Y. OFUCHI, Folia ophthal. Jap. 19, 534 (1968).
- 5 Y. OFUCHI, Acta Soc. ophthal. Jap. 72, 515 (1968).
- 6 T. OISHI, Jap. J. ophthal. 72, 51 (1968).
- 7 K. SEKOGUTI, J. Cell comp. Physiol. 56, 129 (1960).
- 8 F. MOOG, Proc. natn. Acad. Sci., USA 29, 176 (1943).
- 9 J. BRACHET, *Chemical Embryology* (Interscience Publisher, Inc., New York 1950).
- 10 E. GARCIA-AUSTT and M. A. PATETTA-QUEIROLO, Acta neurolatino-am. 7, 179 (1961).
- 11 P. WITKOVSKY, Vision Res. 3, 341 (1963).
- 12 T. OOKAWA, Poultry Sci. 50, 1185 (1971).
- 13 V. HAMBURGER and H. L. HAMILTON, J. Morph. 88, 49 (1951).
- 14 M. WACHSTEIN and E. MEISEL, Am. J. clin. Path. 27, 13 (1957).
- 15 D. B. MEYER, L. D. HAZLETT and S. R. SUSAN, Tissue Cell 5, 489 (1973).
- 16 E. YAMADA, K. TOKUYASU and S. IWAKI, J. Electronmicrosc. 6, 42 (1958).