

wird. Damit ist aber entweder die Gl. (1) in der Stellungnahme von ENGEL nicht mehr erfüllt oder es entsteht Sauerstoff.

Das thermodynamische Problem, das ENGEL erwähnt, ist mir durchaus bekannt und war für uns, als wir auf dieses Problem stießen, Anlaß zu weiteren Experimenten, von denen ein Teil der Redaktion zur Veröffentlichung vorliegt. Diese Versuche zeigen den Weg, auf dem die Natur dieses Problem

ohne Verstoß gegen die Thermodynamik löst und bringen Licht in die chemischen Zusammenhänge. Ich möchte deshalb hier nur auf diese Experimente verweisen.

Zur Frage der Reinheit meiner *Nitrobacter*-Kulturen muß ich allerdings zugeben, daß sie sehr wahrscheinlich nicht sauberer sind als diejenige Reinkultur, die mir Herr Professor ENGEL freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades

VI. Über den Aufbau weitestgehend isogener, homozygoter penta- und hexaploider Stämme sowie den Einfluß bestimmter mutierter Allele auf die Strahlenresistenz

Von WOLFGANG LASKOWSKI

Aus dem I. Physikalischen Institut der Freien Universität Berlin, Abteilung für Biophysik
(Z. Naturforsch. 17 b, 93—108 [1962]; eingegangen am 31. Juli 1961)

Herrn Professor Dr. H. LASSEN zum 65. Geburtstag gewidmet

A series of extensively homozygous and isogenic *Saccharomyces* strains of different ploidy (haploid—hexaploid) was developed by controlled matings. The degree of ploidy was further checked by analysis of the segregation of mating type alleles and in case of the hexaploid strain also of two other markers. The genetic analysis was consistent with previous findings. Measurements of linear dimensions of the various strains indicated an increase of cellular volume proportional with ploidy. Radiation inactivation studies on the different strains with UV showed a maximum of resistance of the triploid strains and a decrease of resistance with further increase of ploidy from triploid to hexaploid. In X-ray and Po- α -ray inactivation, diploid strains heterozygous in the mating type alleles showed a maximum of resistance, whereas diploids homozygous in the mating type alleles proved to be less resistant than triploids. Additional to the effect of the mating type alleles on the resistance to X-rays and Po- α -rays (az-effect) there could be shown an effect of alleles controlling the dependence on the aminoacids serine and valine-isoleucine (AS-effect). Strains dependent on serine or valine-isoleucine proved to be more X-ray and Po- α -ray resistant than related prototrophic strains. There is, however, no difference in the UV resistance. This AS effect is not present in haploid strains but only in strains of higher ploidy. The dose effect curves of strains exhibiting an AS effect or an az effect show a characteristic difference. The AS effect is expressed by a constant dose reduction factor. The az effect, however, produces dose effect curves that have a more expressed shoulder in the lower dose range than comparable curves of aa or az strains but run parallel to these curves in the higher dose ranges. Possible meanings of these findings are discussed.

In einer Reihe früherer Veröffentlichungen^{1a-d} wurde darauf hingewiesen, daß quantitative Analysen von Inaktivierungsprozessen in Abhängigkeit vom Ploidiegrad bei Serien weitestgehend homozygoter, isogener Stämme in gewissem Maße durch die Erscheinung des „az-Effektes“ behindert werden. Dieser Effekt manifestiert sich in einer größeren Resistenz gegenüber ionisierenden Strahlen bei diploiden *Saccharomyces*-Stämmen mit der Paarungstyp-Konstitution aa im Vergleich zu aa- oder

aa-Diplonten. Bisher konnte das Ausmaß des az-Effektes nur bei diploiden Stämmen beurteilt werden, da polyploide Stämme, die auch für die Paarungstypparallele homozygot sind, nicht zur Verfügung standen. Weitestgehend homozygote aaa- oder aaa-Triploiden sind erst bei der Sporulation geeigneter hexaploider Stämme zu erwarten. Aus diesem Grunde wurde, ausgehend von der in l.c.^{1a} beschriebenen Serie weitestgehend homozygoter und isogener haploider bis tetraploider Stämme, zu-

^{1a} W. LASKOWSKI, Z. Naturforsch. 15b, 495 [1960].

^{1b} W. LASKOWSKI u. W. STEIN, Z. Naturforsch. 15b, 604 [1960].

^{1c} W. LASKOWSKI, E.-R. LOCHMANN, A. WACKER u. W. STEIN, Z. Naturforsch. 15b, 730 [1960].

^{1d} W. STEIN u. W. LASKOWSKI, Z. Naturforsch. 15b, 734 [1960].

nächst der Aufbau geeigneter penta- und hexaploider Stämme begonnen. Im folgenden sollen die zur Zucht dieser Stämme notwendigen Kreuzungsexperimente sowie der Einfluß bestimmter mutierter Allele auf die Resistenz gegenüber ionisierenden und nichtionisierenden Strahlen beschrieben werden.

1. Methodik

a) Kreuzungs- und Sporulations-Experimente

Die verwendeten Nährböden sowie die Kreuzungs- und Sporulationsmethoden waren im allgemeinen die gleichen wie in l. c.^{1a}. Da die Sporulationsfähigkeit der ingezüchteten Stämme oft schwach war, wurde in späteren Experimenten ein verbessertes Sporulationsmedium folgender Zusammensetzung verwendet: 0,82% Na-acetat, 0,1% Glucose, 0,25% Yeast-Extract, 0,18% KCl, 2% Agar (nach McCLARY, NULTY und MILLER²). Nach 2-tägiger Vorzucht auf einem Praesporulations-Medium (2% Glucose, 0,2% (NH₄)₂SO₄, 0,2% KH₂PO₄, 0,5% Yeast-Extract, 2% Agar)² war bei vielen Stämmen die Ascusbildung auf dem Sporulationsmedium nach McCLARY besser als auf dem früher verwendeten FOWELL-Medium. Bei Aufbewahrung bei Zimmertemperatur waren die Asci 2–4 Tage nach Auftragung auf das Sporulationsmedium ausgebildet. Bei Kreuzungsprodukten mit geringer Sporenbildung oder Sporenkeimung wurden die Ascosporen nicht mit Hilfe eines Mikromanipulators, sondern durch Massen-isolationstechnik³ isoliert. Zu diesem Zweck werden die Zellen vom Sporulationsmedium mit einer 0,5-proz. Tween-80-Lösung abgespült und unter Zugabe von Paraffinöl in einer Bakterienmühle zermahlen. Die Sporen sammeln sich in der Paraffinölschicht und werden in geeigneter Verdünnung auf Nähragarplatten ausgespatelt. Nach 3–4-tägiger Bebrütung sind die Sporen zu Kolonien ausgewachsen, die nun in größerer Anzahl isoliert werden können. Die Tetradenzusammengehörigkeit geht natürlich bei dieser Technik verloren. Die Aufspaltungsergebnisse sind nur statistisch auswertbar.

Zur Isolierung auxotropher Mutanten wurden etwa 200–250 Zellen pro Vollmediumplatte (Zusammensetzung: 1% Hefe-Extract [Difco], 0,5% Pepton, 2% Glucose, 2% Agar) für 48 Std. bebrütet und die entstandenen Kolonien auf ein synthetisches Minimalmedium überstempelt⁴. Das synthetische Medium (SM) wurde nach den Angaben für „Difco yeast nitrogen base“ hergestellt und enthielt folgende Substanzen pro l Wasser:

Vitamine: 2 γ Biotin, 400 γ Thiamin HCl, 400 γ Pyridoxin, 400 γ Ca-Pantothenat. Spurenelemente: 10 γ

H₃BO₃, 10 γ CuSO₄·5 H₂O, 10 γ KJ, 50 γ FeCl₃·6 H₂O, 70 γ ZnSO₄·7 H₂O. Mineralsalze: 875 mg KH₂PO₄, 125 mg K₂HPO₄, 500 mg MgSO₄·7 H₂O, 100 mg NaCl, 100 mg CaCl₂·2 H₂O. Stickstoffquelle: 1 g (NH₄)₂SO₄. Kohlenstoffquelle: 20 g Glucose. Aminosäuren, Purine und Pyrimidine wurden je nach der Bedürftigkeit der Stämme hinzugefügt. Zur Verfestigung wurden 2% Bacto-Agar (Difco) zugesetzt.

Für die Stempelversuche wurde dieses Medium ohne Aminosäuren, Purine und Pyrimidine verwendet. Die Bedürfnisse der aufgetretenen auxotrophen Mutanten wurden zuerst durch Zusatz von hydrolysiertem Casein klassifiziert und dann durch Zusatz einzelner Aminosäuren bestimmt.

Zur Gewinnung prototropher Kreuzungsprodukte aus einem Gemisch auxotropher Elternzellen wurde SM unter Weglassung der spezifischen Wachstumsbedürfnisse der Elternstämme verwendet (Prototroph-Technik⁵).

b) Bestrahlungsexperimente

Die Röntgenbestrahlungen wurden mit einer Machlett-Röhre (Typ OEG-60, W-Anode, Be-Fenster) bei 50 kV Röhrenspannung und 9 mA Röhrenstrom durchgeführt. Bei 15 cm Focus-Abstand betrug die Dosisrate ≈ 10 kr/Minute. Für die Po- α -Bestrahlung wurde im wesentlichen die gleiche Anordnung wie in l. c.^{1a} nach ELKIND und BEAM⁶ benutzt. UV-Bestrahlungen wurden mit einer Hg-Niederdrucklampe (Osram HNS 12), die mehr als 90% der Intensität mit der Wellenlänge 254 m μ ausstrahlt, durchgeführt (Strahlendosis = 1,52 erg/mm²·sec).

Die bestrahlten Zellsuspensionen wurden, nötigenfalls nach geeigneter Verdünnung, auf Nähragarplatten (2% Hefe-Extract [Difco], 0,5% Pepton, 2% Glucose, 2% Agar) ausgespatelt und für 3 bis 5 Tage bei 30 °C bebrütet. Unbestrahlte Kontrollen wurden auf ähnliche Weise behandelt. Sämtliche angeführten Dosis-effektcurven wurden durch graphische Mittlung aus 4 bis 15 unabhängigen Versuchen, die zumeist über einen Zeitraum von mehreren Monaten verstreut waren, gemittelt. Einzelne in den Kurven angegebene Inaktivierungs-Prozentsätze (Punkte oder Kreuze) stellen Mittelwerte dar, die jeweils aus der Koloniezahl von 4–5 Platten gemittelt werden.

Weitere Angaben über die verwendeten Strahlenquellen sowie über die Art der Behandlung der Zellen bei den Bestrahlungsversuchen sind in l. c.^{1a} gegeben.

2. Aufbau der Stämme

In Abb. 1 ist der Stammbaum der gezüchteten weitestgehend homozygoten, isogenen haploiden bis hexaploiden Saccharomyces-Stämme wiedergegeben.

² D. O. McCLARY, W. L. NULTY u. G. R. MILLER, J. Bacteriol **78**, 362 [1959].

³ C. C. EMEIS u. H. GUTZ, Z. Naturforschg. **13b**, 647 [1958].

⁴ J. LEDERBERG u. E. M. LEDERBERG, J. Bacteriol **63**, 399 [1952].

⁵ S. POMPER u. P. R. BURKHOLDER, Proc. nat. Acad. Sci. USA **35**, 456 [1949].

⁶ M. M. ELKIND u. C. A. BEAM, Rad. Res. **3**, 88 [1955].

von der Paarungstyp-Konstitution $aa\alpha$, aaa oder $aaaa$ sind. Diese Stämme vermögen wiederum zu sporulieren aber nicht zu kopulieren. Von MORTIMER⁹ wurde nun kürzlich gezeigt, daß sich aus Mischungen geeigneter triploider Stämme mit komplementären Wachstumsbedürfnissen in Minimalmedium hexaploide Stämme isolieren lassen. Offensichtlich gehen diese Hexaplonten aus der Kopulation zweier Triplonten hervor, bei denen jeweils ein Paarungstypallel mutiert ist ($aa\alpha \rightarrow aaa$ und $az\alpha \rightarrow \alpha\alpha\alpha$).

Voraussetzung für die Herstellung eines weitestgehend homozygoten hexaploiden Stammes ist also das Vorhandensein weitestgehend isogener, homozygoter triploider Stämme mit komplementären Wachstumsbedürfnissen. Da, wie in l. c.^{1a} beschrieben, die haploiden Stämme 211-1a und 211-1b mit Ausnahme der Paarungstypallele isogen sind, wurden diese als Ausgangspunkt für den Aufbau weitestgehend homozygoter und isogener di- und triploider Stämme mit komplementären Wachstumsbedürfnissen gewählt. Beide Stämme sind unabhängig von Aminosäuren sowie von Purinen und Pyrimidinen. Mit Hilfe der Stempeltechnik⁴ wurde aus beiden Stämmen je eine spontan aufgetretene Mutante isoliert. Dazu wurden bei Stamm 211-1a insgesamt $\approx 90\,000$ Kolonien überprüft, bei Stamm 211-1b insgesamt $\approx 80\,000$. Die aus 211-1a isolierte Mutante (211-1aM) erwies sich bedürftig für Valin und Isoleucin, während die aus 211-1b isolierte Mutante (211-1bN) serin-bedürftig war.

Zur Überprüfung der genetischen Grundlagen beider Mutanten wurden die Stämme 211-1aM und 211-1bN mit je einem aminosäure-prototrophen haploiden Stamm von komplementärem Paarungstyp gekreuzt. Aus den Kreuzungen resultierten die az -Diplonten 263 bzw. 264. Von Stamm 263 und Stamm 264 wurden 20 bzw. 15 viersporige Asci isoliert und die Sporen separiert. Die Keimungsfähigkeit der Sporen war schlecht. So wurde von Stamm 263 nur 1 Ascus erhalten, von dem alle 4 Sporen auskeimten, bei 3 Asci keimten je 3 Sporen aus, bei 5 je 2 und bei den übrigen 11 nur je eine Spore. Der viersporige Ascus ergab eine 2:2-Aufspaltung ($vi : Vi = \text{Valin-Isoleucin-Bedürftigkeit} : \text{Valin-Isoleucin-Nichtbedürftigkeit}$). Sämtliche Asci, bei denen nur 3 Sporen ausgekeimt waren, gaben eine 2 : 1- oder 1 : 2-Aufspaltung ($vi : Vi$). Betrachtet man die Sporenkulturen insgesamt, so ist

⁹ R. K. MORTIMER, Rad. Res. 9, 312 [1958].

das Verhältnis von $vi : Vi = 16 : 18$. Damit kann als ausgeschlossen gelten, daß die Valin-Isoleucin-Bedürftigkeit auf die Mutation zweier ungekoppelter Loci zurückzuführen ist. Ob nur ein Locus oder mehrere eng gekoppelte Loci mutiert sind, bleibt vorerst unentschieden. Von den 15 von Stamm 264 isolierten Asci keimten bei 3 jeweils 4 Sporen aus, bei 9 keimten jeweils 3 Sporen aus und bei 3 jeweils 2 Sporen. Das Verhältnis Serin-Bedürftigkeit : Serin-Nichtbedürftigkeit ($se : Se$) war in allen Asci mit 4 ausgekeimten Sporen 2 : 2 und in Asci mit 3 ausgekeimten Sporen 2 : 1 oder 1 : 2. Insgesamt betrug das Verhältnis $se : Se = 23 : 22$, was für die Mutation eines Locus als Ursache der Serinbedürftigkeit spricht. In allen Fällen wurde die Aufspaltung der Paarungstypallele zur Kontrolle mit beobachtet und erfolgte erwartungsgemäß.

Aus den haploiden Mutanten 211-1aM und 211-1bN wurden nun az sowie $\alpha\alpha$ - bzw. aa -Diplonten gewonnen (230, 219 sowie 211-1aM/2 und 211-1bN/2, vgl. Abb. 1). Bei der Sporulation der az -Diplonten wurden die haploiden Sporenkulturen 219-1a bis 219-1d sowie 230-1b und 230-1c isoliert. Die Bildung 4-sporiger Asci erfolgte in diesen weitestgehend homozygoten Stämmen nur recht spärlich und die Keimfähigkeit der Sporen war schlecht. Von mehreren isolierten Asci des Stammes 230 keimten maximal 3 Sporen eines 3-sporigen Ascus aus (230-1a bis 230-1c). Die Stämme 230-1b und 230-1c erwiesen sich als haploid, während der Stamm 230-1a diploid ist, möglicherweise also durch Verschmelzung zweier haploider Kerne im Ascus entstanden war. Von 219 konnten 4 keimungsfähige haploide Sporenkulturen aus einem Ascus gewonnen werden. Nach Isolierung geeigneter aa - und az -Diplonten und Kreuzungen mit haploiden oder diploiden Zellen vom komplementären Paarungstyp wurden die triploiden Stämme 300 und 301 sowie die tetraploiden Stämme 400 und 401 hergestellt (s. Abb. 1).

Die von 211-1aM sowie 211-1bN abstammenden Stämme sollten ihrer Entstehungsweise zufolge jeweils weitestgehend homozygot und isogen sein. Diese Annahme wird durch die in folgenden Abschnitten zu besprechenden Ergebnisse auch bestätigt. Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die Stämme 211-1aM ($vi Se$) und 211-1bN ($Vi se$) durch komplementäre Aminosäurebedürfnisse. Der gleiche Unterschied trifft naturgemäß für alle Abkömmlinge beider Stämme zu. Die polyploiden

Stämme dieser beiden Serien erfüllen daher eine notwendige Voraussetzung zur Gewinnung von weitestgehend homozygoten Ploidieklassen >4 . So wurden Zellen der Stämme 211-1aM/2 und 300 miteinander in Nährmedium für 24 Stdn. gezüchtet und nach Waschung auf synthetisches Medium ohne Valin, Isoleucin und Serin ausgeplattet. Während in Kontrollversuchen, in denen etwa die gleiche Zellzahl des Stammes 211-1aM/2 oder 300 auf Minimalmedium ausgeplattet wurde, keine Kolonien wuchsen, traten solche bei der Kultur, die Zellen beider Stämme enthielt, nach Übertragung auf Minimalmedium auf. Eine dieser prototrophen Kolonien wurde ausgewählt (Stamm 500). In gleicher Weise wurde mit einem Gemisch der Stämme 300 und 301 verfahren und 1 prototrophe Kolonie ausgewählt (Stamm 600). Daß die isolierten Stämme 500 und 600 tatsächlich aus Kreuzungen der diploiden bzw. triploiden Elternstämme hervorgegangen sind, wird durch die im folgenden Abschnitt zu besprechende genetische Analyse bestätigt. Einen weiteren bestätigenden Hinweis liefert ein Vergleich der durchschnittlichen Zellvolumina.

3. Genetische Analyse des Ploidiegrads

a) Haplonten

Beweise für die haploide Natur der Stämme 211-1a und 211-1b wurden bereits in l. c.^{1a} erbracht. Die Haploidie der Mutanten 211-1aM und 211-1bN wird, abgesehen von ihrer Entstehungsweise und ihrer Morphologie (runde, klumpenbildende Zellen), auch durch die Ergebnisse der im vorigen Abschnitt geschilderten Kreuzungsversuche zur genetischen Analyse der Valin-Isoleucin- bzw. Serin-Bedürftigkeit bestätigt.

b) Diplonten

Der Ploidiegrad aller in Abb. 1 aufgeführten α -Diplonten wurde durch Ascosporenanalyse bestätigt. War auch die Sporenbildung und -keimfähigkeit bei diesen weitestgehend homozygoten Stämmen meist gering, so widersprach jedoch die Verteilung der Paarungstypallele in den Sporenkulturen niemals der Erwartung. Die Verteilung anderer

genetischer Markierungsfaktoren war infolge der Homozygotie dieser Stämme nicht zu verfolgen.

Die für die Paarungstypallele homozygoten aa - oder $\alpha\alpha$ -Diplonten sporulieren nicht. Ein genetischer Beweis für ihren Ploidiegrad ist erst aus der Analyse polyploider Stämme, die durch Kreuzung von aa - oder $\alpha\alpha$ -Diplonten entstanden sind, zu erbringen.

c) Polyplonten

Die Aufspaltungsergebnisse der Sporenkulturen polyploider Stämme sind in Tab. 1–4 zusammengefaßt. Da die tri- und tetraploiden Stämme bis auf die Paarungstypallele homozygot sind, kann bei diesen Stämmen nur die Verteilung der Allele a und α verfolgt werden. Im übrigen ist aber der haploide Ausgangsstamm des gesamten Stammsystems, α -41, durch folgende Eigenschaften ausgezeichnet: Vergärungsfähigkeit von Saccharose und Maltose, Unfähigkeit zur Vergärung von Galaktose und Melibiose, Unabhängigkeit von Adenin und Uracil. Diese Eigenschaften finden sich auch bei allen Stämmen aller Ploidieklassen des Stammbaums in Abb. 1 sowie bei sämtlichen geprüften Sporenkulturen, was ein weiterer Beweis für die durch keine Verunreinigung durch Fremdinfection gestörte verwandtschaftliche Zusammengehörigkeit dieser Stämme sowie für die Homozygotie der di- und polyploiden Stämme anzusehen ist.

α) Triplonten

Da die Häufigkeit der Ascusbildung und die Keimungsfähigkeit der Ascosporen bei den triploiden Kulturen gering ist¹⁰, wurden Sporenisolierungen nicht mit dem Mikromanipulator, sondern nach der Massenisolations-Technik vorgenommen. Wenn man mögliche Verteilungs-Irregularitäten während der Meiose vernachlässigt, ist für die Verteilung der Paarungstypallele in den aus triploiden Stämmen erhaltenen Sporenkulturen ein Aufspaltungsverhältnis trisomer Typen zu erwarten¹¹. Da Stamm 300 aus einer Kreuzung der Stämme 211-1bN/2 (aa) und 219-1a (α) hervorgegangen ist, sollte er bezüglich der Paarungstypallele von der Konstitution aaa sein, Stamm 301 sollte auf Grund der Konstitution

¹⁰ Eine geringe Sporenbildung und Keimungsfähigkeit triploider *Saccharomyces*-Stämme wurde bereits beim Aufbau der zentralen Stammserie der Abb. 1 beobachtet (W. LASKOWSKI, Habilitationsschrift Freie Universität Berlin, 1960). Gleiche Beobachtungen liegen von anderen Autoren

vor, l. c.⁹ und l. c.¹¹. Die Ursachen hierfür sind wohl in Anomalien während der Meiose und der dadurch bedingten Entstehung aneuploider nicht vitaler Sporen zu sehen.
¹¹ C. C. EMEIS u. S. WINDISCH, Z. Naturforschg. **15b**, 702 [1960].

	Theoretische Erwartung		Exp. Befund	χ^2	P
	A	B			
Paarungstyp-Konstitution: aaz Experimentelles Ergebnis Stamm 300 Paarungstyp-Konstitution: aaz	$az : aa : a : \alpha$ $2 : 1 : 2 : 1$	$az : a' : \alpha$ $2 : 3 : 1$	$az : a' : \alpha$ $32 : 53 : 15$	1,55	0,46
Paarungstyp-Konstitution: aaz Experimentelles Ergebnis Stamm 301	$az : \alpha\alpha : a : \alpha$ $2 : 1 : 1 : 2$	$az : a : \alpha'$ $2 : 1 : 3$	$az : a : \alpha'$ $38 : 16 : 42$	1,89	0,39

Tab. 1. Aufspaltung der Paarungstypallele in den Sporenkulturen triploider Stämme.

der Elternstämme (211-1aM/2 [$\alpha\alpha$] und 230-1c [α]) vom Typ $\alpha\alpha$ sein (s. Abb. 1). Die für beide Paarungstyp-Konstitutionen zu erwartenden Aufspaltungsverhältnisse sowie die experimentellen Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. In der Rubrik B der Tab. 1 sind die zu erwartenden haploiden und diploiden Kulturen des gleichen Paarungstyps zusammengezogen. Da eine eindeutige genetische Klassifizierung zwischen haploiden und für die Paarungstypallele homozygoten diploiden Kulturen nur durch weitere Kreuzungsanalysen zu erreichen ist, wurde auf eine Trennung dieser beiden Klassen verzichtet. Die isolierten Sporenkulturen wurden jeweils mit einem haploiden Teststamm vom Paarungstyp a bzw. α zusammengebracht und der Paarungstyp entsprechend der Zygotenbildung bestimmt. Fand eine Zygotenbildung weder mit dem a -Teststamm noch mit dem α -Teststamm statt, wurden die Kulturen als az -Stämme klassifiziert. Wie die P -Werte zeigen, sind die beobachteten Verteilungen der Paarungstypallele in den Sporenkulturen mit dem triploiden Zustand der Stämme 300 und 301 und deren vermuteter Paarungstyp-Konstitution gut verträglich. Damit ist auch die vermutete homozygote aa - bzw. $\alpha\alpha$ -Konstitution der diploiden Elternstämme 211-1bN/2 und 211-1aM/2 bestätigt.

β) Tetraplonten

Eine genetische Analyse wurde bisher nur mit Stamm 400 durchgeführt, der aus der Kreuzung 211-1bN/2 $\times$ 219-1a/2 hervorgegangen ist. Der Stamm 211-1bN/2 ist gleichzeitig ein Elter des triploiden Stammes 300, und seine Paarungstyp-Konstitution (aa) wurde bereits durch die Analyse der Sporenkulturen von 300 bestätigt. Auf Grund seiner Entstehungsweise (Selbstdiploidisierung von 219-1a) hat Stamm 219-1a/2 vermutlich die Paa-

rungstyp-Konstitution $\alpha\alpha$, so daß Stamm 400 vom Typ $aaaa$ (duplex) sein sollte.

Infolge relativ guter Ascusbildung des Stammes 400 wurden 15 Asci mit dem Mikromanipulator geöffnet und die Sporen isoliert aufgezogen. Nur bei 6 Asci keimten jedoch alle 4 Sporen aus, bei je 4 keimten 3 bzw. 2 Sporen aus und bei einem Ascus keimte nur eine Spore aus. Infolge des geringen Vorhandenseins kompletter Tetradenkulturen ist in Tab. 2 a zunächst analog zu Tab. 1 die Verteilung der Paarungstypen sämtlicher erhaltenen Einzelsporenkulturen der statistischen Erwartung gegenübergestellt. Unter bestimmten vereinfachenden Voraussetzungen, zu denen vor allem die Annahme einer zufallsmäßigen bivalenten Chromosomenpaarung und einer gleichmäßigen, zufälligen Verteilung der Zentromeren zu den Polen gehören, sind nach EMEIS und WINDISCH¹¹ 3 Typen diploider Sporenkulturen in bestimmtem, in Tab. 2 a angegebenem Verhältnis zu erwarten. Je nach dem Ausfall der Zygotenbildung mit a - und α -Teststämmen wurden die Sporenkulturen als az - oder aa -Kulturen eingeordnet. Sporenkulturen, die mit beiden Teststämmen keine Zygoten bildeten, wurden als aa -Stämme klassifiziert. Sämtliche Stämme letzterer Gruppe konnten zur Ascusbildung induziert werden, wodurch ihre az -Konstitution bestätigt wird. Wie aus Tab. 2 a zu

	Theoretische Erwartung	χ^2	P
Paarungstyp-Konstitution aazx $4 : 1 : 1$		0,32	0,85
Experimentelles Ergebnis Stamm 400 $31 : 7 : 7$			

Tab. 2 a. Aufspaltung der Paarungstypallele in den Sporenkulturen tetraploider Stämme.

ersehen, stimmen die beobachteten Ergebnisse gut mit der theoretischen Erwartung überein.

Zusätzlich zu der vorangegangenen statistischen Beurteilung der Aufspaltungsverhältnisse in den Sporenkulturen vollständig und unvollständig ausgekeimter Tetraden können auch die Aufspaltungsverhältnisse in mehreren vollständig ausgekeimten Tetraden beurteilt werden. Unter den oben bereits erwähnten vereinfachenden Annahmen sind bei einem tetraploiden Stamm vom duplex-Typ nach ROMAN und Mitarbb.¹² 3 Ascustypen zu erwarten, die bezüglich der Paarungstypallele folgender Konstitution sind:

I	a α	a α	a α	a α
II	aa	aa	a α	a α
III	aa	a α	a α	a α

Unter obigen Voraussetzungen hängt die Häufigkeit der Typen I und II im wesentlichen von der Häufigkeit ab, mit der sich während der Meiose Chromatiden mit gleichem oder komplementärem Allel paaren. Bei rein zufälliger Paarung ist das Verhältnis I : II = 2 : 1 zu erwarten. Asci vom Typ III können nur durch ein crossing-over zwischen Paarungstypallele und dem entsprechenden Zentromer entstehen; die Häufigkeit des Typs III ist also ein Maß für aufgetretenen Chromatidenaustausch und damit für den Abstand Zentromer – Allel.

Zur Tetradenanalyse standen 6 Asci mit 4 ausgekeimten Sporenkulturen zur Verfügung. Außerdem ist eine Klassifizierung der 4 Asci mit je 3 ausgekeimten Sporenkulturen möglich. Bei 3 dieser Asci bildeten alle 3 Sporen keine Zygoten mit a- oder α -Teststämmen, sporulierten aber. Diese Asci können, entsprechend obigen Voraussetzungen nur zum Typ I gehören. Die nicht gekeimte Spore mußte dann ebenfalls von der Konstitution a α gewesen sein. Beim vierten 3-sporigen Ascus waren 2 Sporenkulturen sporulationsfähig aber nicht kopulationsfähig, während die 3. Sporenkultur Zygoten mit einem a-Teststamm bildete. Dieser Ascus kann entsprechend obiger Voraussetzung nur zum Typ III gehören, die nicht gekeimte Spore sollte dann von der Konstitution aa gewesen sein. Das Gesamtergebnis der Tetradenanalysen ist in Tab. 2 b zusammengefaßt und den von ROMAN und Mitarbb.¹² erzielten Aufspaltungsergebnissen aus 10 tetraploiden Stämmen mit insgesamt 168 analysierten Asci gegen-

Stamm	Paarungstyp	Ascustypen			χ^2	P
		I	II	III		
400	a α a α	4	1	5	1,52	0,47
Sammelergebnis von ROMAN u. Mitarbb. ¹²		48,2%	9,5%	42,3%		

Tab. 2 b. Aufspaltung der Paarungstypallele in Tetraden tetraploider Stämme (Einzelheiten im Text).

übergestellt. Die Übereinstimmung der Häufigkeiten der Ascustypen I, II und III zwischen beiden Ergebnissen ist befriedigend. Diesen Ergebnissen zufolge kann der tetraploide Zustand von Stamm 400 und gleichzeitig die homozygot diploide a α - bzw. aa-Konstitution der Elternstämme als gesichert angesehen werden.

γ) Pentaploidenten

Der Stamm 500 wurde isoliert als eine prototrophe Kolonie, die aus einer Mischung der beiden auxotrophen Stämme 300 und 211-1aM/2 hervorgegangen ist. Der triploide Stamm 300, dessen Ploidiegrad durch Analyse der Aufspaltung der Paarungstypallele in den Sporenkulturen bestätigt wurde (s. Tab. 1), ist bedürftig für die Aminosäure Serin und von übrigen Aminosäuren unabhängig. Der diploide Stamm 211-1aM/2 ist unabhängig von Serin aber abhängig von den Aminosäuren Valin und Isoleucin. Wie weiter oben ausgeführt, ist die Valin-Isoleucin-Abhängigkeit des haploiden Ausgangsstammes 211-1aM auf die Mutation eines Locus oder mehrerer eng gekoppelter Loci zurückzuführen. Die genetische Konstitution des selbst-diploidisierten Stammes 211-1aM/2 kann dementsprechend durch die Symbole a α , vi vi, SeSe wiedergegeben werden und die des triploiden Stammes 300 durch die Symbole aa α , Vi Vi Vi, se se se.

Da nur die Zellen des Stammes 211-1aM/2 kopulationsfähig sind, die des Stammes 300 aber nicht kopulieren können, liegt die Vermutung nahe, daß als Voraussetzung für die Entstehung von Stamm 500 eine Mutation eines Paarungstypallels in einer Zelle des Stammes 300 zu der Paarungstyp-Konstitution aaa geführt hat. Aus einer Vermehrung derartiger für das Paarungstypallele a homozygoter triploider Zellen und nachfolgender Kopulation mit einer diploiden aa-Zelle könnte der pentaploide Stamm 500 möglicherweise hervorgegangen sein.

¹² H. ROMAN, M. M. PHILLIPS u. S. M. SANDS, *Genetics* **40**, 546 [1955].

Dessen genetische Konstitution wäre dann durch die Symbole $aaazx$, $Vi Vi Vi vi vi$, $Se Se se se se$ zu kennzeichnen.

Eine Analyse der Sporenkulturen von St. 500 wurde durch mikromanipulatorische Isolierung mehrerer Asci durchgeführt. Von 18 isolierten Asci keimten nur bei 9 alle 4 Sporen aus, bei 5 Asci keimten je 3 Sporen aus, bei 3 Asci je 2 Sporen und bei 1 Ascus keimte nur 1 Spore. Die Sporenkulturen wurden mit haploiden a - und α -Teststämmen gekreuzt. Fand Zygotenbildung mit einem a -Teststamm statt, wurde die Kultur als a' klassifiziert, bei Zygotenbildung mit einem α -Teststamm wurde die Kultur entsprechend als α' klassifiziert. Unter dem Symbol θ wurden alle Kulturen zusammengefaßt, die weder mit dem a - noch mit dem α -Teststamm Zygoten bildeten. Letztere Gruppe von Kulturen wurde außerdem auf ihr Sporulationsvermögen geprüft. Ascusbildung war selbst nach mehrfachen Sporulationsansätzen bei einem Teil der θ -Kulturen nicht zu beobachten. Da bereits bei triploiden Kulturen häufig eine geringe Ascusbildung beobachtet wird¹⁰, ist dieses Ergebnis bei den wahrscheinlich vielfach aneuploiden Chromosomensätzen der Sporenkulturen pentaploider Stämme nicht unverständlich.

Da Stamm 500 auch heterozygot für Serin- und Valin-Isoleucin-Bedürftigkeit bzw. -Nichtbedürftigkeit ist, wurden die Sporenkulturen auch auf ihre Abhängigkeit von diesen Aminosäuren geprüft. In Tab. 3 a und b sind die Ergebnisse der Sporenanalysen zusammengefaßt. Dabei wird das aus der Analyse sämtlicher Sporenkulturen vollständig und unvollständig ausgekeimter Tetraden erhaltene Ergebnis von den aus kompletten Tetraden gewonnenen Ergebnissen getrennt aufgeführt.

Bisher liegen noch keine genetischen Analysen pentaploider Hefestämme vor, mit denen die in

Verteilung des Paarungsverhaltens $\theta:a':\alpha'$	Zahl der Asci	Nichtbedürftigkeit: Bedürftigkeit	Zahl der Asci	
			Serin	Valin-Isoleucin
4:0:0	2	4:0	4	3
3:1:0	5	3:1	5	3
2:1:1	2	2:2	0	3

Tab. 3 b. Aufspaltung des Paarungsverhaltens und der Aminosäurebedürftigkeit in den Sporenkulturen vom Stamm 500 (nur 9 Asci, in denen alle 4 Sporen ausgekeimt sind, wurden berücksichtigt).

Tab. 3 a und b zusammengefaßten Daten verglichen werden könnten. Da sich während der Meiose pentaploider Zellen möglicherweise eine Reihe theoretisch schwer erfaßbarer Anomalien ereignen, wurde im Rahmen dieser Untersuchungen mit dem hier vorliegenden kleinen Material kein Versuch zur Entwicklung theoretischer Modelle zur Klärung der Aufspaltungsverhältnisse unternommen. Immerhin kann der Unterschied in den Aufspaltungsergebnissen für die Paarungstyp-Konstitution im Vergleich zu den an Stamm 300 erzielten Ergebnissen (s. Tab. 1) als Hinweis für einen nicht triploiden Zustand gewertet werden. Außerdem zeigt das Auftreten serin- bzw. valin-isoleucin-bedürftiger Sporenkulturen (s. Tab. 3 a und b), daß St. 500 tatsächlich aus einer Verschmelzung von Zellen der Stämme 300 und 211-1aM/2 hervorgegangen ist. Der bekannte Ploidiegrad dieser Stämme verstärkt die Wahrscheinlichkeit für den pentaploiden Zustand von Stamm 500. Schließlich sei noch hingewiesen auf die Zusammenstellung der durchschnittlichen Zellvolumina haploider bis hexaploider Stämme in Tab. 5. Wie zu ersehen, liegt das durchschnittliche Zellvolumen von Stamm 500 zwischen den Werten der tetraploiden und hexaploiden Stämme. Alle diese Angaben bestärken die Wahrscheinlichkeit für den pentaploiden Zustand des Stammes 500.

δ) Hexaploiden

Stamm 600 wurde isoliert als eine prototrophe Kolonie, die aus einer Mischung der auxotrophen triploiden Stämme 300 und 301 hervorgegangen ist. Stamm 300 ist serin-bedürftig, Stamm 301 valin-isoleucin-bedürftig. Da beide triploiden Stämme infolge ihrer Entstehungsweise bis auf die Paarungstypallele homozygot sein sollten, läßt sich ihre vermutliche genetische Konstitution symbolisch folgendermaßen angeben: 300: $aa\bar{x}$, $se\ se\ se$, $Vi Vi Vi$; 301: $aa\bar{x}$, $Se Se Se$, $vi vi vi$.

Paarungsverhalten	Zahl der Sporenkulturen	Bedürftigkeit	Zahl der Sporenkulturen
θ	42	Serin	7
a'	12	Valin-Isoleucin	15
α'	4	Serin + Valin-Isoleucin	0
		nicht bedürftig	36

Tab. 3 a. Aufspaltung des Paarungsverhaltens sowie der Aminosäurebedürftigkeit in sämtlichen Sporenkulturen aller analysierten Asci eines vermutlich pentaploiden Stammes (500).

Stamm	Paarungsverhalten $\theta : a' : \alpha'$	Serin- Nichtbedürftigkeit : Bedürftigkeit	Valin-Isoleucin- Nichtbedürftigkeit : Bedürftigkeit
600	61 : 8 : 6 81,4% 10,6% 8%	60 : 10 ¹ 85,7% 14,3%	68 : 2 ¹ 97,1% 2,9%
Angaben von Mortimer ⁹	72 : 10 : 10 78,4% 10,8% 10,8% ²	95% : 5% ³ 90% : 10%	95% : 5% ³
X ²	0,83	18,21 1,78	0,93
P	0,66	2.10 ⁻⁵ 0,42	0,33

Tab. 4. Aufspaltung des Paarungsverhaltens und der Aminosäurebedürftigkeit in den Sporenkulturen hexaploider Stämme.

¹ Es wurden nur 70 Kulturen auf ihre Aminosäurebedürftigkeit überprüft. ² Von MORTIMER⁹ beobachtete Häufigkeiten von Sporenkulturen mit entsprechendem Paarungsverhalten. ³ Von MORTIMER⁹ berechnete theoretische Erwartung für die Häufigkeiten homozygot rezessiver Sporenkulturen bei triplex Konstitution des Hexaplonten.

Da beide Stämme nicht kopulieren können, liegt, ähnlich wie bei der Entstehung von Stamm 500, die Annahme nahe, daß der auxotrophe Stamm 600 aus einer Verschmelzung zweier durch Mutation eines Paarungstypallels komplementär homozygot gewordener triploider Zellen hervorgegangen ist. Seine genetische Konstitution sollte sich dann symbolisch folgendermaßen ausdrücken lassen: $aaa\alpha\alpha\alpha$, $Se\ Se\ Se\ se\ se\ se$, $Vi\ Vi\ Vi\ vi\ vi\ vi$ (triplex Typ).

Mit Hilfe der Massenisolations-Technik wurden 75 Sporenkulturen von Stamm 600 isoliert und auf ihr Paarungsverhalten sowie ihre Abhängigkeit von Serin und/oder Valin-Isoleucin überprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt und mit Ergebnissen von MORTIMER⁹, die aus Tetradenanalysen eines hexaploiden Stammes (ebenfalls triplex Typ) gewonnen wurden, verglichen.

Zur Bestimmung des Paarungsverhaltens wurden alle Sporenkulturen auf ihre Kopulationsfähigkeit mit einem haploiden a - oder α -Teststamm geprüft und bei Zygotenbildung als α' bzw. a' klassifiziert. Der Ploidiegrad der a' - und α' -Stämme wurde nicht weiter analysiert; die kopulationsfähigen Stämme sind wahrscheinlich homozygot für die Allele a bzw. α . Nicht kopulationsfähige Stämme wurden unter dem Symbol θ zusammengefaßt. Auch bei diesen Stämmen wurde der Ploidiegrad nicht bestimmt. Sie sind wahrscheinlich heterozygot für die Paarungstypallele. Nicht bei allen Stämmen der letzten Gruppe konnte Sporenbildung beobachtet werden. Wie aus Tab. 4 zu ersehen, stimmen die Häufigkeiten der Sporenkulturen verschiedenen Paarungsverhaltens gut mit den von MORTIMER beobachteten Werten überein. Die Übereinstimmung mit den von MORTIMER unter bestimmten Voraussetzungen (u. a. zufallsgemäße Bivalentbildung, gleichmäßige und zufällige Verteilung der Zentromere zu

den Polen) errechneten theoretischen Erwartungswerten ($\theta : a' : \alpha' = 90 : 5 : 5$) ist dagegen weniger gut. Der damit zweifach beobachtete höher als theoretisch zu erwartende Prozentsatz von Sporenkulturen, die für die Paarungstypallele homozygot sind, deutet auf das Nichtzutreffen bestimmter theoretischer Voraussetzungen hin. So lassen sich die Befunde z. B. durch die Annahme einer bevorzugten Polwanderung von Chromosomen mit gleichem Paarungstypallel erklären.

Außer der Aufspaltung der Paarungstypallele läßt sich in den Sporenkulturen von Stamm 600 noch die Aufspaltung der die Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit von Serin und Valin-Isoleucin steuernden Allele verfolgen. Hierbei können ohne weitere Kreuzungsanalysen nur zwei Klassen unterschieden werden; einmal Sporenkulturen, die bedürftig für eine bestimmte Aminosäure sind und damit homozygot für das betreffende rezessive Allel sein müssen, zum anderen Sporenkulturen, die für eine bestimmte Aminosäure nicht bedürftig sind und dementsprechend ein oder mehrere dominante Allele besitzen. Nach Berechnungen von MORTIMER sind unter den oben bereits erwähnten Voraussetzungen unter den Sporenkulturen eines hexaploiden Stammes von triplex Konstitution 5% für ein bestimmtes Allel homozygot rezessive Kulturen zu erwarten. Wie aus Tab. 4 ersichtlich, ist die Übereinstimmung zwischen theoretischer Erwartung und beobachtetem Ergebnis im Falle der Valin-Isoleucin-Bedürftigkeit befriedigend, während im Falle der Serin-Bedürftigkeit eine erhebliche Abweichung von der Erwartung festzustellen ist. Ursachen für das Überwiegen der homozygot rezessiven serin-bedürftigen Kulturen sind schwer eindeutig anzugeben. Jedoch zeigten bereits die experimentellen Befunde MORTIMERS bezüglich des Paarungsverhaltens der Sporenkulturen, daß an-

Stamm	Ploidiegrad	Paarungstyp- allele	Durchmesser 2a [μ] 2b		Volumen ¹ [μ^3]	relat. Vol. ² [V_p/V_1]
211—1bN	haploid	a	4,4	4,2	40,5	1,00
211—1aM	haploid	α	4,5	3,9	37,8	
211—1bN/2	diploid	aa	5,7	5,3	83,6	2,19
211—1aM/2	diploid	$\alpha\alpha$	6,0	5,3	88,1	2,26
219	diploid	az	6,6	5,6	107,5	2,74
230	diploid	az	5,7	5,0	74,6	1,90
300	triploid	aa α	7,5	6,2	151,2	3,86
301	triploid	aa α	7,5	5,7	127,7	3,25
400	tetraploid	aa $\alpha\alpha$	8,2	6,5	181,4	4,64
500	pentaploid	aaa $\alpha\alpha$	8,7	6,7	204,2	5,20
600	hexaploid	aaa $\alpha\alpha\alpha$	9,7	7,2	262,0	6,70

Tab. 5. Zelldurchmesser und -Volumen einer weitestgehend homozygoten Stammserie.

¹ Berechnet nach $V = \frac{4\pi}{3} a b^2$.² $V_1 = 39,15$ (Mittelwert der Volumina der beiden Haplonten).

statt der theoretisch erwarteten 5% homozygot rezessiver Sporenkulturen 10% auftraten, was auf eine Abweichung vom zufallsgemäßen Verteilungsmechanismus der die Paarungstypallele tragenden Chromosomen hindeutet. Nimmt man für die die Se/se-Allele tragenden Chromosomen eine Abweichung von etwa gleichem Ausmaß an, vergleicht man also die beobachteten Werte von 14,3% bzw. 85,7% mit Erwartungswerten von 10% bzw. 90%, ergibt sich ein X^2 -Wert von 1,78 und ein P -Wert von 0,42. Hieraus wird ersichtlich, daß die beobachteten Werte der Häufigkeiten serin-bedürftiger bzw. -nicht-bedürftiger Kulturen eine hexasome Konstitution (triplex Typ) des die entsprechenden Allele tragenden Chromosomen nicht unbedingt ausschließen.

Die beobachteten Werte lassen sich allerdings auch durch andere Annahmen interpretieren. So hat man z. B. bei Gültigkeit oben erwähnter Voraussetzungen und Vorliegen hexaploider Zellen vom duplex Typ (Se Se se se se se) etwa 20% homozygot rezessiver Sporenkulturen zu erwarten⁹. Jedoch ist es zum Entstehen einer derartigen Konstitution notwendig, daß der homozygot dominante Elter 301 (Se Se Se) durch Mutation heterozygot (Se Se se) wurde. Eine derartige Heterozygotie des Stammes 301 konnte bei Überprüfung seiner Sporenkulturen nicht nachgewiesen werden. Natürlich ist nicht auszuschließen, daß gerade an der zur Bildung des Stammes 600 führenden Kopulation eine 301-Zelle obigen Typs beteiligt war. Schließlich mag auch der Verlust eines ein dominantes Allel tragenden Chromosoms in den Zellen des Stammes 600 zu einem vermehrten Auftreten homozygot rezessiver Sporenkulturen führen.

Eine eindeutige Entscheidung zwischen diesen verschiedenen Interpretations-Möglichkeiten ist ohne weitere ausgedehnte Kreuzungsanalysen nicht möglich. So läßt sich vorerst zusammenfassend nur feststellen, daß in den Zellen des Stammes 600 das jeweils 6-fache Vorliegen der Chromosomen, die die den Paarungstyp, die Serin-Synthese sowie die Valin-Isoleucin-Synthese steuernden Gene tragen, nicht unwahrscheinlich ist, wenn man annimmt, daß die Chromosomen der beiden erstgenannten Gruppen nicht rein zufällig verteilt während der Meiose an die Pole wandern. Ein weiterer Hinweis auf die hexaploide Konstitution des Stammes 600 ergibt sich aus dem Vergleich der durchschnittlichen Zellvolumina mit denjenigen der übrigen Ploidieklassen (vgl. Tab. 5).

4. Durchschnittliche Zellvolumina der Stämme

Bereits von MUNDKUR¹³ und MORTIMER⁹ sowie in l. c.^{1a} wurde eine annähernd ploidiegrad-proportionale Zunahme des Zellvolumens bei Saccharomyces-Stämmen verschiedenen Ploidiegrades festgestellt. Eine Bestimmung der Zellvolumina der hier beschriebenen Stammserien konnte deshalb weitere Hinweise zur Beurteilung des Ploidiegrades liefern. So wurden die langen und kurzen Achsen (2a bzw. 2b) von jeweils 100 bis 120 Zellen aus Kulturen in der stationären Wachstumsphase nach Waschung und Aufbringung auf eine Agarschicht mit Hilfe eines Okularmikrometers bestimmt. Die Mittelwerte für die Zelldurchmesser und die daraus berechneten Werte für absolutes und relatives Zellvolumen sind

¹³ B. D. MUNDKUR, Experientia [Basel] 9, 373 [1953].

in Tab. 5 zusammengefaßt. Wie zu ersehen, steigt das relative Zellvolumen annähernd proportional mit steigendem Ploidiegrad. Dieser Befund stimmt mit den Resultaten anderer Autoren über eine ploidiegrad-proportionale Zunahme des Zellvolumens polyploider *Saccharomyces*-Stämme überein^{9, 13}.

Die absoluten Werte der Tab. 5 liegen systematisch etwas höher als die in l. c.^{1a} ermittelten Werte. Dieser Unterschied mag in der verschiedenartigen Methode begründet liegen. Während damals die Zelldurchmesser aus Mikrophotographien bestimmt wurden, wurde diesmal eine direkte Messung vorgenommen. Wichtiger als die absoluten sind in diesem Falle jedoch die relativen Werte.

5. Strahlenempfindlichkeit der Stämme

Bei der weitgehenden Homozygotie und Isogenie der in Abb. 1 aufgeführten Stämme konnte eine weitgehend gleiche Strahlenempfindlichkeit der Stämme einer Ploidieklasse erwartet werden. Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Ploidieklassen sollten dann allein durch die unterschiedliche Zahl von Chromosomensätzen pro Zelle bedingt sein und Schlüsse auf ploidiegradabhängige Prozesse ermöglichen, die der Inaktivierung zugrunde liegen.

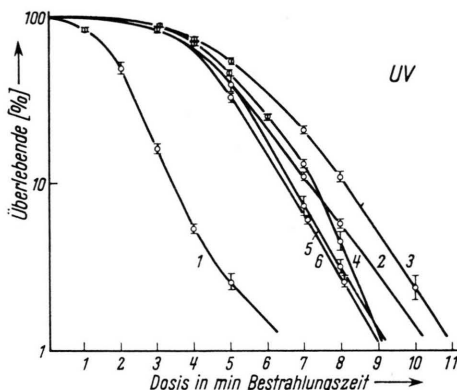


Abb. 2. UV-Dosiseffektkurven einer Serie weitestgehend homozygoter, isogener Stämme. Die Senkrechten geben die halben maximalen Schwankungsbreiten an.

- 1 haploid: Stamm-Nr. 211-1bN (211-1a, 211-1b, 211-1aM)
- 2 diploid: Stamm-Nr. 211-1bN/2 (211-1aM/2, 211-1a/2, 211-1b/2, 211, 219, 230)
- 3 triploid: Stamm-Nr. 300 (301, 313)
- 4 tetraploid: Stamm-Nr. 400
- 5 pentaploid: Stamm-Nr. 500
- 6 hexaploid: Stamm-Nr. 600

(In Klammern Stämme, deren Inaktivierungsraten unsystematisch innerhalb der eingetragenen Schwankungsbreiten streuen.)

Inaktivierungsversuche mit ultravioletem Licht (UV) erbrachten tatsächlich eine gleichartige Strahlenempfindlichkeit aller Stämme gleicher Ploidieklasse. In Abb. 2 sind die UV-Dosiseffektkurven für eine Serie haploider bis hexaploider Stämme wiedergegeben. Für die Kurven 1–3 liegen jeweils Werte von 3–7 Stämmen vor, die unsystematisch im Rahmen der eingezeichneten Schwankungen streuen (Einzelwerte für eine Anzahl diploider Stämme sind in Abb. 8 angegeben.) Allgemein ist festzustellen, daß die haploiden Stämme am empfindlichsten sind, daß Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit der di- und polyploiden Stämme nicht sehr stark ausgeprägt sind (vgl. dagegen Rö-Dosiseffektkurven), daß aber dennoch in einem größeren Dosissbereich eine maximale Strahlenresistenz der Triplonten und eine zunehmende Empfindlichkeit bei Tetra- bis Hexaplonten erkennbar ist.

Eine derartige identische Empfindlichkeit aller Stämme einer Ploidieklasse des hier behandelten Stammsystems ist dagegen bei Inaktivierungsversuchen mit Röntgenstrahlen (Rö) nicht vorhanden. Hier zeigen sich Einflüsse der Paarungstypallele sowie der die Abhängigkeit von bestimmten Aminosäuren bedingenden Allele. Der bereits in l. c.^{1a} beschriebene „ $\alpha\alpha$ -Effekt“ (höhere Rö-Resistenz von $\alpha\alpha$ -Diplonten im Vergleich zu $\alpha\alpha$ - bzw. $\alpha\alpha$ -Diplonten bei sonst völliger Homozygotie und Isogenie) tritt bei sämtlichen Diplontengruppen des Stammbaums der Abb. 1 auf. Im übrigen erweisen sich die di- und polyploiden aminosäure-bedürftigen Abkömmlinge von 211-1aM und 211-1bN deutlich Rö-resistenter als jeweils die prototrophen Stämme gleicher Ploidieklasse der zentralen Stammserie der Abb. 1.

In Abb. 3 sind die Dosiseffektkurven einer Serie haploider bis tetraploider Stämme – als Abkömmlinge von 211-1bN sämtlich serin-bedürftig – sowie die Kurven für den prototrophen penta- und hexaploiden Stamm wiedergegeben. Wenn man vom diploiden $\alpha\alpha$ -Stamm absieht, ergibt sich im Vergleich zu den UV-Dosiseffektkurven eine gleichartige, jedoch wesentlich deutlicher ausgeprägte relative Strahlenresistenz der einzelnen Ploidieklassen^{13a}. Der $\alpha\alpha$ -Effekt wird aus dem unterschiedlichen Verlauf der beiden Kurven Nr. 2 deutlich. Diese unter-

^{13a} Die Dosiseffektkurven der prototrophen penta- und hexaploiden Stämme können allerdings infolge des fehlenden $\alpha\alpha$ -Effektes nicht unmittelbar mit den Kurven der übrigen auxotrophen Stämme verglichen werden.

schiedliche Rö-Empfindlichkeit tritt im gleichen Ausmaß bei allen aminosäure-bedürftigen Diplonten des hier behandelten Stammsystems auf. So zeigen Abkömmlinge des Stammes 211-1aM eine etwa gleiche Rö-Empfindlichkeit wie Abkömmlinge des jeweils gleichen Ploidiegrades von Stamm 211-1bN. In der Legende zu Abb. 3 sind in Klammern diejenigen überprüften Stämme angegeben, deren Inaktivierungsrate unsystematisch im Rahmen der eingetragenen Schwankungsbreite der jeweiligen Kurven streuen (Einzelwerte sind z. T. in Abb. 5 und 7 angegeben).

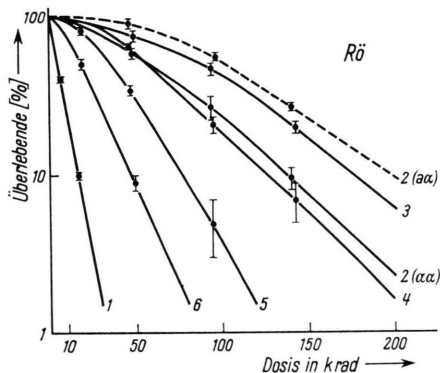


Abb. 3. Röntgenstrahlen-Dosiseffektkurven einer Serie weitestgehend homozygoter, isogener Stämme. Die Senkrechten geben die halbe maximale Schwankungsbreite an.

- 1 haploid: Stamm-Nr. 211-1bN (211-1a, 211-1b, 211-1aM, 219-1a bis 1d)
- 2 (aa) diploid: Stamm-Nr. 211-1bN/2 (211-1aM/2, (aα) 219-1a/2, 219-1b/2)
- 2 (aα) diploid: Stamm-Nr. 219 (230, 260)
- 3 triploid: Stamm-Nr. 300 (301)
- 4 tetraploid: Stamm-Nr. 400
- 5 pentaploid: Stamm-Nr. 500
- 6 hexaploid: Stamm-Nr. 600

(In Klammern Stämme, deren Inaktivierungsraten unsystematisch innerhalb der eingetragenen Schwankungsbereiche streuen.)

Was den aα-Effekt betrifft, ist ein Hinweis auf die Stammpaare 211-1bN/2 (aa) und 219 (aα) sowie 219-1b/2 (aa) und 260 (aα) interessant. Das erste Paar wurde aus dem haploiden Stamm 211-1bN isoliert, das zweite aus dem haploiden Stamm 219-1b, der wiederum aus einer Ascospore von 219 hervorgegangen ist (vgl. Abb. 1). Die Dosiseffektkurven dieser Stämme sind identisch mit den entsprechenden aa- bzw. aα-Kurven der Abb. 3. Die 4 haploiden Sporenkulturen des Ascus 219-1 zeigen alle eine gleiche Rö-Empfindlichkeit. Die Inaktivierungsraten dieser Stämme fallen unsystematisch streuend in den Schwankungsbereich der Kurve 1 der Abb. 3. Der Resistenzeffekt verschwindet also in den haploiden

Produkten der Meiose, tritt aber nach aα-Diploidisierung in gleichem Ausmaß wieder auf. Erwähnt sei in diesem Zusammenhang noch einmal, daß auch die aus der Sporenkultur 219-1a isolierte diploide aα-Kultur 219-1a/2 die gleiche Rö-Empfindlichkeit wie die aus der Sporenkultur 219-1b isolierte aa-Kultur 219-1b/2 besitzt.

Der aα-Effekt tritt nicht nur bei Rö-Inaktivierungen, sondern auch bei Inaktivierungen durch Po-α-Strahlen auf (s. Abb. 4).

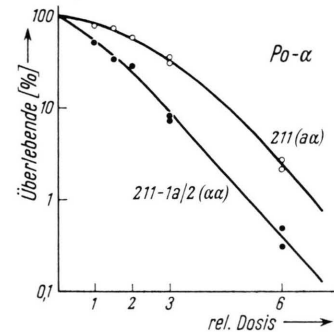


Abb. 4. Po-α-Strahlen-Dosiseffektkurven für einen aα und einen aa-Diplonten. Beide Stämme sind für die übrigen Allele homozygot und isogen.

Außer den Paarungstypallelen üben auch die die Serin- bzw. Valin-Isoleucin-Bedürftigkeit steuernden Allele einen resistenzerhöhenden Effekt aus. Dieser Resistenzeffekt wirkt sich nur bei di- und polyploiden Stämmen aus. Während sämtliche haploiden Stämme des Stammbaums der Abb. 1 eine gleiche Rö-Empfindlichkeit aufweisen, sind sämtliche auxotrophen di- und polyploiden Stämme wesentlich röntgen-resistenter als die entsprechenden prototrophen Stämme (zentrale Serie der Abb. 1). Abb. 5 zeigt als Beispiel die

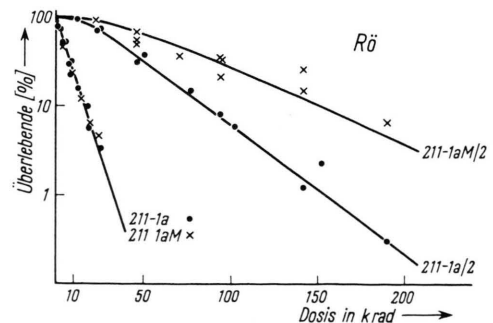


Abb. 5. Röntgenstrahlen-Dosiseffektkurven für verschiedene prototrophe und valin-isoleucin-bedürftige Haplonten und aα-Diplonten (Einzelheiten im Text).

Dosiseffektkurve für haploide und diploide prototrophe und auxotrophe Stämme. Daß auch bei den tri- und tetraploiden Stämmen derartige Resistenzunterschiede vorliegen, zeigt ein Vergleich der entsprechenden Dosiseffektivkurven aus Abb. 2 mit den früher^{1a} veröffentlichten Rö-Dosiseffektcurven für die prototrophe Stammserie. Ähnliche Resistenzunterschiede treten auch bei Po- α -Bestrahlung auf (Abb. 6). Dieser mit der Bedürftigkeit für be-

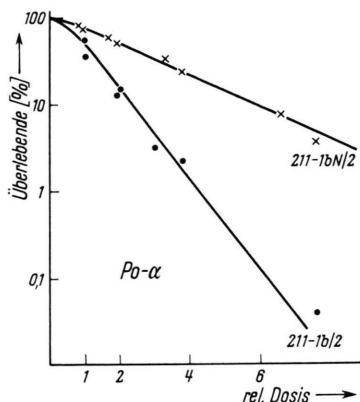


Abb. 6. Po- α -Strahlen-Dosiseffektcurven für einen prototrophen (211-1b/2) und einen serin-bedürftigen (211-1bN/2) $\alpha\alpha$ -Diplonten.

stimmte Aminosäuren eng korrelierte Resistenzeffekt soll im folgenden als „AS-Effekt“ bezeichnet werden.

Der AS-Effekt wurde bisher nur bei di- und polyploiden Stämmen festgestellt, die bedürftig für Serin oder Valin-Isoleucin waren. Um das Vorkommen dieses Effekts auch bei anderen auxotrophen Mutanten zu prüfen, wurde nach weiteren spontan aufgetretenen auxotrophen Mutanten bei verschiedenen haploiden Stämmen dieses Stammsystems gesucht. Bisher wurde eine methionin-bedürftige Mutante isoliert, die nach Diploidisierung jedoch keine größere Rö-Resistenz als prototrophe Diplonten aufweist. Dieser Befund zeigt, daß nicht jede Aminosäurebedürftigkeit zu einer Resistenzhöhung diploider Stämme führt. Dennoch soll die Bezeichnung „AS-Effekt“ als terminus technicus für eine durch eine Aminosäurebedürftigkeit bedingte Resistenzhöhung weiterhin verwendet werden. Abschließend sei noch betont, daß der AS-Effekt nicht den $\alpha\alpha$ -Effekt aufhebt, was bereits aus Abb. 3 erkennbar ist. Die Überlagerung von AS- und $\alpha\alpha$ -Effekt wird besonders deutlich bei einem Vergleich der Rö-Inaktivierungskurven von prototrophen und serin-bedürftigen $\alpha\alpha$ - und $\alpha\alpha$ -Diplonten (Abb. 7).

Wie bereits erwähnt, treten weder der AS- noch der $\alpha\alpha$ -Effekt bei UV-Inaktivierung auf (Abb. 8).

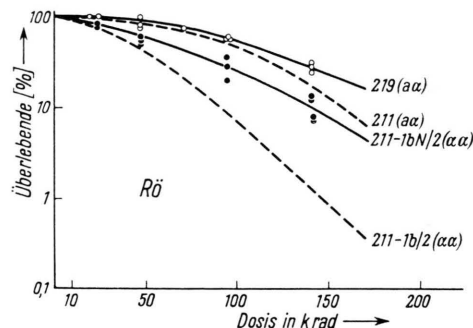


Abb. 7. Röntgenstrahlen-Dosiseffektcurven für prototrophe (211-1b/2, 211) und serin-bedürftige (211-1bN/2, 219) Diplonten. Die gestrichelten Kurven wurden aus l. c.^{1a} übernommen (Einzelheiten im Text).

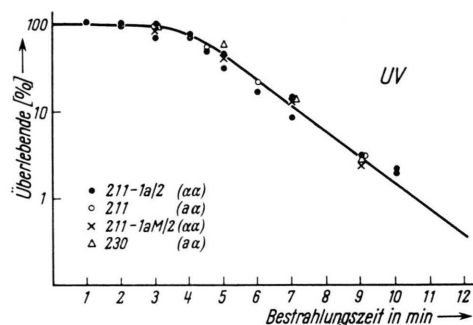


Abb. 8. UV-Dosiseffektcurve für verschiedene prototrophe und valin-isoleucin-bedürftige $\alpha\alpha$ - und $\alpha\alpha$ -Diplonten.

6. Zusammenfassende Diskussion

Durch Anwendung geeigneter Kreuzungs- und Sporulationsschritte wurde versucht, ein System weitestgehend isogener, homozygoter haploider bis hexaploider *Saccharomyces*-Stämme aufzubauen. Der infolge der jeweiligen Entstehungsweise vermutete Ploidiegrad der einzelnen Stämme wurde durch Analyse der Verteilung bestimmter Markierungsfaktoren in den Sporenkulturen der Stämme geprüft. Im allgemeinen wurde zu dieser genetischen Analyse die Aufspaltung der Paarungstypallele herangezogen und mit bereits bekannten Erwartungswerten verglichen. Nur für pentaploide Stämme liegen bisher in der Literatur noch keine Erwartungswerte vor, so daß der Ploidiegrad des Stammes 500 nur indirekt auf Grund der Entstehungsweise, des durchschnittlichen Zellvolumens und der Feststellung der Aufspaltung unterschiedlicher Markierungsfaktoren

beider Elternstämme in den Sporenkulturen erschlossen werden konnte. Während bei den meisten Stämmen infolge ihrer mit Ausnahme der Paarungstypallele strengen Homozygotie keine Aufspaltung weiterer Markierungsfaktoren beobachtet werden konnte, war hierzu beim penta- und hexaploiden Stamm die Möglichkeit gegeben. Diese beiden Stämme sind das prototrophe Kreuzungsprodukt von jeweils 2 komplementär auxotrophen Elternstämmen und sind deshalb heterozygot für 2 weitere Allelenpaare. Nur beim hexaploiden Stamm war die Aufspaltung der beiden Allelenpaare, die die Serin- bzw. Valin-Isoleucin-Synthese steuern, mit bekannten Erwartungswerten zu vergleichen. Auch die Verteilung dieser Allelenpaare in den Sporenkulturen war unter bestimmten Annahmen mit der vermuteten hexaploiden Konstitution nicht unverträglich. Schließlich ergab eine Bestimmung der durchschnittlichen Zelldurchmesser haploider bis hexaploider Stämme eine annähernd ploidiegrad-proportionale Zunahme der Zellvolumina, was in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen^{1a} und Beobachtungen anderer Autoren^{9, 13} steht.

Alle diese Befunde machen es wahrscheinlich, daß eine Serie haploider bis hexaploider Stämme vorliegt. Es sei jedoch betont, daß genetisch nur nachgewiesen wurde, daß bei den di- und polyploiden Stämmen eine di- bis hexasome Konstitution bestimmter einzelner Chromosomen mit bestimmter Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann. Da eine cytologische Bestimmung der Chromosomenzahl pro Zelle bei *Saccharomyces* bisher nicht eindeutig zu bewerkstelligen ist, könnte ein eindeutiger Nachweis echter Euploidie — d. h. das der Ploidieklasse entsprechende mehrfache Vorhandensein sämtlicher Chromosomen eines Satzes — nur durch Überprüfung der meiotischen Verteilung von mindestens jeweils einem zentromergekoppelten Markierungsfaktor pro bekannter Kopplungsgruppe erbracht werden. Die bisher vollständigste genetische Analyse hat das Vorliegen von 10 Kopplungsgruppen bei *Saccharomyces* nachgewiesen¹⁴. Demzufolge wäre die Beobachtung der Aufspaltung von jeweils mindestens 10 an verschiedene Zentromere gekoppelten heterozygot vorliegenden Markierungsfaktoren in den Tetraden der zu prüfenden Stämme notwendig.

Abgesehen von der Aufwendigkeit einer derartigen Analyse, läßt sich dieser Idealfall bei den hier gezüchteten Stämmen infolge der angestrebten möglichst weitgehenden Homozygotie nicht verwirklichen. Man muß sich also mit der oben erwähnten Wahrscheinlichkeits-Aussage begnügen und kann ein mögliches Vorliegen aneuploider Stämme nicht streng ausschließen.

Trotz dieser Einschränkungen bilden die hier gezüchteten Stämme eine wesentliche Voraussetzung zur Beurteilung und Abschätzung strahleninduzierter inaktivierender Prozesse¹⁵. In den durchgeführten Inaktivierungsversuchen hat sich wiederum die bereits früher^{1a} an einer Serie haploider bis tetraploider weitestgehend homozygoter, isogener Stämme festgestellte maximale Strahlenresistenz von Triplonten bzw. $\alpha\alpha$ -Diplonten bestätigt. Darüber hinaus zeigte sich, daß die Abnahme der relativen Strahlenresistenz bei Ploidieklassen >3 sich auch bei penta- und hexaploiden Stämmen sowohl nach Rö- als auch nach UV-Inaktivierung fortsetzt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Befunden von MORTIMER⁹ nach Rö-Bestrahlung haploider bis hexaploider Stämme.

Wie bereits mehrfach diskutiert^{1a, 9}, läßt sich das Maximum der relativen Strahlenresistenz bestimmter Ploidieklassen plausibel durch die unterschiedlichen Auswirkungswahrscheinlichkeiten induzierter rezessiver und dominanter Letalmutationen¹⁶ verstehen. Eine quantitative Analyse der Ausmaße der verschiedenen Letaleffekte bei den hier behandelten Stammserien soll in einer späteren Arbeit erfolgen. Hier seien die Auswirkungen bestimmter mutierter Allele auf die Strahlenresistenz diskutiert.

Ein Ergebnis der geschilderten Kreuzungsexperimente ist das Vorliegen dreier Serien haploider bis tetraploider Stämme, die bis auf die Bedürftigkeit bzw. Nichtbedürftigkeit für bestimmte Aminosäuren jeweils weitestgehend isogen und homozygot sind. In Inaktivierungs-Experimenten zeigte sich, daß die durch Mutation eines Gens auxotroph gewordenen Stämme der Ploidieklassen >1 wesentlich resistenter gegenüber Rö- und Po- α -Strahlen waren als die sonst weitestgehend isogenen prototrophen Stämme gleicher Ploidieklasse (AS-Effekt). Ein Einfluß verschiedener die Synthese bestimmter Aminosäuren

¹⁴ D. C. HAWTHORNE u. R. K. MORTIMER, *Genetics* **45**, 1085 [1960].

¹⁵ W. STEIN u. W. LASKOWSKI, *Z. Naturforsch.* **13b**, 651 [1958].

¹⁶ Unter „Letalmutationen“ werden hier alle genotypischen Veränderungen, die zu einem Ausbleiben der Koloniebildung auf Vollmedium führen, verstanden.

steuernder Allele auf die strahleninduzierte Mutagenese ist bereits von anderen Organismen bekannt¹⁷. Charakteristisch für den hier beschriebenen AS-Effekt ist jedoch sein Auftreten bei di- und polyploiden Stämmen und sein Fehlen bei Haplonten. Sucht man zur Erklärung dieser Erscheinung nach möglichen Unterschieden im Inaktivierungs-Mechanismus zwischen haploiden und höher-ploiden *Saccharomyces*-Zellen, so fallen die unterschiedlichen Anteile an rezessiven und dominanten Letalmutationen bei der Inaktivierung haploider und höher-ploider Stämme auf¹⁴. Während die Inaktivierung haploider Zellen vorwiegend auf Induktion rezessiver Letalmutationen beruht, ist die Inaktivierung di- und polyploider Zellen wohl vorwiegend auf die Induktion dominanter Letalmutationen zurückzuführen. Im Hinblick auf diesen Tatbestand wäre die Ploidiegradabhängigkeit des AS-Effektes durch die Annahme erklärbar, daß dieser Effekt vornehmlich die Induktions- oder Auswirkungswahrscheinlichkeit dominanter Letalmutationen reduziert, sich deswegen also nur in Ploidieklassen >1 merklich auswirken kann. Da eine frühere Analyse¹⁴ gezeigt hat, daß der Anteil dominanter Letalmutationen bei der UV-Inaktivierung diploider bis tetraploider Zellen wesentlich geringer als bei Inaktivierung mit ionisierenden Strahlen ist, erscheint das Fehlen des AS-Effektes in UV-Inaktivierungs-Experimenten nicht unplausibel. Die Richtigkeit dieser indirekt erschlossenen Annahme kann in noch durchzuführenden Kreuzungs- und Sporulations-Experimenten direkt überprüft werden. Sollte sich dabei bestätigen, daß der AS-Effekt tatsächlich vorwiegend die Häufigkeit dominanter Letalmutationen reduziert, wäre damit wohl ein erstes physiologisches Mittel zur differenzierten Beeinflussung dieser beiden Klassen von Letalmutationen nachgewiesen.

Über die konkreten biochemischen Ursachen des AS-Effektes lassen sich bisher nur Vermutungen äußern. Möglicherweise sammeln sich in Zellen, deren Fähigkeit zur Synthese bestimmter Aminosäuren blockiert ist, Vorstufen an, die eine Strahlenschutzwirkung ausüben. Bereits heute steht fest, daß jedoch nicht alle Aminosäuresynthese-Blockierungen derartige Schutzeffekte bewirken. Das zeigt der Fall einer methionin-bedürftigen Mutanten, bei der kein AS-Effekt festzustellen war.

Außer den Allelen, die die Synthese bestimmter Aminosäuren steuern, haben auch wieder, in Bestätigung früherer Befunde^{1a}, die Paarungstypallele einen zusätzlichen Einfluß auf die Resistenz diploider Stämme gegenüber ionisierenden Strahlen gezeigt ($\alpha\alpha$ -Effekt). Mögliche biochemische Ursachen dieses Effektes wurden bereits an anderer Stelle erörtert^{1c, 18}.

Vergleicht man die durch den $\alpha\alpha$ -Effekt vermittelte Strahlenresistenz mit der durch den AS-Effekt bedingten, fällt ein charakteristischer Unterschied im Verlauf der entsprechenden Inaktivierungskurven auf (vgl. Abb. 3, 4 mit 5, 6 und 7). Während die Inaktivierungskurven der resistenten und empfindlichen Stämme im Falle des AS-Effektes durch einen annähernd konstanten Faktor miteinander in Beziehung zu setzen sind (Dosisreduktionsfaktor bei R α -Inaktivierung $\approx 1,8$, bei Po- α -Inaktivierung $\approx 2,5$), gilt ein solcher konstanter Dosisreduktionsfaktor nicht für die den $\alpha\alpha$ -Effekt dokumentierenden Kurvenpaare. Vielmehr zeigen die Dosiseffekt-kurven der $\alpha\alpha$ -Diplonten in niedrigen Dosisbereichen einen stärker gekrümmten Anfangsteil als die entsprechenden Kurven der aa- oder $\alpha\alpha$ -Diplonten, verlaufen aber in höheren Dosisbereichen annähernd parallel zu letzteren. Formal treffertheoretisch wäre ein derartiger Unterschied der Dosis-effekt-kurven im Falle des $\alpha\alpha$ -Effektes durch eine zur Inaktivierung der $\alpha\alpha$ -Diplonten notwendige höhere Trefferzahl zu deuten. Im Gegensatz hierzu wäre formal treffertheoretisch die durch den AS-Effekt bedingte Resistenz durch eine Verringerung der Treffer-wahrscheinlichkeit bei annähernd gleicher Trefferzahl zu interpretieren. Genetisch gesehen, haben beide Resistenzeffekte ($\alpha\alpha$ - und AS-Effekte) eine ähnliche Ursache; sie sind jeweils nur auf die Änderung eines Allels bzw. Allelenpaares bei sonst unverändertem identischem Genom zurückzuführen. Diese durch die Mutation einzelner Allele bedingte charakteristische Änderung der Inaktivierungskinetik deutet auf einen indirekten Wirkungsmechanismus der Inaktivierung durch Röntgen- und Po- α -Strahlen. Eine Analyse der dieser unterschiedlichen Inaktivierungskinetik zugrunde liegenden Ursachen muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben.

Für zahlreiche anregende Diskussionen bin ich Herrn Prof. Dr. W. STEIN und für verantwortungsbewußte

¹⁷ Für *Escherichia coli* s. z. B. S. W. GLOVER, Carnegie Inst. Washington Publ. 612, 121 [1956].

¹⁸ W. LASKOWSKI, Zbl. Bakteriöl., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg. I. Abt., Orig. 184, 251 [1962].

technische Assistenz Fräulein CHRISTA UMLAUF und Fräulein GABRIELE RIEBKE zu Dank verpflichtet. Finanziell wurden die Untersuchungen durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und das

Bundesministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft unterstützt, wofür diesen Institutionen auch an dieser Stelle gedankt sei.

Über zeitliche und quantitative Verhältnisse beim Erwerb artfremder Antigeneigenschaften der Zellen in vitro

Von ARNO GEISSLER und ELSE KNAKE

Aus der Abteilung für Gewebezüchtung am Max-Planck-Institut für vergleichende Erbbiologie, Berlin-Dahlem

(Z. Naturforschg. 17 b, 108—112 [1962]; eingegangen am 2. Mai 1961)

Im Glas gezüchtete Zellstämme nehmen mit dem Nährmedium ein in Form von Blutserum zugeführtes artfremdes Eiweiß auf und erwerben seine serologische Arteigenschaft. Wird ihnen Serum von verschiedenen Tierarten gleichzeitig angeboten, so üben die Zellen hierbei kein Wahlvermögen aus. Das gilt selbst dann, wenn sich unter den Seren das zur Herkunftsart des Zellstammes homologe Serum befindet. Ebenso erfolgt die Aufnahme der verschiedenen, gleichzeitig angebotenen Serumarten auch dann im gleichen Mengenverhältnis, wenn die Zellen an eines der zugeführten Seren bereits sehr lange gewöhnt sind.

Die Zellen nehmen die Arteigenschaft des fremden Serums bereits in der ersten Züchtungspassage an. Sie verlieren diese Eigenschaft aber sofort wieder, sobald ihnen das Serum entzogen wird. Nur wenn sie ein fremdes Serum über einen längeren Zeitraum zugeführt bekommen, können sie die Fähigkeit zur Synthese der serologisch wirksamen Substanz dieser Arteigenschaft aus artfremdem Serum mindestens über einen gewissen Zeitraum erwerben.

In einer vorangegangenen Arbeit (GEISSLER und KNAKE¹) stellten wir fest, daß in vitro gezüchtete Kulturen permanenter Zellstämme (established strains of monolayers) die serologische Arteigenschaft des Serums der fremden Tierart erworben hatten, das dem Nährmedium als Eiweißquelle zugegeben worden war.

Die bei diesen Versuchen verwendeten Zellkulturen von Mensch und Maus waren mit einem Nährmedium gefüttert worden, das zwischen 10 und 20% Kälberserum enthielt. Alle Zellstämme hatten in gleichem Maße die serologische Arteigenschaft „Rind“ angenommen, und zwar unabhängig von ihrer Herkunft und ihrer Wuchsform in vitro. Das erworbene Artmerkmal lag in Form eines Haptens vor und trat quantitativ sehr stark in Erscheinung.

In Weiterverfolgung dieses Themas versuchten wir, die folgenden Fragen experimentell zu beantworten:

1. Wieviele Züchtungspassagen sind erforderlich, bis ein permanent wachsender Zellstamm nach Fütterung mit artfremdem Serum diese fremde Arteigenschaft annimmt?

2. Wieviele Züchtungspassagen sind andererseits notwendig, bis ein Zellstamm eine auf diese Weise

erworbene fremde Arteigenschaft wieder verliert, nachdem ihm das entsprechende Serum im Nährmedium entzogen worden ist?

3. Sind permanent wachsende Zellstämme in der Lage, bei Zuführung von Serum verschiedener fremder Tierarten mit dem Nährmedium gleichzeitig mehrere serologische Arteigenschaften zu erwerben? Sprechen gegebenenfalls die quantitativen serologischen Ergebnisse für selektive Eigenschaften der Zellen, indem Serum bestimmter Tierarten von ihnen bevorzugt wird?

Eigene Versuche

Material und Methode

Die Untersuchungen wurden mit dem permanent wachsenden Menschenzellstamm HeLa durchgeführt. Nähere Angaben über die Herkunft und Züchtung dieses Stammes, über die Art der Zubereitung der Antigene aus den Zellkulturen und über die Technik der angewandten Komplement-Bindungsreaktion können in unserer vorangegangenen Arbeit¹ nachgelesen werden. Die Antiartsera gewannen wir von Kaninchen durch Immunisierung mit Serum von der jeweiligen Tierart bzw. dem Menschen. Außer Antiartserum „Mensch“ stellten wir Antiartserum gegen Rind, Schwein und Pferd her. Nähere Angaben über die Methodik finden sich ebenfalls in der oben bereits genannten Arbeit.

¹ A. GEISSLER u. E. KNAKE, Z. Naturforschg. 15b, 707 [1960].