

Unterschiede zwischen Milz- und Thymuszellen der Ratte in der Wirkung von Ethidiumbromid auf die unprogrammierte DNA-Synthese (DNA-Reparatursynthese) und die Nucleoidsedimentation

Differences between Rat Splenic and Thymic Cells with Respect to the Effects of Ethidium Bromide on the Unsheduled DNA Synthesis (DNA Repair Synthesis) and the Nucleoid Sedimentation

K. Tempel, A. Goette und I. Schmerold *

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, Königinstraße 16, D-8000 München 22

Z. Naturforsch. **39c**, 600–605 (1984); received October 31/March 22, 1984

Ethidium Bromide, DNA Repair Synthesis, Nucleoid Sedimentation, Splenocytes, Thymocytes

To get further insight into the causes of differences between rat splenic and thymic cells with regard to DNA repair synthesis, scheduled (SDS) and unscheduled (UDS) DNA synthesis as well as nucleoid sedimentation of the cells were investigated under the influence of ethidium bromide (EB, 1–1000 µg/ml). – At concentrations of ≥ 25 µg/ml, EB inhibited SDS of both cell species and UDS of thymic cells; much higher additions of the drug (> 200 µg/ml) were needed to diminish UDS of splenic cells, lower EB-concentrations (25–175 µg/ml) stimulating the UDS of the splenic cell preparation. – The sedimentation rate of splenic and thymic cell nucleoids within neutral sucrose gradients had a biphasic dependence on the EB-concentrations. As compared to thymic cells however, preincubation of splenic cells with 50–250 µg EB/ml resulted in a significant greater (15–30 percent) sedimentation distance. – The results suggest that a relationship exists between the stimulation of UDS and the ability of cells to establish a greater DNA compactness in the presence of EB.

Ethidiumbromid (EB), 2,7-Diamino-10-äthyl-9-phenyl-phenanthridinium-bromid, gehört zu den Substanzen, welche interkalierend an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) gebunden werden. In höheren Konzentrationen (Bereich etwa 10–1000 µg/ml, entsprechend ~ 25 µmol bis 2,5 mmol/l) hemmt EB daher u.a. die Zellteilung, die DNA-Synthese und den enzymatischen DNA-Abbau (Übersicht z. B. bei Neidle, l.c. [1]). Auch die Wechselwirkung anderer Agentien, wie jene von Bleomycin [2] oder *cis*-Diammindichlorplatin (II) [3], mit der DNA wird durch EB beeinflusst.

Obwohl EB gegenüber Organismen unterschiedlicher Entwicklungshöhe, wie Viren, Bakterien, Protozoen und Säugetierzellen, wirksam sein kann, machen einige Eigenschaften – wie bevorzugter Angriff an zirkulär geschlossener DNA, Hemmung der reversen Transkriptase und Anreicherung in Mikroorganismen – die Substanz zu einem Chemo-

therapeutikum bei verschiedenen mikrobiellen Infektionen [1, 4]. Die besondere Empfindlichkeit von Trypanosomen gegenüber EB wird auf erhöhte Membranpermeabilität dieser Protozoengattung für die Substanz zurückgeführt (ibid.). – In der molekularen Biologie wird EB u.a. zur Färbung von Nukleinsäuren und Chromatin sowie als biochemisches Hilfsmittel bei Struktur- und Funktionsanalysen von DNA- bzw. Chromatin-Präparationen verwendet ([3, 5] u. a.).

Frühere Untersuchungen hatten deutliche Unterschiede zwischen Thymus- und Milzzellen der Ratte hinsichtlich ihrer *in vitro* gemessenen Reparatursynthese nach Einwirkung von Ultraviolettlicht, Röntgenstrahlen und Methylmethansulfonat, einem biologischen Alkylans, ergeben [6]. Eine Erklärung für dieses Phänomen steht bisher aus. Da in diesem Zusammenhang auch zellspezifische Unterschiede in der superhelikalen DNA-Struktur eine wesentliche Rolle spielen können, wurde vorliegend der Einfluß von EB auf die semikonservative (SDS) und die unprogrammierte (engl. „unscheduled“, UDS) DNA-Synthese sowie auf das Sedimentationsverhalten von „Nucleoiden“ von Thymus- und Milz-

* Für hervorragende technische Assistenz sind wir Frau B. Klaeger zu großem Dank verpflichtet.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. K. Tempel.

0341-0382/84/0600-0600 \$ 01.30/0

zellen der Ratte untersucht. SDS und UDS wurden als Ausdruck funktioneller, die Nucleoid-Sedimentation als Kriterium struktureller DNA-Integrität gewertet. – Die als „Nucleoide“ bezeichneten und im wesentlichen aus DNA, RNA und Spuren von Protein zusammengesetzten Partikel entstehen, sobald Zellen bei hohen Salzkonzentrationen mit einem nicht-ionischen Detergens lysiert werden [7–9]. Die Nucleoide eines gemeinsamen Zellaufschlusses bilden dabei ein gelartiges Aggregat, das bei Zentrifugation im Saccharosegradienten als einheitliche Bande sedimentiert und – etwa über seine Fluoreszenz in Gegenwart von EB – sichtbar gemacht werden kann. Gegenwärtig wird davon ausgegangen, daß das Sedimentationsverhalten der Nucleoide – innerhalb der von der Methode vorgegebenen Grenzen und Fehlermöglichkeiten [9] – superhelikale Strukturen der DNA widerspiegelt [9–12].

Material und Methodik

Die Versuche wurden an weiblichen Wistar-Ratten aus institutseigener, konventioneller Zucht durchgeführt. Das Körpergewicht der etwa 3 Monate alten Tiere betrug 200–250 g. Den Tieren standen Altromin® – Standardfutter und Wasser ad libitum zur Verfügung.

Die Gewinnung der Zellen folgte den bereits früher beschriebenen laborüblichen Bedingungen [6, 13].

Als Maß der SDS diente der Einbau von [³H]Methylthymidin (dT-³H, wäßrige Lösung mit 2% Äthanolzusatz, 1,5–2,2 TBq/mmol, Amersham Buchler, TRK 418) in die mit Perchlorsäure (PCA, Endkonzentration 1 mol/l) fällbare Fraktion. Die Ansätze – bestehend aus 1,0 ml Zellsuspension (3×10^6 – 5×10^6 Zellen/ml Ca²⁺- und Mg²⁺-freier Hanks'-Lösung) und 50 µl einer wäßrigen dT-³H-Lösung (46,25 kBq) – wurden 45–90 min aerob bei 37 °C inkubiert.

Ausdruck der UDS war die in Gegenwart von Hydroxyharnstoff (HU) (10^{-2} mol/l) gemessene Markierung der mit PCA fällbaren Fraktion durch dT-³H. Die Ansätze enthielten 1,0 ml Zellsuspension (wie im SDS-Versuch) und (im Unterschied zum SDS-Versuch) 100 µl dT-³H-Lösung entsprechend einer Aktivität von 185 kBq. Die Inkubation dauerte 90–120 min.

Nach Abschluß der Inkubationen wurde das mit PCA gefällte Sediment in 5 ml kalter PCA (1 mol/l) gewaschen, anschließend in 2 ml PCA (ebenfalls 1 mol/l) resuspendiert und 20 min einer Temperatur von 95 °C ausgesetzt. Nach 30-minütiger Abkühlung bei –25 °C wurde das Reaktionsgemisch erneut zentrifugiert (10 min bei $900 \times g$). Die ³H-Aktivität des Überstandes wurde flüssigszintillationsspektrometrisch gemessen und auf die Extinktionsdifferenz ΔE (260–280 nm) – als Ausdruck der Zellzahl – bezogen (weitere Einzelheiten s. unter l.c. [13]).

Die *Nucleoidsedimentation* folgte im wesentlichen der von Weniger [9] beschriebenen Methode: In Zellulosenitrat-Röhrchen wurden auf einen linearen Saccharose-Gradienten (15–30%, Füllungsstand der Röhrchen 9 mm, gemessen vom oberen Rand) zunächst 0,4 ml Lyselösung (Zusammensetzung: 1,5 mol NaCl, 0,1 mol EDTA \times Na₂ – Äthylendiamintetraessigsäure-Natriumsalz – und 7 g Triton-X-100 in 1 Liter dest. Wasser, Einstellung auf pH 8,0 mit 1 mol/l HCl) und anschließend 0,3 ml Zellsuspension (10^4 Zellen pro µl) aufgetragen. – Die Saccharoselösung enthielt NaCl (1,5 mol/l), Tris-Puffer (0,02 mol/l), EDTA \times Na₂ (1 mmol/l) sowie EB (30 µg/ml). – Nach dem Auftragen wurden die Zellen bei Zimmertemperatur 45 min der Lyselösung ausgesetzt und anschließend 90–120 min bei 20 °C und 25 000 U/min (Beckman – Ultrazentrifuge L2, Rotor SW 41) zentrifugiert. Form und Lage der Nucleoid-Banden wurden aufgrund der Fluoreszenz des EB-Komplexes im UV-Licht bestimmt.

EB (Serva 21238) wurde in den erforderlichen Konzentrationen in Hanks'-Medium gelöst und den Zellansätzen in Volumina von jeweils 100 µl zugesetzt. Als Kontrollansätze dienten Zellsuspensionen, welche das gleiche Volumen des EB-freien Lösungsmittels erhalten hatten. Unter leichtem Schütteln wurden die Proben nunmehr 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließendem Ersatz des EB-haltigen Mediums durch EB-freie Hanks' Lösung erfolgte der Zusatz von dT-³H zur Messung der DNA-Synthese bzw. die Lyse zur Nucleoidsedimentation. – Jeder EB-Konzentrationswert wurde in mindestens zwei Versuchsreihen dreifach belegt.

In einigen Versuchen wurde die EB-Wirkung auf die durch UV-Licht stimulierte UDS von Thymus- und Milzzellen gemessen: Jeweils drei Parallelansätze wurden zu diesem Zweck nach Vorinkubation

mit der gewünschten EB-Konzentration (und noch im EB-haltigen Medium) gemeinsam auf eiskühlten Petrischalen ausgebreitet (ca. $0,04 \text{ ml/cm}^2$) und mit einer UV-Lampe (Philips TUV 30 W, Leistung $4 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) bestrahlt. Bei Kombination von EB mit UV-Bestrahlung stellte sich somit die Reihenfolge der Arbeitsgänge wie folgt dar: Vorinkubation mit EB → UV-Bestrahlung → Mediumwechsel → UDS-Markierungsansatz → Messung der dT- ^3H -Aktivität im PCA-Präzipitat.

Ergebnisse und Diskussion

dT- ^3H -Einbau (SDS und UDS)

Modellvorstellungen, welche primär für isolierte native Nukleinsäurepräparate, z. B. für Phagen-DNA [2], gelten [1, 5], mittlerweile aber auch auf komplexere Systeme – wie Säugetierzellen – übertragen wurden [14], besagen, daß EB in verhältnismäßig niedrigen Konzentrationen (Größenordnung: Einige μg bzw. nmol pro ml , abhängig vom EB-Nukleinsäurebasen-Verhältnis) zunächst zu einer Entwindung der negativ gedrehten DNA-Helix im Bereich der Interkalation führt [1, 2, 5, 14]. Die damit verbundene Relaxation kann die Verfügbarkeit der DNA für bestimmte chemische Agentien, vor allem aber auch als Matrize für Replikations- und Transkriptionsvorgänge verbessern [1, 14–16]. Als biochemische Konsequenz ist in letzterem Fall mit einer Erhöhung der dT- ^3H -Einbaurrate in die DNA zu rechnen. Tatsächlich konnten beispielsweise Mattern und Painter [14] an permeabilisierten Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters den Einbau von dTMP- ^3H in die säurefällbare Fraktion durch EB in Konzentrationen von $1\text{--}10 \mu\text{g/ml}$ – maximal zweifach – erhöhen. Konzentrationen unter $1 \mu\text{g/ml}$ hatten keinen Einfluß. – In zellfreien Ansätzen mit tierischen und pflanzlichen DNA-Polymerasen, einer *Escherichia coli*-Polymerase und einer reversen Transkriptase blieb der stimulierende Einfluß von EB (Konzentrationsbereich hier $1\text{--}100 \mu\text{mol/l}$) auf das bakterielle Enzym sowie auf die pflanzlichen Polymerasen beschränkt [16].

In Konzentrationen von $1\text{--}50 \mu\text{g/ml}$ hatte EB vorliegend keinen signifikanten Einfluß auf den replikativen dT- ^3H -Einbau in die DNA von Milz- und Thymuszellen (Abb. 1). – Die nicht durch UV-Licht stimulierte UDS wurde im Unterschied zur SDS in Milzzellen durch EB-Konzentrationen von

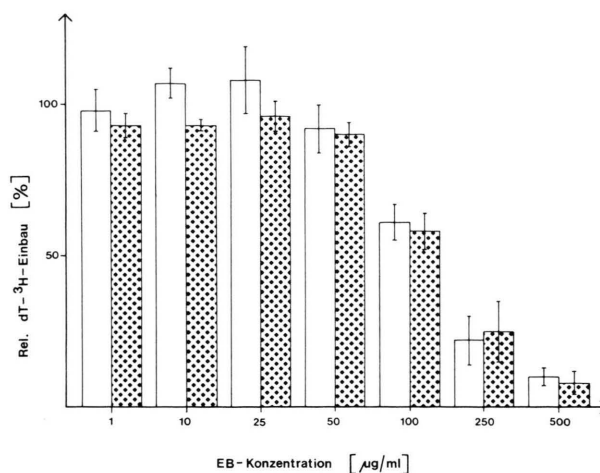


Abb. 1. Semikonservativer dT- ^3H -Einbau in Milz- (□)- bzw. Thymus (▨)-Zellen der Ratte *in vitro* unter dem Einfluß von EB konzentrationsabhängig. Ordinate: Durchschnittliche Markierungsrate in Prozent, bezogen auf die nicht mit EB versetzten Kontrollansätze mit Standardabweichung.

$25\text{--}175 \mu\text{g/ml}$ signifikant um $10\text{--}25\%$ erhöht. Der unprogrammierte dT- ^3H -Einbau nahm demgegenüber in Thymuszellen nach Vorbehandlung mit EB konzentrationsproportional ab (Abb. 2).

Da die intrazelluläre Reparatur durch sekundäre DNA-Schädigung vor und während des Reparaturablaufs beeinflusst werden kann [17], wurde auch die durch UV-Licht ($16\text{--}64 \text{ J m}^{-2}$) ausgelöste UDS von Milz- und Thymuszellen unter dem Einfluß von EB untersucht. Dabei ergab sich zunächst, daß der unmittelbar nach Exposition gemessene unprogrammierte dT- ^3H -Einbau – ohne zellspezifische Besonderheiten – durch EB-Konzentrationen von $0,05\text{--}50 \mu\text{g/ml}$ um rund 10% gehemmt wird. Noch höhere Substanzkonzentrationen führten – analog dem Verhalten der SDS (Abb. 1) – zu einem konzentrationsabhängig fortschreitenden Abfall der dT- ^3H -Einbaurrate (keine eigene Darstellung). – Unter Berücksichtigung der nicht durch UV-Licht stimulierten UDS besteht somit in dem o. a. Konzentrationsbereich ein bisher nicht beschriebener, signifikanter Unterschied zwischen Milz- und Thymuszellen.

Bei höheren EB-Konzentrationen ($\geq 25 \mu\text{g/ml}$: UDS der Thymuszellen, $\geq 50 \mu\text{g/ml}$: SDS von Thymus- und Milzzellen, $\geq 200 \mu\text{g/ml}$: UDS der Milzzellen) wurde hier wie in vergleichbaren Unter-

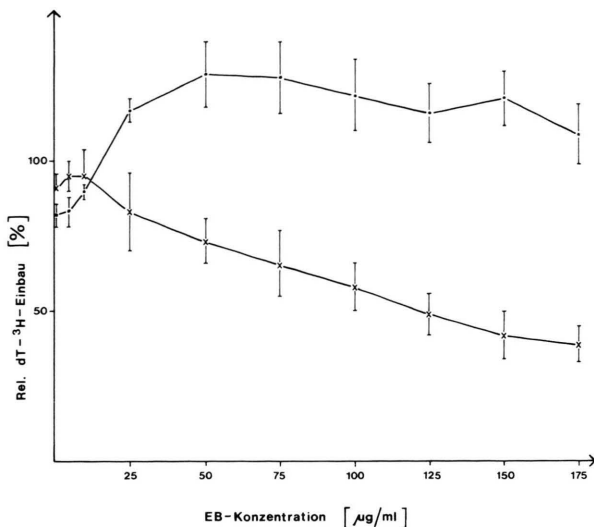


Abb. 2. Unprogrammierter dT-³H-Einbau in Milz-(●—●) bzw. Thymus(×—×)-Zellen der Ratte *in vitro* unter dem Einfluß von EB konzentrationsabhängig. Ordinate: Durchschnittliche Markierungsrate in Prozent, bezogen auf die nicht mit EB versetzten Kontrollansätze (= residuale dT-³H-Einbaureate in Gegenwart von 10⁻² mol HU pro l) mit Standardabweichung.

suchungen (18–20) eine mit der Konzentration zunehmende starke Hemmung des dT-³H-Einbaus beobachtet (Abb. 1 und 2). — Eine Erklärung für die Hemmung der DNA-Synthese durch hohe EB-Konzentrationen wird darin gesehen, daß es in diesem Bereich zu einer Verdrehung der DNA-Helix in positiver Richtung ([1, 2, 14] u. a.) und somit zu einer neuerlichen Verfestigung des Chromatin-Komplexes kommt, was die Verfügbarkeit der DNA für Replikations- und Transkriptionsvorgänge wiederum vermindert [1]. Die vorliegenden Untersuchungen verdeutlichen allerdings, daß der Übergang einer potentiell nachweisbaren DNA-Synthesesteigerung in die stets eintretende Synthesehemmung nach Vorbehandlung mit EB von den Versuchsbedingungen, insbesondere von der untersuchten Zellart und dem in Frage stehenden Synthesetyp abhängig ist.

Quantitative Unterschiede zwischen den Ergebnissen verschiedener Untersuchungsgruppen können durch Verwendung primär nicht vergleichbarer Zell- bzw. Synthese-Systeme — etwa permeabilisierter Zellen bzw. zellfreier Systeme dort [14, 16], ganzer Zellen hier — bedingt sein. Die gleiche Über-

legung gilt auch, wenn zellspezifische Unterschiede unter im übrigen identischen Versuchsbedingungen (Aktivierung der UDS in Milz-, nicht dagegen in Thymuszellen) erklärt werden sollen. Vor allem ist an die Möglichkeit zu denken, daß sich verschiedene Zellspezies in ihrer Fähigkeit unterscheiden, angebotene Substanzen (hier: dT-³H, HU und EB) aufzunehmen, intrazellulär zu verteilen und zu metabolisieren. Setzt man einmal Unterschiede der genannten Art für die hier untersuchten Zellarten als gegeben voraus, hätte man zellspezifische Besonderheiten hinsichtlich der (relativen) DNA-Markierungsrate der Kontrollen sowie der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Hemmung der SDS durch HU und EB erwarten müssen, was nicht der Fall war ([6, 13, 20], Abb. 1). Abgesehen davon hätten sich bei zellspezifisch divergenter EB-Aufnahme die in Abb. 2 dargestellten Unterschiede zwischen Milz- und Thymuszellen innerhalb des gewählten — großen — EB-Konzentrationsbereichs ausgleichen müssen, was ebenfalls nicht zutraf.

Nucleoidsedimentation

Die Sedimentationsuntersuchungen erbrachten signifikante Unterschiede zwischen Milz- und Thymuszellen nach Vorbehandlung mit EB: In Übereinstimmung mit den Befunden von Mattern und Painter [14] an EB-vorbehandelten Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (Nucleoidsedimentation im EB-freien Gradienten) und in Analogie zu den Ergebnissen von Autoren, welche den Einfluß der EB-Konzentration des Saccharosegradienten auf die Sedimentation von Nucleoiden EB-frei inkubierter Zellen untersucht hatten (so i. c. [11, 21–22]), wurde deutlich, daß die Sedimentationsstrecke im unteren EB-Konzentrationsbereich abnimmt und jenseits eines — von den genannten Autoren bei etwa 1–6 µg/ml angenommenen — „Äquivalenzpunktes“ (Bereich maximaler DNA-Relaxation) konzentrationsabhängig bis auf Werte zunimmt, die beträchtlich — vorliegend etwa 30% — über den Kontrollen liegen können (Abb. 3). Vergleicht man nun unter den gewählten Bedingungen die Sedimentation von Milz- und Thymuszell-nucleoiden nach Vorbehandlung der Zellen mit EB, so fällt auf, daß erstere in einem EB-Konzentrationsbereich von 50–250 µg/ml (maximal um 100 µg/ml) eine signifikant (15–30%) längere Sedimentationsstrecke durchlaufen als Thymuszell-

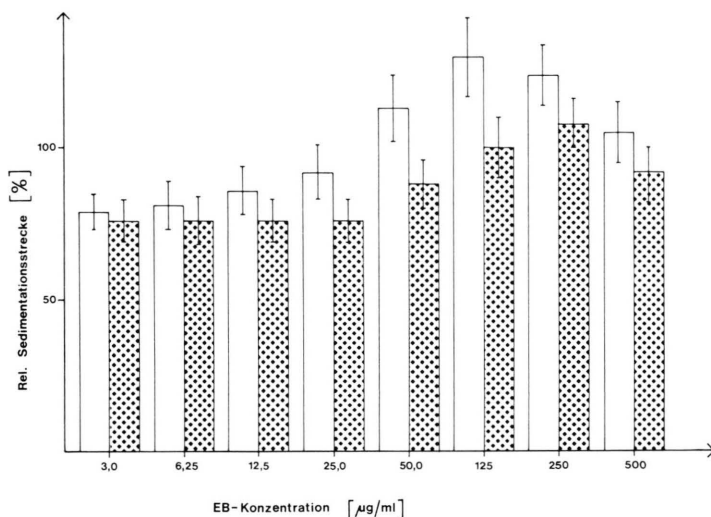


Abb. 3. Sedimentation von Milz-(□) bzw. Thymus(▤)-Nucleoiden nach Vorbehandlung der Zellen mit EB konzentrationsabhängig. Ordinate: Relative Sedimentationsstrecke in Prozent, bezogen auf die nicht mit EB versetzten Kontrollansätze.

nucleoide (Abb. 3), woraus auf stärkere „Kompaktierung“ der Milzzell-DNA nach Einwirkung von EB geschlossen werden kann [12].

dT³H-Einbau und Nucleoidsedimentation im Vergleich

Die Gegenüberstellung der Diagramme von Abb. 2 und Abb. 3 verdeutlicht für vergleichbare EB-Konzentrationen die Fähigkeit von Milzzellen zur Aktivierung der UDS und zu stärkerer DNA-Kompaktierung. – DNA-Reparatursynthese gilt im allgemeinen als Zeichen vorausgegangener DNA-Schädigung [23]. Zumindest für Strangbrüche – sie können unmittelbar und/oder mittelbar (etwa durch Endonucleasen) ausgelöst werden – lieferten die vorliegenden Untersuchungen keinen Anhaltspunkt, da man in diesem Fall eine mit der EB-Konzentration zunehmende Verminderung der Nucleoidsedimentation unter die entsprechenden Kontrollwerte hätte erwarten müssen (Abb. 3). – Auch mit der Methode der „Alkalischen Elution“ [24] konnte für die untersuchten Zellarten kein signifikanter Einfluß von EB (Konzentrationsbereich 10–1000 µg/ml) im Sinne der Bildung von DNA-Bruchstücken nachgewiesen werden [25]. Dies kann bedeuten, daß sich – entsprechend der von anderen Autoren gegebenen Deutung [1, 14–16] – die Ver-

fügbarekeit der DNA für Reparaturenzyme (z. B. die DNA-Polymerase β) bei Helixrelaxation unter dem Einfluß von EB zellspezifisch unterschiedlich erhöht. – Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch die Feststellung, daß der stimulierende Einfluß von EB auf die UDS von Milzzellen nicht mehr nachweisbar ist oder gar in eine Hemmwirkung übergeht, wenn „echte“ Reparaturvorgänge (hier: nach Einwirkung von UV-Licht) ablaufen bzw. wenn die superhelikale Struktur der DNA bereits so weit verändert ist, daß sich eine – theoretisch denkbare – Verbesserung der DNA-Verfügbarkeit für Reparaturenzyme nicht mehr auswirken kann.

Zusammengefaßt erlauben die hier mitgeteilten Ergebnisse folgende Schlüsse: 1. Durch EB-Vorbehandlung und Nucleoidsedimentation lassen sich orientierende Aussagen über zellspezifische Besonderheiten im Verhalten der superhelikalen DNA-Struktur gewinnen. – 2. Hinsichtlich ihrer Reaktion gegenüber EB bestehen zwischen Thymus- und Milzzellen der Ratte deutliche physikalisch (Nucleoidsedimentation) und biochemisch (Reparatursynthese) faßbare Unterschiede. – 3. Die Frage, inwieweit sich die spezifische Fähigkeit von Zellen zur Änderung ihrer superhelikalen DNA-Struktur zell- und schädigungsspezifisch auf den Ablauf von Reparaturvorgängen auswirkt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

- [1] S. Neidle, pp. 151–221 in: *Progress in Medicinal Chemistry*, Vol. 16, ed. by G. P. Ellis and G. B. West, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1979.
- [2] Cheng-Hsiung Huang, Ch. K. Mirabelli, S. Mong, and S. T. Crooke, *Cancer Res.* **43**, 2849–2856 (1983).
- [3] C. M. Merkel and S. J. Lippard, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**, 355–360 (1983).
- [4] F. E. Hahn, *Antibiotics Chemother.* **27**, 70–92 (1980).
- [5] H.-M. Wu, N. Dattagupta, M. Hogan, and D. M. Crothers, *Biochemistry* **19**, 626–634 (1980).
- [6] K. Tempel, *Z. Naturforsch.* **35c**, 106–111 (1980).
- [7] P. R. Cook and I. A. Brazell, *J. Cell Sci.* **10**, 261–279 (1975).
- [8] P. R. Cook and I. A. Brazell, *Nature* **263**, 679–682 (1976).
- [9] P. Weniger, pp. 261–265 in: *Progress in Mutation Research*, Vol. 4, ed. by A. T. Natarajan, G. Obe, and H. Altmann, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Oxford, New York 1982.
- [10] M. R. Mattern, R. F. Paone, and R. S. Day, III, *Biochim. Biophys. Acta* **697**, 6–13 (1982).
- [11] L. H. F. Mullenders, A. A. van Zeeland, and A. T. Natarajan, *Mutat. Res.* **112**, 245–252 (1983).
- [12] M. R. Mattern, L. A. Zwelling, D. Kerrigan, and K. W. Kohn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 1077–1084 (1983).
- [13] A. Goette, *Diss. med. vet. München* 1982.
- [14] M. R. Mattern and R. B. Painter, *Biochim. Biophys. Acta* **563**, 293–305 (1979).
- [15] E. J. Gabbay and W. D. Wilson, *Meth. Cell Biol.* **18**, 351–383 (1978).
- [16] M. Castroviejo, P. V. Graves, D. Tharaud, E. Hevia-Campos, and S. Litvak, *Biochimie* **64**, 195–202 (1982).
- [17] N. J. Bernheim and H. Falk, *J. Amer. Coll. Toxicol.* **2**, 23–54 (1983).
- [18] E. Wawra, W. Klein, F. Kocsis, and P. Weniger, *Ber. Nr. 2469, BL-144/75 d. Österr. Studienges. f. Atomenergie GmbH*, 1975.
- [19] H. Altmann, H. Tuschl, E. Wawra, I. Dolejs, W. Klein, and A. Wottawa, pp. 39–46, in: *Modification of Radiosensitivity of Biological Systems*, Panel Proc. Series, International Atomic Energy Agency, Vienna 1976.
- [20] J. Winkle, *Diss. med. vet. München* 1980.
- [21] K. Langrock, *Radiobiol. Radiother.* **23**, 301–308 (1982).
- [22] S. M. Hamlet, M. F. Lavin, and P. A. Jennings, *Int. J. Radiat. Biol.* **41**, 483–491 (1982).
- [23] A. D. Mitchel, *Mutat. Res.* **123**, 363–410 (1983).
- [24] L. G. Petzold and J. A. Swenberg, *Cancer Res.* **38**, 1589–1594 (1978).
- [25] W. Pfahler, *Diss. med. vet. München* 1983.