

<sup>35</sup>S-Inkorporation in das Wurzelspitzenmeristem von *Vicia faba*

Von WOLFGANG SCHEUERMANN

Aus dem Institut für Strahlenbiologie der T.H. Hannover (Direktor: Prof. Dr. H. GLUBRECHT)

(Z. Naturforsch. **19 b**, 434–438 [1964]; eingegangen am 24. Februar 1964)

<sup>35</sup>S wurde als Sulfat bzw. als Methionin über die Nährlösung in Wurzelspitzen von *Vicia faba* inkorporiert. Unter gleichen Bedingungen wird das Methionin fast achtmal schneller inkorporiert als das Sulfat. Die aus der Inkorporation resultierende Strahlenbelastung im Wurzelspitzenmeristem wurde errechnet und damit im Zusammenhang die Strahlenwirkung auf Chromosomen-Aberrationen bzw. eine Unterbindung des Mitose-Teilungszyklus diskutiert. Aus Mikroautoradiografien wurden Rückschlüsse auf die Einbaurrate des <sup>35</sup>S in das Protein und Nucleoprotein gezogen.

Die Untersuchung der Wirkungen inkorporierter Radionuklide bietet in manchen Fällen einen tieferen Einblick in das Zellgeschehen als die Analyse einer äußeren Bestrahlung. Wenn die Verteilung des betreffenden Nuklids im biologischen Objekt bekannt ist, kann man von der Tatsache Gebrauch machen, daß ein Teil der Wirkungen beim Zerfall der Radionuklide, nämlich Transmutation und Rückstoß, lokal begrenzte Vorgänge an definierbaren Stellen der Makromoleküle sind (FRIEDRICH-FRESKA, KAUDEWITZ<sup>1</sup>, KAUDEWITZ u. a.<sup>2</sup>, STRAUSS<sup>3,4</sup>). Die folgenden Untersuchungen befassen sich mit der Aufnahme von <sup>35</sup>S in das Wurzelspitzenmeristem von *Vicia faba*. <sup>35</sup>S ist dabei von Interesse, da es im Aufbau der Proteinmoleküle, insbesondere über die Disulfidbrücken, eine wesentliche Rolle spielt und seine Umwandlung zu <sup>35</sup>Cl beim Zerfall mit Sicherheit eine Veränderung des betreffenden Moleküls zur Folge hat. Außerdem entspricht seine  $\beta$ -Strahlung mit  $E_{\max} = 0,167$  MeV fast genau der des <sup>14</sup>C ( $E_{\max} = 0,155$  MeV), so daß Vergleichsuntersuchungen über die Wirkungen der Inkorporation beider Radionuklide eventuell Rückschlüsse auf den Anteil erlauben, den Strahlung bzw. Transmutation an diesen Wirkungen haben. Voraussetzung aller derartiger Versuche ist die Kenntnis der Aufnahme und Verteilung des betreffenden Radionuklids.

Aus der Literatur sind keine hinreichenden Daten über Aufnahme, Stoffwechsel und Ausscheidung von <sup>35</sup>S im Wurzelspitzenmeristem bekannt. Eingehen-

dere Untersuchungen über den Schwefel-Stoffwechsel wurden von KYLIN<sup>5</sup> und KYLIN und HYLMO<sup>6</sup>, insbesondere an jungen Weizenkeimlingen durchgeführt. Sie befassen sich jedoch mit Aufnahme und Transport von Sulfat-S in das differenzierte Wurzelgewebe und den Sproß sowie mit dem Stoffwechsel 3 bis 10 Tage nach der Sulfataufnahme. MOTHES<sup>7</sup> untersuchte den S-Stoffwechsel in Blättern verschiedener Pflanzen, u. a. auch *Vicia faba*. Die sehr interessanten Ergebnisse erlauben jedoch keine unmittelbare Übertragung auf die Verhältnisse in Wurzelspitzenmeristemen. Schließlich liegen Untersuchungen von HOWARD und PELC<sup>8</sup> vor, die <sup>35</sup>S-markiertes Sulfat für 20 Stdn. mit der Nährlösung *Vicia faba*-Wurzeln zuführten und den Einbau in organische Substanzen des Wurzelspitzenmeristems – insbesondere Proteine und Nucleoproteine – mikroautoradiografisch prüften. Diese Technik ermöglicht jedoch keine quantitativen Aussagen.

Für Vergleiche der Wirkungen von inkorporiertem <sup>35</sup>S mit denen äußerer Bestrahlung oder anderer Radionuklide war zunächst eine quantitative Untersuchung von Aufnahme und Einbau Sulfat- oder organisch gebundenen Schwefels erforderlich. Da es ferner nahe liegt, bei dem gewählten Objekt in erster Linie cytologische Testmethoden anzuwenden, muß vor allem die Aufnahme innerhalb kurzer Zeitspannen bis etwa 24 Stdn. kontrolliert werden. Die Identifizierung von Chromosomen-Aberrationen erfolgt am besten in der ersten Mitose, die dem Interphase-

<sup>1</sup> H. FRIEDRICH-FRESKA u. F. KAUDEWITZ, Z. Naturforsch. **8 b**, 343 [1953].

<sup>2</sup> F. KAUDEWITZ, W. VIELMETTER u. H. FRIEDRICH-FRESKA, Z. Naturforsch. **13 b**, 793 [1958].

<sup>3</sup> B. S. STRAUSS, Radiat. Res. **11**, 345 [1959].

<sup>4</sup> B. S. STRAUSS, Radiat. Res. **8**, 234 [1958].

<sup>5</sup> A. KYLIN, Physiol. Plantarum [Copenhagen] **6**, 775 [1953].

<sup>6</sup> A. KYLIN u. B. HYLMO, Physiol. Plantarum [Copenhagen] **10**, 467 [1957].

<sup>7</sup> K. MOTHES, Planta **29**, 67 [1939].

<sup>8</sup> A. HOWARD u. S. R. PELC, Nature [London] **107**, 599 [1951].

stadium folgt, in welcher die „Behandlung“ stattfand. Nach Angaben von DEWEY und HOWARD<sup>9</sup> sowie EVANS und SAVAGE<sup>10</sup> beträgt die Dauer eines Mitosecyclus für *Vicia faba*-Wurzelspitzenmeristem bei 19 °C etwa 18–26 Stunden.

### Material und Methoden

Als biologisches Material diente *Vicia faba*. Von der Saatzuchtwirtschaft Otto Breustedt GmbH. wurde uns freundlicherweise Hochzuchtsamen der Sorte „Breustedts Schladener kleine Feldbohne“ zur Verfügung gestellt.

Nach einheitlicher Größe verletzte Samen wurden zwischen angefeuchtetem Zellstoff in belüfteten Exsikkatoren bei 24 °C etwa 3 Tage lang nach Angaben von MICHAELIS und RIEGER<sup>11</sup> angekeimt. Danach wurden Keimlinge mit 2,5–3 cm langen Wurzeln auf kleine Kulturgefäße mit einer variierten Knopschen Nährlösung (MgSO<sub>4</sub> wurde durch MgCl<sub>2</sub> ersetzt; Behandlungslösung war gegenüber der Originallösung 1/3-konzentriert, *p*<sub>H</sub> 5,8) für 6 Stdn. gesetzt. Bei der folgenden „Behandlung“ wurde <sup>35</sup>S als Sulfat oder Methionin der variierten Knops-Lösung beigegeben. Das <sup>35</sup>S-Sulfat lag als Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in isotonischer NaCl-Lösung vor bei einer spezifischen Aktivität von 100 mc/mMol. Beide Substanzen wurden vom Radiochemical Center, Amersham, bezogen.

Die Behandlungszeit (BZ) betrug 8 Stunden. Anschließend wurden die Keimlinge auf ein „Erholungsbad“ (Leitungswasser) gebracht und nach unterschiedlichen Zeiten (EZ) Proben für Aktivitätsmessungen, Mikroautoradiografien und cytologische Auswertungen entnommen. Ankeimung, Behandlung und Erholung erfolgten im Dunkeln bei 24 ± 1,5 °C.

Zur Aktivitätsmessung verwendete Wurzelspitzen wurden nach dreimaligem kurzem Spülen in Leitungswasser auf Filterpapier abgetupft, die 3 mm lange Wurzelspitze abgeschnitten, im Thermostaten 1 Stde. bei 110 °C getrocknet, im Reagenzglas fein zermörsert, mit Äthanol angeteigt und suspendiert. Aliquote Mengen wurden auf Meßschälchen aufpipettiert und nach Antrocknen im Methandurchflußzähler (FH 51) gemessen. Eine eingehendere Beschreibung und Diskussion der hierbei auftretenden Schwierigkeiten und Fehler erfolgt an anderer Stelle.

Der errechnete Mittelwert wurde im allgemeinen aus der Untersuchung von 5 Wurzelspitzen gebildet, von denen je drei Proben dreimal gemessen wurden.

Der mittlere prozentuale Fehler vom Mittelwert für die einzelnen Meßpunkte wird auf etwa 30% geschätzt, wobei ein großer Anteil auf die biologische Variabilität zurückzuführen ist. Trotz Auslese einheitlich großer Samen und Vorselektion der Keimlinge lassen sich

diese Schwankungen bei nicht selbstgeernteten Samen nach Erfahrungen von MOTHES<sup>7</sup> nicht viel weiter herabdrücken, da u. a. ein unterschiedlicher Reifegrad zu verschiedenen Anteilen an Sulfat-S, Neutral-S und Eiweiß-S in den einzelnen Samen führt.

Zur Ermittlung der Gewebedosis waren absolute Aktivitätsmessungen notwendig. Die Dosis läßt sich dann aus dem Quotienten der freierwerdenden, absorbierten  $\beta$ -Energie und der Masse des Gewebes errechnen.

Zur Bestimmung der Masse wurde eine Dichte des Gewebes von 1,1 g/cm<sup>3</sup> angenommen, das Volumen wurde aus den bekannten Abmessungen der Wurzelspitze errechnet, wobei die Form einer kubischen Parabel zugrunde gelegt wurde.

Die  $\beta$ -Teilchen, die zwar innerhalb der Wurzelspitze emittiert, dort aber nicht vollständig absorbiert werden, wurden insofern berücksichtigt, als von dem in Frage kommenden geometrischen Volumen eine entsprechende Oberflächenschicht abgezogen wurde.

Mit diesen Daten, der bekannten mittleren Energie der <sup>35</sup>S- $\beta$ -Teilchen und der gemessenen Aktivität wurde die absorbierte Dosis im Gewebe errechnet. Der mittlere prozentuale Fehler wurde dabei auf ± 35% geschätzt.

Während bei der Aktivitätsmessung aller lösliche und an Proteine gebundene <sup>35</sup>S erfaßt wurde, sollte durch die Mikroautoradiografie ein Überblick über die Verteilung des im Eiweiß eingebauten <sup>35</sup>S in dem Wurzelspitzenmeristem erhalten werden: Dementsprechend wurde das Material in Carnoy-Gemisch fixiert, 11 min in *n*/10-HCl bei 60 °C hydrolysiert, nach Feulgen gefärbt und nach Anfertigung von Quetschpräparaten noch dreimal je eine Stde. in einer 1-proz. Lösung von MgSO<sub>4</sub> und Methionin gewaschen. Die anschließende Mikroautografie wurde mit Hilfe von AR-10-Stripping-Filmen durchgeführt (TAYLOR)<sup>12</sup>.

Zur cytologischen Untersuchung wurden, wie oben beschrieben, nach Feulgen gefärbte Quetschpräparate angefertigt und nach der Methode von CONGER und FAIRCHILD<sup>13</sup> Dauerpräparate hergestellt.

### Ergebnisse

In vier aufeinanderfolgenden Versuchen wurde <sup>35</sup>S je zweimal als Sulfat (<sup>35</sup>S-III- und <sup>35</sup>S-IV-Versuch) bzw. als DL-Methionin (<sup>35</sup>S-V- und <sup>35</sup>S-VI-Versuch) über einen Zeitraum von 8 Stdn. gegeben; die spezifische Aktivität der Nährlösung betrug in allen Fällen 10  $\mu$ c/Milliliter.

Die Inkorporation und Exkorporation von Sulfat wird in Abb. 1, die von DL-Methionin in Abb. 2 als <sup>35</sup>S-Gesamtaktivität pro Wurzelspitze (3-mm-Spitze) im Verlauf der Behandlungs- und Erholungszeit dar-

<sup>9</sup> D. L. DEWEY u. A. HOWARD, Radiat. Bot. **3**, 259 [1963].

<sup>10</sup> H. J. EVANS u. J. R. K. SAVAGE, Exp. Cell Res. **18**, 51 [1959].

<sup>11</sup> A. MICHAELIS u. R. RIEGER, Biol. Zbl. **80**, 301 [1961].

<sup>12</sup> H. J. TAYLOR, Physical Techniques in Biological Research Vol. III, 546 [1956], Academic Press.

<sup>13</sup> A. D. CONGER u. L. F. FAIRCHILD, Stain Technol. **28**, 281 [1953].

gestellt. Dabei wurden die Kurven aus den Mittelwerten der jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen abstrahiert.

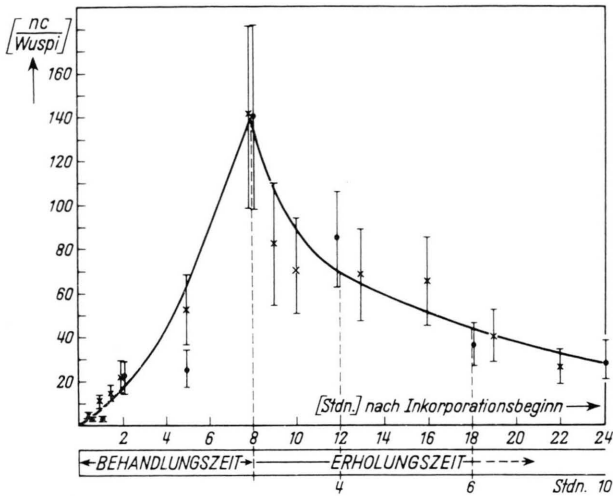


Abb. 1. Aufnahme und Ausscheidung von  $^{35}\text{S}$ -markiertem Sulfat in Wurzelspitzen von *Vicia faba*.

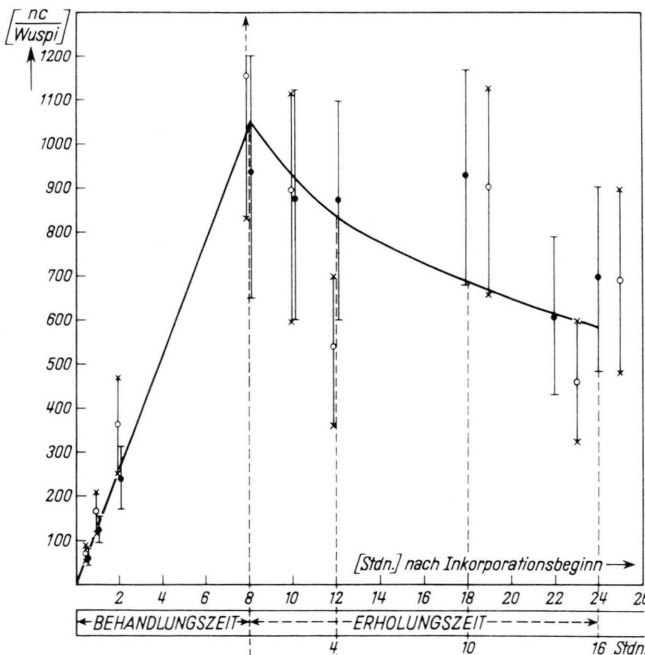


Abb. 2. Aufnahme und Ausscheidung von  $^{35}\text{S}$ -markiertem DL-Methionin in Wurzelspitzen von *Vicia faba*.

Wie Abb. 1 und 2 zu entnehmen ist, wird DL-Methionin in gleichen Behandlungszeiten fast achtmal schneller inkorporiert als Sulfat. Im Verlauf der anschließenden 16-stdg. Erholungszeit werden etwa 45% des DL-Methionins wieder exkorporiert gegenüber etwa 80% des Sulfats.

Die angefertigten Mikroautoradiografien der  $^{35}\text{S}$ -V- und  $^{35}\text{S}$ -VI-Versuche (DL-Methionin  $^{35}\text{S}$ -Inkorporation;  $10 \mu\text{g/ml}$ ; BZ 8 Stdn.; EZ 4 Stdn.) sollten einen Hinweis über die Verteilung des  $^{35}\text{S}$  in dem Wurzelspitzenmeristem sowie einen Anhalt über den Einbau von inkorporiertem  $^{35}\text{S}$  in das Protein geben. Da durch die HCl-Hydrolyse und zusätzliches Auswaschen der Quetschpräparate mit  $\text{MgSO}_4$  und Methionin angenommen werden kann, daß nur noch protein- und nucleoproteingebundener Schwefel in den Zellen vorhanden und nach HOWARD und PELC<sup>8</sup> ein  $^{35}\text{S}$ -Austausch vernachlässigbar ist, muß auch aus den mikroautoradiografischen Ergebnissen geschlossen werden, daß bei Methionin-Inkorporation die Einbauraten von  $^{35}\text{S}$  in Proteine sehr hoch ist. Wenn die Mikroautoradiografie auch keine quantitativen Aussagen erlaubt, so dürfte doch der Schluß auf eine hohe  $^{35}\text{S}$ -Einbauraten insofern berechtigt sein, als bereits nach einer Film-Expositionsdauer von 1 Stde. die Schwärzung über dem Cytoplasma etwa 10-mal stärker ist als der Grauschleier des Strippingfilms.

Während HOWARD und PELC<sup>8</sup> fanden, daß nach 20-stdg. Behandlung in  $1 \mu\text{g/ml}$   $^{35}\text{S}$ -Sulfatlösung etwa 79% der Interphasekerne des Meristems markiert waren, konnte dies nach  $^{35}\text{S}$ -Methionin-Inkorporation ( $10 \mu\text{g/ml}$ ; 8 Stdn. BZ + 4 Stdn. EZ) nicht festgestellt werden; es waren praktisch alle Meristemzellen markiert. Die Markierung war sehr gleichmäßig (die relative prozentuale Abweichung betrug  $\pm 5\%$ ). Dies kann keinesfalls als widersprüchlich zu den Ergebnissen und Deutungen von HOWARD und PELC angesehen werden, da – wie im folgenden noch besprochen wird – durch die hohe Strahlenbelastung bereits pathologische Verhältnisse im Wurzelspitzenmeristem aufgetreten waren.

Bei dem  $^{35}\text{S}$ -III-Versuch (Sulfatinkorporation) wurde cytologisch die Chromosomen-Aberrationsrate von Wurzelspitzen bestimmt, die nach EZ von 4, 10 und 16 Stdn. entnommen waren. Dabei wurden folgende Abweichungen erfaßt:

Chromosomen- (B'') und Chromatidbrüche (B') von m- und SAT-Chromosomen sowie Translokationen (T') zwischen m/m-, m/SAT- und SAT/SAT-Chromosomen. Chromosomen-Translokationen (T'') wurden nicht gefunden.

Die Strahlendosen, die das Wurzelspitzen Gewebe bis zu den verschiedenen EZ bei den Sulfat- $^{35}\text{S}$ - und  $^{35}\text{S}$ -DL-Methionin-Inkorporations-Versuchen erhalten hatte, sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

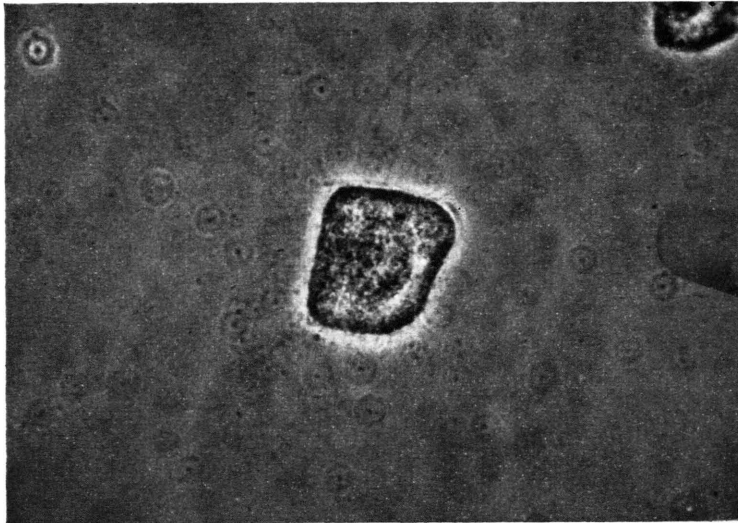


Abb. 3.

Abb. 3 und 4. Mikroautoradiografie einer Wurzelspitzenzelle von *Vicia faba* nach Aufnahme von <sup>35</sup>S-DL-Methionin. Abb. 3. Mikroaufnahme in Zellebene. Abb. 4. Mikroaufnahme in der Ebene des AR-10-Strippingfilms.

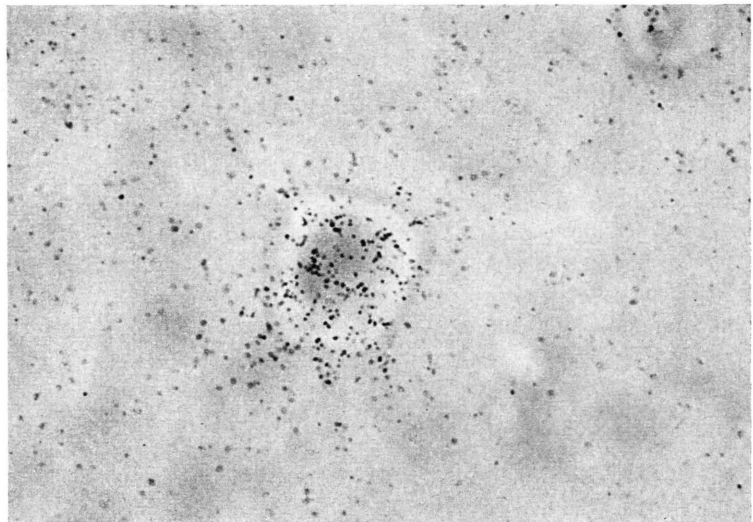


Abb. 4.

EZ→[Stdn.:]	<sup>35</sup> S-Inkorporation als	
	Sulfat	DL-Methionin
4	28	290
10	40	450
16	48	590

Tab. 1. Strahlendosen im Wurzelspitzen-Meristem von *Vicia faba* nach <sup>35</sup>S-Inkorporation in rad (mittl. proz. Fehler ± 35%).

Die Aberrationsrate (Prozentsatz an Zellen mit einer oder mehreren Chromosomen-Mutationen) betrug nach 4 Stdn. EZ 5% (230 + 12), nach 10 Stdn. EZ 8% (231 + 20) und nach 16 Stdn. EZ 5,5% (227 + 13). Bei unbehandelten Wurzelspitzen wurden 0,8% (396 + 3) abweichende Zellen gezählt.

Die cytologische Untersuchung der beiden <sup>35</sup>S-V- und VI-Versuche (DL-Methionin-Inkorporation) ergab, daß wohl die hohe Strahlenbelastung nicht nur die Kernteilung vollständig unterbunden hatte, sondern auch alle Zellen einen pathologischen Eindruck machten.

### Diskussion

Nach einer Hypothese von AUGENSTEIN<sup>14</sup> sind die S-S-Brücken in Proteinen als „schwache Stellen“ des Moleküls anzusehen, deren Bruch zu einer Denatu-

<sup>14</sup> L. G. AUGENSTEIN, Symposium on information theory in Biology, Pergamon Press 1956, S. 287.

rierung des betreffenden Moleküls führen soll. Da die Transmutation beim Zerfall eines <sup>35</sup>S-Nuklids mit Sicherheit zu einem Bruch der Disulfidbrücke führt, müßte dann beim spezifischen Einbau in diese Gruppen eine über die reine Strahlenwirkung vom <sup>35</sup>S hinausgehende Wirkung zu erwarten sein. Voraussetzung hierfür ist jedoch, daß es gelingt, einen hohen Anteil des inkorporierten <sup>35</sup>S in Disulfidbrücken des Proteins einzubauen. Sollen Chromosomenbrüche als Wirkungskriterium herangezogen werden, so wäre darüber hinaus ein bevorzugter Einbau des <sup>35</sup>S in die Nucleoproteine in möglichst kurzer Zeit zu fordern (Mitosecyclus etwa 18 Stdn.) DEWEY und HOWARD<sup>9</sup>, EVANS und SAVAGE<sup>10</sup>, wobei zunächst ein direkter Zusammenhang zwischen Denaturierung des Nucleoproteins und dem Chromosomenbruch angenommen werden soll.

Wenn auch KYLIN und HYLMO<sup>5,6</sup> einen schnellen Einbau als Sulfat aufgenommenen Schwefels in Protein nachweisen konnten, so dürfte doch weder die Zeit des Einbaus für unsere Zwecke kurz genug noch der Anteil des in Proteine-Nucleoproteine eingebauten S hoch genug sein. Die Inkorporation von <sup>35</sup>S als Methionin – und sicher auch als Cystein – erfolgt, wie Abb. 1 und 2 zu entnehmen ist, nicht nur in wesentlich kürzerer Zeit als die des Sulfat-Schwefels, es muß – wie aus der geringeren Exkorporation zu schließen ist – auch wesentlich mehr von dem Methionin-Schwefel in Proteine eingebaut werden.

Wie HOWARD und PELC<sup>8</sup> zeigen konnten, wird der Schwefel offenbar bevorzugt während der S-Phase des Zellkerns im Wurzelspitzenmeristem eingebaut, das heißt aber auch, daß die Nucleoprotein-Synthese zeitlich parallel mit der DNS-Reduplikation erfolgt. Es könnte daher bei kurzzeitiger <sup>35</sup>S-Cystein-Inkor-

poration während der S-Phase ein bevorzugter Einbau des <sup>35</sup>S in das Nucleoprotein erwartet werden.

Die cytologische Auswertung zeigte, daß die <sup>35</sup>S-Sulfat-Inkorporation eine relativ geringe Chromosomen-Aberrationsrate bedingte, während die <sup>35</sup>S-Methionin-Behandlung unter sonst gleichen Bedingungen zu einer absoluten Unterbrechung des Mitose-Teilungszyclus führte. Beide Ergebnisse können in erster Linie auf die Strahlenbelastung zurückgeführt werden, die das Wurzelspitzenmeristem während der Behandlungs- und Erholungszeit erhielt.

Ein Vergleich der Abb. 1 und 2 zeigt, daß bei einer Behandlungsdauer von 1 Stde. mit Methionin etwa die gleiche Menge <sup>35</sup>S inkorporiert werden kann wie bei einer 8-stdg. Sulfat-Inkorporation. Vernachlässigt man die unterschiedliche Exkorporation, so würde das zu einer vergleichbaren Strahlenbelastung führen.

Die kurze Inkorporationszeit von Methionin und wohl auch Cystein hätte darüber hinaus den wesentlichen Vorteil, daß durch gezielten Einbau während der S-Phase mit einer hohen Einbaurrate in die Nucleoproteine gerechnet werden kann.

Dahingehende weitere Versuche sowie Untersuchungen über den spezifischen Einbau von <sup>35</sup>S in die Nucleoproteine sollen folgen.

Herrn Professor H. GLUBRECHT danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und die zahlreichen Diskussionen, Fräulein Dipl. chem. KNÄLMANN für die Ausarbeitung der Aktivitäts-Meßmethoden, Herrn Dipl. phys. ERNST für die Unterstützung bei den Dosis-Berechnungen. Den technischen Assistentinnen Frau GIMMELER und Fräulein HILDEBRANDT sei ebenfalls für die sorgfältige Mitarbeit gedankt.

Das Bundesministerium für wissenschaftliche Forschung gewährte in dankenswerter Weise die finanzielle Unterstützung zu diesen Arbeiten.