

# Cytogenetische Untersuchungen mit zwei N-substituierten Endoxanabkömmlingen an menschlichen Leukocyten in vitro

## II. Anaphase-Telophase-Aberrationen und Bruchlokalisation

DIETER STOPIK und KLAUS ERICH HAMPEL

I. Medizinische Klinik der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. H. Frhr. von KRESS)

Eingegangen am 2. April 1968

### *Cytogenetic Studies with Two N-Substituted Cytosan Derivatives on Human Leukocytes in vitro*

#### *II. Anaphase — Telophase — Aberrations and the Localization of Breaks*

*Summary.* Postmetaphase aberrations were significantly higher in cultures of human leukocytes treated with N, N, N'-tris-(2-chloroethyl)-N', O-propylene phosphoric acid ester diamide (Z 4828) and N-(2-chloroethyl)-N'-(2-chloroethyl)-N', O-propylene phosphoric acid ester diamide (Z 4942) than in untreated controls. The pattern of the intrachromosomal distribution of 1000 breaks each was significantly nonrandom. Clear clusters of breaks occurred for instance in the distal segments of chromosomes numbered 1, 2, 4—5, 6—12 and X, and 13—15. Further experiments are necessary to interpret these data.

*Zusammenfassung.* Anaphase-Telophase-Aberrationen waren nach Einwirkung von N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Z 4828) und N-(2-Chloräthyl)-N'-(2-chloräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Z 4942) in Leukocytenkulturen signifikant höher als bei den Kontrollen. Das intrachromosomale Verteilungsmuster von jeweils insgesamt 1000 Brüchen war signifikant ungleichmäßig, besondere Häufungen traten unter anderem in den distalen Segmenten der Chromosomen 1, 2, 4—5, 6—12 und X und 13—15 auf. Zur Deutung dieses Befundes sind weitere Experimente erforderlich.

### Einleitung

Quantitative Untersuchungen über Anaphase-Telophase-Veränderungen bei menschlichen Zellen in vitro durch verschiedene mutagene Agentien wurden u. a. von BÖÖK, FRACCARO, FREDGA u. LINDSTEN (fetale Lungen- und Gehirnzellen: Röntgenstrahlen), HAMPEL u. LEVAN (fetale Lungenzellen: Kälte), NICHOLS u. HENEEN (fetale Lungenzellen: Arabinosylcytosin) und NICHOLS, LEVAN, CORIELL, GOLDNER u. AHLSTRÖM (Leukocyten: Schmidt-Ruppin-Stamm des Rous-Sarkom-Virus) mitgeteilt. Die im Vergleich zu pflanzlichen Testobjekten geringe Zahl der oben angegebenen Befunde kann u. a. durch die niedrige Frequenz auffindbarer Postmetaphasestadien besonders in menschlichen Leukocytenkulturen erklärt werden. Wenn auch die in Teil I dieser Arbeit beobachteten Reunionsfiguren und azentrischen Fragmente mit genügender Sicherheit eine Aussage über das Auftreten von Chromosomenmutationen nach Einwirkung der zwei untersuchten N-substituierten Endoxanabkömmlinge zulassen, so sind Anaphase-Telophase-Untersuchungen doch geeignet, derartige Befunde zu bestätigen.

Folgende Mitteilungen über induzierte intrachromosomale Bruchlokalisationen bei menschlichen Zellen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen konnten

gefunden werden: AYA, MAKINO u. YAMADA (Leukocyten: Herpes simplex-Virus), COHEN (Leukocyten: Streptonigrin), COHEN u. SHAW (Leukocyten: Mitomycin C), HAMPEL, KOBER, RÖSCH, GERHARTZ u. MEINIG (Leukocyten: Trisäthyläminobenzochinon (Trenimon), Triäthylmelamin (TEM), Triäthylthio-phosphoramid (Thiotepa) und N,N-Bis-(2-chloräthyl)-O-(3-aminopropyl)-phosphorsäureamidoester (A 2), HAMPEL (Leukocyten: Fluordesoxyuridin), HAMPEL u. LEVAN (fetale Lungenzellen: Kälte, Röntgenstrahlen), KELLER u. NORDÉN (Knochenmark- und Blutzellen: Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel in vivo), KIHLMAN, NICHOLS u. LEVAN (Leukocyten: Desoxyadenosin und Cytosinarabinosid), KRONE, WOLF u. FOULADWAND (Fibroblasten: Hydroxylamin und Bromdesoxyuridin), NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN (Leukocyten: Desoxyadenosin, Cytosinarabinosid, Masernviren) und OBE (Leukocyten: Chinon I).

Da verschiedene Agentien offenbar eine unterschiedliche Bruchverteilung aufweisen, erschien es angebracht, entsprechende Ergebnisse auch bei zwei neuartigen N-substituierten Cyclophosphamidabkömmlingen mitzuteilen.

### Material und Methode

Als Testsubstanzen dienten:

1. N, N, N'-Tris-(2-chloräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamid, Asta Z 4828, Charge 427<sup>1</sup> und

2. N-(2-Chloräthyl)-N'-(2-chloräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamid, Asta Z 4942, Charge 420<sup>1</sup>.

Die Verbindung 1 stand zu 10%, die Verbindung 2 zu 20% gelöst in dem Imidazolidon-derivat Oximazon<sup>1</sup> zur Verfügung. Der Ansatz und die Bearbeitung der Leukocytenkulturen erfolgte nach der von MOORHEAD u. Mitarb. unter Verwendung früher angegebener Modifikationen (HAMPEL u. Mitarb., 1966).

Bei insgesamt acht Leukocytenkulturen wurden die Aberrationen der späten Anaphasen und frühen Telophasen bewertet. Je drei Kulturen wurde 0,6 mg der Testsubstanz 1, drei weiteren 1 mg/ml Kulturmedium der Testsubstanz 2 24 Std vor Abbruch zugesetzt, zwei Kontrollkulturen erhielten zum gleichen Zeitpunkt entsprechende Mengen des Lösungsvermittlers Oximazon. Die Bearbeitung erfolgte analog den Metaphasepräparaten. Lediglich der Zusatz von Desacetylmethylcolchicin (Colcemid®, Ciba) und die hypotonische Vorbehandlung entfielen. Als Anaphase-Telophase-Aberrationen wurden Fragmente und Brückenbildung bewertet.

Als Ausgangsmaterial für die Bruchlokalisierung dienten die Präparate von insgesamt 14 Leukocytenkulturen mit direktem Zusatz von Testsubstanz 1 und insgesamt 12 Kulturen mit direktem Zusatz von Testsubstanz 2 24 Std vor Abbruch, deren Dosis-Wirkungs-Beziehungen bereits Gegenstand des ersten Teils dieser Arbeit waren. Die dort als Chromatid- und Isochromatidbrüche bewerteten Aberrationen wurden visuell verschiedenen Chromatidsegmenten verschiedener Chromosomen bzw. Chromosomengruppen in Metaphasen ohne Reunionsfiguren zugeordnet. Azentrische Fragmente wurden nicht berücksichtigt. Folgende Chromosomen und Chromosomengruppen wurden entsprechend der Denver Nomenklatur unterschieden: 1, 2, 3, 4—5, 6—12 und X, 13—15, 16, 17—18, 19—20 und 21—22 und Y. Sofern möglich, wurden die Chromatid- und Isochromatidbrüche über drei gleich großen Segmenten (distal, intermediär und proximal vom Centromer) der langen und kurzen Arme lokalisiert. Jeweils 1000 durch die genannten Testsubstanzen induzierte Brüche in den Chromosomen nur männlicher Leukocytenspender wurden registriert und die gefundene Bruchverteilung mit den theoretischen Werten einer gleichmäßigen Verteilung verglichen. Die Längenrelationen der einzelnen Chromatidsegmente wurden errechnet aus den von LEVAN u. NICHOLS mitgeteilten Meßdaten, wobei die Gesamtlänge der Chromosomen einer Metaphase des Mannes auf 1000 Längeneinheiten festgesetzt wurde.

<sup>1</sup> Die genannten Substanzen wurden uns von den Asta-Werken A. G., Brackwede, zur Verfügung gestellt.



Abb. 1



Abb. 2

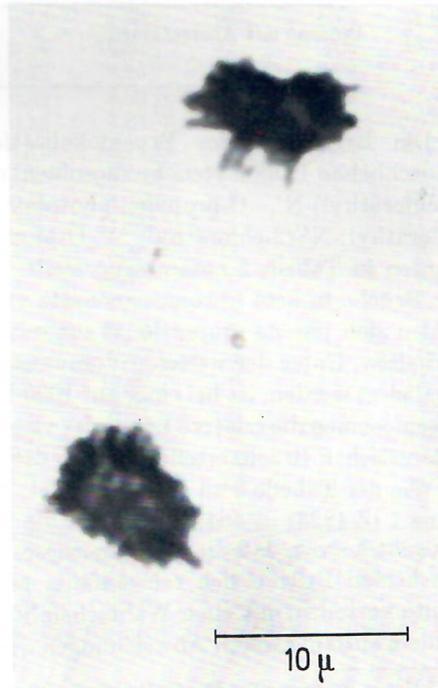


Abb. 3

Beispiele für induzierte Anaphase-Telophase-Aberrationen:

Abb. 1. Längsgeteiltes azentrisches Fragment

Abb. 2. Brückenbildung wahrscheinlich durch dizentrisches Chromosom: Trennungstyp „über Kreuz“

Abb. 3. Zwei Fragmente, davon eines ringförmig, vermutlich bei intercalarer Deletion

### Ergebnisse

Die gefundenen Aberrationen der späten Anaphasen und frühen Telophasen wurden in Tabelle 1 zusammengestellt. Gegenüber den Kontrollen war die Aberrationshäufigkeit nach Zusatz beider Testsubstanzen 24 Std vor Abbruch der Kulturen bei dem relativ geringen Stichprobenumfang doch signifikant höher. Wegen des geringen Materials wurde nur eine grobe Klassifikation der Aberrationstypen vorgenommen. Drei Beispiele einer differenzierteren Einteilung sind in den Abb. 1 bis 3 wiedergegeben. In einem Fall wurde außerdem eine tripolare Anaphase beobachtet (0,6 mg/ml der Testsubstanz 1).

Tabelle 1. *Anaphase-Telophase-Aberrationen durch N, N, N'-Tris-(2-chloräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Asta Z 4828) und N-(2-Chloräthyl)-N'-(2-chloräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Asta Z 4929) bei menschlichen Leukocyten in vitro*

Anaphasen/Telophasen	Kontrollen	24 Std vor Abbruch	
		Z 4828 0,6 mg/ml	Z 4942 1 mg/ml
Normal	35	11	42
Mit Fragmenten	—	4	6
Mit Brückenbildung	1	2	3
Mit Fragmenten und Brückenbildung	—	—	1
Ausgewertet	36	17	52
Prozent mit Aberrationen	~ 3	~ 35 (P < 0,001)	~ 19 (P ~ 0,0005)

Die Ergebnisse der Bruchlokalisierung<sup>2</sup> in den verschiedenen Segmenten menschlicher Leukocytenchromosomen nach direktem Zusatz von N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Z 4828) und N-(2-Chloräthyl)-N'-(2-chloräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamid (Z 4942) wurden in Tabelle 2 zusammengestellt. Setzt man eine gleichmäßige Verteilung der Brüche in dem Chromosomensatz voraus, so müßten die gefundenen Bruchzahlen sich jeweils proportional zur relativen Länge der Chromosomensegmente verhalten. Unter der weiteren Voraussetzung, daß insgesamt jeweils 1000 Brüche lokalisiert werden, ist bei einer auf 1000 Einheiten festgesetzten Gesamtlänge aller Chromosomen die relative Länge der verschiedenen Chromosomensegmente bei der theoretischen Bruchverteilung gleich der darin zu erwartenden Bruchfrequenz.

Wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, betragen die  $\Sigma\chi^2$ -Werte für die Testsubstanz 1 (Z 4828) = 464,991 und für die Testsubstanz 2 (Z 4942) = 486,879. Daraus geht hervor, daß die Nullhypothese, d. h. die Wahrscheinlichkeit, daß die beobachteten Brüche sich rein zufällig über die verschiedenen Chromosomensegmente verteilen, mit einer Wahrscheinlichkeit von  $P \ll 0,1\%$  abzulehnen ist. Besonders auffällig waren Abweichungen der beobachteten Bruchzahlen in folgenden

<sup>2</sup> Herrn Professor Dr. Dr. G. FUCHS, Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation an der Freien Universität Berlin, sind wir für seine Unterstützung dankbar.

Tabelle 2. Verteilung der Chromatidbrüche in den Chromosomensegmenten

Chromosomen-segmente	Relative Länge = erwartete Bruchfrequenz bei gleichmäßiger Verteilung (E)	Z 4828			Z 4942			
		Beobachtete Bruchfrequenz (B <sub>1</sub> )	B <sub>1</sub> /E	$\chi^2$	Beobachtete Bruchfrequenz (B <sub>2</sub> )	B <sub>2</sub> /E	$\chi^2$	
1	l d	15,25	51	<b>3,35</b>	<b>83,12</b>	42	<b>2,75</b>	<b>46,92</b>
	i	15,25	17	1,17	0,20	22	1,44	2,99
	p	15,25	18	1,27	0,49	20	1,31	1,48
	k d	13,84	11	0,79	0,58	17	1,22	0,72
	i	13,84	11	0,79	0,58	7	0,51	3,38
2	p	13,84	5	0,36	5,65	8	0,57	2,46
	l d	16,57	36	<b>2,17</b>	<b>22,78</b>	43	<b>2,60</b>	<b>42,15</b>
	i	16,57	25	1,50	4,29	18	1,08	0,16
	p	16,57	17	1,02	0,01	13	0,78	0,77
	k d	10,64	21	<b>1,97</b>	<b>10,09</b>	15	1,40	1,78
3	i	10,64	7	0,65	1,24	17	1,59	3,80
	p	10,64	12	1,13	0,17	10	0,93	0,04
	± d	23,20	23	0,99	0,001	19	0,81	0,64
	i	23,20	19	0,81	0,76	11	0,47	6,41
	p	23,20	12	0,51	5,41	8	0,34	9,96
4—5	l d	28,80	54	<b>1,87</b>	<b>22,05</b>	51	<b>1,77</b>	<b>17,11</b>
	i	28,80	47	<b>1,63</b>	<b>11,50</b>	47	<b>1,63</b>	<b>11,50</b>
	p	28,80	18	0,62	4,05	7	0,25	16,50
	k d	11,69	16	1,36	1,59	16	1,36	1,59
	i	11,69	20	1,71	5,90	20	1,71	5,90
6—12, X	p	11,69	9	0,76	0,62	5	0,42	3,83
	l d	80,46	176	<b>2,18</b>	<b>113,44</b>	184	<b>2,28</b>	<b>133,24</b>
	i	80,46	70	0,87	1,36	93	1,15	1,95
	p	80,46	44	0,54	16,52	42	0,52	18,38
	k d	40,39	52	1,28	3,26	40	0,99	0,003
13—15	i	40,39	28	0,69	3,80	32	0,79	1,74
	p	40,39	24	0,59	6,65	24	0,59	6,65
	l d	29,49	53	<b>1,79</b>	<b>18,74</b>	60	<b>2,03</b>	<b>31,56</b>
	i	29,49	31	1,05	0,08	28	0,94	0,07
	p	29,49	18	0,61	4,48	9	0,30	14,23
16	k	13,18	1		11,25	1		11,25
	l d	6,19	4		0,45	12		5,45
	i	6,19	11		3,73	6		0,006
	p	6,19	5		0,23	1		4,35
	k	12,36	0		12,36	5		4,38
17—18	l d	13,81	4		6,97	13		0,05
	i	13,81	2		10,10	6		4,41
	p	13,81	4		6,97	3		8,46
	k	14,90	1		12,96	2		11,17
	±	45,66	8		31,06	11		26,31
19—20	l	34,14	15		10,73	12		14,36
	k	8,77	0		8,77	0		8,77
21—22, Y								
		1000,00	1000	$\Sigma\chi^2$ 464,991		1000	$\Sigma\chi^2$ 486,879	
				(FG = 41; P << 0,001)			(FG = 41; P << 0,001)	

l = langer Arm, k = kurzer Arm, d = distales Segment, i = intermed. Segment, p = proximales Segment.

Z 4828 = N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamid.

Z 4942 = N-(2-Chloräthyl)-N'-(2-chloräthyl)-N', O-propylen-phosphorsäureester-diamid.

Segmenten (vgl. Quotienten aus den beobachteten und theoretischen Bruchfrequenzen  $B_1/E$  und  $B_2/E$ ): *Überschuß* vorwiegend in den distalen Segmenten der langen Arme von Chromosom Nr. 1, 2, 4—5, 6—12 und X, 13—15, ferner in den intermediären der langen Arme von Nr. 4—5, *Defizit* vorwiegend in den proximalen Segmenten der kurzen Arme von Chromosom 1 und der kurzen wie langen Arme der Gruppe 6—12 und X. Dabei wurden abweichende Ergebnisse entsprechender Chromosomensegmente für beide Testsubstanzen schon wegen des geringen Stichprobenumfangs nicht berücksichtigt, da zufällige Meßergebnisse nicht auszuschließen waren.

Bei der Betrachtung der interchromosomalen Bruchverteilung fällt das Defizit der Chromosomengruppen 17—22 und Y auf. In der Mehrzahl der bewerteten Metaphasen ließ sich das Y-Chromosom von den übrigen kleinen akrozentrischen unterscheiden. Sofern möglich, wurden daher Brüche innerhalb dieses Chromosoms gesondert aufgeführt. Der Längenanteil des Y-Chromosoms beträgt 9,08 gegenüber 42,91 der gesamten Gruppe 21—22 und Y. Bei Annahme einer gleichmäßigen interchromosomalen Bruchverteilung in dieser Gruppe müßten erwartungsgemäß bei insgesamt 15 Brüchen nach Testsubstanz 1 (Z 4828) 3,2 und bei insgesamt 12 Brüchen nach Testsubstanz 2 (Z 4942) 2,5 Brüche auf das Y-Chromosom entfallen. Die beobachteten Werte hingegen lagen mit 8 bzw. 6 auffallend höher.

#### Diskussion

Während die meisten der an Pflanzen getesteten mutagenen Stoffe eine präferentielle Lokalisation der Aberrationen in den heterochromatinreichen Abschnitten der Chromosomen aufwiesen (z. B. bei *Vicia faba* Triäthylenmelamin (OCKEY) und Mitomycin C (MERZ) — Zusammenstellung bei RIEGER u. MICHAELIS), — ergaben sich bei menschlichen Zellen unterschiedliche Befunde. So beobachtete COHEN nach Streptonigrinbehandlung Brüche vorwiegend im Bereich der sekundären Constrictionen der Chromosomen Nr. 1 und 2, während anscheinend im Chromosom Nr. 3 eine gleichmäßige Verteilung vorlag. Nach Hydroxylamin wurden Aberrationen vorwiegend in der sekundären Constriction des Chromosoms 1, nach BUDR in der der kurzen Arme der Gruppe 4—5 gefunden (KRONE, WOLF u. FOULADWAND). Auch Mitomycin C induzierte gehäuft Brüche in den sekundären Constrictionen der Chromosomen 1, 9 und 16 (COHEN u. SHAW). Nach AYA, MAKINO u. YAMADA traten in Kulturen, die durch Herpes simplex-Viren infiziert worden waren, Aberrationen gehäuft in den intermediären Segmenten der langen Arme der Gruppen 4—5, 6—12 und X und 13—15 auf. Bei Masernviren hingegen fanden NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN keine eindeutigen Häufungen in bestimmten Abschnitten. Nach Kälteeinwirkung auf Langzeitkulturen fetaler Lungenzellen beobachteten HAMPEL u. LEVAN gehäuft Brüche in dem distalen Segment der Gruppe 6—12 und X. Eine Bevorzugung der distalen Abschnitte bei verschiedenen Chromosomengruppen sahen auch NICHOLS, LEVAN u. KIHLMAN nach Desoxyadenosin und Cytosinarabinosid. OBE konnte ähnliche Befunde bei Chinon I erheben, wenn auch die von proximal nach distal zunehmende Bruchzahl in den am weitesten nach distal gelegenen Bereichen wieder abnahm, wobei die Unterteilung der Chromatide in jeweils zehn Segmente zu berücksichtigen ist. Nach alkylierenden Substanzen, wie Trisäthyleniminobenzochinon, Triäthylenmelamin, Triäthylthiophosphoramid, N, N-Bis-(2-chloräthyl)-O-(3-aminopropyl)-phosphor-

säureamidoester, wie auch nach Fluordesoxyuridin waren die Brüche generell vorwiegend in den distalen, weniger in den intermediären und selten in den proximalen Segmenten lokalisiert (HAMPEL). Eine ähnliche intrachromosomale Bruchverteilung wurde auch bei den hier untersuchten N-substituierten Endoxanabkömmlingen gefunden. Ob bei diesem Verteilungsmuster Artefakte, chromosomaler Spiralisationszustand, Restitutionsprozesse, mechanische Momente im Zusammenhang mit der Zellmotilität, oder andere Faktoren eine Rolle spielen, ist noch nicht abzuschätzen. Unterschiede im Wirkungsmechanismus mutagener Verbindungen bedingen noch nicht unterschiedliche Bruchverteilungsmuster, wie am Beispiel verschiedener alkylierender Substanzen einerseits und dem Thymidylatsynthetaseblocker FUDR andererseits gezeigt werden konnte. Auch ließ sich eine Anreicherung mutagener Stoffe ( $^{14}\text{C}$ -Maleinsäurehydrazid (CALLAGHAN u. GRUN) und  $^{35}\text{S}$ -Senfgas (LOVELESS)) in den heterochromatinreichen Chromosomenabschnitten bei verschiedenen Pflanzen autoradiographisch nicht nachweisen, obwohl die überwiegende Mehrzahl der Brüche nach Einwirkung dieser Substanzen gerade in jenen Abschnitten lokalisiert war. Es bleibt abzuwarten, wie sich andere markierte Mutagene bei verschiedenen Testobjekten verhalten.

### Literatur

- AYA, T., S. MAKINO, and M. YAMADA: Chromosome aberrations induced in cultured human leukocytes by herpes simplex virus infection. *Proc. jap. Acad.* **43**, 239—244 (1967).
- BÖÖK, J. A., M. FRACCARO, K. FREDGA, and J. LINDSTEN: Radiation induced chromosome aberrations in human foetal cells grown in vitro. *Acta Genet. med. (Roma)* **11**, 356—389 (1962).
- CALLAGHAN, J. J., and P. GRUN: Incorporation of  $\text{C}^{14}$ -labeled maleic hydrazide into the roottip cells of *Allium cepa*, *Vicia faba*, and *Tradescantia paludosa*. *J. biophys. biochem. Cytol.* **10**, 567—574 (1961).
- COHEN, M. M.: The specific effects of streptonigrin activity on human chromosomes in culture. *Cytogenetics* **2**, 271—279 (1963).
- , and M. W. SHAW: Effects of mitomycin C on human chromosomes. *J. cell. Biol.* **23**, 386—395 (1964).
- HAMPEL, K. E.: Über die Wirkung von Zytostatika auf die Chromosomen des Menschen. Habilitationsschrift, Berlin 1967.
- , B. KOBER, D. RÖSCH, H. GERHARTZ, and K. H. MEINIG: The action of cytostatic agents on the chromosomes of human leukocytes in vitro (preliminary communication). *Blood* **27**, 816—823 (1966).
- , and A. LEVAN: Breakage in human chromosomes induced by low temperature. *Hereditas (Lund)* **51**, 315—343 (1964).
- , D. STOPIK u. M. FRITZSCHE: Cytogenetische Untersuchungen mit zwei N-substituierten Endoxanabkömmlingen an menschlichen Leukocyten in vitro. I. Dosis-Wirkungs-Beziehungen. *Humangenetik* **5**, 321—334 (1968).
- KELLER, R., and Å. NORDÉN: Chromosome observations in bone marrow cells and lymphocytes of peripheral blood of patients with megaloblastic anemia. *Hereditas (Lund)* **58**, 265—283 (1967).
- KIHLMAN, B. A., W. W. NICHOLS, and A. LEVAN: The effect of deoxyadenosine and cytosinearaboside on the chromosomes of human leukocytes in vitro. *Hereditas (Lund)* **50**, 139—143 (1963).
- KRONE, W., U. WOLF u. B. FOULADWAND: Einfluß mutagener Substanzen auf die Chromosomenmorphologie. *Homo Suppl.* 46—49 (1965).
- LEVAN, A., and W. W. NICHOLS: Human chromosome lengths for use in distribution studies. *Hereditas (Lund)* **51**, 378—380 (1964).
- LOVELESS, A.: Chemical and biochemical problems arising from the study of chromosome breakage by alkylating agents and heterocyclic compounds. *Heredity* **6**, 293—298 (1953).

- MERZ, T.: Effect of mitomycin C on lateral root-tip chromosomes of *Vicia faba*. *Science* **133**, 329—330 (1959).
- NICHOLS, W. W., and W. K. HENEEN: Chromosomal effects of arabinosylcytosine in a human diploid cell strain. *Hereditas* (Lund) **52**, 402—410 (1964).
- , A. LEVAN, L. L. CORIELL, H. GOLDNER, and C. G. AHLSTRÖM: Chromosome abnormalities in vitro in human leukocytes associated with Schmidt-Ruppin Rous sarcoma virus. *Science* **146**, 248—250 (1964).
- —, and B. A. KIHLMAN: Chromosome breakage associated with viruses and DNA inhibitors. *Proc. Symp. internat. Soc. Cell Biol.* **3**, 255—271 (1964).
- OBE, G.: Untersuchungen über die Wirkung einer alkylierenden Verbindung (Chinon I) auf menschliche Chromosomen in vitro. Inaug.-Diss., Berlin 1967.
- OCKEY, C. H.: A quantitative comparison between the cytotoxic effects produced by proflavine, acetyleneimine and triethylene melamine on root-tips of *Vicia faba*. *J. Genet.* **55**, 525—549 (1957).
- RIEGER, R., u. A. MICHAELIS: Die Auslösung von Chromosomenaberrationen bei *Vicia faba* durch chemische Agenzien: Eine Übersicht. *Kulturpflanze* **10**, 212—292 (1962).

Dr. med. D. STOPIK  
Cytogenetisches Labor  
I. Medizinische Klinik  
der Freien Universität Berlin  
1000 Berlin 19, Spandauer Damm 130