

Wirkung von Actinomycin D auf die RNS-Synthese und die synchrone Mitosetätigkeit in *Physarum polycephalum*

Von

Wilhelm Sachsenmaier* und Joyce E. Becker**

Aus dem Institut für experimentelle Krebsforschung
der Universität Heidelberg

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 5. Januar 1965)

Actinomycin D (250 γ /ml) hemmt in Suspensionskulturen von *Physarum polycephalum* spezifisch die RNS-Synthese, während die DNS- und Proteinsynthese innerhalb der ersten drei Stunden nur wenig beeinträchtigt werden. Die Auslösung einer synchronen Kernteilung in Makroplasmoiden kann durch 250 γ /ml Actinomycin D verhindert oder stark verzögert werden, sofern der Hemmstoff spätestens zu Beginn des letzten Drittels der Interphase (\sim 2 Stdn. vor Prophase) dem Medium zugesetzt wird. Die Mitosehemmung ist durch Auswaschen des Hemmstoffes reversibel. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß zur Vorbereitung einer Mitose während des größten Teiles der Interphase DNS-abhängige RNS neu gebildet werden muß, die möglicherweise als Informationsüberträger die Synthese mitosespezifischer Proteine kontrolliert. Es wird eine Arbeitshypothese diskutiert, nach der die Mitose als ein durch Genregulation gesteuerter Vorgang aufzufassen wäre.

Actinomycin D (250 γ /ml) specifically inhibits RNA synthesis in suspension cultures of *Physarum polycephalum* whereas DNA and protein synthesis are less affected within the first three hours. Onset of synchronous mitoses in macroplasmidia is prohibited or largely delayed by 250 γ /ml actinomycin D if the inhibitor is added to the medium at or prior to the beginning of the last third of interphase (\sim 2 hrs. prior to prophase). Removal of the inhibitor from the medium reverses the inhibitory effect on mitosis. The results indicate that prepa-

* Herrn Prof. Dr. Hermann Bretschneider zum 60. Geburtstag gewidmet.

** Gegenwärtige Anschrift: McArdle Memorial Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin, Madison (Wis.) USA.

ration of mitosis requires synthesis of DNA dependent RNA during the major part of interphase. These RNA molecules possibly carry information for the synthesis of proteins specifically involved with mitosis. A working hypothesis is discussed suggesting that mitotic activities may be controlled by gene regulation.

Die mit der Regulation der Zellteilung verknüpften chemischen Prozesse sind noch weitgehend unbekannt. Zu ihrem Studium werden vielfach synchrone Zellsysteme verwendet, die es gestatten, genügend Material für biochemische Untersuchungen zu gewinnen, das definierte Stadien des Teilungszyclus repräsentiert. Neben verschiedenen Systemen, die z. B. durch Temperaturschock-Behandlung¹ oder durch Einwirkung von Antimetaboliten² künstlich synchronisiert werden können, hat in den letzten Jahren ein Schleimpilz, *Physarum polycephalum*³, besonders an Bedeutung gewonnen, der einen natürlich synchronen Kernteilungsrhythmus zeigt⁴. Dieser Organismus bildet in seiner vegetativen Phase vielkernige Plasmodien, die auf einem sterilen, flüssigen Nährmedium⁵ als scheibenförmige Syncytien bis zu einer Größe von etwa 8 cm Durchmesser gezüchtet werden können. Solche Makroplasmodien enthalten mehrere Millionen Zellkerne, die sich bei 26° C etwa alle 9 Stunden voll synchron durch Mitose teilen. Die natürliche Synchronie ist offenbar durch das Fehlen von Zellwänden zwischen den Kernen bedingt.

Die Verdoppelung der Desoxyribonucleinsäure (DNS)* erfolgt im ersten Drittel der Interphase^{6, 7}, während Ribonucleinsäure (RNS) während des gesamten Generationenzyclus synthetisiert wird. Die RNS-Synthese zeigt jedoch ein Minimum zur Zeit der Mitose und ein Maximum nach Abschluß der DNS-Replikation⁷. Hemmversuche⁸ mit dem DNS-Antimetaboliten 5-Fluor-2'-desoxyuridin⁹ sprechen für eine strenge zeitliche Korrelation zwischen DNS-Synthese und der nächsten Mitose, ob-

* Folgende Abkürzungen werden verwendet: DNS = Desoxyribonucleinsäure; RNS = Ribonucleinsäure; m-RNS = Messenger-Ribonucleinsäure; TCE = Trichloressigsäure.

¹ O. Scherbaum und E. Zeuthen, *Exper. Cell Res.* **6**, 221 (1954).

² R. R. Rueckert und G. C. Mueller, *Cancer Res.* **20**, 1584 (1960).

³ L. D. Schweinitz, „Synopsis Fungorum“, Naturforschende Ges. in Leipzig, Suppl. No. **382**, 63 (1822); E. Guttes, S. Guttes und H. P. Rusch, *Developm. Biol.* **3**, 588 (1961).

⁴ F. L. Howard, *Ann. Botany [London]* **46**, 461 (1932).

⁵ J. W. Daniel und H. P. Rusch, *J. Gen. Microbiol.* **25**, 47 (1961).

⁶ O. F. Nygaard, S. Guttes und H. P. Rusch, *Biochim. biophys. Acta [Amsterdam]* **38**, 298 (1960).

⁷ W. Sachsenmaier, *Biochem. Z.* **340**, 541 (1964).

⁸ W. Sachsenmaier und H. P. Rusch, *Exper. Cell Res.* **36**, 124 (1964).

⁹ R. Duschinsky, E. Pleven, J. Malbica und Ch. Heidelberger, 132nd Meeting Amer. Chem. Soc., Wash., Abstr. p. 19 C (1957).

gleich beide Ereignisse durch eine lange G₂-Periode (prämitotische Ruhephase¹⁰) getrennt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Antibioticums Actinomycin D auf die Zeitbestimmung und den Ablauf der synchronen Mitose in *Physarum polycephalum* studiert, um Hinweise auf die Rolle der DNS-abhängigen RNS (Messenger-RNS; m-RNS) bei der Regulation der Mitosetätigkeit zu gewinnen. Die Actinomycine¹¹ hemmen bei zahlreichen Organismen und in vitro spezifisch die Synthese DNS-abhängiger RNS^{12, 13} durch Komplexbildung mit Guanin-haltigen Abschnitten der als Matrize dienenden DNS¹⁴. Die Actinomycine sind daher nützliche Hilfsmittel zum Studium genetisch gesteuerter Prozesse.

Methodik

Kultivierung von Physarum polycephalum. Der Organismus wurde routinemäßig als eine Suspension von Mikroplasmoiden in einem sterilen, flüssigen Nährmedium gezüchtet⁵. Die stark formveränderlichen Mikroplasmoiden erreichen in einer maschinell geschüttelten Submerskultur eine durchschnittliche Größe von 0,1 mm und sind vielkernig. Alle Kerne innerhalb eines einzigen Plasmodiums teilen sich synchron, jedoch besteht zwischen den Plasmodien einer Suspension keine Synchronie. Makroplasmoiden wurden durch Fusion zahlreicher Mikroplasmoiden auf einer Filterpapierunterlage hergestellt, wie an anderer Stelle ausführlich beschrieben wurde⁶⁻⁸. Unmittelbar nach der Fusion sistiert jede Mitosetätigkeit. Nach ca. 5 Stdn. erscheint die erste synchrone Mitose, an der sich unter optimalen Bedingungen sämtliche Kerne mit höchstens ± 5 Min. Zeitdifferenz beteiligen. Weitere synchrone Teilungen folgen im Abstand von 8—10 Stdn. bei 26° C.

Einwirkung von Actinomycin D. Vorversuche zeigten, daß relativ hohe Dosen von Actinomycin D ($> 30 \gamma/\text{ml}$) erforderlich sind, um das Wachstum von *Physarum polycephalum* zu beeinflussen. Verschiedene Unterlinien des Organismus, die alle von einer Kultur abstammten, die jedoch mehrere Monate getrennt gezüchtet wurden, zeigten unterschiedliche Empfindlichkeit gegen diesen Hemmstoff. In den hier beschriebenen Versuchen wurden eine „empfindliche“ (B'') und eine „wenig empfindliche“ Linie (B') sowie Hemmstoffkonzentrationen von 100—250 γ/ml angewendet.

¹⁰ A. Howard und S. R. Pelc, Heredity (Suppl.) **6**, 261 (1953).

¹¹ H. Brockmann, Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **18**, 1 (1960).

¹² E. Reich, R. M. Franklin, A. J. Shatkin und E. L. Tatum, Proc. nat. Acad. Sci. [Wash.] **48**, 1238 (1962).

¹³ E. Harbers und W. Müller, Biochem. biophys. Res. Commun. **7**, 107 (1962); I. H. Goldberg und M. Rabinowitz, Science **136**, 315 (1962); J. Hurwitz, J. J. Furth, M. Malamy und M. Alexander, Proc. nat. Acad. Sci. [Wash.] **48**, 1222 (1962); G. Hartmann und U. Coy, Angew. Chemie **74**, 501 (1962).

¹⁴ H. Rauen, H. Kersten und W. Kersten, Z. Physiol. Chem. **321**, 139 (1960); W. Kersten, Biochim. biophys. Acta [Amsterdam] **47**, 610 (1961); I. H. Goldberg, M. Rabinowitz und E. Reich, Proc. nat. Acad. Sci. [Wash.] **48**, 2094 (1962); E. Harbers, W. Müller und R. Backmann, Biochem. Z. **337**, 224 (1963); M. Liersch und G. Hartmann, Biochem. Z. **340**, 390 (1964).

Die unterschiedlichen Effekte von Actinomycin D auf die Biosynthese der Nucleinsäuren und der Proteine wurden an nicht synchronen Suspensionskulturen der „empfindlichen“ Linie (*B*) wie folgt untersucht. Drei Kulturen à 20 ml (entsprechend ca. 60 mg Protein) wurden 60 Stdn. nach Inoculation vereinigt, mit 20 ml Medium verdünnt, davon je 10 ml in sechs 50 ml Erlenmeyerkolben pipettiert und mit 120 Perioden/Min. maschinell geschüttelt. Nach 45 Min. wurden drei der Kulturen mit je 2,5 mg Actinomycin D (Merck, Sharp & Dohme, Rahway, N. J.), gelöst in 0,1 ml eiskalter aqua dest., versetzt. Eine Minute später wurden zu je einer Kontrollkultur und zu je einer mit dem Hemmstoff versetzten Kultur eine der folgenden radioaktiv markierten Synthesestufen zugegeben: a) 100 μC ^3H -Thymidin (0,6 C/mMol, The Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire, Engl.); b) 50 μC ^3H -Cytidin (1 C/mMol, Schwarz Bioresarch Inc., Mount Vernon, N. Y.); c) 134 μC ^3H -Lysin (54,7 mC/mMol, Amersham). Im Verlaufe von drei Stunden wurden in verschiedenen Zeitabständen 1 ml-Proben entnommen und in 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 1 ml eiskalter 0,5*n*-Trichloressigsäure (*TCE*) vermischt. Nach mindestens 15 Min. Stehen in Eis wurden die säureunlöslichen Rückstände abzentrifugiert und 2mal mit je 1 ml der folgenden Waschflüssigkeiten durch Resuspendieren und Zentrifugieren bei 0° C gewaschen: 0,25*n*-*TCE*, 8% *TCE* in Aceton, 96proz. Äthanol. Die getrockneten Rückstände der mit ^3H -Thymidin und mit ^3H -Lysin markierten Proben wurden in 0,7 ml 98proz. Ameisensäure über Nacht bei 35° C gelöst. Die mit ^3H -Cytidin markierten Proben wurden mit 0,7 ml Ribonuclease-Lösung (100 γ /ml Pankreas-Ribonuclease, Serva Heidelberg, 5mal kristallisiert, 10 Min. bei 97° C erhitzt, in 0,025*m*-TRIS-Puffer pH 7,4) über Nacht bei 35° C extrahiert, anschließend mit 3,5 ml 96proz. Äthanol versetzt und nach 2 Stdn. Stehen in Eis zentrifugiert. Zur Messung der Radioaktivität im Packard TRICARB Scintillationsspektrometer wurden 0,1 ml der Ameisensäurelösungen bzw. 0,5 ml der Ribonucleaseextrakte in 10 ml Scintillationsflüssigkeit [7 g/l 2,5-Diphenyloxazol, 0,3 g/l 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol, 100 g/l Naphthalin in Dioxan] verwendet. Nur die innerhalb der ersten Stunde nach Zugabe der Scintillationsflüssigkeit gemessenen Impulse wurden verwertet, da die Zählzählbeute bei längeren Messungen, offenbar infolge geringer Niederschlagsbildung, langsam abfiel. Die Radioaktivitätsmessungen wurden nach Zusatz eines inneren Standards (tritiiertes Wasser, entsprechend 23 000 Zerfälle/Min.) wiederholt, um den Quench-Effekt zu eliminieren.

Die Wirkung von Actinomycin D auf die Mitosetätigkeit wurde an Oberflächenkulturen synchroner Makroplasmoidien studiert, die durch Fusion suspendierter Mikroplasmoidien hergestellt und nach Ablauf der 2. synchronen Kernteilung in den Versuch genommen wurden. In verschiedenen Stadien des Teilungszyklus wurden sektorförmige Stücke (2—4 cm²) eines Plasmoidiums abgetrennt und auf frisches Medium mit 100—250 γ /ml Actinomycin D bzw. auf Kontrollmedium übertragen. Die abgetrennten Stücke wuchsen als eigenständige Plasmoidien weiter, wobei die Kontrollen den Mitoserhythmus der Mutterkultur über zwei bis drei Teilungen mit nur geringen Abweichungen beibehielten. Der Ablauf der Mitosen wurde durch Herstellung von Quetschpräparaten, die nach ca. 2 Min. Alkoholfixierung mit dem Phasenkontrastmikroskop untersucht wurden, verfolgt. Zur Messung des Einbaues von ^3H -Cytidin wurde je eine Hälfte eines Makroplasmoidiums auf Kontroll- bzw. auf Actinomycin D-Medium übertragen. Nach 30 und 100 Min. wurden von jeder Kulturhälfte Teilstücke (2—4 cm²) abgetrennt und 15 Min. auf ent-

sprechenden radioaktiven Medien mit $2 \mu\text{C/ml}$ ^3H -Cytidin (1 C/mMol) inkubiert. Die Aufarbeitung der markierten Proben erfolgte wie oben beschrieben. Der RNS-Gehalt wurde durch UV-Absorptionsmessung bei $260 \text{ m}\mu$ in den Ribonuclease-Extrakten ermittelt ($\gamma \text{ RNS/ml} = 34 \cdot E_{260}$).

Ergebnisse

Abb. 1 zeigt die selektive Hemmung der RNS-Synthese in einer nicht synchronen Suspensionskultur durch $250 \gamma/\text{ml}$ Actinomycin D. Die Proteinsynthese, gemessen am Einbau von ^3H -Lysin, wurde während der

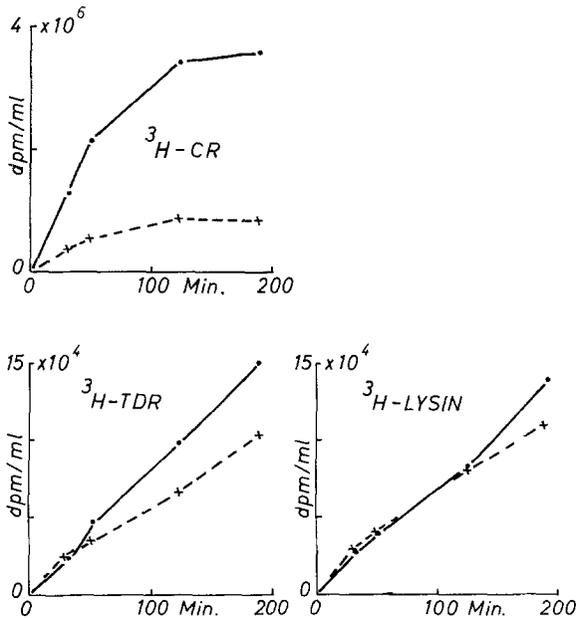


Abb. 1. Wirkung von Actinomycin D auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese in nicht synchronen Suspensionskulturen (*B*). Einbau von ^3H -Thymidin, ^3H -Cytidin und ^3H -Lysin: —•— Kontrollen; \times --- \times nach Zugabe von $250 \gamma/\text{ml}$ Actinomycin D zum Zeitpunkt 0

ersten drei Stunden praktisch nicht und der Einbau von ^3H -Thymidin in die DNS nur wenig beeinträchtigt. Dies spricht dafür, daß Actinomycin D trotz der erforderlichen hohen Konzentration bei *Physarum polycephalum* selektiv die Synthese der DNS-abhängigen RNS blockiert, analog dem bei anderen, wesentlich empfindlicheren Systemen beobachteten Wirkungsmechanismus^{12, 13}.

Die Änderung der RNS-Syntheserate im Verlaufe eines Teilungszyclus synchroner Makroplasmoidien ist aus Abb. 2 zu ersehen. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen⁷ steigt die Einbaurrate von ^3H -Cytidin nach einem Minimum zur Zeit der Mitose im ersten Drittel der Interphase allmählich bis zu einem deutlichen Maximum an, das zeitlich mit dem Abschluß der DNS-Verdoppelung in den Kernen zusammenfällt.

In Abb. 3 ist der Effekt von Actinomycin D auf den Mitosezeitplan synchroner Makroplasmoidien der beiden verschieden empfindlichen Linien *B'* und *B''* wiedergegeben. Auf der Abszisse ist der Zeitpunkt der Hemmstoffzugabe, auf der Ordinate die Verzögerung des Beginns der Mitose (*M*) gegenüber der Kontrolle angezeigt. Die ausgezogene Kurve entspricht dem Effekt bei kontinuierlicher Einwirkung von 200 γ /ml Actinomycin D auf Plasmodien der „wenig empfindlichen“ Linie (*B'*). Die gestrichelte Kurve zeigt die Wirkung in Kulturen derselben Linie, die

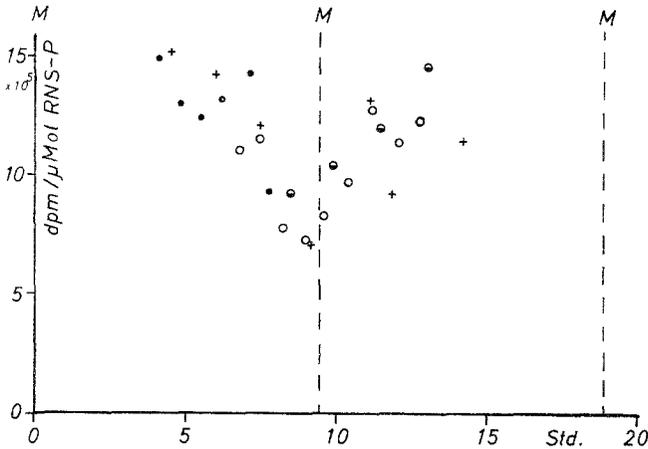


Abb. 2. Pulsmarkierung synchroner Makroplasmoidien (*B''*) mit ^3H -Cytidin. Die Meßpunkte geben die spezif. Radioaktivität der RNS von ca. 2 cm^2 großen Plasmodienstücken an, die in verschiedenen Stadien zweier aufeinander folgender Kernteilungszyklen von vier parallel angesetzten Makroplasmoidien abgetrennt und 15 Min. mit $2\text{ }\mu\text{C/ml}$ ^3H -Cytidin markiert wurden. Gleiche Symbole kennzeichnen Teilstücke ein und desselben Makroplasmoidiums. *M*: Zeitpunkte synchroner Kernteilungen (Telophase)

nach 4 Stdn. Behandlung mit 200 γ /ml Actinomycin D wieder auf normales Medium übertragen wurden (Pulsbehandlung). Der Hemmstoff hatte bei *B'*-Kulturen nur geringe Wirkung, wenn er während der letzten zwei Drittel der Interphase vor Mitose (*M*) zugesetzt wurde. Zugabe während oder vor der vorausgehenden Mitose (*M*-1) verzögerte den Beginn von Mitose (*M*) hingegen um mehr als 5 Stdn., sofern die Hemmstoffeinwirkung nicht unterbrochen wurde. Diskontinuierliche Behandlung während jeweils einer Periode von 4 Stdn. hatte nur geringen Effekt, unabhängig vom Stadium des Teilungszyclus. Dies spricht für eine weitgehend reversible Bindung von Actinomycin D an die DNS von *Physarum polycephalum*.

Die relativ geringe Wirkung einer Behandlung mit Actinomycin D während der letzten zwei Drittel der Interphase ist wahrscheinlich auf eine nur unvollständige Hemmung der RNS-Synthese unter den gewählten Versuchsbedingungen zurückzuführen. Die intrazelluläre Hemmstoffkonzentration erreichte offenbar nur sehr langsam eine Höhe, die ausreicht,

um die RNS-Synthese unter einen kritischen Wert zu senken, unter dem die Vorbereitung der nächsten Mitose entscheidend beeinträchtigt wird. Eine deutliche Hemmung des Mitosebeginns wurde demnach nur dann beobachtet, wenn Actinomycin D 2—3 Stdn. vor dem RNS-Synthesemaximum zur Einwirkung kam. Eine verzögerte Entfaltung der mitosehemmenden Wirkung von Actinomycin D wurde auch bei anderen Systeme-

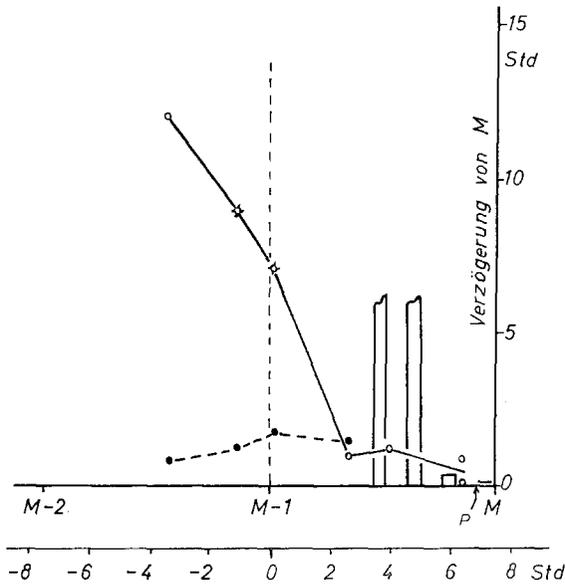


Abb. 3. Wirkung von Actinomycin D auf den Zeitplan der Kernteilung in synchronen Makroplasmoiden. Abszisse: Zeitpunkt der Hemmstoffzugabe. Ordinate: Verzögerung des Beginns der Mitose (M) gegenüber den Kontrollen. — Kontinuierliche Einwirkung von 200 γ /ml Actinomycin D auf Kulturen der „wenig empfindlichen“ Linie (B'); - - - desgl., jedoch nur 4 Stdn. Einwirkung des Hemmstoffes (Pulsbehandlung). \times Arretierung der Kerne in Metaphase. Säulen: kontinuierliche Einwirkung von 250 γ /ml Actinomycin D auf Kulturen der „empfindlichen“ Linie (B''); die Beobachtung der Kulturen wurde 6 Stdn. nach Ablauf der Mitose (M) in den Kontrollen beendet. $M-2$, $M-1$, M : Zeitpunkte synchroner Mitosen (Telophase). P : Prophase

men beobachtet. Möglicherweise spielte auch in jenen Fällen eine nur teilweise Hemmung der RNS-Synthese infolge Permeationsschwierigkeiten¹⁵ oder unterschwelliger Hemmstoffkonzentration im Medium¹² eine Rolle.

Der kritische Zeitpunkt, bis zu dem eine Zugabe von Actinomycin D die nächste Mitose noch nennenswert beeinflussen kann, liegt bei der „empfindlichen“ Linie (B'') und bei Verwendung einer erhöhten Hemmstoffkonzentration von 250 γ /ml sehr viel später, nämlich am Ende des zweiten Drittels der Interphase (Säulen in Abb. 3). Dies spricht dafür, daß in *Physarum polycephalum* zumindest bis 2 Stdn. vor der Prophase die

¹⁵ A. K. Bal und P. R. Gross, Science **139**, 584 (1963).

Synthese DNS-abhängiger RNS zur Vorbereitung einer Mitose erforderlich ist.

Tab. 1 zeigt deutlich, daß die Länge der gegen Actinomycin D unempfindlichen Periode des Generationscyclus stark mit der Hemmstoff-

Tabelle 1. Hemmung der RNS-Synthese und des Mitosebeginns durch verschiedene Konzentrationen von Actinomycin D

Hemmstoffkonz. (γ /ml)	0,11	0,50	0,85	Cyclusstadium*
100		25	53	Hemmung der RNS-Syntheserate %**
200	32 (64)	82	66	
100	> 3†† < 15	0†	0†	Verzögerung des Mitosebeginns (Stdn.)
200		> 14	0,3	

In früher, mittlerer und später Interphase wurde je ein Makroplasmodium der Linie *B'* in drei gleich große Sektoren geteilt und letztere auf frisches Medium mit 0, 100 und 200 γ /ml Actinomycin D übertragen. Nach 30 (100) Min. wurden von allen drei Sektoren ca. 2 cm² große Stücke abgetrennt, 15 Min. auf entsprechenden radioaktiven Medien mit 2 μ C/ml ³H-Cytidin inkubiert und anschließend, wie im method. Teil beschrieben, aufgearbeitet. Die Wirkung auf den Mitosebeginn wurde in den restlichen, nicht radioaktiven Plasmodienstücken beobachtet.

* Stadium des Teilungscyclus zum Zeitpunkt der Hemmstoffzugabe. Gesamtlänge des Cyclus von Telophase zu Telophase = 1.0 (entsprechend 8,7 Stdn.).

** % Hemmung des Einbaues von ³H-Cytidin in die RNS 30 (100) Min. nach Hemmstoffzugabe.

† Dauer der Metaphase: 1–2 Stdn. (Kontrolle ~ 10 Min.).

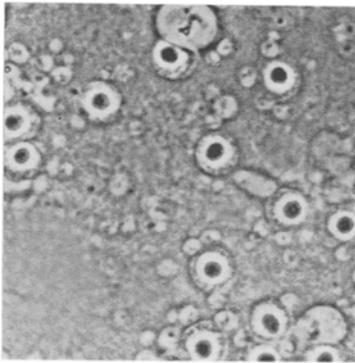
†† Arretierung der Kerne in Metaphase.

konzentration variiert und zwar parallel mit der Wirkung auf die RNS-Synthese. Durch 100 γ /ml Actinomycin D wurde nur dann der Mitosebeginn verzögert, wenn der Hemmstoff bereits in früher Interphase zugeetzt wurde. Zugabe während der Mitte der Interphase oder später führte lediglich zu einer Verlängerung des Metaphase-Stadiums. Die RNS-Synthese war 30 Min. nach Einwirkung von 100 γ /ml Actinomycin D nur mäßig gehemmt. Die weitere Abnahme der RNS-Synthese zwischen der 30. und 100. Minute bestätigt, daß die Hemmwirkung nur langsam zur Entfaltung kommt. Demgegenüber war bei Erhöhung der Hemmstoffkonzentration auf 200 γ /ml eine Zugabe von Actinomycin D noch mindestens bis zur Mitte der Interphase mitosewirksam. Parallel hierzu war die Hemmung der RNS-Synthese erheblich verstärkt.

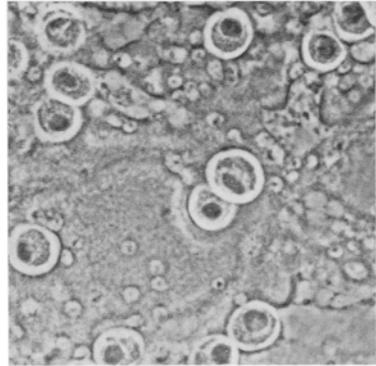
Unter der Einwirkung von Actinomycin D war eine Verkleinerung der Nucleolen und eine körnige Verdichtung des Chromatins zu beobachten. Etwa zwei Stunden vor Eintritt in die Metaphase accumulierte das Chromatin im Zentrum der Kerne um die Nucleolen, ähnlich wie bei Beginn einer normalen Prophase¹⁶ (Abb. 4). Auffällig war ferner eine deutliche Verlängerung des Metaphasestadiums auch in Fällen, in denen der Mitosebeginn noch nicht verzögert war. Unter Bedingungen, die eine verstärkte Mitosehemmung zur Folge hatten, war neben einer Verzögerung des Mitose-

¹⁶ E. Guttes und S. Guttes, Exper. [Basel] 20, 269 (1964).

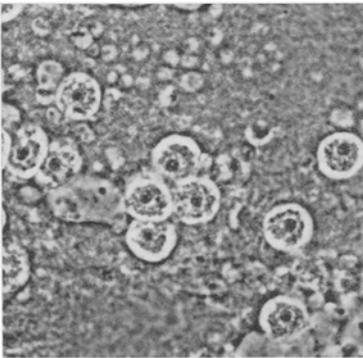
beginns eine völlige Arretierung der Kerne in Metaphase zu beobachten, die im weiteren Verlauf zur Ausbildung zahlreicher pyknotischer Kerne führte. Wenn andererseits Kerne in Gegenwart von Actinomycin D nach einer Verzögerung von mehr als 10 Stunden in die Mitose eintraten, durch-



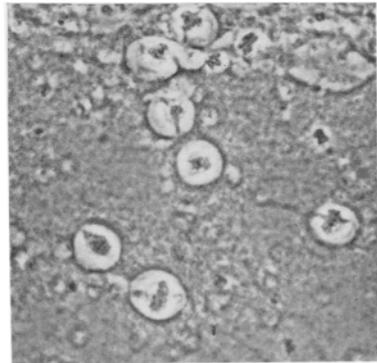
4 a



4 b



4 c



4 d

Abb. 4. Mikroaufnahmen ungefärbter Quetschpräparate mit dem Zeiss-Photomikroskop (Phasenkontrast). Vergrößerung 1000fach.

Kontrollkulturen

- a) Interphase;
 - b) beginnende Prophase;
- Mit 250 γ /ml Actinomycin D behandelte Kulturen (B'') (Hemmstoffzugabe 2 Stdn. vor Mitose);
- c) Prophase-ähnliche Veränderungen, sehr kleine Nucleolen;
 - d) vorübergehend (ca. 1 Stde.) arretierte Metaphase

liefen die meisten Kerne alle Mitosestadien mit normaler Geschwindigkeit. In diesen Fällen erreichten die zunächst über mehrere Stunden sehr klein gebliebenen Nucleolen vor Beginn der Teilung normale Größe. Nach Ablauf der um mehr als 10 Stunden verzögerten Mitosen setzte trotz unveränderter Gegenwart des Hemmstoffes wieder sichtbares Wachstum der Kulturen ein, was für eine gewisse Adaptationsfähigkeit des Organismus gegenüber Actinomycin D spricht.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß in *Physarum polycephalum* zur Vorbereitung einer synchronen Kernteilung während mindestens $\frac{2}{3}$ des Reproduktionscyclus DNS-abhängige RNS synthetisiert werden muß. Dies wäre mit der Annahme vereinbar, daß die periodische Auslösung von Kernteilungen durch einen genetischen Regulationsmechanismus gesteuert wird. Hiernach müßten bestimmte Proteine, die in spezifischer Weise an der Steuerung der Mitosetätigkeit beteiligt sind, vor jeder Teilung neu gebildet werden. Die in der DNS festgelegte genetische Information für die Synthese dieser Proteine muß offenbar ständig durch Produktion von m-RNS nachgeliefert werden. Die Lebensdauer dieser m-RNS-Moleküle kann höchstens zwei Stunden betragen, denn die Auslösung einer Mitose wird noch bis zwei Stunden vor Beginn der Prophase durch Zugabe von Actinomyein D unterdrückt. Andererseits wird der Einbau von ^3H -Lysin in die Gesamtproteine zumindest während der ersten drei Stunden nach Zugabe von Actinomyein D nicht nennenswert gehemmt, sodaß die durchschnittliche Lebensdauer aller m-RNS-Moleküle mehr als zwei Stunden betragen muß. Möglicherweise ist nur ein relativ kleiner Anteil der m-RNS-Moleküle mit vergleichsweise hohem „Turnover“ für die Auslösung der Mitose von Bedeutung, während die Hauptmenge von stabileren Molekülen gebildet wird, die an der Regulation der Mitose nicht unmittelbar beteiligt sind.

Hotta und *Stern*¹⁷ diskutieren auf Grund von Versuchen an synchronen Mikrosporen von Blütenpflanzen ebenfalls die Möglichkeit einer genetischen Regulation der Mitosetätigkeit nach den von *Jacob* und *Monod*¹⁸ entwickelten Prinzipien für die Induktion und Repression von Bakterienenzymen. In Mikrosporen, die einen extrem langen Generationscyclus von mehreren Wochen zeigen, werden bestimmte Enzyme, z. B. Thymidinkinase, in einer mit der Mitose streng gekoppelten Periodizität induziert. Neuere Untersuchungen an *Physarum polycephalum* ergaben¹⁹, daß auch in diesem rasch wachsenden Organismus die Thymidinkinase-Aktivität im Rhythmus der Kernteilungen periodisch zu- und abnimmt. Dem Prinzip der genetischen Regulation periodischer Vorgänge im Verlauf des Zellteilungscyclus könnte demnach eine allgemeinere Bedeutung zukommen. Es wäre denkbar, daß nicht nur die mit dem Nucleinsäurestoffwechsel assoziierte Thymidinkinase, sondern auch andere, noch unbekannte En-

¹⁷ *Y. Hotta* und *H. Stern*, Proc. nat. Acad. Sci. [Wash.] **49**, 648, 861 (1963).

¹⁸ *F. Jacob* und *J. Monod*, J. molec. Biol. **3**, 318 (1961).

¹⁹ *W. Sachsenmaier*, Vortrag Herbsttagung Ges. Physiol. Chem., Köln, 22. 10. 1964.

zyme, die an der Steuerung der Mitose beteiligt sind, periodisch induziert und wieder reprimiert werden.

Die Syntheserate der Gesamt-RNS scheint nicht geschwindigkeitsbestimmend für die Vorbereitung der nächstfolgenden Mitose zu sein, denn der Einbau von ^3H -Cytidin kann durch mittlere Konzentrationen (100 γ/ml) von Actinomycin D teilweise gehemmt werden, ohne den Beginn der nächsten Mitose zu verzögern (Tab. 1). Dies könnte bedeuten, daß ein Überschuß an mitosespezifischen m-RNS-Molekülen gebildet wird, so daß der Mitosebeginn erst nach Absinken der RNS-Syntheserate unter einen kritischen Wert verzögert wird. Andererseits wäre es auch denkbar, daß die Synthese der für die Steuerung der Mitose benötigten RNS-Moleküle gegen Actinomycin D weniger empfindlich ist als die Synthese anderer RNS-Sorten.

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß nicht alle Teilprozesse des Mitoseablaufes in gleicher Weise durch Actinomycin D beeinflußt werden. Unter bestimmten Bedingungen konnte eine selektive Blockierung der Kerne im Stadium der Metaphase beobachtet werden, die an die bekannte Wirkung des Colchicins^{20, 21} erinnert. *Physarum polycephalum* ist erstaunlicherweise gegen dieses Alkaloid sowie gegen das ebenfalls als Spindelgift wirkende Vincalucoblastin²² völlig resistent²³. Dies ist offenbar darauf zurückzuführen, daß die Kernmembran während der Mitose erhalten bleibt und die Spindel im Inneren der Kerne gebildet wird. Es scheint nicht ausgeschlossen, daß Actinomycin D in nahe an der mitosewirksamen Grenze liegenden Konzentrationen mittelbar, über eine Hemmung der RNS- und Proteinsynthese, Spindelstörungen verursacht, zumal ähnliche morphologische Effekte auch nach Einwirkung des RNS-Antimetaboliten 5-Fluor-uridin bei *Physarum polycephalum* beobachtet werden konnten²⁴. In diesem Falle wäre anzunehmen, daß verschiedene Stadien des Mitoseablaufes von verschiedenen m-RNS-Molekülararten kontrolliert werden, die möglicherweise durch Actinomycin D unterschiedlich beeinflußt werden. Eine Arretierung der Kerne im Stadium der Metaphase könnte andererseits auch auf eine mechanische Behinderung der Chromosomentrennung durch Chromatinverklebungen zurückzuführen sein. Dieser Mechanismus wird von Lettré²¹ für die Wirkung des Trypaflavins diskutiert, das wie Actinomycin D mit der DNS Komplexe bildet

²⁰ R. J. Ludford, Arch. exper. Zellforsch. **18**, 411 (1936).

²¹ H. Lettré, Ergebn. Physiol. exper. Pharmakol. **46**, 379 (1950).

²² R. L. Noble, C. T. Beer und J. H. Cutts, Ann. N. Y. Acad. Sci. **76**, 882 (1958); W. Siebs, Z. Zellforsch. **61**, 231 (1963).

²³ J. Becker, J. W. Daniel und H. P. Rusch, Cancer Res. **23**, Part II, 1910 (1963); W. Sachsenmaier, unveröffentlicht.

²⁴ W. Sachsenmaier und H. P. Rusch, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. **3**, 357 (1962).

und Zellen in der Gewebekultur selektiv im Stadium der Metaphase arretiert. Leider können wegen der Kleinheit der Chromosomen bei *Physarum polycephalum* eventuelle morphologische Veränderungen an den Chromosomen, wie Verklebungen, Brüche etc., lichtmikroskopisch nicht erfaßt werden.

Die Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Herrn Prof. Dr. H. Lettré danke ich für die Förderung der Untersuchungen. Frl. I. Hodel und Frl. G. Maurer leisteten wertvolle experimentelle Mithilfe.