

einerseits und den *Cerealia* Schiem. andererseits soll später berichtet werden.

Zusammenfassung

1. Nach Angleichung der Blütezeiten wurde der F_1 -Bastard *Secale cereale* \times *Sec. silvestre* hergestellt.

2. Er zeigt morphologisch einen intermediären Typ mit deutlicher Heterosis in Halmzahl, Stroh-
länge und Zahl der Mittelblüten.

3. Die Fertilität ist in beiden Geschlechtern stark herabgesetzt.

4. Die cytologische Untersuchung zeigte in der Diakinese der Pollenmeiose 4 Bivalente und 1 Ring oder 1 Kette von 6 Chromosomen, so daß der gleiche Typus der zwei reziproken Translokationen angenommen werden kann, wie er *Sec. cereale* von *Sec. montanum* trennt.

5. Die von STUTZ 1957 erwogene Entstehung von *Sec. cereale* durch Bastardierung von *Sec. silvestre* mit *Sec. montanum* wird daher für unwahrscheinlich gehalten.

Literatur

1. PRICE, S.: Irradiation and interspecific hybridization in *Secale*. Genetics 40, 651—667 (1955). — 2. RILEY, R.: The cytogenetics of the differences between some *Secale* species. J. Agric. Sci. 46, 377—383 (1955). — 3. ROSHEVITZ, R. Y.: A monograph of the wild, weedy, and cultivated species of rye. Acta Inst. Bot. No. 1, 105—163 (1948). — 4. SCHIEMANN, E.: Weizen, Roggen, Gerste. Verlag Gustav Fischer, Jena (1948). — 5. SCHIEMANN, E., und U. NÜRNBERG-KRÜGER: Neue Untersuchungen an *Secale africanum* Stapf. II. *Secale africanum* und seine Bastarde mit *Secale montanum* und *Secale cereale*. Naturwiss. 39, 136—137 (1952). — 6. STUTZ, H. C.: A cytogenetic analysis of the hybrid *Secale cereale* L. \times *Secale montanum* Guss. and its progeny. Genetics 42, 200—221 (1957).

Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin in Gatersleben und dem Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle—Wittenberg

Einige experimentelle Ergebnisse zur Wirkung von Myleran* auf die Chromosomen von *Vicia faba* L.

Von A. MICHAELIS und R. RIEGER

Mit 11 Abbildungen

I. Einleitung

Eine schwache mutagene Wirkung des in die Gruppe der polyfunktionellen alkylierenden¹ Verbindungen gehörenden Sulfonsäureesters Myleran (Dimethansulfonoxybutan, Abb. 1) wurde von DEMEREC et al. (1952) und von HEMMERLEY und DEMEREC (1955) an Bakterien, von BIRD (1951) und RÖHRBORN (1959) an *Drosophila* nachgewiesen. Chlorophyllmutationen der Gerste konnten mit Hilfe von Myleran durch v. WETTSTEIN et al. (1959), HESLOT et al. (1959) und EHRENBERG et al. (zit. nach EHRENBERG 1960, GUSTAFSSON 1960) ausgelöst werden. Mit 10 mg/100 ml Myleran gelang es STEINMAN et al. (1958) nicht, bei *Escherichia coli* Genmutationen zu induzieren. Die Dosis dürfte bei 100% Überlebenden zu niedrig gewesen sein.

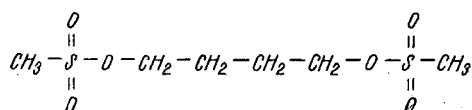


Abb. 1. Strukturformel von Myleran (Dimethansulfonoxybutan).

In bezug auf die Induktion von Chromosomenaberrationen bei *Vicia faba* (LOVELESS 1953), bei der Zwiebel und Bohne (TRUHAUT und DEYSSON 1954), in tierischen Tumorzellen (TANAKA, OHNO, KINOSITA und BIERMAN 1955, KOLLER 1958) und in Fibroblasten von Hühnern, Mäusen und menschlichen Embryonen (CHEVREMONT, FREDERIC und BAECKELAND

1959) erzeugte Myleran die gleichen Effekte und ein ähnliches Aberrationsspektrum wie andere alkylierende Verbindungen. Auf Grund seiner cytotatischen Wirkung wird Myleran zur Therapie von Leukämien verwendet, da es eine gewisse selektive Wirkung auf die myeloische Reihe hat (HADDOW u. TIMMIS 1953, GALTON 1953).

Veranlassung zur Durchführung unserer im folgenden zu schildernden Experimente mit Myleran bei *Vicia faba* waren Untersuchungen von J. und M. MOUTSCHEN-DAHMEN (1958, 1959) an der Gerste und Ackerbohne. Sie erhielten nach Samenbehandlung mit Myleransuspensionen eine Reihe interessanter Ergebnisse, die sich für *Vicia faba* etwa wie folgt zusammenfassen lassen:

1. Myleran war in der Lage, Chromosomenaberrationen zu induzieren, ohne daß in nennenswertem Umfange Reunionen eintraten.

2. Schwesterchromatidenreunion nach Eintritt von Isolocusbrüchen erfolgte praktisch nur in den azen-
trischen, nicht aber in den zentrischen Fragmenten.

3. Chromatidentranslokationen konnten nur sehr selten beobachtet werden. Tri- und Tetradiale traten zu etwa 0,1% in den der Behandlung folgenden Metaphasen auf. Echte intra- und interchromosomale Brücken fehlten in der Anaphase vollständig.

4. Während der Entwicklung der Wurzelspitzen nach der Myleraneinwirkung bestand eine Tendenz zur Verkürzung der Gesamtlänge der Chromosomen, die möglicherweise auf Defizienzen zurückzuführen ist.

5. Eine klare quantitative Veränderung in der Aberrationshäufigkeit mit Einwirkung von 20, 40 und 80 mg Myleran pro 100 ml Aqua dest. konnte nicht gefunden werden.

6. Die Aberrationen waren bevorzugt in den als heterochromatisch bekannten Segmenten des *Vicia-*

* Herr Dr. G. SIEBER vom Institut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie in Jena (Abt. Organische Synthese) stellte uns freundlicherweise das Myleran zur Verfügung.

¹ Unter Alkylierung ist die chemische Anlagerung einer Alkylgruppe ($\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$) an ein Molekül oder Atom zu verstehen.

Chromosomensatzes und in der Sekundäreinschnürung der Satellitenchromosomen lokalisiert, wobei sich aber die Lokalisation in der Sekundäreinschnürung als weniger konstant erwies.

Die unter Punkt 2—4 aufgeführten Ergebnisse der Untersuchungen von MOUTSCHEN-DAHMEN wurden dem Myleran im Vergleich mit den Befunden nach Einwirkung anderer alkylierender Verbindungen wie Stickstoff-Lost (FORD 1948), Di-(2-3-epoxypropyl)-äther (REVELL 1953), Triäthylenmelamin und Äthyl-enimin (OCKEY 1957, 1960) eine Sonderstellung insofern einräumen, als eine derart drastische Reduktion des „Reunionsgeschehens“ bisher ebenso unbekannt ist wie eine Tendenz zur Verkürzung der Gesamtlänge der Chromosomen auf Grund von Defizienzen nach Einwirkung radiomimetischer Verbindungen. Es erschien uns aus diesem Grunde wichtig, den Versuch zu unternehmen, die genannten Effekte zu reproduzieren und gegebenenfalls näheren Einblick in mögliche hier zugrunde liegende Mechanismen zu suchen.

Während MOUTSCHEN-DAHMEN zur Verbesserung der außerordentlich geringen Wasserlöslichkeit des Mylerans die Suspensionen auf 45 °C erhitzten, verwendeten wir neben Suspensionen auch Lösungen, um einwandfrei quantitativ arbeiten zu können. Zur Lösung des Mylerans diente ein geringer Prozentsatz Aceton (maximal 4%), der von *Vicia faba* ohne Nebeneffekte vertragen wird. Zur Einwirkung kam Myleran sowohl auf Samen als auch zu Vergleichszwecken auf Primärwurzeln, und nach entsprechender Erholungszeit erfolgte die cytologische Auswertung der Präparate anhand von Meta- und Anaphasen. Zusätzlich wurde der Einfluß der Hydrolyse, unterschiedlicher Temperaturen während der Einwirkungszeit und die Gegenwart von Stoffwechselinhibitoren auf die radiomimetische Wirksamkeit des Mylerans geprüft und ein Kombinationsversuch von Myleran und Äthylalkohol durchgeführt.

II. Material und Methodik

Als Versuchsmaterial wurden Samen von *Vicia faba* var. *minuta*, Sorte „Dornburger Ackerbohne“ verwendet. Während der Behandlung quellender Samen in Lösungen oder Aqua dest. standen die Gefäße im Thermostaten bei $24 \pm 1,0$ °C bzw. im Kühlschrank bei $12 \pm 2,0$ °C. Zu den Wurzelbehandlungen dienten $2,0 \pm 0,5$ cm lange Primärwurzeln, die auf feuchten Zellwattlagen im belüfteten Exsikkator bei 24 °C herangezogen worden waren. Die Temperatur in den Behandlungs- und Erholungszeitgefäßen wurde mit Hilfe von Höppler-Thermostaten auf $\pm 0,2$ °C konstant gehalten.

Im Anschluß an die Erholungszeit (EZ) erfolgte Colchicinbehandlung (100 Minuten, 0,05%) zur Verkürzung der Chromosomen und Metaphasenanreicherung, Fixierung in Alkohol-Eisessig 3 : 1, Feulgen-Quetsch-Präparation und Verarbeitung über Trockeneis-Alkohol zu Euparal-Dauerpräparaten. Für jede Versuchsstufe wurden soweit möglich pro Wurzelspitze jeweils 50 Metaphaseplatten ausgezählt und die Aberrationen erfaßt. Als Maß für die Streuung der einzelnen Werte ist der mittlere Fehler errechnet und in den Tabellen und Abbildungen angegeben worden.

Die Substanzen für die Versuche mit Primärwurzeln wurden in Sörensen-Phosphat-Puffer pH 7

(0,017 mol), für Behandlungen quellender Samen in Aqua dest. gelöst. Das in Wasser schwer lösliche Myleran wurde mit Hilfe von Aceton, in dem sich bei 24 °C etwa 1,25 g pro 100 ml lösen, in Lösung gebracht. Der Acetonanteil in der endgültigen Lösung überstieg 4% nicht. Nähere Angaben über die Methodik finden sich bei den entsprechenden Versuchen im experimentellen Teil.

III. Ergebnisse

a) Samenbehandlung mit Myleran

Zur 6-, 12- und 24-stündigen Samenbehandlung kamen 1 mmolare (24,6 mg/100 ml) Myleranlösungen zur Anwendung. Als Kontrollen dienten über gleiche Zeiträume in Aqua dest. eingequollene Samen. Das Gewichtsverhältnis Samen : Flüssigkeit betrug in allen Fällen 1 : 5, die Temperatur lag von einigen

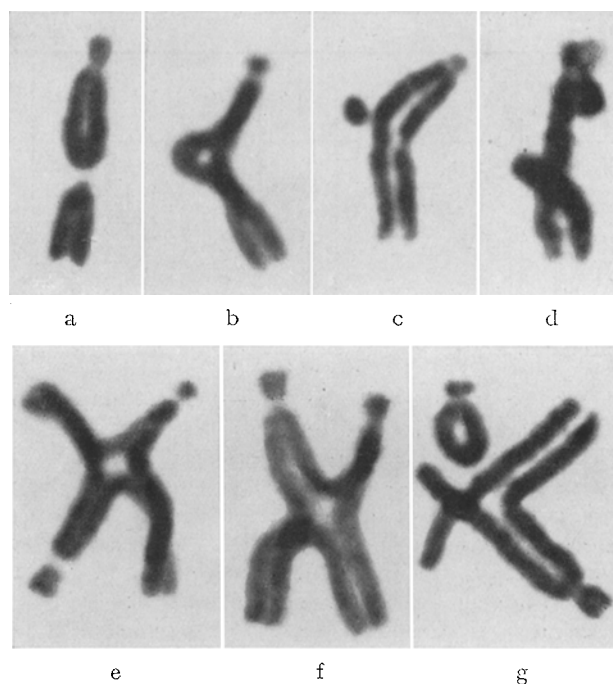


Abb. 2. Die verschiedenen Typen der Chromosomenaberrationen am Beispiel der m-Chromosomen von *V. faba* (die gleichen Aberrationen treten an den Satellitenchromosomen auf). a) Isolocusbruch mit Schwescherchromatidenreunion im zentrischen und azentrischen Fragment (B''); b) Duplikations-Deletion (DD); c) Deletion (D); d) freier Chromatidenbruch (B'); e) symmetrische Chromatidentranslokation (T'); f) asymmetrische Chromatidentranslokation (T'); g) Triradial (Tri).

Ausnahmen abgesehen, auf die jeweils besonders hingewiesen wird, sowohl in der Behandlungs- wie Erholungszeit bei 24 °C.

An Aberrationstypen wurden in die Metaphaseauswertungen Isolocusbrüche (B''), Chromatidentranslokationen (T'), Triradiale (Tri), Duplikations-Deletionen (DD), Deletionen mit seitlich angeheftetem Ringfragment (D) und freie Chromatidenbrüche (B') einbezogen, und zwar in Zellen, die sich stets in der ersten Mitose nach dem Eintritt der betreffenden Aberration befanden. Beispiele der verschiedenen Aberrationen sind für die m-Chromosomen in Abb. 2 zu finden.

Im Falle von Anaphaseauswertungen wurden 1. Zellen mit einem oder mehreren Fragmenten, 2. Zellen mit Brücken und Fragmenten und 3. Zellen mit einer oder mehreren Brücken ohne Fragmente erfaßt. Es ist verständlich, daß die Metaphaseauswertungen wesentlich zuverlässiger als solche der Ana-

phase sind, da im ersten Falle alle Chromosomen klar erkennbar und alle Aberrationstypen einwandfrei unterscheidbar sind. Die Anaphaseauswertungen wurden lediglich durchgeführt, um den von MOUTSCHEN-DAHMEN (1958) erhobenen Befund zu überprüfen, daß nach Myleranbehandlung von Samen keine echten Anaphasebrücken auftreten.

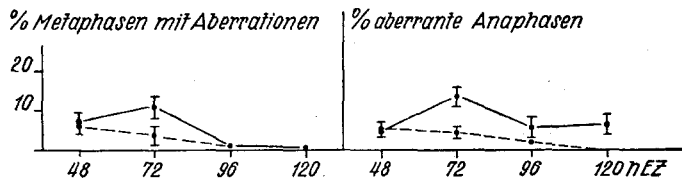


Abb. 3. Der Einfluß 6stündiger Samenbehandlung mit 1 mmol Myleranlösung auf die Frequenz aberranter Meta- und Anaphasen (Einwirkung und Erholung bei 24°C; 200 Zellen pro Meßpunkt). Gestrichelte Linie = Kontrolle in Aqua dest. (vergl. Tab. 1 u. 2).

Tabelle 1. a) Der Einfluß 6stündiger Quellung von *Vicia*-Samen in 1 mmol Myleranlösung bei 24°C (200 Metaphasen); b) Kontrolle mit Aqua dest.

EZ h	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt- aberra- tionen	Aberrationen pro ausge- wertete „geschä- digte“ Zelle	
	abs.	%									
a) 48	15	7,5 ± 1,7	6	8	0	1	0	0	15	0,08	1,00
72	22	11,0 ± 2,4	12	6	0	2	2	0	22	0,11	1,00
96	1	0,5 ± 0,5	0	0	0	0	1	0	1	0,01	1,00
120	1	0,5 ± 0,5	1	0	0	0	0	0	1	0,01	1,00
b) 48	14	7,0 ± 2,1	6	7	0	0	1	0	14	0,07	1,00
72	8	4,0 ± 2,2	4	4	0	0	0	0	8	0,04	1,00
96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Der Prozentsatz von Metaphasen bzw. Anaphasen mit Chromosomenaberrationen nach 6stündiger Einwirkung (24°C) von 1 mmol Myleran auf *Vicia*-Samen ist für die verschiedenen, sich über eine Periode von 120 Stunden erstreckenden Erholungszeiten (24°C) in Abb. 3 angegeben worden. Die Einzelwerte des Versuches gibt Tabelle 1 an. Aus Abb. 3 und Tab. 1 können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Im Vergleich mit den Kontrollen erhöhte 6stündige Einwirkung von 1 mmol Myleran den prozentualen Anteil von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen. Die Myleranwirkung war unter diesen Versuchsbedingungen nicht sehr stark und führte zu einer Erhöhung der Gesamtzahl an Aberrationen von 22 (Kontrolle) auf 39.

2. Während das Aberrationsmaximum der Kontrollen bereits nach 48stündiger Erholungszeit auftrat, verschob sich das Maximum mit der Myleranbehandlung auf 72 h Erholungszeit. Anschließend sank der Anteil von Zellen, die sich in der ersten Metaphase nach dem Eintritt der Aberrationen be-

Tabelle 2. a) Der Anteil von Anaphasen mit Störungen nach 6stündiger Einwirkung von 1 mmol Myleranlösung bei 24°C auf quellende Samen (200 Anaphasen); b) Kontrolle mit Aqua dest.

EZ h	Anaphasen mit Störungen %	ein oder mehrere Fragmente	Brücke und Fragment	eine oder mehrere Brücken
a) 48	4,5 ± 1,5	8	0	1
72	13,5 ± 2,6	24	1	2
96	5,5 ± 2,4	10	0	1
120	6,5 ± 1,9	10	0	3
b) 48	5,0 ± 1,3	9	0	1
72	4,5 ± 0,3	8	0	1
96	2,0 ± 0,0	4	0	0
120	0,0	0	0	0

fanden, rasch ab, während der Prozentsatz von Zellen, welche bereits die zweite Metaphase nach der Aberrationsinduktion erreicht hatten, anstieg.

3. Die in den Kontrollen aufgetretenen Aberrationen waren das Ergebnis der im Behandlungszeitraum herrschenden partiellen Anaerobiose, in deren Verlauf von den Zellen durch Gärungsvorgänge Äthylalkohol erzeugt wird, welcher bei *Vicia faba* radiomimetische Effekte auslöst (RIEGER u. MICHAELIS 1958, 1960).

Die Resultate der Anaphaseauswertungen für den gleichen Versuch geben Abb. 3 und Tab. 2 an. Der langsamere Abfall der Kurve im Vergleich mit den Verhältnissen nach Metaphaseauswertung dürfte die Folge davon sein, daß im letzten Falle nur Zellen in der ersten Mitose nach dem Aberrationseintritt erfaßt wurden. Bei Anaphaseauswertungen ist eine Unter-

scheidung von Mitose I und Mitose II nach dem Auftreten der Aberrationen meist nicht möglich. Die Anaphasekurve fällt langsamer ab, weil auch in den späteren Mitosen noch Brücken- und Fragmentbildungen möglich und in die Auswertung mit einbezogen worden sind. Den höchsten Anteil an den Anaphaseaberrationen

machten die Fragmente aus, aber ohne Zweifel traten echte, in den frühen Erholungszeiten stets einsträngige Brücken auf, die im Verlauf der Anaphaseverteilung asymmetrischer Chromatidentranslokationen bzw. durch Schwesterchromatidenreunion zentrischer Fragmente nach Isolocusbrüchen gebildet wurden.

Ein zu Vergleichszwecken angestellter Versuch, wobei 5 mmol Myleran als Suspension 6 Stunden lang auf Samen einwirkten, brachte nach Abb. 4 und Tab. 3 größenordnungsmäßig gleiche Ergebnisse wie nach Behandlung der Samen mit 1 mmol Myleran als Lösung. Das bedeutet, daß die 5 × stärkere Konzentration von Myleran in Suspensionsform keine höheren Effekte zu induzieren vermochte, ein Ergebnis, das auf eine verringerte Aufnahme des Agens als Suspension durch die quellenden Samen zurückzuführen sein dürfte. Das zur Lösung des Mylerans benutzte Aceton induzierte in dem verwendeten Konzentrationsbereich keine Chromosomenaberrationen.

% Metaphasen mit Aberrationen

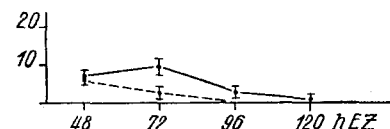


Abb. 4. Der Einfluß 6stündiger Samenbehandlung mit 5 mmol Myleran (Suspension) auf die Frequenz aberranter Metaphasen (Einwirkung und Erholung bei 24°C; 200 Zellen pro Meßpunkt). Gestrichelte Linie = Kontrolle in Aqua dest. (vergl. Tab. 3).

Wurde die Einwirkungszeit der 1 mmolaren Myleranlösung von 6 auf 14 Stunden ausgedehnt, lag das Aberrationsmaximum ebenfalls bei 72 Stunden Erholungszeit (Abb. 5), und es resultierte ein stärkerer Anstieg in der prozentualen Häufigkeit von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen, der im Ver-

Tabelle 3. a) Der Einfluß 6stündiger Quellung von *Vicia*-Samen in 5 mmol Myleran-Suspension bei 24 °C (200 Metaphasen); b) Kontrolle mit Aqua dest.

EZ h	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt- aberra- tionen	Aberrationen pro „geschä- digte“ Zelle	
	abs.	%								ausge- wertete Zelle	
a) 48	14	7,0 ± 1,7	5	9	0	0	0	0	14	0,07	1,00
72	19	9,5 ± 2,1	11	6	0	1	1	0	19	0,09	1,00
96	4	2,7 ± 1,2	4	0	0	0	0	0	4	0,02	1,00
120	1	0,5 ± 0,5	1	0	0	0	0	0	1	0,01	1,00
b) 48	13	6,5 ± 0,5	5	7	0	1	0	0	13	0,07	1,00
72	5	2,5 ± 1,6	3	1	0	1	0	0	5	0,03	1,00
96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	1	0,5 ± 0,5	1	0	0	0	0	0	1	0,01	1,00

gleich mit der 6stündigen Einwirkung keineswegs proportional zur verlängerten Einwirkungszeit erfolgte. Während nach 6stündiger Behandlung der Samen maximal 11% (nach Abzug der „Spontanrate“ der Kontrolle 7%) aller Metaphasen Chromosomenaberrationen bei 72 Stunden Erholungszeit aufwiesen, waren es bei Verlängerung der Behandlungszeit auf 14 Stunden 70% (nach Abzug der Kontrollwerte 62%; Abb. 5 und Tab. 4).

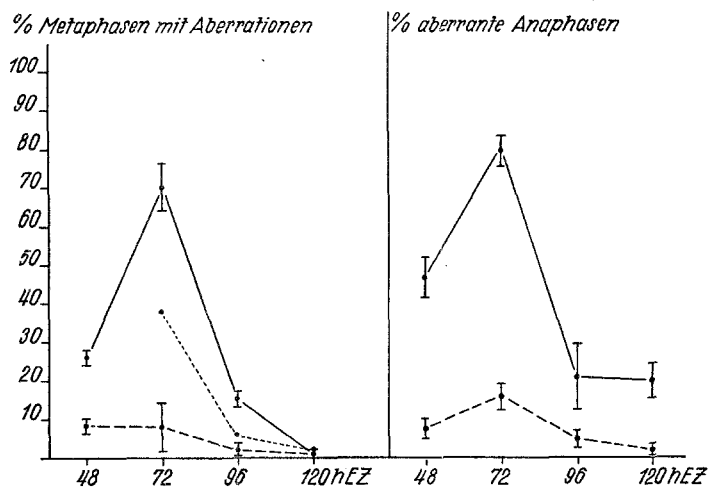


Abb. 5. Der Einfluß 14stündiger Samenbehandlung mit 5 mmol Myleran (Lösung) auf die Frequenz aberranter Meta- und Anaphasen (Einwirkung und Erholung bei 24 °C; 200 Metaphasen pro Meßpunkt). Grob gestrichelte Linie = Kontrolle in Aqua dest. (vergl. Tab. 4 u. 5); fein gestrichelte Linie = colchicininduzierte tetraploide Zellen mit Chromosomenaberrationen (pro Meßpunkt 100 Zellen; vergl. Text).

Chromatidentranslokationen besonders auffallend und mit den von MOUTSCHEN-DAHMEN gewonnenen Ergebnissen in keiner Weise in Einklang zu bringen ist. Nach 6stündiger Myleraneinwirkung traten Isolocusbrüche und Chromatidentranslokationen im Verhältnis 1:0,74 auf. Die Anzahl der Aberrationen pro „geschädigte“ Zelle lag bei maximal 1,13, d. h., es trat unter diesen Versuchsbedingungen nur in Ausnahmefällen (Erholungszeit 72 h) mehr als eine

Chromosomenaberration pro Zelle auf. Die starke Zunahme der Myleranwirkung mit Ausdehnung der Behandlungszeit auf 14 h war also im wesentlichen die Folge davon, daß mehr Metaphasen Chromosomenaberrationen aufwiesen, während sich die Anzahl der Aberrationen pro „geschädigte“ Zelle nur unwesentlich erhöhte.

Für die Anaphaseauswertungen nach 14stündiger Myleranbehandlung gilt prinzipiell das gleiche wie für die 6stündige Einwirkung (Abb. 5, Tab. 5). Im Vergleich mit den Metaphaseaberrationen erfolgte auch hier aus den oben genannten Gründen der Abfall des prozentualen Anteiles aberranter Zellen langsamer. Auch hier traten echte Anaphasebrücken auf, für die allerdings ebenfalls ein Defizit gegenüber der Erwartung zu verzeichnen ist, da theoretisch die asymmetrischen Translokationen und die zentrischen Fragmente mit Schwester-

Tabelle 4. a) Der Einfluß 14stündiger Quellung von *Vicia*-Samen in 1 mmol Myleranlösung bei 24 °C (200 Metaphasen); b) Kontrolle mit Aqua dest.

EZ h	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt- aberra- tionen	Aberrationen pro „geschä- digte“ Zelle	
	abs.	%								ausge- wertete Zelle	
a) 48	53	26,5 ± 1,0	22	25	0	4	3	0	54	0,27	1,02
72	140	70,0 ± 6,5	43	76	2	18	18	1	158	0,79	1,13
96	31	15,5 ± 1,5	14	12	3	1	1	0	31	0,16	1,00
120	2	1,0 ± 0,6	1	0	0	0	1	0	2	0,01	1,00
b) 48	17	8,5 ± 1,5	10	6	0	1	0	0	17	0,09	1,00
72	16	8,0 ± 6,0	11	5	0	0	0	0	16	0,08	1,00
96	4	2,0 ± 2,0	3	1	0	0	0	0	4	0,02	1,00
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Aus Tab. 4 ist der jeweilige Anteil der verschiedenen Aberrationstypen an der Gesamtzahl der erfaßten Aberrationen in den aufeinanderfolgenden Fixierungen ersichtlich. Für den gesamten Versuch betrug die gegenseitige Relation der Isolocusbrüche (B''), Chromatidentranslokationen (T'), Duplikations-Deletionen (DD) und Deletionen (D) 1:1,41:0,29:0,29, wobei der außerordentlich hohe Anteil an

chromatidenreunionen nach Eintritt von Isolocusbrüchen zu Brüchen führen sollten.

Die Wurzelspitzenmeristeme der 14 Stunden mit Myleran behandelten Samen waren durch eine mit verlängerter Erholungszeit zunehmende Schädigung gekennzeichnet, die zur Folge hatte, daß die meisten Wurzeln von der 120stündigen Erholungszeit an entweder keine oder eine stark reduzierte Anzahl von

Tabelle 5. a) Der Anteil von Anaphasen mit Störungen nach 14stündiger Einwirkung von 1 mmol Myleranlösung bei 24 °C auf quellende Samen (200 Anaphasen); b) Kontrolle mit Aqua dest.

EZ h	Anaphasen mit Störungen %	ein oder mehrere Fragmente	Brücke und Fragment	eine oder mehrere Brücken
a) 48	47,0 ± 5,0	44	3	0
72	80,0 ± 3,5	89	21	10
96	20,7 ± 8,7	27	5	4
120	20,0 ± 4,7	26	9	5
b) 48	7,5 ± 2,2	12	1	2
72	16,0 ± 3,5	20	8	4
96	5,0 ± 2,1	8	0	2
120	2,0 ± 1,4	4	0	0

Mitosen aufwiesen. 24stündige Einwirkung der gleichen Mylerankonzentration führte über Wurzelanschwellungen zu Letaleffekten.

Um festzustellen, ob Myleran während der Erholungszeiten noch radiomimetische Effekte zu induzieren vermochte, wurden die Primärwurzeln 14 Stunden mit 1 mmol Myleran behandelter Samen nach 42-, 66- und 90stündiger Erholungszeit 6 Stunden mit 0,05% Colchicininlösung behandelt und jeweils nach weiteren 24 Stunden Erholungszeit, also 72, 96 und 120 Stunden nach Abschluß der Myleraneinwirkung auf die Samen, fixiert. Ausgewertet wurden tetraploide Metaphasen auf Chromosomenaberrationen. Die zur Markierung benutzte Tetraploidie wies nach, daß sich die betreffenden Zellen mindestens in der zweiten Mitose nach Abschluß der Myleranbehandlung befunden hatten. Die Auswertungsergebnisse von je 100 tetraploiden Metaphasen sind in Abb. 5 als kurz-gestrichelte Linie angegeben worden. Nach 72, 96 und 120 Stunden Erholungszeit wiesen 38, 6 bzw. 2% aller polyploiden Metaphasen Chromosomenaberrationen auf, die erst nach der Colchicininierung, also während der Erholungszeit entstanden waren. Die entsprechenden Werte ohne Colchicininierung betrugen 70,0, 15,5 und 1,0% (Abb. 5). Der Versuch weist aus, daß nach Myleraneinwirkung noch relativ spät während der Erholungszeiten Chromosomenaberrationen neu auftraten, auf deren mögliche Ursachen in der Diskussion noch einzugehen sein wird. Die in Abb. 5 für 72 (und 96) Stunden Erholungszeit angegebenen prozentualen Anteile von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen bauen sich somit etwa zur Hälfte aus Zellen auf, deren Aberrationen erst in der vorangegangenen Interphase eingetreten waren, also etwa nach 48–52 Stunden Erholungszeit, wenn man die Dauer des Mitosezyklus

bei 24 °C etwa auf 23–24 Stunden ansetzt (EVANS und SAVAGE 1959).

Die folgenden Versuche hatten den Zweck, den Einfluß herabgesetzter Temperatur während der Einwirkungszeit des Agens und während der Erholungszeit auf die radiomimetische Wirkung von Myleran zu untersuchen. Dazu wurde die Temperatur von 24 °C auf 12 °C reduziert.

Erfolgte die 14stündige Myleraneinwirkung bei 24 °C und betrug die Temperatur während der Erholungszeit statt 24 °C nur 12 °C, wurde die Entwicklung der Primärwurzeln erheblich verzögert, so daß die ersten Fixierungen erst nach 96 Stunden Erholungszeit erfolgen konnten und bis zu 240 Stunden ausgedehnt werden mußten. Das Aberrationsmaximum wurde auch hier in der zweiten Fixierung erfaßt (Abb. 6, Tab. 6), war aber in seiner Größe erheblich gedrückt (Abfall von 62 auf 40% nach Abzug der Kontrollwerte). Dieser Effekt erfuhr aber eine Kompensation insofern, als der prozentuale Anteil von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen in der folgenden Erholungszeit erheblich höher lag und langsamer absank als bei Temperaturen von 24 °C. Die Folge war, daß kein Abfall in der Gesamtzahl aberranter Zellen zu verzeichnen war. Das Maximum an Chromosomenaberrationen pro „geschädigte“ Zelle lag bei 1,24 nach 192stündiger Erholungszeit, d. h., unter diesen modifizierten Versuchsbedingungen traten die Höchstzahl aberranter Zellen an der ausgewerteten Gesamtzellzahl und das Maximum an Chromosomenaberrationen pro „geschädigte“ Zelle zeitlich getrennt voneinander auf, während beide zusammenfielen, wenn die Temperatur in der Erholungszeit 24 °C statt 12 °C betrug. Die Allgemeinschädigung der Meristeme war unter diesen Temperaturverhältnissen geringer.

% Metaphasen mit Aberrationen

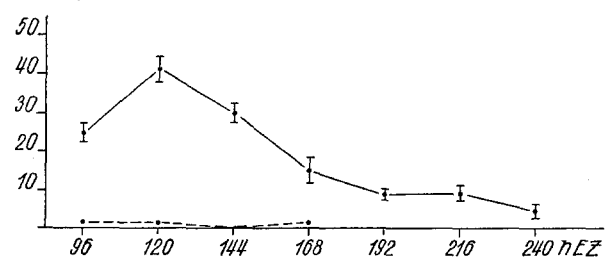


Abb. 6. Der Einfluß 14stündiger Samenbehandlung mit 1 mmol Myleran (Lösung) auf die Frequenz aberranter Metaphasen (Einwirkung bei 24 °C, Erholung bei 12 °C; 200 Zellen pro Meßpunkt). Gestrichelte Linie = Kontrolle in Aqua dest. (vergl. Tab. 6).

Tabelle 6. a) Der Einfluß 14stündiger Quellung von Vicia-Samen in 1 mmol Myleranlösung bei 24 °C (200 Metaphasen, Erholungszeit bei 12 °C); b) Kontrolle mit Aqua dest. (100 Metaphasen).

EZ h	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt- aberra- tionen	Aberrationen pro ausge- wertete Zelle	
	abs.	%								pro „geschädigte“	pro „geschädigte“
a) 96	49	24,5 ± 2,5	23	15	3	4	4	1	50	0,25	1,02
120	82	41,0 ± 3,3	31	33	3	11	6	1	85	0,43	1,03
144	59	29,5 ± 1,9	27	22	2	11	3	0	65	0,33	1,10
168	30	15,0 ± 3,1	11	14	2	2	2	0	31	0,16	1,03
192	17	8,5 ± 0,9	9	9	1	2	0	0	21	0,12	1,24
216	18	9,0 ± 1,9	5	6	2	3	2	0	18	0,09	1,00
240	9	4,5 ± 1,5	4	3	0	2	0	0	9	0,05	1,00
b) 96	1	1,0	0	1	0	0	0	0	1		
120	1	1,0	1	0	0	0	0	0	1		
144	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
168	1	1,0	1	0	0	0	0	0	1		

Der Anteil der Chromatidentranslokationen war niedriger als im vorher geschilderten Versuch. Das gegenseitige Verhältnis der Isolocusbrüche, Chromatidentranslokationen, Duplikations-Deletionen und Deletionen belief sich auf 1(1) : 0,93(1,41) : 0,39(0,29) : 0,16(0,29). Die in Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf Erholungszeiten bei 24 °C. Der Proportionsverschiebung zwischen Isolocusbrüchen und Chromatidentranslokationen soll in diesem Zusammenhang keine besondere Bedeutung beigemessen werden, während wichtig erscheint, daß auch hier beide Aberrationstypen anteilmäßig sehr dicht beieinander liegen. Asymmetrische und symmetrische Translokationen traten im Verhältnis 1 : 0,38 auf.

Betrug die Temperatur während der Einwirkungs- und Erholungszeit 12 °C, traten praktisch überhaupt keine Chromosomenaberrationen auf. Erfolgte die 14stündige Einwirkung bei 12 °C und lag die Temperatur während der Erholungszeit normal bei 24 °C, war die radiomimetische Wirkung von 1 mmol Myleran sehr gering (Tab. 7). Wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß die 1 mmolare Myleranlösung bei 12 °C übersättigt ist, ein Teil der Substanz ausfällt und Schlußfolgerungen (siehe Diskussion) aus den beiden letzten Versuchen nur sehr vorsichtig gezogen werden dürfen.

Tabelle 7. Der Einfluß 14stündiger Quellung von *Vicia*-Samen in 1 mmol Myleranlösung. a) Einwirkungszeit bei 12 °C, Erholungszeit bei 24 °C; b) Einwirkungszeit und Erholungszeit bei 12 °C (200 Metaphasen).

EZ h	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt- aberra- tionen
	abs.	%							
a) 48	4	2,0	2	1	0	1	0	0	4
72	3	1,5	2	1	0	0	0	0	3
96	1	0,5	0	0	1	0	0	0	1
120	10	5,0	6	3	1	0	0	0	10
144	4	2,0	3	1	0	0	0	0	4
b) 96	1	0,5	1	0	0	0	0	0	1
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0
144	1	0,5	1	0	0	0	0	0	1

Der Prozentsatz aberranter Zellen lag bei Erholungszeit mit verringerter Temperatur in den Kontrollen sehr niedrig, da der in diesem Falle für die Induktion der Aberrationen verantwortliche Äthylalkohol erst während der Erholungszeit, und zwar bei höherer Temperatur zur Wirkung kommt und radiomimetische Effekte auslöst (RIEGER und MICHAELIS 1960a).

Außerordentlich niedrig war in allen Versuchen der Anteil freier, d. h. nicht an Reunionen beteiligter Chromatidenbrüche. Bei dieser Aberrationskategorie treten leicht Verwechslungen mit sogenannten „achromatischen Lücken“ („gaps“) ein, die wahrscheinlich keine echten Unterbrechungen der Längsstruktur der Chromatiden darstellen (REVELL 1959) und nicht mit erfaßt worden sind. Bemerkenswerte Verschiebungen in der gegenseitigen Relation der einzelnen Aberrationstypen erfolgten im Verlauf der Erholungszeit nicht. Nach Eintritt von Isolocusbrüchen war in fast allen Fällen Schwesterchromatidenreunion im zentrischen und azentrischen Fragment in der in Abb. 2 dargestellten Weise erfolgt. In einigen wenigen Fällen war die Reunion in dem einen oder anderen Fragment unterblieben, ein Ausfall der Schwe-

sterchromatidenreunion im zentrischen und azentrischen Fragment wurde nicht beobachtet.

b) Einwirkung von Myleran auf Primärwurzeln

Die Einwirkungsdauer verschiedener Mylerankonzentrationen bei 24 °C betrug 24 Stunden. Die gleiche Temperatur wurde während der anschließenden Erholungszeit beibehalten. Getestet wurde fast der gesamte Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1,0 mmol und zusätzlich die Konzentrationen 1,6, 2,0 und 50,0 mmol Myleran. Die letzte Konzentration stellte eine Suspension dar und sollte zu Vergleichen mit den Lösungen dienen. Der zur Lösung des Mylerans verwendete jeweilige Acetonanteil ist in Spalte 2 von Tab. 8 angegeben worden. Aceton induzierte im Bereich von 0,25 bis 4,0% bei 24stündiger Einwirkung auf Primärwurzeln keine Chromosomenaberrationen und führte zu keinerlei erkennbaren Nebeneffekten, wie entsprechende Kontrollen ergaben.

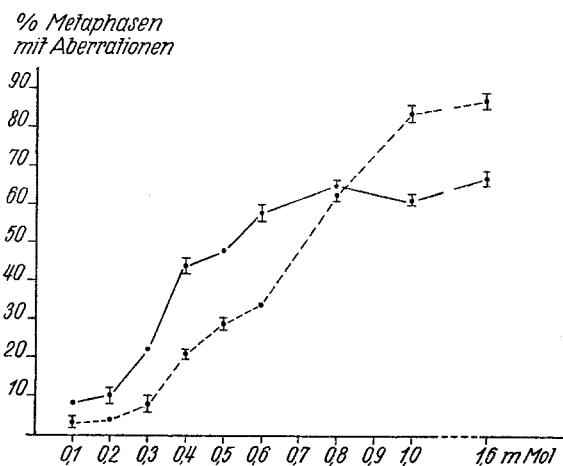


Abb. 7. Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Myleran (Lösung) auf die chromosomale Aberrationsrate bei Wurzelbehandlung (Einwirkung und Erholung 24 °C; 100 Metaphasen pro Meßpunkt). Durchgezogene Linie = 24 Stunden Erholungszeit, gestrichelte Linie = 48 Stunden Erholungszeit.

Abb. 7 gibt einen Überblick über den prozentualen Anteil von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen nach der 24stündigen Einwirkung der verschiedenen Mylerankonzentrationen. Einzelheiten der Auswertungen sind der Tab. 8 zu entnehmen. Nach Abb. 7 wurden die Aberrationsmaxima bis zur Konzentration von 0,8 mmol nach 24 Stunden Erholungszeit erfaßt, für 1,0 und 1,6 mmol verschoben sie sich auf 48 Stunden. Gleichzeitig damit wechselte das Maximum an Chromosomenaberrationen pro „geschädigte“ Zelle in derselben Weise (letzte Spalte in Tab. 8). Die Höchstzahl an Aberrationen pro „geschädigte“ Zelle stieg von 1,00 im unteren Konzentrationsbereich auf etwa 1,30 in den beiden stärksten zur Anwendung gekommenen Myleranlösungen. Nach den Ergebnissen der Samenbehandlung zu schließen, dürfte die Maximumverschiebung im Prozentsatz aberranter Metaphasen zum Teil auf eine mit höherer Einwirkungskonzentration gesteigerte Mitoseverzögerung, zum Teil auf die Induktion von Chromosomenaberrationen während der Erholungszeit zurückzuführen sein. Nach Behandlung mit 2,0 mmol Myleran waren die Primärwurzeln ohne Mitosen und zum Teil letal. Die Verwendung der in Tab. 8 am Schluß aufgeführten 50 mmol Myleransuspension führte grundsätzlich zum gleichen Aberrationsspektrum wie Lösungen. Nach 48 Stunden Erholungszeit

Tabelle 8. Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Myleran auf die chromosomale Aberrationsrate (24 h Einwirkungszeit, 100 Zellen pro Konzentrationsstufe).

Konzentration mmol	% Aceton	PH	EZ h	Metaphasen mit Aberrationen %	B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt-aberrationen	Aberrationen pro ausge-wertete Zelle	„ge-schädigte“ Zelle
0,01	0,25	o.P.	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0,5	o.P.	24	8,0	5	3	0	0	0	0	8	0,08	1,00
			48	3,0 ± 1,0	2	1	0	0	0	0	3	0,03	1,00
0,2	0,4	7,1	24	10,0 ± 2,0	5	4	0	0	1	0	10	0,10	1,00
			48	4,0	2	1	1	0	0	0	4	0,04	1,00
0,3	0,75	7,1	24	22,0	9	5	1	4	3	0	22	0,22	1,00
			48	8,0 ± 2,0	3	4	0	1	0	0	8	0,08	1,00
0,4	0,75	7,1	24	44,0 ± 2,0	20	15	1	3	7	0	46	0,46	1,05
			48	21,0 ± 1,0	10	8	0	3	0	0	21	0,21	1,00
0,5	1,0	7,1	24	48,0	23	19	1	3	4	0	50	0,50	1,04
			48	29,0 ± 1,0	11	10	4	3	2	0	30	0,30	1,03
0,6	1,5	7,1	24	58,0 ± 2,0	29	23	1	7	4	1	65	0,65	1,12
			48	34,0	9	16	2	8	1	0	36	0,36	1,06
0,8	1,5	7,1	24	65,0 ± 1,0	30	29	0	15	8	1	83	0,83	1,28
			48	63,0 ± 2,0	33	16	2	14	10	0	75	0,75	1,19
1,0	2,0	o.P.	24	61,0 ± 2,0	25	24	3	15	8	1	76	0,76	1,25
			48	84,0 ± 2,0	44	35	9	16	9	0	113	1,13	1,35
1,6	3,0	7,1	24	67,0 ± 2,0	37	26	2	12	8	2	87	0,87	1,30
			48	87,0 ± 2,0	52	35	0	14	14	0	115	1,15	1,32
2,0	2,5	o.P.	24	ohne Zellteilung, zum Teil letal									
			48	ohne Zellteilung, zum Teil letal									
50,0 (Suspension)	2,0	o.P.	24	93,0 ± 4,0	49	49	4	15	19	0	136	1,36	1,46
			48	ohne Zellteilung, zum Teil letal									

o. P. = ohne Puffer in Aqua dest. gelöst.

waren die Wurzeln in diesem Falle ohne Mitosen bzw. letal.

Die mit zunehmender Konzentration des einwirkenden Agens zunehmende radiomimetische Wirkung war unter unseren Versuchsbedingungen im wesentlichen auf einen gesteigerten Prozentsatz von Zellen mit Chromosomenaberrationen zurückzuführen, während die Anzahl der Chromosomenaberrationen pro „geschädigte“ Zelle nur in mäßigen Grenzen anstieg. Dieser Effekt dürfte unter anderem durch die relativ langen Einwirkungszeiten mitbestimmt sein. Leider sind Behandlungen der Wurzeln über kürzere Zeiträume deshalb schwer durchführbar, weil zur Lösung größerer Mengen des Agens relativ viel Aceton nötig wird, das sich in höheren Konzentrationen auf die Wurzeln schädlich auswirkt.

Die in Tab. 8 aufgeführten Aberrationstypen verteilten sich auf Isolocusbrüche, Chromatidentranslokationen, Duplikations-Deletionen und Deletionen im Verhältnis 1 : 0,85 : 0,32 : 0,27 für 24, und im Verhältnis 1 : 0,76 : 0,36 : 0,22 für 48 Stunden Erholungszeit. Daraus errechnet sich eine Gesamtrelation von 1 : 0,81 : 0,33 : 0,25. Auch hier folgten Isolocusbrüche und Chromatidentranslokationen einander sehr dicht und die Verteilungstendenz der verglichenen Typen war sowohl nach Samen- wie nach Wurzelbehandlung sehr ähnlich. Unterschreiten Duplikations-Deletionen und Deletionen eine bestimmte Größe, wird ihre Erfassung sehr unsicher und schließlich unmöglich, so daß von beiden Typen sicherlich nicht die reale Anzahl in die Auswertung einbezogen werden konnte. Das Verhältnis der asymmetrischen und symmetrischen Translokationen betrug für den Gesamtversuch 1 : 0,59 und war damit etwas enger als nach Samenbehandlung (1 : 0,38). Diesen Relationen sollte keine übermäßige Bedeutung beigemessen werden, da sich keineswegs alle Translokationen einwandfrei zuordnen lassen und damit eine zufällige Komponente in die Auswertungen ein-

geht. Mit einiger Sicherheit darf geschlossen werden, daß beide Translokationstypen nicht im gleichen Verhältnis auftraten. Freie Chromatidenbrüche wurden ebenso wie unvollständige Chromatidentranslokationen nur in Ausnahmefällen gefunden.

Der folgende Versuch wurde durchgeführt, um einen ungefähren Anhaltspunkt zu bekommen, in welcher Phase des Mitosezyklus Myleran zur Wirkung kommt und Aberrationen an den Chromosomen auslöst. Zur Einwirkung kamen 0,5 mmol Myleran 24 h lang bei 24 °C. Nach Abschluß der Behandlung wurde in 8 Intervallen bis 48 h während der Erholungszeit fixiert (Abb. 8, Tab. 9). Nach 3- und 6stündiger Erholungszeit traten praktisch keine Metaphasen mit Chromosomenaberrationen auf. Von der 12- bis zur 24stündigen Erholungszeit erfolgte ein etwa linearer Anstieg im prozentualen Anteil von Metaphasen mit Aberrationen, anschließend ein langsamer ebenfalls linearer Abfall. Ausgewertet wurden wie in allen anderen Versuchen lediglich Zellen in der ersten Metaphase nach dem Aberrationseintritt.

Aus der Aberrationsverteilung über die Erholungszeit ist unter Einkalkulation einer in ihrem Ausmaß unbekannten, durch das Agens verursachten Mitoseverzögerung zu schließen, daß Myleran Chromosomenaberrationen in der Interphase induziert, und zwar wahrscheinlich in der ersten Hälfte. Anderenfalls müßte das Aberrationsmaximum früher liegen. Die sensible Periode der Interphase zeitlich näher zu charakterisieren, ist nach dieser Versuchsanstellung nicht möglich. Die Verlässlichkeit derartiger Schlußfolgerungen hängt unter anderem davon ab, daß erstens das Agens schnell an den Wirkungsort gelangt, zweitens seine Aktivität innerhalb der Zelle kurz ist und drittens keine Veränderung der Mitosedauer durch das Agens veranlaßt wird (KOLLER 1958). Es liegt auf der Hand, daß keine dieser drei Voraussetzungen in unserem Falle mit absoluter Sicherheit gewährleistet ist. Die Dauer des Mitosezyklus liegt

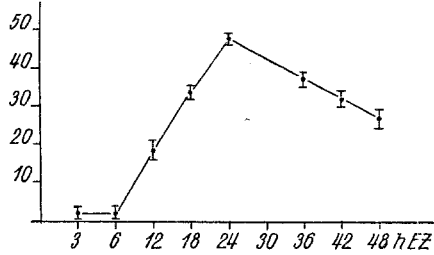
% Metaphasen
mit Aberrationen

Abb. 8. Der prozentuale Anteil von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen nach unterschiedlich langer Erholungszeit bei 24 °C im Anschluß an 24stündige Einwirkung von 0,5 mmol Myleran (24 °C; 150 Metaphasen pro Meßpunkt). Vergl. Tab. 9.

Tabelle 9. Die Höhe der Chromosomenaberrationsrate nach unterschiedlich langen Erholungszeiten im Anschluß an eine 24stündige Einwirkungszeit von 0,5 mmol Myleran bei 24 °C (150 Metaphasen pro Erholungszeit).

EZ h	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt- aberra- tionen	Aberrationen pro ausge- wertete „ge- schädigte“ Zelle	
	abs.	%									
3	3	2,0 ± 1,1	3	0	0	0	0	0	3	0,02	1,00
6	3	2,0 ± 1,1	1	1	0	1	0	0	3	0,02	1,00
12	28	18,7 ± 2,4	13	7	0	6	4	0	30	0,20	1,07
18	51	34,0 ± 1,1	21	16	2	8	6	1	54	0,36	1,06
24	72	48,0 ± 1,1	30	19	2	16	6	0	73	0,49	1,01
36	56	37,3 ± 1,8	33	16	1	7	4	0	61	0,41	1,09
42	48	32,0 ± 2,0	27	19	1	3	4	0	54	0,36	1,13
48	41	27,3 ± 2,4	19	15	0	7	3	0	44	0,29	1,07

bei *Vicia faba* für die hier verwendeten Temperaturen bei 23 bis 24 h (EVANS und SAVAGE 1959), wenn keine experimentelle Beeinflussung erfolgt.

Die Verteilung aller Aberrationen und der Einzeltypen über den Erholungszeitraum zeigt Abb. 9. Bemerkenswerte Verschiebungen in der gegenseitigen Relation der Aberrationstypen traten mit fortschreitender Erholungszeit nicht ein.

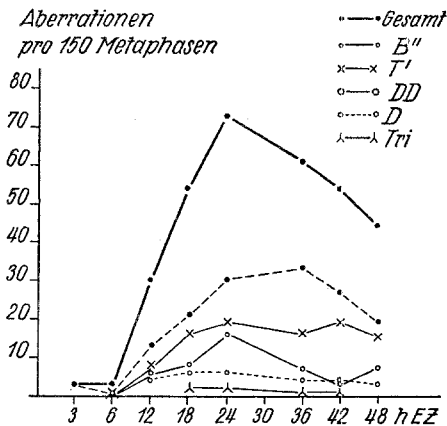


Abb. 9. Der Anteil der verschiedenen Aberrationstypen an der Gesamtzahl der erfaßten Aberrationen nach den gleichen Erholungszeiten und Versuchsbedingungen wie in Abb. 8.

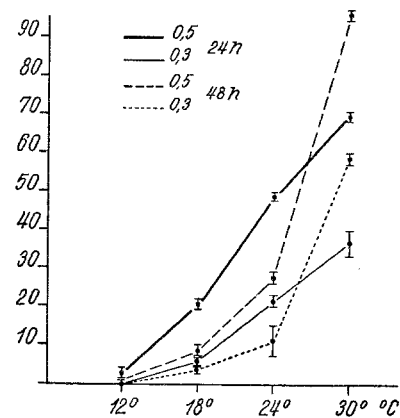
% Metaphasen
mit Aberrationen

Abb. 10. Der Einfluß der Temperatur während der 24stündigen Einwirkungszeit von 0,3 und 0,5 mmol Myleran (Lösung) auf den prozentualen Anteil aberranter Metaphasen (Erholungszeit 24°C; 150 Metaphasen pro Meßpunkt). Vergl. Tab. 10.

c) Der Einfluß der Temperatur auf die radiomimetische Wirkung des Mylerans

Wie Tab. 10 und Abb. 10 zeigen, ist die radiomimetische Wirkung des Mylerans erheblich durch die

Ausfall von Myleran aus den Lösungen trat im Gegensatz zur Samenbehandlung mit 1 mmol bei 12 °C im Falle der hier verwendeten Konzentrationen nicht ein.

Tabelle 10. Der Einfluß unterschiedlicher Temperaturen auf die Chromosomenaberrationsrate bei 24stündiger Einwirkung von a) 0,3 mmol und b) 0,5 mmol Myleran (150 Metaphasen pro Erholungszeit).

T °C	EZ h	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt- aberra- tionen	Aberrationen pro aus- gewertete „ge- schädigte“ Zelle	
		abs.	%									
a) 12	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	24	8	5,3 ± 0,7	3	2	0	1	2	8	0,05	1,00
	48	6	4,0 ± 2,3	3	1	0	0	1	1	6	0,04	1,00
	24	24	32	21,3 ± 0,7	14	10	1	4	3	32	0,21	1,00
	48	17	11,3 ± 3,5	7	7	0	2	1	0	17	0,11	1,00
30	24	55	36,7 ± 2,7	26	16	1	7	5	2	57	0,38	1,04
	48	90	59,0 ± 0,8	42	26	6	15	9	0	98	0,65	1,09
b) 12	24	4	2,7 ± 0,7	1	1	0	1	0	0	3	0,02	1,00
	48	1	0,7 ± 0,7	1	0	0	0	0	0	1	0,01	1,00
	18	24	31	20,7 ± 0,7	14	6	1	8	3	32	0,21	1,03
	48	13	8,7 ± 1,8	8	0	1	2	2	0	14	0,09	1,08
	24	24	73	48,7 ± 0,7	34	27	2	8	6	77	0,51	1,05
	48	42	28,0 ± 1,1	17	13	4	4	5	0	43	0,29	1,02
30	24	105	70,0 ± 0,8	45	36	0	24	12	0	117	0,78	1,11
	48	144	96,0 ± 0,8	75	72	15	30	18	3	213	1,42	1,48

Tabelle 11. Der Einfluß von hydrolysiertem Myleran auf die chromosomale Aberrationsrate (24stündige Einwirkung 0,5 mmol, p_H 7, 24 °C, 24 h Erholungszeit, 150 Metaphasen).

Dauer der Hydrolyse	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt-aberrationen	Aberrationen pro „geschädigte“ Zelle	
	abs.	%								ausgewertete	„ge-schädigte“
Kontrolle	73	48,7 ± 3,7	29	20	1	16	13	0	79	0,53	1,08
8' bis 90 °C	40	26,7 ± 0,7	18	9	2	7	4	0	40	0,27	1,00
15' bei 90 °C	5	3,3 ± 0,7	2	2	0	1	0	0	5	0,03	1,00
30' bei 90 °C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Temperaturen von 12 °C während des Einwirkungszeitraumes von 24 h verhinderten das Auftreten von Chromosomenaberrationen praktisch vollständig. Mit Erhöhung der Temperaturen auf 18, 24 und 30 °C wurde der prozentuale Anteil von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen kontinuierlich erhöht, wenn die Fixierungen nach 24 h Erholungszeit verglichen werden. Bis zur Temperatur von 24 °C lagen die Aberrationsmaxima bei der 24stündigen Erholungszeit. Mit Erhöhung der Temperatur von 24 auf 30 °C verlagerten sich die Maxima übereinstimmend in beiden geprüften Konzentrationen auf die 48stündige Erholungszeit und gleichzeitig erfolgte eine Erhöhung der Anzahl von Aberrationen pro „geschädigte“ Zelle, die im Falle der höheren Konzentration von 0,5 mmol besonders ausgeprägt ist. Die Maximumverschiebung im Prozentsatz aberranter Metaphasen dürfte bei unveränderten Temperaturen (24 °C) während der Erholungszeit auf eine mit der Erhöhung der Temperatur im Einwirkungszeitraum sich verstärkende Mitoseverzögerung zurückzuführen sein. Das Aberrationsspektrum entsprach weitgehend dem der vorher geschilderten Versuche.

d) Der Einfluß der Hydrolyse auf die Aktivität des Mylerans

Die Ester der Methansulfonsäuren sind relativ beständige Substanzen. Die Halbwertszeit der Hydrolyse liegt bei p_H 7 und 37 °C bei etwa 8 h (LOVELESS 1960). Unsere bei höherer Temperatur durchgeführten Hydrolyseversuche hatten das Ziel, festzustellen, wie sich die Aktivität des Agens zur Hydrolysezeit verhält und ob radiomimetisch wirksame Hydrolyseprodukte oder Hydrolysezwischenprodukte in ausreichender Konzentration entstehen, um Chromosomenaberrationen zu induzieren.

Zu diesem Zweck wurde eine 0,5 mmol Myleranlösung in 8 Minuten bis auf 90 °C unter Verwendung eines Rückflußkühlers erhitzt und dann 15 und 30

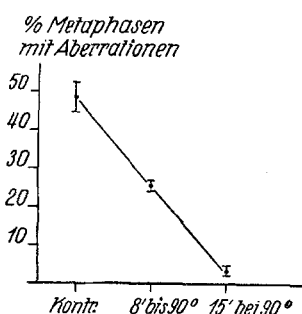


Abb. 11. Der prozentuale Anteil von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen nach 24stündiger Wurzelbehandlung mit unterschiedlich lange hydrolysiertem (90 °C) Myleran (Einwirkung und Erholung bei 24 °C; 150 Metaphasen pro Meßpunkt). (Vergl. Tab. 11).

Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Es erfolgte dreimalige Probenentnahme und die Proben kamen 24 h bei 24 °C auf Primärwurzeln zur Einwirkung. Die Aberrationsmaxima fielen mit der 24stündigen Erholungszeit zusammen.

Ausgehend von dem für die verwendete Ausgangskonzentration von 0,5 mmol bei 48,7% liegenden Kontrollwert

(Abb. 11, Tab. 11), sank der prozentuale Anteil an Metaphasen mit Chromosomenaberrationen nach Einwirkung der Hydrolyseprobe, die 8 Minuten lang bis auf 90 °C erhitzt worden war, auf 26,7% ab. Verblieb die Hydrolyseprobe noch 15 bzw. 30 Minuten bei 90 °C, war ihre radiomimetische Aktivität auf 3,3% gesunken bzw. erloschen.

Radiomimetische Hydrolyseprodukte in wirksamen Konzentrationen entstanden nicht.

e) Versuche zur Modifizierung der Myleranwirkung durch Respirationsinhibitoren und Sulfathiazol (Eleudron)

Im Rahmen dieses Versuchskomplexes sollte versucht werden, die radiomimetische Wirkung einer 0,5 mmolaren Myleranlösung durch gleichzeitige Gabe von Fermentinhibitoren zu modifizieren. Zu diesem Zweck wirkten 0,5 mmol Myleran in Kombination mit den drei Respirationsinhibitoren 2,4-Dinitrophenol, Kaliumcyanid, Hydroxylamin und dem die Folsäuresynthese blockierenden Sulfonamid Sulfathiazol (Eleudron) 24 Stunden lang bei 24 °C und p_H 7 (p_H 5,3 für 2,4-Dinitrophenol) auf die Primärwurzeln ein. Über die Folsäuresynthese beeinflusst Eleudron (bei Bakterien) den Purinstoffwechsel, 2,4-Dinitrophenol hemmt über die Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung die Synthese energiereicher Phosphate (ATP), Kaliumcyanid blockiert u. a. die Cytochromoxydase und damit die Respirationskette. Hydroxylamin wirkt auf Enzyme, die Carbonylgruppen, aber kein Metall führen und hemmt ebenso wie 2,4-Dinitrophenol und Kaliumcyanid die Respiration. Die in Tabelle 12 aufgeführten Konzentrationen der Inhibitoren waren in der Lage, die radiomimetische Wirkung von Äthylalkohol stark zu reduzieren (RIEGER u. MICHAELIS 1960a u. d.). Das gleiche gilt für 2,4-Dinitrophenol und Kaliumcyanid bei Kombination mit 8-Äthoxycoffein (KIHLMAN 1955, 1956). Bei kombinierter Einwirkung induzierte 8-Äthoxycoffein keine Chromosomenaberrationen mehr.

Wie sich aus Tab. 12 bei einem Vergleich mit den Kontrollwerten ergibt, blieb bei Kombination von Myleran mit 2,4-Dinitrophenol, Kaliumcyanid bzw. Hydroxylamin die radiomimetische Wirksamkeit des Mylerans vollkommen unbeeinflusst. Gleichzeitige Einwirkung von Myleran und Eleudron veränderte die Gesamtanzahl nach 24- und 48stündiger Erholungszeit erfaßter Aberration nicht, verschob aber das sonst bei 24 h Erholungszeit auftretende Aberrationsmaximum um 24 h.

24 h mit 0,3 und 0,5 mmol Myleran behandelte Primärwurzeln waren letal, wenn über die gleiche Zeit zusätzlich über Pyrogallol vorgereinigter Stickstoff durch die Lösung geblasen wurde. Der Einfluß der Anaerobiose auf die radiomimetische Wirkung

Tabelle 12. Der Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die Induktion von Chromosomenaberrationen durch 0,5 mmol Myleran (24 °C, 150 Metaphasen).

Konzentration des Inhibitors mmol	pH	EZ h	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt-aberrationen	Aberrationen pro „ge-schädigte“ Zelle	
			abs.	%								aus-gewertete	„ge-schädigte“
DNP 0,01	5,3	24	71	47,3	34	23	2	10	8	0	77	0,51	1,08
		48	40	26,7	22	12	1	3	5	0	43	0,29	1,08
KCN 0,1	7,0	24	70	46,7	33	18	1	7	10	0	69	0,46	0,99
		48	39	26,0	17	14	1	4	8	0	44	0,29	1,13
HXA 1,0	7,0	24	70	46,7	26	23	2	8	10	0	69	0,46	0,99
		48	40	26,7	18	15	1	4	2	0	40	0,26	1,00
Eleudron 0,06	7,0	24	38	25,3	20	10	1	4	4	0	39	0,26	1,03
		48	70	46,7	38	21	3	10	7	0	79	0,52	1,13
Kontrolle	7,0	24	73	48,7	34	27	2	8	6	0	77	0,51	1,05
		48	42	28,0	17	13	4	4	5	0	43	0,29	1,02

Tabelle 13. Der Einfluß gleichzeitiger 24stündiger Einwirkung von Myleran und Äthylalkohol auf die chromosomale Aberrationsrate (24 °C, pH 7, 150 Metaphasen pro Erholungszeit).

MYL Konzentration mmol	ÄA Konzentration mmol	EZ h	Metaphasen mit Aberrationen		B''	T'	Tri	DD	D	B'	Gesamt-aberrationen	Aberrationen pro „ge-schädigte“ Zelle	
			abs.	%								aus-gewertete	„ge-schädigte“
—	50	24	40	26,7	21	13	0	4	3	0	41	0,27	1,03
		48	1	0,7	0	0	0	1	0	0	1	0,01	1,00
0,3	—	24	31	20,7	15	7	0	3	6	0	31	0,21	1,00
		48	11	7,3	7	1	2	0	1	0	11	0,07	1,00
0,3	50	24	100	66,7	48	39	2	22	14	0	125	0,83	1,25
		48	32	21,3	15	6	5	5	3	0	34	0,23	1,06
0,3 + 0,1 KCN	50	24	44	29,3	23	12	1	6	5	0	47	0,31	1,07
		48	21	14,0	13	5	1	3	1	0	23	0,15	1,10

von Myleran ließ sich somit unter unseren Versuchsbedingungen bei relativ langen Einwirkungszeiten nicht prüfen.

f) Kombinierte Einwirkung von Myleran und Äthylalkohol

Äthylalkohol ist in relativ hohen Konzentrationen in der Lage, bei *Vicia faba* Chromosomenaberrationen zu induzieren (MICHAELIS, RAMSHORN u. RIEGER 1959, RIEGER u. MICHAELIS 1960a). Die Wirkung des Äthylalkohols ist ebenso wie die von Myleran auf den ersten Teil der Interphase beschränkt. Das zeitliche Auftreten der Aberrationsmaxima und die Aberrationsspektren sind sich in beiden Fällen sehr ähnlich. Es lag nahe, den Effekt kombinierter Einwirkung beider Agenzien auf 24 h lang bei 24 °C behandelte Primärwurzeln zu prüfen.

Verwendet wurden 0,3 mmol Myleran und 50 mmol Äthylalkohol jeweils allein und in Kombination (Tab. 13). Kombinierte Einwirkung führte im Vergleich zu den Kontrollen zu Effekten, die höher waren, als bei reiner Addition der Wirkungen zu erwarten gewesen wäre. Diese Sachlage ist ohne Schwierigkeiten verständlich, wenn von der Vorstellung ausgegangen wird, daß die durch jedes Agens induzierten „Brüche“ in der Lage waren, in Wechselwirkung zu treten, und zum Teil an der Restitution verhindert wurden. Allerdings war auch hier die Zunahme der radiomimetischen Effekte im wesentlichen dadurch bedingt, daß prozentual mehr Meta-

phasen mit Chromosomenaberrationen auftraten. Die Anzahl von Chromosomenaberrationen pro „geschädigte“ Zelle stieg lediglich bis auf 1,25 an.

Wurde der Kombination von 0,3 mmol Myleran und 50 mmol Äthylalkohol noch 0,1 mmol Kaliumcyanid zugesetzt und 24 h lang behandelt, sank der prozentuale Anteil von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen im Meristem der Primärwurzeln von 66,7% auf 29,3% nach 24, bzw. von 21,3% auf 14,0% nach 48 h Erholungszeit ab. Dieser Effekt ist nach Abschnitt e) (S. 158) die Folge davon, daß Kaliumcyanid die radiomimetische Wirkung des Äthylalkohols senkt, während die von Myleran unbeeinflusst bleibt.

IV. Diskussion

Verglichen mit den in der Einleitung zusammengefaßten, wichtigsten Versuchsergebnissen von MOUTSCHEN-DAHMEN (1958) nach Einwirkung von Myleran auf *Vicia faba*-Samen ergeben sich auf Grund unserer Experimente eine Reihe wichtiger Unterschiede, die es nicht erlauben, dem Myleran eine Sonderstellung unter den alkylierenden Substanzen mit radiomimetischer Wirkung einzuräumen. Eine solche Sonderstellung schien sich darin anzudeuten, daß MOUTSCHEN-DAHMEN zwar „Chromosomenbrüche“, aber kaum Reunionsprodukte fanden, wenn von dem Sonderfall der Schwesterchromatidenreunion ausschließlich in azentrischen Fragmenten nach Eintritt von Isolocusbrüchen abgesehen wird.

Das Alkylierungsmittel Myleran war in unseren Versuchen nach Einwirkung auf Samen und Primärwurzeln von *Vicia faba* in der Lage, Chromosomenaberrationen zu induzieren. Die sensible Phase des Mitosezyklus war aller Wahrscheinlichkeit nach die erste Hälfte der Interphase. Das Aberrationsspektrum unterschied sich im Gegensatz zu den Befunden von MOUTSCHEN-DAHMEN nicht von dem anderer alkylierender und nicht-alkylierender radiomimetischer Verbindungen, wie z. B. N-Lost (FORD 1948), Diepoxypropyläther (REVELL 1953), Triäthylenmelamin bzw. Äthylenimin (OCKEY 1957, 1960), Beta-Propiolacton (SWANSON u. MERZ 1959), Maleinsäurehydrazid (MCLEISH 1953), 8-Äthoxycoffein (KIHLMAN 1955, 1956), Äthylalkohol und Acetaldehyd (RIEGER u. MICHAELIS 1960 a u. b).

Alle Chromosomenaberrationen waren in der für die meisten Radiomimetica bei *V. faba* typischen Weise auf chromatidaler Basis erfolgt und traten präferentiell in den als heterochromatisch bekannten Segmenten des Chromosomensatzes auf (siehe GLÄSS 1956, MCLEISH 1953, REVELL 1953, MOUTSCHEN-DAHMEN 1958, MICHAELIS u. RIEGER 1958). In allen von uns mit Myleran durchgeführten Experimenten waren die 10 kleinen, sogenannten m-Chromosomen wesentlich häufiger an den Aberrationen beteiligt als die beiden etwa doppelt so großen Satelliten-Chromosomen. Während das genaue Längenverhältnis der SAT- und m-Chromosomen bei 2:4,4 (REVELL 1953, MICHAELIS u. RIEGER 1959) liegt, verteilten sich die Aberrationen nach 14stündiger Einwirkung von 1,0 mmol Myleran im Verhältnis 2:34,3 auf die beiden Chromosomengruppen. Ein übereinstimmendes Verhältnis von 2:33,8 wurde nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von 0,1 bis 1,6 mmol Myleran auf Primärwurzeln gefunden. Eine bevorzugte Beteiligung der Sekundäreinschnürung der SAT-Chromosomen am Aberrationsgeschehen erfolgte nicht.

Im Gegensatz zu den Angaben von MOUTSCHEN-DAHMEN war die gegenseitige Relation von Isolocusbrüchen und Chromatidentranslokationen sehr eng. Triradiale wurden in Übereinstimmung mit den genannten Autoren nur sehr selten gefunden. Sofern es sich um die erste Mitose nach dem Eintritt der Aberration handelte, zeigten die Isolocusbrüche fast ausschließlich Schwesterchromatidenreunionen im zentrischen und azentrischen Fragment. Fehlende Reunion in einem der beiden Fragmente wurde nur in Ausnahmefällen beobachtet, gleichzeitiger Ausfall der Reunion in beiden Fragmenten trat nicht auf. In den späteren Mitosen nach dem Aberrationseintritt sank der Anteil zentrischer Fragmente mit Schwesterreunionen ab. Die azentrischen Fragmente waren in diesen Zellen entweder degeneriert oder bereits eliminiert worden. Der Befund deckt sich weitgehend mit den nach Auflösung von Chromosomenaberrationen durch Äthylalkohol (MICHAELIS u. RIEGER 1958) erhaltenen Ergebnissen.

Die aufgeführten Beobachtungen stimmen nicht mit denen von MOUTSCHEN-DAHMEN (1958) überein, wonach in zentrischen Fragmenten nach Eintritt von Isolocusbrüchen keine Schwesterreunion erfolgte. Auf Grund des relativ hohen, von uns gefundenen Anteiles der Chromatidentranslokationen an den Gesamtaberrationen erübrigen sich auch die von MOUTSCHEN-DAHMEN gezogenen Parallelen zwi-

schen der Wirkung von UV-Licht und Myleran. Für UV-Licht ist das Vorherrschen von terminalen Deletionen zwar bekannt, aber nach Untersuchungen von EMMERLING (1955) und FABERGÉ (1951, 1956) können auch nach Einwirkung dieses Agens in begrenzter Häufigkeit komplexe Chromosomenaberrationen entstehen. Für Myleran besteht nach unseren Erfahrungen keinerlei Veranlassung, einen Ausfall der Reunionen und interchromosomalen Strukturveränderungen zu proklamieren, obwohl der Prozentsatz der Anaphasebrückenbildungen hinter der Erwartung zurückblieb. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, daß die Brücken in der späten Anaphase bereits gerissen waren und nicht mehr in die Auswertungen einbezogen wurden. Für diese Erklärung könnte sprechen, daß die meisten Aberrationen in der Mitte der langen Arme der m-Chromosomen bzw. in Centromernähe lokalisiert waren und somit relativ kurze Brücken entstehen mußten. Ähnliche Schwierigkeiten in der Korrelation der Metaphaseaberrationen mit den Anaphasebrücken traten auch nach Einwirkung von Röntgenstrahlen (WOLFF u. LUIPPOLD 1957) und von β -Propiolacton (SWANSON u. MERZ 1959) auf.

Eine Tendenz zur Verkürzung der chromosomalen Gesamtlänge, wie sie von MOUTSCHEN-DAHMEN postuliert wird, ließ sich in unserem Falle nicht feststellen, ist aber ohne umfangreiche Messungen auch kaum exakt zu erfassen.

Myleran ist nach den Ergebnissen der Markierungsversuche mit Colchicin (S. 154) durch eine in die Erholungszeiten hineingreifende Nachwirkung ausgezeichnet, da nach Samenbehandlung (gleiches dürfte für Einwirkung auf Primärwurzeln gelten) auch in der zweiten und in späteren Wurzelspitzenmitosen noch neue Chromosomenaberrationen auftraten. In den Erholungszeiten von 72 h an dürfte sich der Anteil von Zellen mit Chromosomenaberrationen aus solchen zusammensetzen, die stark verzögert in die Mitose eintraten, und jenen, deren Aberrationen erst relativ spät während der Erholungszeit induziert worden waren. Beide Gruppen dürften zu je etwa 50% beteiligt sein, da jeweils etwa halb so viele tetraploide wie diploide Zellen Chromosomenaberrationen aufwiesen (Abb. 5). Es ist gegenwärtig noch nicht zu entscheiden, ob diese Nachwirkung eine echte Spätwirkung des Mylerans darstellte und an seine Gegenwart in der Zelle gebunden war, oder ob es sich um Aberrationen handelte, die als Produkte verzögerten „Bruchintrittes“ oder verzögerter Reunionen verspätet zustande kamen (ausführliche Diskussion dieser Vorgänge bei MONTEZUMA-DE-CARVALHO 1956). Verzögerter Aberrationseintritt konnte für Senfgas und Triäthylenmelamin bei *Drosophila* nachgewiesen werden (s. AUERBACH 1949, 1958, 1960).

Die radiomimetische Wirkung des Mylerans ließ sich bei Behandlung von Primärwurzeln durch die Temperatur im Einwirkungszeitraum stark beeinflussen. Betrug die Temperatur 12 °C, traten praktisch keine Chromosomenaberrationen auf. Mit Steigerung der Temperatur erhöhte sich die Myleranwirkung (Abb. 10). Zur Erklärung dieses Phänomens bestehen zwei Möglichkeiten:

1. Es könnte durch einen Permeationseffekt bedingt sein, wenn bedacht wird, daß die Permeation mit steigender Temperatur größer wird.

2. Es könnte eine temperatursensible chemische Reaktion vorliegen, die in die Wirkungskette des Agens eingefügt ist und diese erst oberhalb bestimmter Temperaturen optimal ablaufen läßt.

Eine temperaturabhängige Wirkung alkylierender, radiomimetischer Verbindungen ist bekannt (KIHLMAN 1956), ein Aussetzen der Wirkung bereits bei 12 °C jedoch noch nicht beobachtet worden. In unserem Falle ergeben sich bei der Entscheidung darüber, welcher Mechanismus dem Temperatureffekt zugrunde liegt, erhebliche Schwierigkeiten, da für beide Möglichkeiten Indizien angeführt werden können. Zudem kann die in Abschnitt III a) geschilderte Samenbehandlung mit 1 mmol Myleran bei 12 °C kaum zu Schlußfolgerungen benutzt werden, da bei dieser Temperatur ein Teil des Mylerans aus der Lösung ausfiel.

Die Wurzelspitzenmeristeme wiesen bei 12 °C noch eine recht günstige Mitosefrequenz auf. Daraus darf geschlossen werden, daß die Stoffwechselaktivität noch recht beträchtlich war, und es erscheint aus diesem Grunde nicht überaus wahrscheinlich, daß die Aufnahme einer wirksamen Menge des Agens vollständig verhindert wird. In die gleiche Richtung deuten auch die mit den Respirationsinhibitoren durchgeführten Experimente, in deren Folge keine Senkung der radiomimetischen Aktivität des Mylerans zu verzeichnen war, obwohl unter diesen Bedingungen eine reduzierte Stoffaufnahme durch die Wurzeln im Bereich des Möglichen läge. Es könnte auf Grund dieser Überlegungen eine primäre, chemische Reaktion des Agens, die an der Aberrationsentstehung ursächlich beteiligt ist, in Erwägung gezogen werden, wenn dieser Reaktion ein hoher Temperaturkoeffizient zugeschrieben würde.

Gegen diese Vorstellung spricht allerdings ein nicht unwichtiges Argument. Es wurde nach Samenbehandlung festgestellt, daß etwa 50% der erfaßten Aberrationen erst während der Erholungszeiten eintraten, wie die Markierungsversuche mit Colchicin ergaben. Wurde die Temperatur während der Erholungszeit auf 12 °C herabgesetzt, erfolgte trotzdem keine Senkung des radiomimetischen Effektes (Abb. 6). Aller Wahrscheinlichkeit nach werden somit die mit Sicherheit während des Erholungszeitraumes eintretenden Aberrationen durch die Temperatur nicht beeinflusst, wenn sich ihr Auftreten auch über einen längeren Zeitraum erstreckte. Wenn es sich bei der hier erfolgenden Aberrationsauslösung um einen Effekt handelte, der an die Gegenwart von Myleran in der Zelle gebunden war, sollte das Gegenteil erwartet werden. Es wäre also zu schließen, daß die radiomimetische Wirkung von Myleran bei herabgesetzter Temperatur nicht merkbar beeinflusst wird, wenn das Agens bereits in den Zellen vorliegt. Konsequenterweise wäre dann die Temperaturwirkung durch Permeationsphänomene zu erklären. Allerdings ist auch diese Schlußfolgerung nicht bindend, da noch unbekannt ist, ob die während der Erholungszeit eintretenden Aberrationen noch durch das Agens unmittelbar induziert wurden, oder ob es sich um einen verzögerten Aberrationseintritt auf der Grundlage der bereits erwähnten Mechanismen (S. 161) oder „labiler Zustände“ handelte, die schon erheblich früher eingeleitet worden waren.

Vergleiche des Temperatureinflusses auf die radiomimetische Wirkung des monofunktionellen Alky-

lierungsmittels Äthylmethansulfonat und des bifunktionellen Mylerans (RIEGER u. MICHAELIS 1960c) brachten hinsichtlich der Temperaturwirkung übereinstimmende Resultate und könnten mit Einschränkung gegen eine effektive Beeinflussung der Wirkung über Permeationsphänomene herangezogen werden. Auf Grund dieser Erörterungen dürfte es angebracht sein, Schlußfolgerungen aus dem Temperatureffekt noch nicht zu ziehen.

Der unter ziemlich drastischen Bedingungen angestellte Hydrolyseversuch bestätigte die relativ hohe Beständigkeit des Mylerans in Lösungen. Im Verlauf der Hydrolyse können aus einem Mol Myleran 1 Mol 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester, bzw. 1 Mol 1,4-Butandiol bzw. 2 Mol Methylsulfonsäure entstehen (RÖHRBORN 1959). Im Anschluß an Hydrolyseversuche mit Myleran, die RÖHRBORN unter ähnlichen Bedingungen wie wir durchführte, ergab sich, daß auch nach der Hydrolyse bei *Drosophila* noch Letalfaktoren, und zwar in signifikant erhöhter Rate gegenüber der Einwirkung nicht-hydrolysierten Mylerans, ausgelöst wurden. RÖHRBORN konnte in entsprechenden Versuchen belegen, daß 1,4-Butandiol und Methylsulfonsäure nicht mutagen wirkten. Die Induktion der Letalfaktoren war auf die Wirkung des Hydrolyseproduktes 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureester zurückzuführen.

Wir konnten nach 15 Minuten Hydrolyse bei 90 °C nur noch eine geringe radiomimetische Wirksamkeit der Proben feststellen, welche nach 30 Minuten Hydrolysedauer auch nicht mehr nachweisbar war. Dieser Unterschied der Befunde wird verständlich, wenn bedacht wird, daß es sich bei dem bei *Drosophila* wirksamen Hydrolyseprodukt um eine monofunktionelle, alkylierende Verbindung handelt. Das Wirkungsverhältnis zwischen mono- und bifunktionellen Alkylierungsmitteln liegt bei der Induktion von Chromosomenaberrationen etwa bei 1:50 (LOVELESS 1951, RIEGER u. MICHAELIS 1960c). Danach ist bei der Entstehung des 1,4-Butandiolmonomethylsulfonsäureesters eine Induktion von Chromosomenaberrationen nicht mehr zu erwarten, wenn aus einem Mol Myleran maximal äquimolare Mengen der monofunktionellen Verbindung entstehen können.

Abgesehen von einer Verzögerung im Auftritt der Aberrationsmaxima, ließ sich die radiomimetische Wirkung alkylierender Verbindungen wie N-Lost und Diepoxypropyläther (FORD 1948, KIHLMAN 1955, 1956, AUERBACH 1958) unter anaeroben Verhältnissen (Stickstoffatmosphäre) oder in Gegenwart von Stoffwechselinhibitoren nicht beeinflussen. Oxydative Phosphorylierungen, wie sie im Falle von 8-Äthoxycoffein (KIHLMAN, l. c.) und Äthylalkohol zur Aberrationsentstehung offensichtlich erforderlich sind, scheinen hier keine ausschlaggebende Rolle zu spielen. Mit dieser Feststellung decken sich unsere Befunde nach Einwirkung von Myleran in Kombination mit 2,4-Dinitrophenol, Kaliumcyanid oder Hydroxylamin, die keinerlei Einfluß auf die Aberrationsrate ausübten und auch die Maxima nicht verschoben. Bei gleichzeitiger Einwirkung von Sulfathiazol, das aller Wahrscheinlichkeit nach in den Nukleinsäure-Stoffwechsel eingreift, trat lediglich eine Verzögerung im Auftreten des Aberrationsmaximums ein.

WOLFF et al. (WOLFF u. ATWOOD 1954, WOLFF u. LUIPPOLD 1955, 1956a + b) konnten für *Vicia faba*

zeigen, daß Agentien, die in der Lage waren, den oxydativen Stoffwechsel zu inhibieren und die ATP-Bildung zu reduzieren, bei Anwendung zwischen 2 Röntgendosen dazu führten, daß die induzierten „Bruchenden“ länger offen blieben. Diese konnten sich dann mit Bruchenden vereinigen, die durch die zweite Dosis bis zu 75 Minuten später eingetreten waren, während die Brüche ohne den Einfluß derartiger Agentien zwischen den beiden Dosen innerhalb von 30 Minuten Reunionen eingingen. Demnach scheinen oxydativer Stoffwechsel und ATP Voraussetzung zu Reunionen zumindest eines Teiles der induzierten Brüche zu sein. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen COHN (1958) bei *Allium* und ABRAHAMSON (1959) bei *Drosophila*. Bei Übertragung dieser Befunde auf unsere Versuche mit Stoffwechselinhibitoren würde der Schlußfolgerung eine bestimmte Wahrscheinlichkeit zukommen, daß durch Zugabe von Inhibitoren zum Myleran eine Steigerung des Aberrationsprozentsatzes bzw. der Aberrationszahl pro Zelle eintreten sollte. Grundlage dieser Überlegung wäre, daß bei längerem „Offenbleiben“ der „Bruchenden“ unter dem Einfluß der Inhibitoren pro Kern gleichzeitig mehr reaktionsfähige Bruchenden zur Reunion verfügbar sind. Nach Tab. 12 traten bei Kombination von Myleran mit den Inhibitoren keinerlei derartige Effekte auf. Spekulationen über mutmaßliche Ursachen erscheinen noch nicht angebracht. Wir sind dabei, ähnliche Untersuchungen unter günstigeren experimentellen Bedingungen durchzuführen. Dabei soll festgestellt werden, ob die für Röntgenstrahlen erhobenen Befunde auch für Radiomimetica Gültigkeit haben, da ihnen ein großes theoretisches Interesse zukommt.

Die nach kombinierter Einwirkung von Myleran und Äthylalkohol eingetretenen Effekte (Tab. 13), die höher als additiv waren, deuten an, daß Myleran und Äthylalkohol etwa die gleiche Sensibilitätsphase im Mitosezyklus zukommt und die „Bruchenden“ ohne Schwierigkeiten miteinander Reunionen einzugehen in der Lage sind, obwohl die Mechanismen der Aberrationsentstehung in beiden Fällen sicher grundverschieden sind. Das gilt in gleicher Weise für kombinierte Einwirkung von N-Lost und Röntgenstrahlen bei *Drosophila* (zit. nach AUERBACH 1958, 1960), für Myleran und Äthylmethansulfonat und für Äthylmethansulfonat und Äthylalkohol (RIEGER u. MICHAELIS 1960c) bei *Vicia faba*. Im Rahmen der bisher in dieser Richtung getesteten Agentien scheint somit ein allgemeingültiges Phänomen vorzuliegen, dem unter Umständen bei der Krebstherapie ein praktischer Nutzen zukommen könnte.

Summary

1. Both after treatment of seeds of *Vicia faba* with 1,0 mmol myleran for 6 and 14 hours (recovery time 48 to 120 h) and primary roots with 0,1—1,6 mmol myleran for 24 h a spectrum of chromosome aberrations was found, which is already known for other alkylating and non-alkylating radiomimetica. With the higher concentrations of the agent the peak frequency of aberrations shifted from 24 to 48 h recovery time. All aberrations were of the chromatid rather than the chromosome type. Isolocusbreaks were predominant but closely followed by chromatid interchanges. We disagree with the conclusions of

MOUTSCHEN-DAHMEN (1958) that the number of chromatid interchanges after myleran treatment is extremely low and sister fusion after isolocusbreaks is confined to acentric fragments, although we found a deficit in true anaphase bridges. This deficit may be the consequence of scoring difficulties („free fall“ and broken bridges).

2. The short chromosomes showed much more aberrations than the SAT-chromosome pair. The ratio for the SAT- and m-chromosomes was 2:34,3 after seed-treatment and 2:33,8 after treatment of primary roots, whereas the length-ratio of both chromosome classes is 2:4,4. Most aberrations were preferentially localized in the heterochromatic segments of the chromosome set.

3. Approximately 50% of the aberrations (after seed treatment) were induced during recovery time as was shown by the colchicine method used for marking cells. The other 50% appeared late probably because of mitotic delay. It is at present unknown whether the first 50% were the product of late effects in the sense of deferred reunion, deferred breakage after induction of „labile states“ in the chromosomes or were freshly produced by a still sufficient concentration of myleran within the meristem. The most sensitive period to myleran was the first part of interphase.

4. The aberration frequency was greatly influenced by temperature changes during treatment. At +12 °C practically no aberrations were induced. By rising the temperature from 12 to 18, 24 and 30 °C the frequency was increased. At 30 °C the aberration peak shifted from 24 to 48 h recovery time. It was impossible to decide accurately whether the temperature effect was caused by permeation phenomena or by a primary chemical reaction of the agent which is temperature sensitive.

5. Combined treatments of primary roots by myleran and the metabolic inhibitors 2,4-dinitrophenol, potassium cyanide and hydroxylamine did not change the aberration frequency. After treatment with myleran and sulfathiazol (Eleudron), which influences the nucleic acid metabolism, the peak frequency shifted from 24 to 48 h recovery but the absolute number of aberrations was not altered.

6. By hydrolysis (8 minutes to 90 °C, 15 min. at 90 °C and 30 min. at 90 °C) the radiomimetic activity of myleran dropped sharply. Radiomimetic hydrolysis-products in active concentrations did not appear.

7. As far as the production of chromosome aberrations was concerned, the effects of combined treatment (24 h) of roots with myleran and ethanol were higher than additive, showing that breaks produced by both treatments were able to rejoin mutually. The modes of action of both agents are probably entirely different.

Literatur

1. ABRAHAMSON, S.: The influence of oxygen on the X-ray induction of structural changes in *Drosophila* oocytes. *Genetics* 44, 174—185 (1959). — 2. AUERBACH, CH.: Chemical induction of mutations. *Proc. VIII. Intern. Congr. of Genetics, Hereditas (Suppl.)*, 128—147 (1949). — 3. AUERBACH, CH.: Mutagenic effects of alkylating agents. *Ann. New York Acad. Sci.* 68, 731—736 (1958). — 4. AUERBACH, CH.: Chemical mutagenesis in animals. In: Stubbe, H. (Herausgeb.): *Chemische Mutagenese*, E.-Baur-Gedächtnis-Vorlesungen I. Abhandlg. d. Deutsch. Akad. d. Wiss., Klasse f. Medizin, Jahrgang 1960, Nr. 1,

- 1—13 (1960). — 5. BIRD, M. I.: Chemical mutagenesis. *Dros. Inform. Serv.* 25, 100 (1951). — 6. CHEVREMENT, M., I. FREDERIC, et E. BAECKELAND: Contribution à l'étude de l'action cellulaire du Myleran. I. Modifications cytologiques dans les fibroblastes cultivés in vitro et traités pendant des temps plus ou moins longs. II. Modifications quantitatives de Myleran. *Bull. Acad. roy. Méd. Belg., Sér. 6*, 24, 141—177 (1959). — 7. COHN, N. S.: An analysis of the rejoining of X-ray-induced broken ends of chromosomes in the root tips of *Allium cepa*. *Genetics* 43, 362—373 (1958). — 8. DEMEREC, M., E. M. WITKIN, E. L. LABRUM, I. GALINSKY, I. HANSON, H. MOUSEES and T. H. FETHERSTEN: Bacterial Genetics. *Carnegie Inst. Wash. Year Book* 57, 183—233 (1952). — 9. EHRENBERG, L.: Chemical mutagenesis: Biochemical and chemical points of view on mechanisms of action. In: Stubbe, H. (Herausg.): *Chemische Mutagenese, E.-Baur-Gedächtnis-Vorlesungen I. Abhandl. d. Deutsch. Akad. d. Wiss., Klasse f. Medizin, Jahrg. 1960, Nr. 1*, 124—136 (1960). — 10. EMMERLING, M. H.: A comparison of X-ray and ultraviolet effects on chromosomes of mays. *Genetics* 40, 697—714 (1955). — 11. EVANS, H. I., and I. R. K. SAVAGE: The effect of temperature on the action of colchicine in root meristem cells of *Vicia faba*. *Exp. Cell Res.* 18, 51—61 (1959). — 12. FABERGÉ, A. C.: Ultraviolet induced chromosome aberrations in maize. *Genetics* 36, 549—550 (1951). — 13. FABERGÉ, A. C.: The analysis of induced chromosome aberrations by maize endosperm phenotypes. *Ztschr. Abst.- u. Vererbgs. l.* 87, 392—420 (1956). — 14. FORD, C. E.: Chromosome breakage in nitrogen mustard treated *Vicia faba* root tip cells. *Proc. VIII. Internat. Congr. Genet. Hereditas (Lund), Suppl.* 1948, 570—571 (1948). — 15. GALTON, D. A. G.: Myleran in chronic myeloid leukaemia. Results of treatment. *Lancet* 1953 I, 208—213 (1953). — 16. GLÄSS, E.: Die Verteilung von Fragmentationen und achromatischen Stellen auf den Chromosomen von *Vicia faba* nach Behandlung mit Schwermetallsalzen. *Chromosoma* 8, 260 bis 284 (1956). — 17. GUSTAFSSON, A.: Chemical mutagenesis in higher plants. In: Stubbe, H. (Herausg.): *Chemische Mutagenese, E.-Baur-Gedächtnis-Vorlesungen I. Abhandl. d. Deutsch. Akad. d. Wiss., Klasse f. Medizin, Jahrg. 1960, Nr. 1*, 14—29 (1960). — 18. HADDOW, A., and E. G. M. TIMMIS: Myleran in chronic myeloid leukaemia. 1. Chemical constitution and biological action. *Lancet* 1953 I, 207—208 (1953). — 19. HEMMERLEY, I., and M. DEMEREC: Investigation of diverse systems for cancer chemotherapy screening. XIII. Tests of chemicals for mutagenicity. *Cancer Res.* 3 (Suppl.), 69—75 (1955). — 20. HESLOT, H., R. FERRARY, R. LEVY, et C. MOURARD: Recherches sur les substances mutagènes (halogéno-2-éthyl)amines, dérivés oxygénés du sulfure de bis-(chloro-2-éthyle), esters sulfoniques et sulfuriques. *Compt. rend. des séances de l'Acad. des Sci.* 248, 729—732 (1959). — 21. KIHLMAN, B. A.: Oxygen and the production of chromosome aberrations by chemicals and X-rays. *Hereditas* 41, 384—403 (1955). — 22. KIHLMAN, B. A.: Factors affecting the production of chromosome aberrations by chemicals. *J. Biophys. and Biochem. Cytol.* 2, 543—555 (1956). — 23. KOLLER, P. C.: Comparative effects of alkylating agents on cellular morphology. *Ann. New York Acad. of Sciences* 68, 783—801 (1958). — 24. LOVELESS, A.: Qualitative aspects of the chemistry and biology of radiomimetic (mutagenic) substances. *Nature* 167, 338—342 (1951). — 25. LOVELESS, A.: Chemical and biochemical problems arising from the study of chromosome breakage by alkylating agents and heterocyclic compounds. *Hereditas* 6 (Suppl.), 293—298 (1953). — 26. LOVELESS, A.: Some observations on the interaction between alkylating agents and phage and their relevance to problems of chemical mutagenesis. In: Stubbe, H. (Herausg.): *Chemische Mutagenese, E.-Baur-Gedächtnis-Vorlesungen I. Abhandl. d. Deutsch. Akad. d. Wiss., Klasse f. Medizin, Jahrg. 1960, Nr. 1*, 71—75 (1960). — 27. MCLEISH, I.: The action of maleic hydrazide in *Vicia*. *Hereditas* 6 (Suppl.), 125—147 (1953). — 28. MICHAELIS, A., u. R. RIEGER: Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem der Wurzelspitze von *Vicia faba* L. II. Präferentielle Verteilung der chromosomalen Bruch- und Reunionspunkte nach anaerober Quellung der Samen. *Chromosoma (Berl.)* 9, 514—536 (1958). — 29. MICHAELIS, A., u. R. RIEGER: Strukturheterozygotie bei *Vicia faba*. *Züchter* 29, 354—361 (1959). — 30. MICHAELIS, A., K. RAMSHORN u. R. RIEGER: Äthylalkohol — radiomimetisches Agens bei *Vicia faba* L. *Naturwiss.* 46, 381—382 (1959). — 31. MONTEZUMA-de-CARVALHO, I.: X-ray experiments on mitosis. I. Analysis of chromosome changes in cholchi-tetraploid X₂ cells. *Bot. da Sociedade Broteriana* 30, 221—240 (1956). — 32. MOUTSCHEN-DAHMEN, J., et M. MOUTSCHEN-DAHMEN: L'action du Myleran (di-méthane-sulfonyl-oxy-butane) sur les chromosomes chez *Hordeum sativum* et chez *Vicia faba*. *Hereditas* 44, 415—446 (1958). — 33. MOUTSCHEN-DAHMEN, J., and M. MOUTSCHEN-DAHMEN: Chromosome deficiencies induced with Myleran. *Experientia* 15, 310—311 (1959). — 34. OCKEY, C. H.: A quantitative comparison between the cytotoxic effects produced by proflavin, ethylene-imine and triethylene melamine on root-tips of *Vicia faba*. *J. Genet.* 55, 525 bis 549 (1957). — 35. OCKEY, C. H.: Chromatid aberrations induced by ethyleneimines. In: Stubbe, H. (Herausg.), *Chemische Mutagenese, E.-Baur-Gedächtnis-Vorlesungen I. Abhandl. d. Deutsch. Akad. d. Wiss., Klasse f. Medizin, Jahrg. 1960 Nr. 1*, 47—53 (1960). — 36. REVELL, S. H.: Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in *Vicia*. *Hereditas* 6 (Suppl.), 107—124 (1953). — 37. REVELL, S. H.: The accurate estimation of chromatid breakage, and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations. *Proc. Royal Soc. (B)* 150, 563—589 (1959). — 38. RIEGER, R., and A. MICHAELIS: Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem der Wurzelspitze von *Vicia faba* L. I. Der Einfluß der Unterwasser-Quellung der Samen auf die chromosomale Aberrationsrate. *Chromosoma (Berl.)* 9, 238—257 (1958). — 39. RIEGER, R., and A. MICHAELIS: Über die radiomimetische Wirkung von Äthylalkohol bei *Vicia faba*. In: Stubbe, H. (Herausg.), *Chemische Mutagenese, E.-Baur-Gedächtnis-Vorlesungen I. Abhandl. d. Deutsch. Akad. d. Wiss., Klasse f. Medizin, Jahrg. 1960, Nr. 1*, 54—65 (1960a). — 40. RIEGER, R., u. A. MICHAELIS: Chromosomenaberrationen nach Einwirkung von Acetaldehyd auf Primärwurzeln von *Vicia faba*. *Biol. Zbl.* 79, 1—5 (1960b). — 41. RIEGER, R., u. A. MICHAELIS: Chromatidenaberrationen nach Einwirkung von Äthylmethansulfonat (Methansulfonsäureäthylester) auf Primärwurzeln von *Vicia faba* L. Die Kulturpflanze VIII (im Druck) (1960c). — 42. RIEGER, R., and A. MICHAELIS: Der Einfluß von Stoffwechselinhibitoren auf die radiomimetische Wirkung von Äthylalkohol. *Monatsber. d. DAW., Berlin* 2 (im Druck) (1960d). — 43. RÖHRBORN, G.: Untersuchungen zur Frage der genetischen Wirksamkeit von Myleran an *Drosophila melanogaster*. *Ztschr. f. Vererbgs. l.* 90, 116—131 (1959). — 44. STEINMAN, I. D., V. N. IYER, and W. SZYBALSKI: The mechanism of chemical mutagenesis. II. Interactions of selected compounds with manganous chloride. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 76, 78—86 (1958). — 45. SWANSON, C. P., and T. MERZ: Factors influencing the effect of β -Propiolactone on chromosomes of *Vicia faba*. *Science* 129, 1364—1365 (1959). — 46. TANAKA, T., S. OHNO, R. KINOSHITA, and H. BIEMAN: Effect of Myleran on normal and malignant tissues. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 2, 51 (1955). — 47. TRUHAUT, R., et G. DEYSSON: Etude des effets sur les mitoses des cellules végétales, du 1,4-diméthylsulfonyloxybutane. Essais de protection par le β -mercaptoéthylamine. *Compt. rend. Acad. Sci. (Paris)* 238, 1833—1835 (1954). — 48. WETTSTEIN, D. v., A. GUSTAFSSON und L. EHRENBERG: Mutationsforschung und Züchtung. *Arbeitsgem. f. Forschg. d. Landes Nordrhein-Westfalen* 73, 7—60 (1959). — 49. WOLFF, S., and K. C. ATWOOD: Independent X-ray effects on chromosome breakage and reunion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 40, 188—192 (1954). — 50. WOLFF, S., and H. E. LUIPPOLD: Metabolism and chromosome-break rejoining. *Science* 122, 231—232 (1955). — 51. WOLFF, S., and H. E. LUIPPOLD: The biochemical aspects of chromosome rejoining. *Progress in Radiobiology* (I. S. MITCHELL et al. Herausg.), Oliver and Boyd Ltd. Edinburgh (1956a). — 52. WOLFF, S., and H. E. LUIPPOLD: The production of two chemically different types of chromosome breaks by ionizing radiations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 42, 510—514 (1956b). — 53. WOLFF, S., and H. E. LUIPPOLD: Inaccuracy of anaphase bridges as a measure of radiation-induced nuclear damage. *Nature* 179, 208—209 (1957).