

KFK-419

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM  
KARLSRUHE**

April 1966

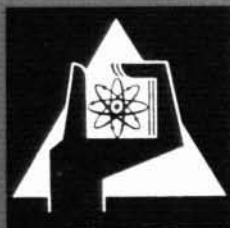
Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
in der Helmholtz-Gemeinschaft  
Kernphysikalische, Chemische und Biologische

KFK 419

Institut für Strahlenbiologie

Studien zur Strahlenwirkung auf Bakteriophagen:  
Einfluß von Hochvakuum, Temperatur und Schutzstoffen

Hans-Henning Günther



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.  
KARLSRUHE

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

April 1966

KFK 419

Institut für Strahlenbiologie

Studien zur Strahlenwirkung auf Bakteriophagen:  
Einfluß von Hochvakuum, Temperatur und Schutzstoffen

Hans-Henning Günther

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe

## Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	1
2. Material und Methodik	4
2.1. Verwendetes Bestrahlungsobjekt	4
2.2. Lysatherstellung	5
2.3. Probenherstellung	6
a) Herstellung trockener Proben	6
b) Herstellung von Phagensuspensionen	7
c) Verwendete Schutzstoffe	9
2.4. Bestrahlungsanordnung	10
a) Beschleuniger und Strahlengang	10
b) Bestrahlungskammer	11
c) Temperaturmessung	11
d) Bestrahlungsanordnung für Gammabestrahlung	12
2.5. Bestrahlungsdurchführung	12
a) Probenbestrahlung	12
b) Dosimetrie	13
2.6. Titration der Phagen	14
3. Versuchsauswertung und Ergebnisse	15
4. Diskussion	21
4.1. Einige allgemeine Tatsachen und Hypothesen	21
4.2. Temperatureffekt	24
4.3. Cystamineffekt	29
4.4. Schwefeleffekt	32
4.5. Temperatur- und schutzstoffunabhängiger Strahlenschaden	34
4.6. Vergleich mit Ergebnissen an T1-Phagen	35
4.7. Vergleich mit Temperaturmessungen an anderen biologischen Objekten	38
4.8. Vergleich der Cystaminschutzeffekte von $\phi$ X-174 und T1	41
4.9. Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren	41
5. Zusammenfassung	43
Literaturverzeichnis	45



## 1. Einleitung

Schon immer ist die Menschheit ionisierender Strahlung ausgesetzt gewesen, doch hat sich während der letzten 50 Jahre mit der zunehmenden Anwendung der Röntgendiagnostik und Strahlentherapie und wegen der Strahlenaussetzung in gewissen Berufen die Strahlengefährdung vergrößert. Seit der Entdeckung der Kernspaltung im Jahr 1939 und der darauffolgenden Entwicklung der Atomenergie ergaben sich zusätzliche Gefahrenquellen. Dennoch rufen natürliche und vom Menschen erzeugte Strahlungsquellen bisher nur selten bei Unfällen somatische Schäden hervor, da die auf die Menschheit einwirkende Strahlungsmenge im allgemeinen geringer ist als die Toleranzdosis. Grundsätzlich anders verhält es sich mit den genetischen Wirkungen ionisierender Strahlung, für die es keine Schwellendosis gibt und die deshalb auch bei niederen Strahlendosen auftreten können. So hat man berechnet, daß durch diagnostische Röntgenbestrahlung und radioaktiven Ausfall die Mutationshäufigkeit um etwa 2,2 % der natürlichen Mutationsrate zunimmt.

Die genetische Strahlenschädigung kann entweder in Mutation einzelner Gene (Punktmutation) oder in groben Abweichungen in den Chromosomen (Chromosomenmutation) bestehen. Die phänotypische Ausprägung dominanter Mutationen wird in der nächsten Generation ersichtlich z.B. durch Absterben des Embryos in utero, Mißbildungen, verminderter Lebenserwartung, Stoffwechselstörungen. Im Gegensatz zu diesen schweren Veränderungen wirken sich die zahlreich auftretenden rezessiven Mutationen heterozygot kaum aus, so daß sich ihre Eliminierung im Verlauf der Generationen nur langsam vollzieht. Eine verzögerte Eliminierung bei einer gleichzeitig auch nur geringen Erhöhung der Mutationsrate könnte aber eines Tages zu einer starken genetischen Belastung führen, besonders wenn man bedenkt, daß durch die fortlaufend verbesserte medizinische Behandlung die natürliche Selektion vermindert ist.

Die skizzierten Überlegungen machen den Wunsch verständlich, möglichst bald ein therapeutisches Mittel zur Hand zu haben, um derartigen erbbiologischen Schäden wirkungsvoll zu begegnen. Eine kausale Therapie setzt aber ein Verständnis der komplizierten physikalischen und chemischen Prozesse voraus, die bei der Strahlenabsorption ablaufen und sich letzten Endes in biologischen Wirkungen manifestieren. Es gilt also, jene Reaktionskette aufzuklären, die mit der Absorption der Strahlungsenergie in den Nukleinsäure-molekülen der Keimzelle be-

ginnt und mit der Ausprägung eines morphologischen und funktionellen Defektes der Individuen der folgenden Generationen endet. Diese Reaktionskette wird aus methodischen Gründen in drei Phasen eingeteilt. In der ersten physikalischen Phase findet die Wechselwirkung der ionisierenden Strahlung mit der Materie statt, in der anschließenden zweiten physiko-chemischen und chemischen Phase treten dann als Folge der Wirkungen der ersten Phase neue chemische Produkte auf, die sekundär weitere Reaktionen eingehen können. Die chemischen Veränderungen der Nukleinsäure bilden die Grundlage dessen, was in der biologischen Terminologie als Mutation des Genotyps bezeichnet wird. Die ersten beiden Phasen sind nach etwa  $10^{-6}$  sec abgeschlossen, während die darauffolgende biologische Phase, die Entstehung eines neuen veränderten Phänotyps aus einem mutierten Genotyp längere Zeit, bis zu mehreren Jahren, in Anspruch nehmen kann.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Untersuchung der chemischen Phase, also der Aufklärung der chemischen Reaktionsprodukte und Reaktionen, die als Folge der ionisierenden Strahlenwirkung entstehen. Um die skizzierte Fragestellung zu beantworten, ist es wichtig, geeignete biologische Untersuchungsobjekte auszuwählen, die folgende Bedingungen erfüllen sollen:

- 1) Möglichst hoher Nukleinsäure-Gehalt.
- 2) Wenig Stoffwechsel, um eine metabolisch bedingte Modifizierung des Strahlenschadens zu verhindern.
- 3) Kurze Generationsdauer.
- 4) Objekte, die in großer Zahl zur Verfügung stehen, da das Auftreten und die Vererbung der strahleninduzierten Mutationen statistischen Gesetzen folgt.
- 5) Große Resistenz gegen experimentelle Änderungen des Milieus.
- 6) Geringe biologische Variabilität.

Säugetiere, Arthropoden (*Drosophila*) und selbst Bakterien sind als Untersuchungsobjekt für die spezielle Fragestellung wenig geeignet, da sie die zu fordernden Kriterien entweder überhaupt nicht oder nur teilweise erfüllen. Eine besondere Eignung besitzen dagegen die Viren, die eine Zwischenstellung zwischen belebter und unbelebter Materie einnehmen, in einem wesentlichen Punkt jedoch ein Kriterium des Lebens erfüllen: Sie enthalten Nukleinsäure und besitzen deshalb die Fähigkeit der identischen Replikation. Der relativ zu anderen Organismen hohe Nukleinsäuregehalt vieler Viren (~50 %), das Fehlen eines

Stoffwechsels, ihre Fähigkeit, extreme Umweltbedingungen wie tiefe Temperaturen, Trocknung auf metallischer Unterlage, Zugabe von chemischen Stoffen ohne Verlust ihrer Aktivität zu ertragen, weiterhin die Möglichkeit, sie in großen Mengen zu züchten und in hohen Konzentrationen zu gewinnen ( $\sim 10^{10}$  Viren/ml) und damit statistisch einwandfreie Resultate zu erzielen, machen die Viren zu einem idealen strahlenbiologischen Untersuchungsobjekt. Den Bakteriophagen, die nicht-pathogene Bakterien infizieren und in ihnen vermehrt werden, kommt wegen ihrer Ungefährlichkeit und bequemen Züchtung besondere Bedeutung zu.

Zur Untersuchung der strahleninduzierten chemischen Veränderungen der Nukleinsäuren sind mehrere Methoden ausgearbeitet worden, von denen die drei wichtigsten genannt werden sollen: So kann man zum Beispiel Molekulargewichtsbestimmungen bestrahlter Nukleinsäure mit der Ultrazentrifuge durchführen und auf diese Weise Aussagen über das Auftreten und die Anzahl von Doppelstrang- und Einzelstrangbrüchen in der Nukleinsäure machen. Weiterhin bietet die Methode der Spektrophotometrie mit Radarwellen (Elektronenspinresonanzspektrometrie) die Möglichkeit, freie Radikale im bestrahlten Erbgut quantitativ nachzuweisen und aus der Struktur der auftretenden Absorptionsspektren in manchen Fällen auch auf die Art dieser Radikale zu schließen. Untersuchungen mit diesen beiden Methoden liefern wertvolle Aufschlüsse über die Natur der Strahlenschädigung im Erbgut, haben allerdings den Nachteil, daß aus ihnen nichts über die biologische Wirksamkeit der gefundenen Läsionen ausgesagt werden kann. Es fehlt ein biologisches Indikatorsystem, das den Beweis der biologischen Schädlichkeit der Läsionen liefern könnte. Die gebräuchlichste biologische Nachweismethode, die auch in der vorliegenden Arbeit benutzt werden soll, besteht deshalb darin, daß die Vermehrungsfähigkeit der bestrahlten Bakteriophagen innerhalb des Wirtsbakteriums getestet wird. Man erhält allerdings nur die Information, ob Vermehrung stattfindet oder nicht. Der Aussagewert kann aber wesentlich gesteigert werden, wenn bei der Untersuchung der Überlebensrate der bestrahlten Phagen einzelne physikalische oder chemische Parameter, wie etwa die Temperatur, der Wassergehalt, die Zusammensetzung des Gasraumes, die Suspensionsmedien variiert oder zusätzliche Parameter (Zusatzstoffe) eingeführt werden. Man findet dann, daß einige Parameter die Strahlenempfindlichkeit herabsetzen bzw. erhöhen können. Wie später noch eingehend zu erläutern sein wird, läßt die quantitative Analyse von

Schutz und Sensibilisierung Aufschlüsse über das Ausmaß der einzelnen strahleninduzierten Schadenskomponenten zu. Es ist wichtig, den Einfluß einer möglichst großen Zahl etwa von Schutzfaktoren in ihrer Wirkung zu untersuchen, um das ganze Spektrum der möglichen Strahlenschäden zu analysieren. Darüber hinaus ergeben sich aus der Natur der verwendeten Schutz- oder Sensibilisierungstoffe auch Hinweise auf die Natur des zugeordneten Strahlenschadens. Die vorliegende Untersuchung befaßt sich mit der Messung des Einflusses der Temperatur und des Schutzstoffes Cystamin auf die Strahlenempfindlichkeit des Coliphagen  $\phi$ X-174, eines sehr kleinen und strukturell undifferenzier- ten Phagentyps, dessen Nukleinsäure als Desoxyribonukleinsäure (DNS) in Form einer einsträngigen Nukleotidkette vorliegt. Die Einsträngig- keit der DNS ist ein Sonderfall in der Natur, der nur noch bei eini- gen verwandten Virustypen gefunden wurde, da bei der Mehrzahl der Viren, wie auch bei einzellern und Mehrzellern, die DNS eine Doppel- helixstruktur besitzt. Die strahlenbiologische Untersuchung von  $\phi$ X-174 sollte daher die Möglichkeit bieten, die Strahleninaktivierung von Einzelstrang- und Doppelstrangphagen unter den gegebenen Versuchs- bedingungen zu vergleichen und daraus Schlüsse auf den Einfluß der Nukleotidkettenanzahl auf die Strahlenempfindlichkeit, den Temperatur- und Cystamineffekt zu ziehen (ausführliche Einführung siehe Zimmer 1960, 1963).

## 2. Material und Methodik

### 2.1. Verwendetes Bestrahlungsobjekt

Als Bestrahlungsobjekt verwendeten wir - mit Ausnahme einiger Experimente mit den T1-Phagen - den Bakteriophagen  $\phi$ X-174. Es erwies sich jedoch als nützlich, nicht den Wildtyp, sondern eine Mutante zu wählen, die durch die Ausbildung sehr kleiner "plaques" charakteri- siert ist, wenn die Titration nach der "top-layer"-Methode (Adams 1959) folgt. Da bei Verwendung der  $\phi$ X-174-Mutante ( $\phi$ X-174 m) bis zu 500 plaques pro Petrischale im Gegensatz zu maximal 90 beim Wildtyp ausgezählt werden können, bietet dies den Vorteil einer viel geringe- ren statistischen Streuung. Weiterhin erwies sich die Mutante als wesentlich resistenter gegen Inaktivierung durch Trocknung auf metal- lischer Unterlage.  $\phi$ X-174 m besitzt denselben Wirtsbereich wie  $\phi$ X-174, allerdings ergab die Bestimmung der Dichte mit Hilfe der Dichtegra- dientenzentrifugation in einer Relativmessung einen geringfügig ab- weichenden Wert ( $\Delta\rho = 0,005$ ), der als signifikant anzusehen ist



(vgl. Abb. 1). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß  $\phi$ X-174 m bei Inaktivierung durch Protonen-,  $\text{Co}^{60}$ - $\gamma$ - und Ultraviolett-Bestrahlung im Rahmen der Meßgenauigkeit die gleiche Strahlensensibilität wie der Wildtyp besitzt (Abb. 2, 3, 4).

## 2.2. Lysatherstellung

a) Herstellung des  $\phi$ X-174-Lysates. Der  $\phi$ X-174 Stamm, aus dem unsere Mutante gezüchtet wurde, stammt aus dem California Institute of Technology. Als Wirtsbakterium benutzten wir für die Lysatherstellung und Titration nicht den üblicherweise verwandten Wirt E.coli C, sondern eine Mutante, die im Unterschied zum Wildtyp nicht durch den Phagen T1 infiziert werden kann. Diese Vorsichtsmaßnahme erfolgte aus praktischen Überlegungen, um einer Verfälschung der Ergebnisse durch mögliche Verunreinigungen mit T1 vorzubeugen.

In 50 ml einer 4 %-igen Difco-Nährbouillon-Lösung ließen wir die Bakterien unter kräftiger Belüftung bei 37° C bis zu einem Titer von ca.  $10^8$ /ml wachsen und setzten dann so viele  $\phi$ X-174 Phagen zu, daß das Verhältnis der Anzahl der Phagen zu der der Bakterien 0,5 betrug und ließen etwa 18 Stunden unter Belüftung lysieren. Im Anschluß daran zentrifugierten wir mit einer Laborzentrifuge 15 Minuten lang bei 250 g Zelltrümmer und unlysierte Bakterien ab. Die Aufbewahrung des Lysates, konserviert durch die Zugabe einiger Tropfen Chloroform, erfolgte bei 4° C. Dieses Lysat, das einen Titer von  $\sim 10^{10}$  plaque-bildenden Einheiten besaß, wurde für alle Bestrahlungsexperimente verwendet. Ein Abfall des Titers konnte während der Dauer der Experimente (3 Monate) nicht beobachtet werden.

b) Herstellung eines T1-Lysates. Der untersuchte Coliphage T1 und seine Wirtszelle E.coli B wurden 1958 vom Institut für Genetik der Universität Köln zur Verfügung gestellt. Die Lysatherstellung der T1-Phagen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie für  $\phi$ X-174. Wir erreichten einen Titer von  $\sim 5 \cdot 10^{10}$  plaque-bildenden Einheiten pro Milliliter.

### 2.3. Probenherstellung

a) Herstellung trockener Proben. An die Beschaffenheit der Proben und der Probenträger für die Protonenbestrahlung sind folgende Anforderungen zu stellen: Zunächst müssen die Phagen in einer Schichtdicke vorliegen, die klein gegen die Reichweite der 2 MeV Protonen ist. Diese Voraussetzung ist für eine exakte Dosismessung notwendig und war für unsere Versuche mit Werten von ca. 50  $\mu$  für die Reichweite (Lea 1946) und ca. 8  $\mu$  für die Schichtdicke gegeben. Der Probenträger muß elektrisch leitfähig sein, damit die Dosimetrie nicht verfälscht wird. Er sollte ein gutes Wärmeleitvermögen besitzen, um eine Erwärmung der Phagen durch die Bestrahlung zu vermeiden. Weiterhin muß der Probenträger eine möglichst glatte Oberfläche besitzen, damit sich die Bakteriophagen nach der Bestrahlung quantitativ von der Oberfläche ablösen lassen. Schließlich sollte er sich nicht an chemischen Prozessen der Bestrahlungsprodukte beteiligen. Diese Bedingungen für den Probenträger werden durch die Verwendung von Feingoldronden erfüllt (Jung 1964). Die von uns verwendeten Feingoldronden (Hersteller: Degussa) hatten einen Durchmesser von 12 mm und eine Dicke von 0,5 mm. Um eine homogene Phagenschicht zu erhalten, muß die Oberfläche der benutzten Goldplättchen äußerst sauber sein, damit die aufpipettierte Phagensuspension sich gleichmäßig über die gesamte Oberfläche verteilen läßt. Deshalb wurden sie vor Benutzung eine Stunde lang in konzentrierter Chromschwefelsäure gereinigt, einige Stunden in Leitungswasser und dann in destilliertem Wasser gespült und getrocknet.

Mit einer für diesen Zweck von Jung (1964) entwickelten Pipettiervorrichtung wurden 0,01 Milliliter der zu bestrahlenden Phagensuspension auf Goldplättchen aufgebracht und mit der Pipette bis zu einem Durchmesser von etwa 8 mm gleichmäßig verteilt. Die bei der Bestrahlung verwendeten Schutzstoffe Cystamin und Schwefel waren entweder in der Phagenstamm suspension (Lysat) gelöst, oder wir stellten eine Schutzstofflösung her, in der die Stamm suspension verdünnt wurde. Anschließend folgte Trocknung und mehrstündige Lagerung der Proben in einem Exsikkator über Silikagel bei einem Druck von  $\sim 1$  Torr. Dann wurden die Proben in die Bestrahlungskammer überführt und hier zumindest 20 Stunden bei einem Vakuum von  $\sim 10^{-4}$  Torr getrocknet und entgast.

Es war nicht möglich, Phagen ohne Zusatz von Eiweißstoffen auf Goldplättchen zu trocknen, da durch das Entwässern nahezu ein voll-

ständiger Aktivitätsverlust der Phagen eintritt. Suspendiert man sie dagegen in einer Nährbouillon-Lösung, so wird die Inaktivierung weitgehend vermieden. Besonders empfindlich gegen die letale Wirkung des Trocknens ist  $\phi$ X-174. Die Überlebensrate nach 20-stündigem Trocknen bei  $10^{-4}$  Torr in Abhängigkeit vom Zusatz verschiedener Mengen an Nährbouillon zeigt Tabelle 1. Um einen ausreichend hohen Phagen-Titer zu erhalten und gleichzeitig sicher zu sein, nicht eine Auslese zu bestrahlen, wählten wir eine 8 %-ige Nährbouillon (NB), bei der 41 % der Viren das Trocknen überlebten. Der Zusatz von Cystamin bei einigen Bestrahlungsversuchen bewirkte eine weitere Abnahme der Aktivität, die bei 8 % NB und 0,1 mol/Liter Cystamin 5 % der Ausgangskonzentration der Phagen betrug.

Die T1-Phagen sind gegen das Trocknen weit unempfindlicher. Wir trockneten die T1 unter Zusatz von nur 1 % NB und erhielten Überlebensraten von  $\sim 50$  %. Auch die Zugabe von kolloidalem Schwefel bewirkte keine weitere Aktivitätsabnahme.

Die Proben für  $\gamma$ -Bestrahlungen bestrahlten wir in Glas-Ampullen: 0,2 ml Phagensuspension wurden in Ampullen gefüllt und in einem Exsikkator über Silikagel nach kurzem Ansaugen mit der Pumpe getrocknet. Danach wurden die Ampullen bei  $10^{-1}$  Torr während 48 Stunden evakuiert und dann zugeschmolzen (Hotz 1965).

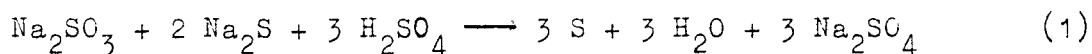
b) Herstellung von Phagensuspensionen. Neben der Bestrahlung getrockneter  $\phi$ X-174 und T1 führten wir auch einige Versuche mit in Nährbouillonlösung suspendierten T1-Phagen durch. Hierfür wurde eine geeignete Menge Stammsuspension (Lysat) in 1 %-iger bzw. 4 %-iger Nährbouillonlösung oder in einer kolloidalen Schwefellösung verdünnt, die ebenfalls 1 bzw. 4 % NB enthielt. Jeweils 0,5 ml dieser Mischung wurden in Glasampullen gefüllt. Um den Sauerstoff aus Lösung und Gasraum zu entfernen, durchperlten wir die Proben ca. 5 Minuten lang mit reinem Stickstoff. Dies erwies sich als notwendig, da Sauerstoff den Schutzeffekt schwefelhaltiger Verbindungen herabsetzt (Hotz 1965). Dann wurden die Ampullen abgeschmolzen. Gasflasche und Proben waren durch Nylon- und Glasröhrchen verbunden, um zu vermeiden, daß Luft-sauerstoff wie bei Gummischläuchen durch die Verbindungen diffundiert (Dewey 1963).

Tabelle 1: Prozentsatz der 20-stündiges Trocknen überlebenden  
ϕX-174 Bakteriophagen.

Konzentration der NB	Überlebende
8 %	41 %
4 %	7 %
1 %	0,2 %

c) Verwendete Schutzstoffe. Bei unseren Versuchen mit  $\phi X$  verwendeten wir Cystamin als Schutzstoff (2-2'-Dithiodiäthylamin $\cdot$ 2 HCl; Hersteller: Calbiochem, Los Angeles). Wir zogen das Cystamin dem Cysteamin vor, da es - bei etwa gleicher Schutzwirkung - geringere Toxizität und größere Strahlenresistenz besitzt (Hotz 1965). Die für eine bestimmte Cystaminkonzentration (0,1, 0,2 und 0,3 mol) notwendige Trockenmenge der Substanz wurde in der Phagensuspension gelöst.

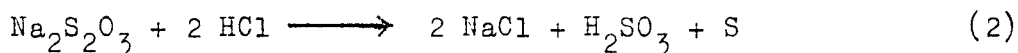
Wir verwendeten weiter kolloidale Schwefellösungen, die wir nach drei verschiedenen Darstellungsmethoden bereiteten (Handbuch d. präp. anorg. Chemie 1, 1960, Charlesby et al. 1962, Gmelin 1953). Die erste Darstellungsmethode läuft nach folgender Gleichung ab:



Man erhält ein rötlich opaleszierendes Schwefel-Sol, dessen Konzentration sich zu  $\sim 0,006$  Grammatom pro Liter ermitteln läßt. Nimmt man an, daß das Gewicht eines Kolloidteilchens etwa  $8 \cdot 10^{-16}$  g beträgt (Gmelin 1953), so findet man  $1,5 \cdot 10^{10}$  Teilchen/0,01 ml. Bei einer Phagenzahl von  $5 \cdot 10^5$ /0,01 ml entfallen dann auf einen Phagen  $3 \cdot 10^4$  Schwefelkolloidteilchen.

Da die Herstellung konzentrierter Schwefelsuspensionen nach dieser Methode unmöglich ist, versuchten wir höhere Konzentrationen durch Anwendung der Raffo-Methode zu erzielen. Sie beruht auf dem Einwirken konzentrierter Schwefelsäure auf wässrige Natriumthiosulfatlösung. Die entstehende Thioschwefelsäure ist instabil und setzt atomaren Schwefel frei, der sich in Mizellen mit Polythionsäuren zusammenlagert. Der Teilchenradius variiert zwischen 0,2 und 0,6  $\mu$ . Die Reinigung der Raffosole erfolgte durch wiederholte Koagulation mit NaCl, rasches Abzentrifugieren des Koagels, Abgießen des Überstandes und Peptisierung des Bodensatzes mit 80° C heißem destilliertem Wasser, am Schluß des letzten Reinigungsvorgangs mit heißer Nährbouillon. Leider waren diese Schwefellösungen infolge der hohen Konzentration nicht stabil, so daß sich schon nach wenigen Tagen ein Bodensatz bildete. Für jeden Bestrahlungsversuch mit Schwefel als Zusatzstoff wurde deshalb ein frisches Raffo-Sol hergestellt. Die Schwefelkonzentrationen, die bei 0,15 Grammatom/Liter lagen, wurden gravimetrisch bestimmt (Einzelheiten: Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie 1953).

Eine weitere Methode der Herstellung von kolloidalen Schwefellösungen, die sich schon in strahlenbiologischen Untersuchungen bewährt hat, übernahmen wir von Charlesby, Garratt, Kopp (1962). Die Präparation erfolgt durch Zusammengeben äquivalenter Mengen Natriumthiosulfat und Salzsäure:



Anschließend wurde die schweflige Säure neutralisiert und die erhaltene Lösung 2 Tage lang dialysiert. Diese Methode besitzt den Vorteil, daß man Schwefellösungen gewünschter definierter Konzentration herstellen kann. Die hochsterreichbare Konzentration, bei der die Lösungen noch stabil bleiben, betrug 0,2 Grammatom/Liter. Zu den Konzentrationsangaben in Grammatom / Liter ist zu bemerken, daß sie gemäß der Definition nur die Anzahl der Schwefelatome angeben. Da aber in Wirklichkeit kolloidale Teilchen von mindestens 8 Schwefelatomen vorliegen, erhält man die Teilchenzahl/Liter nach folgender Gleichung:

$$\text{Teilchen/Liter} = \frac{c \cdot N}{s} \quad (3)$$

(c = Konzentration in Grammatom/l, N = Loschmidtsche Zahl, s = Anzahl der Schwefelatome/Teilchen). Da die kolloidalen Schwefellösungen sauer sind, wurden sie mit 0,1 n NaOH neutralisiert. Eine geeignete Menge Stammsuspension wurde jeweils in einer der drei Schwefellösungen verdünnt.

#### 2.4. Bestrahlungsanordnung

a) Beschleuniger und Strahlengang. Zur Durchführung der Protonenbestrahlungen benutzten wir einen Van de Graaff-Beschleuniger von 2 MeV (Hersteller: High Voltage Eng. Corp.). Die Versuchsanordnung ist in Abb. 5 schematisch wiedergegeben.

Die Protonen wurden in einer Hochfrequenz-Ionenquelle erzeugt und erhielten beim Durchlaufen der Potentialdifferenz die gewünschte Endenergie. Durch das Magnetfeld eines Analysiermagneten wurde der Protonenstrahl um  $25^\circ$  aus seiner ursprünglichen Richtung abgelenkt, wodurch die Abtrennung unerwünschter Strahlanteile, beispielsweise  $\text{H}_2^+$ -Ionen, ermöglicht wurde. Ein unmittelbar dahinter angebrachtes Schlitzsystem sorgte dafür, daß der Strahl nach Lage und Energie stabilisiert wurde. Der abgelenkte Strahl durchlief dann ein 120 cm langes Strahlrohr, einen elektromagnetisch betätigten Verschuß, der es gestattete, den Strahl zu unterbrechen, und durchsetzte schließlich zwei hinterein-

ander angeordnete, jeweils  $0,5 \mu$  starke Nickelfolien (Hersteller: Chromium Corporation of America, Waterbury 20, Conn., Typ: Grade A 0,000 02) (Abb. 6). Diese hatten den Zweck, den Strahl aufzufächern und gestatteten eine praktisch homogene Bestrahlung der gesamten Probenfläche. Nach Durchlaufen einer weiteren 230 cm langen Strecke traf der Strahl auf die in der Bestrahlungskammer befindliche Probe.

b) Bestrahlungskammer. An das Ende des Strahlrohres war die Bestrahlungskammer (Abb. 7) angeflanscht. Sie bestand aus einem zylindrischen Gefäß mit abnehmbarer rückwärtiger Wand. Diese enthielt eine vakuumdichte Drehdurchführung, auf deren Achse der Probenhalter befestigt war (Abb. 8). Dieser konnte von außen gedreht werden und bestand aus einer schwarz eloxierten Aluminiumscheibe, auf deren Peripherie 19 Probenpositionen und eine 20 mm im Durchmesser messende Durchbohrung angebracht waren. Wurde diese Durchbohrung vor das in die rückwärtige Wand eingelassene Quarzglasfenster eingestellt, so konnte der Strahl optisch justiert werden. Das Quarzglasfenster erlaubte es außerdem, die exakte Einstellung der Probenpositionen zu überprüfen. Die drei Blenden am Eingang der Kammer lagen auf verschiedenen Spannungen ( $B = 0 \text{ V}$ ,  $B' = 300 \text{ V}$ ,  $B'' = 600 \text{ V}$ ). Sie sollten verhindern, daß vom Teilchenstrom ausgelöste Sekundärelektronen die Dosismessung verfälschten.

Um Bestrahlungen auch bei tiefer Temperatur durchführen zu können, war in die Bestrahlungskammer eine Kühlfalle eingebaut, die von außen mit einem Kühlmittel gefüllt werden konnte. Die Kühlfalle war so konstruiert, daß die Proben rings von Material umgeben waren, das in wärmeleitendem Kontakt mit der Kühlflüssigkeit stand. Wurde die Kammer evakuiert und die Kühlfalle mit Kühlmittel gefüllt, so näherte sich durch Wärmestrahlung die Probentemperatur der des Kühlmittels. Bei Verwendung von flüssigem Stickstoff als Kühlmittel wurde nach etwa 12 Stunden eine Abkühlung der Proben auf  $110^{\circ} \text{ K}$  erreicht. Während der relativ zur Abkühlzeit kleinen Bestrahlungszeit von einigen Sekunden für eine einzelne Probe hatte die Temperatur einen nahezu konstanten Wert, so daß Bestrahlungen bei beliebigen Zwischentemperaturen vorgenommen werden konnten.

c) Temperaturmessung. Die Temperatur wurde mit einem Thermoelement aus Nickel-Chrom-Konstantan gemessen, das an der Unterseite des Probenhalters befestigt war. Die Eichung des Thermoelements wurde regelmäßig mit flüssigem Stickstoff, Festkohlendioxid und Eiswasser

vorgenommen. Die Temperaturmessung bietet einige methodische Schwierigkeiten. Einmal wird nicht die Temperatur der Probe selbst, sondern die des Probenhalters gemessen, zum anderen ist die Wärmeleitfähigkeit biologischer Objekte besonders schlecht. Berücksichtigt man jedoch die langen Abkühlzeiten und die Tatsache, daß der Temperatureausgleich durch Wärmestrahlung erfolgt (Vakuum), so kann man eine Übereinstimmung von Proben- und Probenhaltertemperatur annehmen. Auch eine mögliche Erwärmung der Proben während der Bestrahlung verfälscht nicht die Temperaturmessung, da sie wegen ihres geringen Betrags im Rahmen der Messgenauigkeit liegt (Hermann 1965).

d) Bestrahlungsanordnung für Gammabestrahlung. Für die Gamma-Bestrahlungen standen zwei  $\text{Co}^{60}$ - $\gamma$ -Quellen zur Verfügung (Hersteller: Atomic Energy of Canada Ltd.). Die Quellen besitzen zylindrische Bestrahlungsräume mit einer nahezu homogenen Dosisleistungsverteilung.

### 2.5. Bestrahlungsdurchführung

a) Probenbestrahlung. Die Proben wurden zunächst 3 Stunden im Exsikkator bei  $\sim 1$  Torr vorgetrocknet und dann in der Bestrahlungskammer 20 Stunden oder länger bei einem Vakuum von  $10^{-4}$  Torr getrocknet und entgast. Nach dem Trocknen wurden die Proben auf die gewünschte Temperatur gebracht. Die nichtzubestrahlenden Kontrollproben wurden in gleicher Weise behandelt. Die Bestrahlungen wurden bei einer Stromdichte von  $10^{-8} \text{ A} \cdot \text{cm}^{-2}$  durchgeführt. Das entspricht etwa  $300 \text{ krad} \cdot \text{sec}^{-1}$  (bei Phagen). Infolge der Instabilität des vom Beschleuniger gelieferten Ionenstroms war es notwendig, den Ionenstrom elektronisch zu integrieren. Die Bestrahlungsdosis konnte in Schritten von  $2,2 \cdot 10^{11} \text{ p} \cdot \text{cm}^{-2}$  vorgewählt werden. Wenn die vorgewählte Dosis erreicht war, schaltete der Verschluß - vom Integrator gesteuert - automatisch ab. Die Bestrahlungszeiten der einzelnen Proben betragen 2,3 sec bei der kleinsten und 48 sec bei der größten Dosis. Wurden die Proben bei gleicher Dosis, aber unterschiedlicher Temperatur bestrahlt, so ließen wir die Proben bis zur tiefsten erreichbaren Temperatur abkühlen, bestrahlten die vorgesehenen Proben und entfernten anschließend das Kühlmittel. Die Temperatur glich sich innerhalb von mehreren Stunden, am Thermoelement ablesbar, der Zimmertemperatur an. Auf diese Weise konnten Proben bei jeder beliebigen Zwischentemperatur bestrahlt werden. Nach vorsichtiger Belüftung des Vakuumsystems wurden die Proben entnommen und weiterverarbeitet.



Zur Durchführung von Versuchen mit  $\gamma$ -Strahlung wurden die Proben in zeitlichen Abständen, zu Beginn diejenigen mit hohen Dosen, zum Schluß die mit niederen, in den Bestrahlungsraum der  $\text{Co}^{60}$ - $\gamma$ -Quelle gestellt. Die unbestrahlten Kontrollproben wurden unter möglichst gleichartigen Bedingungen aufbewahrt.

b) Dosimetrie. Die Dosismessung der 2 MeV Protonen beruht darauf, daß die Bestrahlungskammer wegen ihrer isolierten Anbringung als Faraday-Käfig wirkt. Die gesamte vom Ionenstrom auf die Kammer übertragene und zur Erde abfließende Ladungsmenge wurde mit einem elektronischen Integrator (Typ Elcor A 309 A; Hersteller: Elcor Inc.) gemessen. Bei Erreichen der vorgewählten Ladungswerte betätigte der Integrator den Verschuß. Die Bestrahlungsdosis wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$N_p(\text{Protonen/cm}^2) = Q/e \cdot r^2\pi, \quad (4)$$

wobei  $Q$  die gemessene Ladungsmenge in Coulomb,  $e$  die Elementarladung und  $r$  der Radius der Blendenöffnung bedeuten. Einsetzen der Werte ergibt:

$$N_p(\text{p/cm}^2) = 2,2 \cdot 10^{18} Q \quad (5)$$

Trifft zum Beispiel die Ladungsmenge von  $10^{-7}$  Cb auf die Kammer, so entspricht das einer Dosis von  $2,2 \cdot 10^{11}$  p/cm<sup>2</sup>.

Die Umrechnung der Flußeinheit Protonen/cm<sup>2</sup> in die übliche Einheit rad wird dadurch erleichtert, daß der Energieverlust der 2 MeV Protonen in Schichten, deren Schichtdicke klein gegen die Reichweite der Protonen ist, konstant ist. Die mittlere Schichtdicke der Probe beträgt  $\sim 8 \mu$ , die Reichweite der Protonen von 2 MeV in organischem Material  $50 \mu$ . Aus den bekannten Werten für die Energieabgabe  $dE/dX$  in Materie der Dichte  $\rho = 1 \text{ g/cm}^2$  (Lea 1946) kann man dann die im Phagen absorbierte Dosis in rad berechnen:

$$D[\text{erg/g}] = dE/dX[\text{MeV/cm}] \cdot a[\text{erg/MeV}] \cdot N_p[\text{p/cm}^2] \cdot \frac{1}{\rho}[\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}], \quad (6)$$

wobei:  $dE/dX = 166,5 \text{ MeV/cm}$  und  $a = 1,6 \cdot 10^{-6} \text{ erg/MeV}$ . Das ergibt:

$$D[\text{rad}] = N_p(\text{Zahl der Protonen}) \cdot 2,66 \cdot 10^{-6}/\rho \quad (7)$$

Wie schon beschrieben, standen zwei  $\text{Co}^{60}$ - $\gamma$ -Quellen zur Verfügung. Die schwächere mit einer Dosisleistung von  $\sim 3 \cdot 10^5$  R/Stunde, die stärkere mit  $5,25 \cdot 10^5$  R/Stunde. Die Eichkurven der Quellen wurden verschiedentlich mit einem Eisensulfat-Dosimeter kontrolliert.

## 2.6. Titration der Phagen

Die bestrahlten und die unbestrahlten (Kontroll-) Proben wurden in geeigneter Weise in 1 %-iger Trypton-Nährbouillon verdünnt. Da nur bis etwa 500 Phagen ausgezählt werden konnten, in den meisten Fällen aber wesentlich mehr Phagen die Bestrahlung überlebten, war es notwendig, die hohen Konzentrationen zu verdünnen. Die Verdünnungen wurden so gewählt, daß etwa 100 - 500 Plaques ausgezählt werden konnten. Die auf Goldplättchen aufgetragenen Proben wurden zusammen mit diesen in die Reagenzgläser mit Bouillon überführt, so daß sich die Phagen von ihrer Unterlage ablösen konnten. Dieser Vorgang war nach etwa einer Stunde abgeschlossen, da auch länger dauerndes Resuspendieren keine weitere Erhöhung des Phagentiters brachte. Die Titration der Phagen erfolgte unter Berücksichtigung der von Adams (1959) angegebenen Regeln. Wir plattierten  $\phi$ X-174 und T1 auf einen Indikator-nährboden (Bresch 1952), der in 1 l 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast Extract, 0,5 g NaCl und 15 g Bacto Agar enthielt. Nach Neutralisierung mit n NaOH und Autoklavieren wurden zu 1 l medium 40 ml 40 %-iger Glukose-Lösung, 32 ml 0,1 %-iger Alizarin-Gelb-Lösung und 7 ml 1 %-iger Wasserblau-Lösung gegeben. Danach erfolgte das Ausgießen in sterile Petrischalen ( $\phi$  10 cm). Den Phagen  $\phi$ X-174 plattierten wir nach der sog. Agar-Schicht-Methode (Adams 1959). Zu einigen Millilitern eines auf  $45^\circ\text{C}$  erwärmten flüssigen Oberschichtagars (Zusammensetzung: 0,8g Bacto Nutrient Broth, 0,5 g NaCl, 0,75 g Bacto Agar in 100 ml Aqua bidest.) wurden ca. 0,1 ml Wirtsbakterien und 0,1 ml geeignet verdünnte Phagensuspension gegeben. Diese Mischung wurde auf die Oberfläche der Bodenagarschicht gegossen. Nach dem Festwerden des Oberschichtagars wurden die Petrischalen über Nacht im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Plattierung der T1-Phagen erfolgte in der Weise, daß 0,1 ml Phagensuspension zusammen mit der gleichen Menge Wirtsbakterien (E.coli B) mit einer Pipette auf dem Bodenagar gleichmäßig ausgestrichen und die Petrischalen ebenfalls über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  gehalten wurden.

Auf dem Indikator-nährboden bilden die Bakterien einen blau gefärbten Rasen, in dem die gleichzeitig aufgebraachten nach der Bestrahlung noch voll funktionsfähigen Phagen während der etwa 15 Stunden dauern-

den Bebrütung runde Löcher bilden (= Plaques). Die Zahl der Plaques ist proportional zur Phagenkonzentration (Ellis u. Delbrück 1939). Der Verlust der plaque-bildenden Fähigkeit ist das üblicherweise benutzte Merkmal der Strahlenschädigung: Der Phage gilt als inaktiviert, wenn er keine Plaque mehr bilden kann.

### 3. Versuchsauswertung und Ergebnisse

Bei der graphischen Darstellung unserer Versuchsergebnisse trugen wir den Bruchteil der nach der Bestrahlung überlebenden Phagen in halblogarithmischem Maßstab gegen die Bestrahlungsdosis auf. In allen Fällen erhielten wir Geraden, sog. Eintrefferkurven, die der Exponentialfunktion

$$N/N_0 = \exp(-\sigma \cdot D) \quad (8)$$

folgten. Hierbei ist  $N_0$  der Titer der unbestrahlten Kontrolle und  $N$  der Titer der bestrahlten Probe.  $D$  bedeutet die Bestrahlungsdosis und  $\sigma$  eine für die Phageninaktivierung charakteristische Konstante. Sie ist vom Phagentyp, Strahlenart, der Temperatur, Suspensionsmedien, bei der Bestrahlung anwesenden Gasen und Chemikalien usw. abhängig und bestimmt die Neigung der Geraden. Die für den Spezialfall

$$N/N_0 = e^{-1} \approx 0,37 \quad (9)$$

geltende Dosis ist die 37 %-Dosis oder  $D_{37}$ . Der reziproke Wert der  $D_{37}$  (in  $p \text{ cm}^{-2}$ ) ergibt die Inaktivierungskonstante bzw. den Inaktivierungsquerschnitt  $\sigma$  unmittelbar in Quadratzentimetern.

Da alle in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Dosis-Effekt-Kurven im halblogarithmischen Maßstab Geraden sind, die durch die Steigung  $\sigma$  charakterisiert werden, genügt es zur Bestimmung des Inaktivierungsquerschnitts, zwei Messungen bei verschiedener Dosis durchzuführen, wobei die erste Dosis zweckmäßigerweise gleich 0 gesetzt wird. Die Inaktivierungskonstante berechnet sich dann nach folgender Gleichung:

$$\sigma = (\ln N_0 - \ln N)/N_p, \quad (10)$$

wobei  $N_0$  die Zahl der überlebenden Phagen bei Dosis 0 und  $N$  die Zahl der überlebenden Phagen bei Dosis  $N_p$  (Protonen/cm<sup>2</sup>) bedeuten. Dieses Verfahren ist dann von besonderem Nutzen, wenn man den Einfluß zusätzlicher Parameter (z.B. von Schutzstoffen oder der Temperatur)

auf die Größe des Inaktivierungsquerschnitts bestimmen will. Bei der Messung der Abhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts von der Temperatur ließen wir vier Proben unbestrahlt, die restlichen 15 bestrahlten wir mit gleicher Dosis, jedoch jede einzelne Probe bei einer verschiedenen Temperatur, wobei sich die Anzahl  $N$  der überlebenden Phagen ändert. Versuche, nach dem gleichen Prinzip Cystaminprofile des Inaktivierungsquerschnittes aufzunehmen, schlugen wegen der großen Streubreite der  $\sigma$ -Werte fehl, was wir auf den ungleichmäßig toxischen Einfluß des Cystamins zurückführten.

Wir nahmen zunächst von trockenen  $\phi$ X-174 vollständige Dosiseffektkurven bei Zimmertemperatur und mehreren tiefen Temperaturen auf (Abb. 9). Unter den gleichen Bedingungen wurden aus Suspensionen mit unterschiedlichen (0,1, 0,2 und 0,3 mol) Cystaminkonzentrationen getrocknete  $\phi$ X-174 bestrahlt und Dosiseffektkurven gemessen (Abb. 10 u. 11). Weiterhin wurden getrocknete  $\phi$ X-174 durch  $\text{Co}^{60}$ - $\gamma$ -Bestrahlung inaktiviert (Abb. 3), um die unterschiedliche biologische Wirksamkeit beider Strahlenarten zu prüfen. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 dargestellt. Die Messungen des Temperaturverlaufs des Inaktivierungsquerschnittes für  $\phi$ X-174 ohne und mit Cystaminzusatz sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Wie man aus der graphischen Darstellung ersieht (Abb. 12), lassen sich die Werte recht gut durch eine Gerade wiedergeben. Man erhält dann im untersuchten Temperaturbereich zwischen 110 und 300° K die folgenden Gleichungen für die Ausgleichsgeraden:

für  $\phi$ X-174: 
$$\sigma_1 = 1,2 + 0,00594 \cdot T \quad (11)$$

und für  $\phi$ X-174 + Cystamin: 
$$\sigma_2 = 1,0 + 0,00445 \cdot T \quad (12)$$

In einigen Versuchen wurden trockene T1-Bakteriophagen durch 2 MeV Protonen inaktiviert, wobei die Schutzwirkung unterschiedlicher Konzentrationen von kolloidem Schwefel untersucht wurde (Abb. 13). Diese Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Weiterhin bestrahlten wir T1 in Suspension mit  $\text{Co}^{60}$ - $\gamma$ -Strahlung, wobei wir sowohl die Nährbouillonkonzentration des Suspensionsmediums als auch die Schwefelkonzentration variierten (Tabelle 5) und (Abb. 14, 15). Jeder Punkt der Dosiseffektkurven entspricht mindestens zwei Einzelmessungen, in vielen Fällen jedoch (z.B. bei Cystaminzusatz) bis zu sechs Einzelmessungen.

Tabelle 2: Wirkungsquerschnitt  $\sigma$  und  $D_{37}$  für die Inaktivierung von  $\phi$ X-174-Bakteriophagen mit 2 MeV Protonen und  $\text{Co}^{60}$ - $\gamma$ -Strahlung. Die angegebenen Werte wurden aus den Dosis-effektkurven erhalten.

Material	Strahlen- art	Temp. °K	Wirkungs- querschnitt $\sigma$ $10^{-12} \text{ cm}^2$	Inaktivierungsdosis $D_{37}$	
				$10^{11} \text{ p} \cdot \text{cm}^{-2}$	krad
$\phi$ X-174	Protonen	293	2,76	3,63	965
"	"	123	1,78	5,61	1500
" +Cy	"	293	2,11	4,73	1260
" +Cy	"	125	1,42	7,04	1880
$\phi$ X-174	$\text{Co}^{60}$ - $\gamma$ -	293	-	-	400

Tabelle 3: Inaktivierungsquerschnitte von  $\phi$ X-174-Bakteriophagen bei verschiedenen Temperaturen ohne und mit Schutzstoffzusatz.

$\phi$ X-174		$\phi$ X-174 + Cyst	
T (°K)	$\sigma[10^{-12}\text{cm}^2]$	T (°K)	$\sigma[10^{-12}\text{cm}^2]$
115	1,98	111	1,50
123	1,92	115	1,50
132	2,12	116	1,52
138	1,93	132	1,64
140	1,99	143	1,62
148	2,10	143	1,69
153	2,08	145	1,70
163	2,23	156	1,65
165	2,08	161	1,68
175,5	2,19	166	1,71
177	2,28	170	1,70
179	2,19	173,5	1,73
185,5	2,27	176	1,74
190	2,34	184	1,78
197,5	2,44	185	1,85
201	2,29	188	1,80
211	2,43	200	1,94
226,5	2,49	201	1,84
230	2,52	201	1,92
234,5	2,63	211	2,03
239	2,54	211	1,90
242	2,74	223	2,00
246	2,68	223	2,01
253	2,76	224	2,07
257	2,76	232	2,01
257	2,67	240	2,02
263	2,89	246	2,02
265	2,70	246	2,09
268	2,87	250	2,16
269	2,97	253	2,11
274	2,73	261	2,10
277	2,94	271	2,30
283	2,82	271	2,16
285	3,02	273	2,14
292	3,03	284	2,19
292	2,87	286	2,32
294	3,11	286	2,25
		291,5	2,26
		292	2,40
		294	2,26

Tabelle 4: Wirkungsquerschnitt  $\sigma$  und  $D_{37}$  für die Inaktivierung von T1 mit 2 MeV Protonen bei Zimmertemperatur unter Zusatz von kolloidem Schwefel.

Schwefel in g-atom/l	$\sigma \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$	Inaktivierungsdosis $D_{37}$	
		$10^{11} \text{ p cm}^2$	krad
-	5,05	1,98	530
0,006	5,05	1,98	530
0,15	5,05	1,98	530

Tabelle 5:  $D_{37}$  für die Inaktivierung von T1 in Suspension mit  $Co^{60}$ - $\gamma$ -Strahlung bei Zimmertemperatur. Bestrahlung in  $N_2$ -Atmosphäre.

Suspensions- medium	Schwefel gr-atom/l	$D_{37}$ krad
1 % NB	-	85
1 % NB	0,01	115
4 % NB	-	100
4 % NB	0,2	100



Die Fehler, die bei der Bestrahlung entstehen, setzen sich aus folgenden Anteilen zusammen: Der maximale Fehler der Ladungsmessung beträgt 3 ‰; der durch die Inhomogenität der Probenausleuchtung bedingte Fehler maximal 4 ‰ und der Einfluß des Temperaturmeßfehlers beträgt 5 ‰ bei 100° K und 3,5 ‰ bei 300° K. Addiert man die den drei Ursachen entstammenden Fehler quadratisch, so erhält man den wahrscheinlichen Gesamtfehler bei der Bestrahlung von etwa 7 ‰. Weitere Fehler entstehen bei der Probenherstellung. Der maximale Fehler beim Aufpipettieren von 0,01 ml Phagensuspension auf die Goldplättchen beträgt ± 4,5 ‰, ein weiterer Fehler von ~ 10 ‰ wird durch die Schwankungen der beim Trocknungsprozeß absterbenden Viren verursacht. Dieser Fehler wird bei der Versuchsauswertung infolge des Verdünnens der Phagensuspensionen durch mehrfaches Pipettieren noch überschritten. Durch die geringe Zahl der ausgezählten Phagen entsteht ein weiterer Fehler von 7 ‰. Der wahrscheinliche Gesamtfehler für die einzelnen Meßpunkte beträgt 16 ‰, physikalische und biologische Ursachen zusammengenommen (ausführliche Diskussion und Rechnung siehe Hermann 1965).

#### 4. Diskussion

##### 4.1. Einige allgemeine Tatsachen und Hypothesen

Der Diskussion der Ergebnisse sollen zunächst einige allgemeine strahlenbiologische Hypothesen vorangestellt werden, die als Grundlage für die nachfolgenden Erörterungen wichtig sind. Bestrahlt man Lebewesen in Suspension, so wird ein großer Teil der Strahlenenergie vom Wasser absorbiert. Wie aus strahlenchemischen Untersuchungen hervorgeht, entstehen durch Radiolyse des Wassers reaktionsfähige Radikale, wie zum Beispiel  $H^{\bullet}$  und  $OH^{\bullet}$ , die durch Diffusion zum Wirkungsort gelangen können und dort reagieren. Dieser Vorgang ist es, der bei Bestrahlung in wässriger Suspension den Hauptanteil der biologischen Veränderungen hervorruft. Diese sog. indirekten Strahleneffekte werden weitgehend eliminiert, wenn, wie in den meisten der von uns durchgeführten Versuche, die Bestrahlung getrockneter Objekte vorgenommen wird. Da dann der biologische Effekt fast ausschließlich durch Strahlenabsorption im empfindlichen Bereich des Objekts selbst erfolgt, bezeichnet man ihn als direkte Strahlenwirkung. Eine weitere Möglichkeit, indirekte Strahlenwirkungen auszuschalten, ist die Zugabe geeigneter Stoffe zur Suspension, die die Fähigkeit besitzen, diffusible

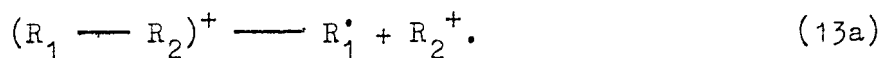
Wasserradikale wegzufangen. Als effektive Radikalfänger haben sich Eiweißstoffe (Nährbouillon) und sulfhydrylhaltige Verbindungen erwiesen. Ihre Bezeichnung als "Schutzstoffe" kennzeichnet ihre Eigenschaft, die Strahlenempfindlichkeit von Lebewesen herabzusetzen. Die Wirksamkeit mancher Verbindungen beschränkt sich jedoch nicht auf den Schutz gegen indirekte Strahlenwirkungen: in jüngerer Zeit stellte sich heraus, daß einige Substanzen, z.B. Cystein, Cysteamin und Cystamin bei der Bestrahlung getrockneter Bakteriophagen oder Enzyme ebenfalls eine Schutzwirkung ausüben. Auf die möglichen Ursachen dieses Phänomens werden wir später noch zurückkommen.

Bakteriophagen sind aus einem Kern aus Desoxyribonukleinsäure, die in Form eines aufgewickelten Fadens vorliegt und einer Hülle von Protein zusammengesetzt. Da Protein und DNS in etwa gleicher Menge vorhanden sind, ergibt sich die Frage, ob der Verlust der plaquebildenden Fähigkeit, den wir im folgenden auch Inaktivierung nennen wollen, ein Ergebnis der Energieabsorption in der Proteinhülle oder in der DNS ist. Bestrahlungsversuche mit infektiöser Nukleinsäure in vitro (Ginoza 1963) und von Phagen-DNS innerhalb ihrer Wirtsbakterien (Luria u. Latarjet 1947) ergaben, daß die Strahlenempfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung der isolierten DNS mit der kompletter Phagenpartikel übereinstimmt. Aus diesen und noch mehreren anderen Versuchen wurde der Schluß gezogen, daß die Phageninaktivierung bei Bestrahlung mit ionisierender Strahlung in Bouillon oder getrocknet auf eine Strahlenschädigung der DNS zurückgeht (Hotz u. Zimmer 1963, Hotz 1965). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß die DNS als Träger der genetischen Information fungiert und im speziellen Fall der Viren die Vorschrift für deren Vermehrung im Wirtsbakterium enthält.

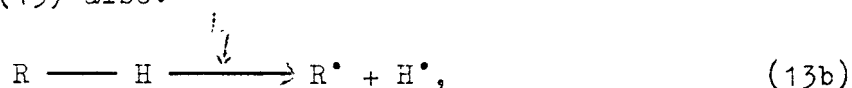
Wir wollen nun kurz auf die Wirkungsweise ionisierender Strahlung eingehen, zu der neben Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlen auch Partikelstrahlen gehören. Beim Durchgang eines Protons durch ein biologisches Makromolekül erfolgt die Energieabgabe hauptsächlich auf zwei Arten (Lea 1946):

- (1) durch Ionisationen, d.h. ein Elektron, meist ein Valenzelektron, wird aus der Elektronen-Hülle eines Makromoleküls herausgeschlagen, so daß das Molekül positiv geladen zurückbleibt.
- (2) durch Anregungen, d.h. ein Elektron eines Moleküls wird auf ein höheres Energieniveau gehoben.

Während die zweite Art der Energieabsorption für die biologische Wirkung relativ harmlos ist, entstehen durch Ionisationen weit schwerwiegendere Folgen. Die Entfernung eines Valenzelektrons, das an der kovalenten Bindung der Atome im Molekül teilhat, kann eine Dissoziation des Makromoleküls in zwei Fragmente bewirken:

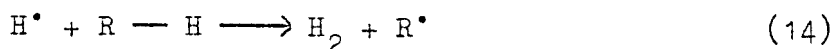


Aus der Gleichung geht hervor, daß hierbei Radikale entstehen, die infolge ihres magnetischen Moments mit Hilfe der Elektronenspinresonanz nachgewiesen werden können. Der sich an die Radikalbildung anschließende Vorgang der Dissoziation hängt außer von der Radikalbildungswahrscheinlichkeit von deren Rekombinationswahrscheinlichkeit ab. Diese wird durch den sog. "Käfig-Effekt" (Franck and Rabinowitsch 1934) für größere und kleinere Radikalfragmente unterschiedlich beeinflusst: Durch den "Käfig" von Seitenketten eines Moleküls werden größere Radikale an der Wegdiffusion gehindert, während kleinere Radikale, insbesondere Wasserstoffatome besonders leicht entkommen. Sie konnten nach der Bestrahlung verschiedener organischer Verbindungen nachgewiesen werden (Hart u. Platzmann 1961, Cole u. Silver 1963). In vielen Fällen lautet Gleichung (13) also:

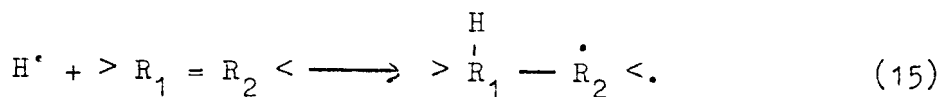


wobei  $R - H$  in unserem Fall ein DNS-Molekül und  $R^\bullet$  ein DNS Radikal bedeuten soll. Der Bildung des Radikals  $R^\bullet$  wird für die Entstehung des biologisch manifesten Strahlenschadens große Bedeutung beigemessen (Zimmer 1959, Müller 1964).

Das gebildete Wasserstoffradikal besitzt die Fähigkeit, auch in fester Phase und bei tiefen Temperaturen zu diffundieren (Jen u. Mitarb. 1958). Es kann mit einem weiteren H-Radikal zu molekularem Wasserstoff rekombinieren und aus der Probe entweichen. Weitere Möglichkeiten bestehen darin, mit einem unbeschädigten Molekül zu reagieren und ein weiteres H-Atom zu abstrahieren (Braams 1963):



oder sich an eine Doppelbindung anzulagern (Voevodski u. Molin 1962):



Diese Sekundärreaktionen des H-Radikals führen also zur Bildung eines weiteren organischen Radikalrestes (Braams 1963). Nach der Braams'schen Hypothese hat man also Strahlenschäden durch Radikalbildung am Ort der Ionisation von solchen zu unterscheiden, die durch diffusible Wasserstoff-Radikale erzeugt werden. Die möglichen Radikalreaktionen verlaufen i.a. exergonisch. Für den Reaktionseintritt ist allerdings eine geringe Aktivierungsenergie erforderlich.

#### 4.2. Temperatur-Effekt

Die Abbildungen (9) und (11) sowie die aus den 37  $\mu$ -Dosen der Tabelle (2) errechneten Schutzfaktoren zeigen, daß tiefe Temperaturen die Strahlensensibilität von 5X-174 und cystamingeschützter 5X-174 in gleicher Weise herabsetzen ( $p = 1,6$ ). Dieser Befund weist darauf hin, daß Cystamin und tiefe Temperatur eine voneinander unabhängige Wirkungsweise besitzen, was für T1 von Hotz (1965) und Hermann (1965) in gleicher Weise gezeigt werden konnte. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß auch die strahleninduzierten Prozesse, die von den beiden Faktoren beeinflußt werden, unterschiedlicher Natur sein müssen.

Wir wollen im folgenden zur Deutung des Temperatureffektes eine Analyse der Abhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts von der Temperatur durchführen, indem wir eine Gleichung der Thermodynamik benutzen, die die Abhängigkeit chemischer Reaktionen von der Temperatur beschreibt:

$$k \sim \exp (-E_a/RT) \quad (16)$$

Dabei ist  $E_a$  die Aktivierungsenergie in kcal/mol, die notwendig ist, damit die Reaktion abläuft,  $k$  ist Anteil der Moleküle, die im thermodynamischen Gleichgewicht eine die Aktivierungsenergie  $E_a$  überschreitende Energie haben,  $T$  die absolute Temperatur und  $R$  die Gaskonstante. Für den Inaktivierungsquerschnitt  $\sigma$  in Abhängigkeit von der Temperatur gilt dann folgende Gleichung

$$\sigma = K \exp (-E_a/RT). \quad (17)$$

Die Berechtigung für die Anwendung dieser Formel leiten wir aus der Hypothese von Braams ab, nach der radikalchemische Reaktionen für die Erzeugung des biologischen Strahlenschadens eine bedeutsame Rolle spielen. Allerdings müssen wir die Einschränkung machen, daß ein bestimmter Anteil des Inaktivierungsquerschnittes keine Temperaturabhängigkeit zeigt: Vor allem gilt dies für Radikalbildungen, die aufgrund

von Ionisationen entstehen (Gl. 13a und b), da die Anzahl der auftretenden Ionisationen von der Dosis und der Ionisationsdichte eines Partikels längs seiner Bahn (LET) abhängen.

Exponentielle Zusammenhänge der Form  $k = \exp(-E_a/RT)$  lassen eine nach Arrhenius benannte Darstellungsform zu, wobei der  $\log K$  bzw.  $\log \sigma$  gegen die reziproke Temperatur aufgetragen wird:

$$\log \sigma \sim -E_a/RT. \quad (18)$$

Aus der Steigung der Geraden kann die Aktivierungsenergie  $E_a$  abgelesen werden.

Tragen wir die von uns gemessenen Inaktivierungsquerschnitte für  $\phi X-174$  bzw. cystamingeschützte  $\phi X-174$  halblogarithmisch gegen die reziproke Temperatur auf (Abb. 16 I u. II), so erhalten wir zunächst keine Geraden. Mit zunehmendem  $1/T$  scheint sich der Inaktivierungsquerschnitt einem konstanten Wert zu nähern. Es sind also offenbar mehrere Prozesse mit verschiedenen Aktivierungsenergien an der Zusammensetzung des Gesamtinaktivierungsquerschnitts beteiligt.

Dennoch ist eine Deutung der gefundenen Temperaturabhängigkeit möglich, die zumindest eine sehr interessante Arbeitshypothese darstellt und Versuche bei noch niedrigeren Temperaturen sehr lohnend erscheinen läßt. Ziehen wir versuchsweise vom Gesamtinaktivierungsquerschnitt  $\sigma$  bei jeder gegebenen Temperatur einen temperaturunabhängigen, konstanten Anteil ( $\sigma_0$ ) mit der Aktivierungsenergie  $E_a = 0$  ab, so erhalten wir für  $\phi X-174$  und für cystamingeschützte  $\phi X-174$  Geraden (Abb. 16 Ia u. IIa), aus deren Steigung sich eine Aktivierungsenergie von  $\sim 1$  kcal/mol berechnen läßt. Da der Inaktivierungsquerschnitt  $\sigma$  somit als Summe zweier Komponenten, einer temperaturunabhängigen ( $\sigma_0$ ) und einer temperaturabhängigen Komponente ( $\sigma_1$ ) aufgefaßt wird

$$\sigma = \sigma_0 + \sigma_1, \quad (19)$$

müssen wir Gleichung (17) berichtigen und statt dessen folgenden Ausdruck schreiben:

$$\sigma = \sigma_0 \exp(-E'_a/RT) + \sigma_1 \exp(-E_a/RT). \quad (20)$$

Da  $E'_a = 0$ , folgt:

$$\sigma = \sigma_0 + F \cdot \sigma_0 \exp(-E_a/RT). \quad (21)$$

Dabei ist  $\sigma$  der Gesamtinaktivierungsquerschnitt der Phagen,  $\sigma_0$  die temperaturunabhängige Komponente,  $F \cdot \exp(-E_a/RT)$  das Verhältnis von temperaturabhängiger zu temperaturunabhängiger Komponente.  $E_a$  ist die Aktivierungsenergie, die insgesamt erforderlich ist, damit der temperaturabhängige Strahlenschaden tatsächlich eintritt. Dieser formale Ausdruck wurde von Hermann (1965) zur Beschreibung seiner Messungen mit T1-Bakteriophagen angegeben. Die Darstellung von  $\sigma$  gegen T als Gerade in Abb. 12 gibt nach diesem Ansatz die Befunde nicht genau wieder, jedoch ist die Abweichung von der Geraden so gering, daß sie innerhalb der Fehlergrenzen liegt.

Durch Einsetzen der experimentell gefundenen Werte in Gleichung (21) erhalten wir folgende Ausdrücke:

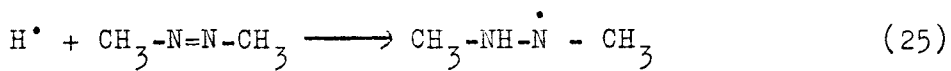
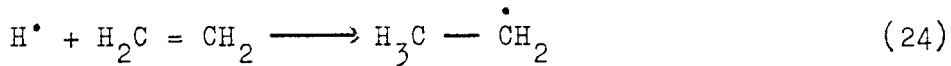
$$\Phi X-174: \quad \sigma_1 = 1,9 \left( 1 + 3,2 e^{-\frac{1 \text{kcal}}{RT}} \right) \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2 \quad (22)$$

$$\Phi X-174 + \text{Cy}: \quad \sigma_2 = 1,5 \left( 1 + 2,8 e^{-\frac{1 \text{kcal}}{RT}} \right) \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2 \quad (23)$$

Der die Temperaturabhängigkeit bestimmte Faktor F beträgt demnach unabhängig von der Schutzstoffzugabe  $3,0 \pm 0,2$ . Der Schutzeffekt des Cystamins bewirkt eine Verkleinerung des temperaturunabhängigen Anteils um einen Faktor von 0,79.

Nach unserer Auffassung wird die temperaturabhängige Komponente  $F \cdot \sigma_0 \cdot \exp(-E_a/RT)$  durch Reaktion kleiner diffusibler Radikale mit biologisch unbeschädigten Molekülen verursacht. Den Mechanismus, der diesen Radikalreaktionen nach Braams zugrunde liegen soll, haben wir im vorangehenden Abschnitt dargestellt (Gleichung 14 und 15). Demnach handelt es sich um Abstraktions- bzw. Anlagerungsreaktionen vorwiegend der Wasserstoffradikale. Bei Zimmertemperatur reicht die thermische Energie der meisten Reaktionspartner aus, um die Barriere der Aktivierungsenergie von  $\sim 1$  kcal/Mol zu überwinden, so daß der temperaturabhängige Schadensanteil überwiegt. Mit abnehmender Temperatur wird die Reaktionswahrscheinlichkeit zunehmend geringer, was darin zum Ausdruck kommt, daß der Gesamtinaktivierungsquerschnitt um den temperaturabhängigen Anteil abnimmt. Die Wasserstoffradikale werden bei tiefer Temperatur vorwiegend entweder als solche oder nach Rekombination zu molekularem Wasserstoff aus der Probe entweichen. Die Aktivierungsenergien für Radikalrekombinationen sind praktisch gleich null, und daher laufen sie auch bei tiefen Temperaturen ab. Wir wollen

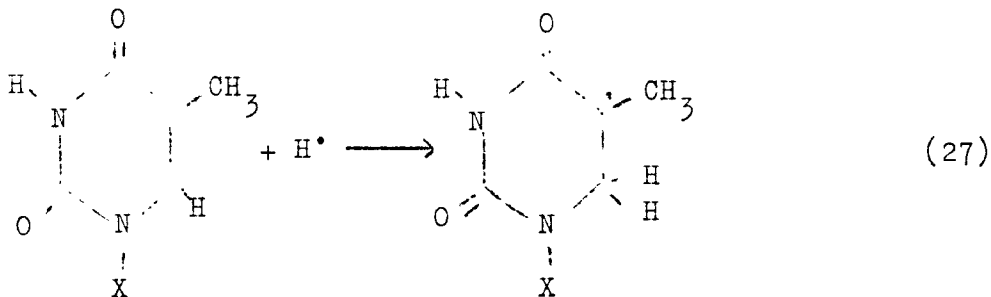
nun noch kurz versuchen, diese allgemeinen Vorstellungen über den Temperatureffekt auf das spezielle Objekt, Phagen-DNS, anzuwenden und einiges über den möglichen Mechanismus der temperaturabhängigen Läsion zu sagen. Die Erzeugung von organischen Radikalen durch Anlagerung von atomarem Wasserstoff an eine Doppelbindung wurde bei Bestrahlung von Benzol bewiesen, wobei das Radikal  $C_6H_7$  entsteht (Voevodskii u. Molin 1962). Die Aktivierungsenergien für derartige Prozesse sind sehr klein. Für die folgenden Reaktionen z.B.



liegt sie mit 1 u. 2 kcal/Mol (Semjonow 1961) im Bereich des von uns gemessenen Wertes. Über die Natur derartiger strahleninduzierter Radikale in DNS geben ESR-spektrographische Untersuchungen Aufschluß: Bei der Bestrahlung trockener Präparate von Thymin und ebenso von DNS tritt eine bestimmte Linienstruktur, ein sog. Oktettspektrum, auf (Ehrenberg et al. 1963, Salovey et al. 1963), das bei der Bestrahlung der anderen Nukleinsäurebestandteile nicht beobachtet wird. Dem Oktettspektrum ist nach Shields und Gordy (1959) ein Radikal folgender Konstitution zugeordnet:



Dieses entsteht aus Thymin durch Anlagerung von atomarem Wasserstoff (Müller 1964) möglicherweise nach folgender Reaktion (Salovey et al. 1963, Gordy et al. 1965):



Es existiert eine Reihe experimenteller Befunde, die dafür sprechen, daß die beschriebene Reaktion wirklich in bestrahlter DNS abläuft und daß sie temperaturabhängig ist. So konnten Gordy, Pruden u. Snipes (1965) zeigen, daß das thyminartige DNS-Spektrum wesentlich verstärkt hervortritt, wenn die trockene DNS-Probe in einer Wasserstoffatmosphäre bestrahlt wird. Dies weist darauf hin, daß strahleninduzierte H-Atome

des absorbierten Gases (neben H-Atomen aus anderen Quellen) ebenfalls mit dem Thymin reagieren und seine Radikalausbeute erhöhen können. In die gleiche Richtung weisen Untersuchungen von Pershan et al. (1965), die ebenfalls ein verstärktes thyminartiges DNS-Signal erhielten, wenn der Wassergehalt der Probe erhöht wurde. Auch in diesem Fall wird die Radikalausbeute des Thymins durch Anlagerung von H-Atomen erhöht, die bei der Radiolyse des Wassers entstehen. Ein interessanter Befund, der die Deutung unterstützt, daß die betrachtete Radikalreaktion temperaturabhängig ist, wurde von Müller (1964) erhoben: Bestrahlt man Thymin bei  $110^{\circ}$  K, so wird das für Thymin bei Zimmertemperatur charakteristische Oktett-Spektrum von einem Dublett überlagert, das Karbonradikalen zugeschrieben wird. Ausgehend von unserer Hypothese könnte man diesen Befund durch Zurückdrängung der oben dargestellten Reaktion (27) infolge ihrer Temperaturabhängigkeit und dem alleinigen Auftreten eines anderen Radikaltyps erklären, der  $\sigma_0$  entsprechen würde. In gleicher Weise sind Experimente von Patten und Gordy (1964) zu deuten. Sie bestrahlten DNS- $H_2O$ -Komplexe bei der Temperatur des flüssigen Heliums und fanden kein thyminartiges Spektrum, wohl aber die Signale freier Wasserstoffatome, die zwar durch die Radiolyse des Wassers gebildet wurden, aber nicht die erforderliche thermische Energie besitzen, um eine Additionsreaktion mit dem Thymin einzugehen.

Eine Schwierigkeit, die sich bei der Deutung des Temperatureffektes durch diffusible Radikale speziell für den Phagen  $\phi$ X-174 ergibt, darf nicht verschwiegen werden. Ein Temperatureffekt kann nach dieser Hypothese nur auftreten, wenn das Ereignis der Erzeugung eines diffusiblen Radikals ( $RH \xrightarrow{h\nu} R^{\bullet} + H^{\bullet}$ ) selbst noch kein Schadensereignis darstellt. Für Phagen mit Doppelstrang-DNS ist dies unproblematisch, da die Radikalbildung an einem Schwesternstrang der Doppelhelix noch keinen manifesten Schaden bedeuten muß. Eine Inaktivierung erfordert Schäden an zwei gegenüberliegenden Positionen des Doppelstranges (Stent u. Fuerst 1955, 1960).  $\phi$ X-174 dagegen besitzt eine DNS, die nicht die von Watson und Crick aufgeklärte Doppelhelixstruktur besitzt, sondern lediglich in Form eines einzigen Stranges vorhanden ist (Tessmann et al. 1957; Sinsheimer 1959a; Tessmann 1959). Es besteht also das Problem, wie für  $\phi$ X-174 nach dem eben Gesagten die unschädliche Erzeugung eines diffusiblen Radikals vor sich gehen soll. Die benötigten Wasserstoff-Atome könnten z.B. von dem für die Funktion der Nukleinsäure verhältnismäßig unwichtigen Zucker (Desoxyribose)



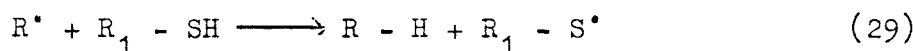
zur Verfügung gestellt werden. Ein Hinweis für diese Vermutung liefert der Befund, daß die Radikalausbeute bestrahlter Nukleinsäurebasen auf das 2 - 5 fache ansteigt, wenn die Basen in Zusammenhang mit dem Zucker, also als Nukleosid bestrahlt werden (Müller 1964). Aber auch die Proteinhülle des Phagen, gebundenes Wasser und organische Zusätze (Nährbouillon) können Wasserstoffatome für den temperaturabhängigen Schadensanteil zur Verfügung stellen.

#### 4.3. Cystamineffekt

In unseren Experimenten an getrockneten Phagen ist die Cystaminwirkung auf einen Schutz gegen die direkten Strahleneffekte zurückzuführen. Wie aus den Gleichungen (22) und (23) hervorgeht, beeinflusst der Schutzeffekt des Cystamins allein die temperaturabhängige Komponente  $\sigma_0$  des Inaktivierungsquerschnittes. Das Cystamin bewirkt also Schutz gegen jenen Schadensanteil, der primär durch Ionisation eines DNS-Moleküls, in vielen Fällen nach folgendem Mechanismus, entsteht:



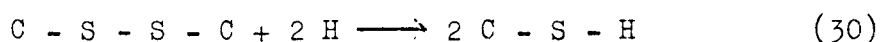
Die Schutzwirkung sulfhydrylhaltiger Verbindungen wird von vielen Autoren (Hotz u. Zimmer 1963) als ein Reparationsmechanismus angesehen, der darin bestehen soll, daß das (in unserem Falle DNS-) Radikal  $R^{\bullet}$  durch Übernahme eines Wasserstoffatoms von der SH-Verbindung in seiner ursprünglichen Form wiederhergestellt wird (Frévo-Bernas 1953, Alexander u. Charlesby 1955):



Der gleiche Effekt, nämlich die Aufhebung des Radikalzustandes, kann nach Ansicht einiger Autoren (Ginoza 1963, Hotz 1965) auch durch Elektronendonation des Schutzstoffmoleküls an das Bioradikal erreicht werden. Ein Schutzmechanismus im Sinne der H-Donation, wie er für Cysteamin angenommen wird, scheint für Cystamin (Oxydationsprodukt des Cysteamins) wegen des fehlenden schwefelständigen Wasserstoffs nicht möglich zu sein. Zwar konnten Pryor et al. (1964) beweisen, daß derin Bezug auf den Schwefel  $\alpha$ -ständige Wasserstoff aliphatischer Disulfide in der Lage ist, Phenylradikale zu restituieren, doch scheint es fraglich, ob dieser Mechanismus in biologischen Systemen wirksam ist. Wenn Disulfide ebenfalls als H-Donatoren wirken könnten, müßte man nämlich erwarten, daß z.B. Cystamin und Cysteamin bzw. ähnliche Redox-

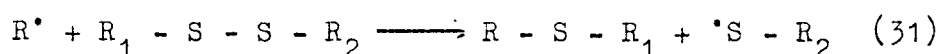
systeme vergleichbare Schutzeffekte erzielen, was zwar für T1 zutrifft, aber für  $\phi$ X-174 nicht nachgewiesen werden konnte. Die Tabelle 6 zeigt, daß die Schutzwirkung der oxydierten S-Verbindungen deutlich kleiner ist als die der reduzierten Verbindungen. Der Schutzfaktor des Cysteamins (2,6) gilt für  $\phi$ X-174, suspendiert in 4 % NB. 4 % NB schützt gegen den Hauptanteil der indirekten Strahlenschäden, so daß  $p = 2,6$  im wesentlichen den Hyperschutz betrifft, obwohl indirekte Effekte sicher trotzdem noch eine gewisse Rolle spielen.

Einer Hypothese von Braams (1963) zufolge soll die Schutzwirkung von sulfhydrylhaltigen Verbindungen auf einer Funktion als Radikalfänger beruhen. Ähnliches wäre auch für das Disulfid Cystamin denkbar, z.B. nach folgender Reaktion:



Wenn diese Reaktion richtig wäre, so müßte man nach dem im Abschnitt über den Temperatureffekt Gesagten erwarten, daß die Temperaturabhängigkeit der Strahlenwirkung auf  $\phi$ X-174 bei Zugabe von Cystamin kleiner wird, und zwar proportional der Menge der H-Atome, die von dem Cystamin weggefangen werden. Da die Temperaturabhängigkeit von  $\phi$ X-174 ohne und mit Cystaminzugabe jedoch gleich ist (1,6), erscheint ein Schutzmechanismus nach Gleichung (30) unwahrscheinlich.

Eine dritte Hypothese zur Erklärung der Schutzwirksamkeit von Disulfiden geht davon aus, daß Cystamin und andere aliphatische Disulfide mit organischen (Pryor et al. 1964) und speziell biologischen Radikalen (Henriksen et al. 1963) unter Bildung von Thioäthern reagieren können:



Diese Reaktion bewirkt ebenfalls die Aufhebung des Radikalzustandes der DNS und möglicherweise die Wiederherstellung der biologischen Funktion. Wenn man annimmt, daß die Schutzwirkung von Sulfhydrylverbindungen auf H-Donation und die Wirkung von Disulfiden auf der Bildung von Thioäthern beruht, lassen sich die unterschiedlichen Schutzfaktoren der einzelnen Stoffe (Tab. 6) in einem kausalen, wenn auch stark hypothetischen Zusammenhang bringen. Die Vorstellung beruht darauf, daß Sulfhydrylverbindungen und Disulfide mit dem gleichen Radikaltyp ( $\text{R}^{\bullet}$  der Gleichungen 28 u. 29) quantitativ in gleichem Ausmaß reagieren. Die H-Donation von G-SH und C-SH wird jedoch das DNS-

Tabelle 6: Schutzwirkung von zwei schwefelhaltigen Redoxsystemen auf die Inaktivierung trockener  $\phi$ X-174 Phagen.

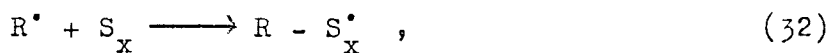
Schutzstoff	Schutzfaktor	Autor
Glutathion G-S-S-G	1	Ginoza 1963
Glutathion G-S-H	2	Ginoza 1963
Cystamin C-S-S-C	1,3	diese Arbeit
Cysteamin C-S-H	(2,6)	Hotz 1965

Molekül in seiner ursprünglichen Form wiederherstellen. Im Gegensatz dazu hat die Thioätherbildung, also die Anlagerung einer Hälfte des Cystamin- bzw. Glutathionmoleküls an die DNS von  $\phi$ X-174 zur Folge, daß die Nukleinsäure in ihrer chemischen und sterischen Konfiguration verändert wird. Diese sterischen Veränderungen werden sicher in manchen Fällen die Funktion der Nukleinsäure, ihre identische Replikation, hemmen, so daß die Schutzwirkung in ihr Gegenteil, die Inaktivierung umschlägt. So ist es z.B. denkbar, daß die Thioäthergruppe nahe einer chemischen Gruppe (Wasserstoff-, Sauerstoff- oder Stickstoffatom) der Nukleinsäurebase entsteht, die für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke im Wirtsbakterium erforderlich ist. Die räumliche Behinderung dieser Gruppe durch die Thioäthergruppe könnte dann dazu führen, daß die Anlagerung einer komplementären Base an dieser Stelle unter Umständen verhindert wird. In diesem Fall könnte der für die Replikation notwendige Komplementärstrang (Stent 1963) nicht gebildet werden. Andererseits ist es auch denkbar, daß in vielen Fällen die Thioätherbildung, entsprechend der zufallsmäßigen Verteilung der strahleninduzierten Radikalbildungen, eine Position im Gerüst der Base einnimmt, die die Funktion der DNS im Wirtsbakterium nicht hemmt, so daß der Schutzmechanismus wirksam werden könnte. Es erscheint nach dieser Hypothese plausibel, daß die Ablesung der genetischen Information umso mehr behindert, und damit die Schutzwirksamkeit der Disulfide im gleichen Ausmaß verringert wird, je größer die Schutzstoffmoleküle sind, die sich an der DNS anlagern. Die verhältnismäßig kleinen Cystaminmoleküle verursachen demnach noch einen Schutzfaktor von 1,3, der aber verglichen mit dem Faktor von 2 der SH-Substanzen (H-Donatoren) klein ist. Glutathion (G-S-S-G) besitzt etwa die dreifache Länge des Cystaminmoleküls, so daß sich aus dieser Tatsache seine völlige Unwirksamkeit als Schutzstoff erklären läßt (Tab. 6).

#### 4.4. Schwefeleffekt

Ein weiterer denkbarer Mechanismus, durch den schwefelhaltige Substanzen ihre Strahlenschutzwirkung entfalten können, ist nach Auffassung einiger Autoren (Ginoza 1963, Hotz 1965) der der Elektronendonatation. Danach soll nicht z.B. ein Wasserstoffatom einer sulfhydrylhaltigen Verbindung, sondern nur ein Elektron des Schwefels übertragen werden. Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen, wurden einige Experimente unter Zusatz von kolloidem Schwefel durchgeführt. Als Versuchsobjekt schien der T1-Phage in zweifacher Hinsicht besser

geeignet als  $\Phi X-174$ , da einmal T1 in Bezug auf Schutzstoffe bei weitem besser untersucht ist (Hotz und Zimmer 1963, Hotz 1965, Hermann 1965), und zum anderen der Schutzeffekt durch schwefelhaltige Verbindungen wesentlich ausgeprägter ist. Abb. 13 zeigt, daß Schwefel keinen erkennbaren Schutzeffekt gegen die Inaktivierung getrockneter Phagen bietet, obwohl die verwendeten Konzentrationen (0,15 molar) die für die maximale Wirksamkeit anderer Schutzsubstanzen i.a. notwendige Konzentration (0,1 molar) überschreiten. Bei Bestrahlung in Lösung unter Zusatz von 1 %-iger Nährbouillon besitzt der Schwefel einen geringen Schutzeffekt (Abb. 14), der aber auf die Beseitigung indirekter Effekte zurückzuführen ist, da bei einer Erhöhung der Nährbouillonkonzentration auf 4 % kein Schutzeffekt mehr vorhanden ist (Abb. 15). Die Ergebnisse zeigen also, daß T1-Bakteriophagen, und damit wahrscheinlich auch alle anderen Phagen, durch kolloiden Schwefel gegen die direkten Strahleneffekte nicht geschützt werden können. Da die Teilchengröße der kolloidalen Schwefellösungen das Phagenvolumen um ein Vielfaches übertrifft, muß man annehmen, daß Schwefelteilchen die Proteinhülle nicht durchdringen und damit auch nicht in direkten Kontakt mit der Phagennukleinsäure gelangen können. Sollte eine Elektronendonatation prinzipiell möglich sein, so ist aus unseren Versuchen der Schluß zu ziehen, daß eine Elektronendonatation durch die Proteinhülle hindurch nicht stattfinden kann. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von Charlesby, Garrat und Kopp (1962) von Interesse, die an Modellsystemen (Polymere) einen Schutzeffekt des kolloiden Schwefels gegen Molekülvernetzungen feststellten; diese Schutzwirkung ist von einer Verminderung strahleninduzierter Radikale begleitet (Garrat u. Ormerod 1963). Mit Hilfe von Tritium-markiertem Wasser konnten Kopp und Charlesby (1965) an Polyäthylenoxyd, einem Modellsystem mit vornehmlich direkten Effekten, zeigen, daß die Wasserstoffdonation für die Schutzwirkung des Schwefels in Systemen mit direkten Effekten keine Rolle spielt. Die Autoren postulieren zwar folgenden Schutzmechanismus:



durch den Vernetzungsreaktionen verhindert werden, doch kann Elektronendonatation als möglicher Schutzmechanismus nicht ausgeschlossen werden. Die an Polymeren in vitro erhaltenen Ergebnisse sind naturgemäß nicht unmittelbar auf Versuche an biologischen Objekten zu übertragen. Zwar wurde in den Modellsystemen die Schwefelwirkung

als Schutz gegen Vernetzungsreaktionen gezeigt und derartige Vernetzungsreaktionen auch an einigen biologischen Objekten (Alexander et al. 1961) nachgewiesen, aber möglicherweise überwiegen in biologischen Systemen andere schädliche Strahlenwirkungen, für die eine Reaktion nach dem Muster von Gleichung (32) keinen Schutz bietet. Die Frage, ob die schwefelhaltigen Verbindungen bei biologischen Objekten ihre Schutzwirksamkeit durch Elektronendonation oder H-Donation bzw. andere Mechanismen entfalten, bedarf daher noch weiterer Untersuchungen.

#### 4.5. Der temperatur- und schutzstoffunabhängige Strahlenschaden

In den beiden vorangehenden Abschnitten haben wir versucht, eine Aussage darüber zu machen, in welchem Ausmaß und nach welchen Mechanismen Cystamin- und Temperatureinfluß die Strahlenempfindlichkeit verändern. Wir stellen z.B. fest, daß der Gesamtinaktivierungsquerschnitt von  $\Phi X-174$  durch tiefe Temperatur und Schutzstoff um 50 % gegenüber dem Wert bei Zimmertemperatur erniedrigt werden kann, mit anderen Worten: Die Hälfte des Strahlenschadens wird durch Mechanismen erzeugt, die nicht temperatur- bzw. cystaminschützbar sind. Es erhebt sich die Frage, auf welche Weise die restlichen 50 % der  $\Phi X-174$  geschädigt werden. Eine unmittelbare Aussage zu dieser Frage kann anhand unserer Experimente nicht gemacht werden, und die Möglichkeit, daß sich auch dieser Anteil aus mehreren Komponenten zusammensetzt, ist nicht auszuschließen. Es ist jedoch einleuchtend, daß der temperatur- und cystaminunabhängige Schadensanteil von tiefergreifenden als den bisher diskutierten Eingriffen in die Struktur der DNS herrührt. Wir denken dabei hauptsächlich an Unterbrechungen der Nukleinsäurekette. So zeigen physikochemische "in vitro"-Untersuchungen röntgenbestrahlter Desoxyribonukleinsäure das Auftreten einer großen Zahl von Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen (Hagen 1964). Die biologische Wirksamkeit der Doppelstrangbrüche wurde an strahleninaktivierten T7-Bakteriophagen wahrscheinlich gemacht (Freifelder 1965). Dieser Autor konnte mit Hilfe biologischer und physikochemischer Nachweismethoden zeigen, daß unter den Bedingungen der vorzugsweise direkten Strahlenwirkung 40 % der inaktivierten Phagen Doppelstrangbrüche aufweisen. wurde Cysteamin zugegeben, so erhöhte sich dieser Anteil auf 100 %, d.h. alle abgetöteten Phagen enthielten Doppelstrangbrüche. Daraus zieht Freifelder den Schluß, daß die nicht durch Doppelbrüche verursachten Inaktivierungen cystea-

menschützbare sind. Dieser Befund ist eine Stütze für die oben ausgesprochene Vermutung, daß wir es bezüglich des cystamin- und temperaturunabhängigen Schadenanteils tatsächlich mit Brüchen der einsträngigen DNS-Kette von  $\phi$ X-174 zu tun haben. Ein direkter Beweis für die absolute Letalität von derartigen Brüchen zeigen Inkorporationsversuche mit radioaktivem Phosphor ( $P^{32}$ ), die von Tessmann (1959) durchgeführt wurden. Der zu einem bestimmten Prozentsatz anstelle des normalen  $P^{31}$  in die DNS von  $\phi$ X-174 eingebaute  $P^{32}$  wandelt sich durch  $\alpha$ -Zerfall in Schwefel um. Diese Umwandlung, d.h. jeder radioaktive Zerfall bewirkt einen Bruch der DNS. Da die Inaktivierungswahrscheinlichkeit für jeden Zerfall zu 1 gefunden wurde, bewirkt jeder Bruch also eine Inaktivierung (Stent 1963). Die Inaktivierung durch Inkorporation von  $P^{32}$  zeigt keine Temperaturabhängigkeit, d.h. Brüche können durch den Einfluß tiefer Temperatur nicht verhindert werden. Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen: Das Auftreten und die biologische Wirksamkeit von DNS-Einstrangbrüchen für  $\phi$ X-174 (Tessmann 1959) und von DNS-Doppelstrangbrüchen für T7 (Freifelder 1965) ist als sicher anzusehen. Weiterhin ist ein Schutz dagegen durch Cystamin und tiefe Temperatur bisher nicht nachgewiesen. Allerdings sind auch chemische Veränderungen einzelner Molekülgruppen der DNS, z.B. Desaminierungen, Dehydroxylierungen oder Bruch einer Basen-Zuckerbindung (Butler 1956) als Ursache für den etwa 50 % betragenden Schadensanteil nicht auszuschließen, der als temperaturunabhängig und durch Schutzstoff unbeeinflussbar gefunden wurde.

#### 4.6. Vergleich mit Ergebnissen am T1-Phagen

Für T1-Bakteriophagen liegen Untersuchungen vor (Hermann 1965), die unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. In Tabelle 7 sind die für T1 und  $\phi$ X-174 gemessenen 37 %-Dosen und Inaktivierungsquerschnitte aufgeführt. Ein Vergleich der  $D_{37}$ -Werte bei Zimmertemperatur zeigt, daß das Verhältnis der für die Inaktivierung benötigten Energieabsorptionen pro Masse- und wegen der etwa gleichen Dichte auch pro Volumeneinheit [ $\phi$ X-174/T1] 2:1 beträgt. Da die DNS-Volumina von  $\phi$ X und T1 sich jedoch wie 1:35 verhalten, beträgt das Verhältnis der Inaktivierungsenergien pro Phage ( $\phi$ X-174/T1) 1:18, oder anders ausgedrückt: Die Strahlenempfindlichkeit von  $\phi$ X ist 18 mal größer als von T1. Werden beide Phagen durch Cystamin geschützt und bei tiefer Temperatur bestrahlt, so beträgt die Inaktivierungsenergie pro  $\phi$ X-Phage sogar nur 1/35 des für T1 notwendigen Wertes. Im vorangehenden

Tabelle 7: 37 %-Dosen und Wirkungsquerschnitte ( $\sigma$ ) in vacuo bestrahlter T1- und  $\phi$ X-174-Bakteriophagen, gemessen mit 2 MeV Protonen in Abhängigkeit von der Temperatur und Cystaminzugabe (Cystaminkonzentration 0,1 molar). Angaben für T1 nach Hermann (1965).

Material	$^{\circ}\text{K}$	$\sigma$ $\cdot (10^{-12} \text{ cm}^2)$	$D_{37}$ $10^{11} \text{ pcm}^{-2}$	$D_{37}$ krad
T1	293	5,41	1,85	494
$\phi$ X-174	293	2,76	2,63	965
T1	101	3,16	3,17	845
$\phi$ X-174	123	1,78	5,61	1500
T1 + Cy	293	2,44	4,09	1079
$\phi$ X-174+Cy	293	2,11	4,73	1260
T1 + Cy	117	1,76	5,67	1513
$\phi$ X-174+Cy	125	1,42	7,04	1880



Abschnitt hatten wir angenommen, daß der weder cystamin- noch temperatur-schützbarer Strahlenschaden bei T1 vorwiegend durch Doppelstrangbrüche und bei  $\phi$ X-174 durch Einzelstrangbrüche entstehen soll. Daraus schließen wir, daß ein Einzelstrangbruch der DNS von  $\phi$ X-174  $1/35$  der Energie erfordert, die zur Inaktivierung von T1 notwendig ist. Da T1 aber 35 derartige Energieportionen absorbiert, sollten in erster Näherung in der T1-Nukleinsäure 35 Einzelstrangbrüche oder Ereignisse mit ähnlichem Energieaufwand auf einen inaktivierenden Doppelstrangbruch kommen. Freifelder (1965) fand an T7 etwa 15 Einzelstrangbrüche pro Doppelstrang bei der 37 %-Dosis, also etwa die Hälfte des von uns geschätzten Wertes. Sollte der Wert auch für T1 gelten, so wären bei diesem Phagen die 35 subletalen Ereignisse pro Doppelstrangbruch zur einen Hälfte auf Einzelstrangbrüche und zur anderen Hälfte auf Läsionen mit ähnlichem Energieaufwand, z.B. Basenschädigung, zurückzuführen.

Interessante Aspekte ergeben sich aus einer vergleichenden Diskussion der Wirkungswahrscheinlichkeiten. Wir wollen darunter die Wahrscheinlichkeit  $\alpha$  verstehen, mit der eine im DNS-Volumen stattfindende Primärionisation den Phagen inaktiviert. Unter der Bedingung, daß eine Primärionisation zur Abtötung ausreicht, erhält man für unseren Fall der Bestrahlung mit schnellen Protonen  $\alpha$  als den reziproken Wert aller Primärionisationen, die bei der 37 %-Dosis im DNS-Volumen entstehen:

$$\alpha = 1/D_{37} \cdot \bar{Q} \cdot Z,$$

wobei  $\bar{Q}$  der mittlere DNS-Querschnitt in  $\text{cm}^2$  ist,  $D_{37}$  in Protonen/ $\text{cm}^2$  angegeben wird und Z die mittlere Zahl der Primärionisationen beim Durchgang eines Protons durch DNS angibt. Bei der Berechnung von Z legten wir einen Energieverlust der 2 MeV Protonen von  $17 \text{ keV}/\mu$  (Lea 1946) zugrunde. Als Wert für den Energieaufwand pro Primärionisation verwendeten wir  $60 \text{ eV}$  (Rauth u. Hutchinson 1962).

Die Wirkungswahrscheinlichkeit pro Primärionisation beträgt für  $\phi$ X-174  $\sim 0,7$ , d.h. nahezu jede Primärionisation inaktiviert den Phagen. Dies ist nicht erstaunlich, wenn man bedenkt, daß  $\phi$ X-174 wegen der Einsträngigkeit seiner DNS die Gesamtheit der genetischen Information nur einfach enthält.

Für T1 beträgt  $\alpha \sim 0,035$ , was bedeutet, daß pro inaktivierendem Ereignis  $\sim 30$  Läsionen auftreten, die nicht letal wirken. Zu dem gleichen Ergebnis hatten schon die oben angeführten Überlegungen ge-

führt, die außerdem die Bedeutung der Einzelstrangbrüche als Ursache eines Großteils der subletalen Effekte zeigen. Eine mögliche Erklärung für den geringen Wert von  $\alpha$  liefert eine Hypothese von Ginoza und Miller (1965), die bei Zweistrangphagen einen sog. "kritischen Treffbereich" postuliert. Nur ein Treffer im kritischen Treffbereich soll zur Inaktivierung führen, während Treffereignisse außerhalb dieses Bereichs die Vermehrungsfähigkeit nicht hemmen. Diese Hypothese berücksichtigt jedoch nicht, daß auch Doppelstrangbrüche (Freifelder 1965) und sicher auch Basenschädigungen an gegenüberliegenden Positionen der DNS-Kette die Plauebildung verhindern. Nach einer Hypothese von Stent und Fuerst (1955) führen nur Doppelstrangbrüche oder Ereignisse, die gegenüberliegende Positionen der Doppelhelix gleichermaßen treffen, zur Inaktivierung. Danach entspricht  $\alpha = 0,035$  der Wahrscheinlichkeit, mit der ein Treffereignis einen Doppelstrangbruch erzeugt (Eintrefferkurve). Demgegenüber sollen Einzelstrangbrüche biologisch wirkungslos sein. Sie sind 15 - 30 mal (Freifelder 1965, diese Arbeit) häufiger als Doppelstrangbrüche und statistisch über beide Schwesternstränge der Doppelhelix verteilt. Zur Bildung einer funktionstüchtigen Replika ist es aber notwendig, daß zumindest einer der beiden Schwesternstränge unbeschädigt ist. Es muß also ein biologischer Reparatonsmechanismus des Wirtsbakteriums wirksam werden, der in einer enzymatischen Exzision der schadhafte Stelle bestehen könnte. Der Stückverlust an der betreffenden Stelle soll dann wieder, analog dem allgemein postulierten Replikationsmechanismus, aufgefüllt werden (Setlow u. Carrier 1964, Boyd u. Howard-Flanders 1964).

#### 4.7. Vergleich mit Temperaturmessungen an anderen biolog. Objekten

Ein Vergleich von Temperaturmessungen an verschiedenen biologischen Objekten zeigt grundsätzliche Übereinstimmungen. So besitzen die Sporen von *Bacillus megaterium*, T1-Phagen,  $\phi$ X-174 und verschiedene Enzyme im Temperaturbereich unter  $100^{\circ}$  K einen konstanten Inaktivierungsquerschnitt. Allen Objekten gemeinsam ist weiterhin, daß im Bereich zwischen  $100^{\circ}$  und  $300^{\circ}$  K eine Aktivierungsenergie für die Inaktivierung der temperaturabhängigen Komponente von etwa 1 kcal/mol gemessen wurde (Tab. 8). Diese beiden Tatsachen geben uns einen Hinweis, daß trotz der unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung der einzelnen biologischen Objekte prinzipiell einige Gemeinsamkeiten in ihrer Strahlenreaktion existieren; diese Gemeinsamkeiten bestehen darin, daß durch

**Tabelle 8:** Übersicht über die an Bakteriensporen, T1- und  $\phi$ X-174-Bakteriophagen und verschiedenen Enzymen gemessenen Aktivierungsenergien. Die Komponente mit der Aktivierungsenergie  $E_3$  tritt erst bei Bestrahlungstemperaturen über Zimmertemperatur auf. (Angaben z.T. nach Henriksen, 1965 und Hermann, 1965)

Objekt	Strahlenart	Aktivierungsenergien (kcal/mol)			Autor
		$E_1$	$E_2$	$E_3$	
B. Megaterium	Röntgen	0	ca. 1	-	(Webb, Ehret and Powers 1958)
T1-Phagen	2MeV Protonen	0	1	-	(Hermann 1965)
$\phi$ X-174-Phagen	2MeV Protonen	0	1	-	(diese Arbeit)
Ribonuklease	Elektronen	0	1,1	-	(Henriksen 1965)
"	"	0	1,06	6,1	(Fluke 1965)
"	2 MeV p, d	0	1	-	(W. Günther 1965)
Lysozym	Elektronen	0	1,2	6,6	(Henriksen 1965)
"	"	0	0,6	2,54	(Fluke 1965)
"	$^4\text{He}$ Ionen	0	1	5,0	(Henriksen 1965)
"	$^{12}\text{C}$ Ionen	0	1	4,0	( " " )
Trypsin	Elektronen	0	1,45	-	( " " )
"	$^4\text{He}$ Ionen	0	1,05	-	( " " )
"	$^2\text{D}$ Ionen	0	1,35	4,7	(Brustad 1964)
"	$^4\text{He}$ Ionen	0	1,35	5,2	( " " )
"	$^{12}\text{C}$ Ionen	0	1,0	3,9	(Henriksen 1965)
"	$^{12}\text{C}$ Ionen	0	1,15	4,2	(Brustad 1964)
"	$^{20}\text{Ne}$ Ionen	0	1,05	3,8	( " " )
"	$^{40}\text{A}$ Ionen	0	1,3	-	(Henriksen 1965)
"	$^{40}\text{A}$ Ionen	0	1,3	3,7	(Brustad 1964)

die ionisierende Strahlung kleine diffusible Radikale ( $H^\bullet$ ) gebildet werden, die bei zunehmender Temperatur mit steigender Wahrscheinlichkeit schädliche Sekundärreaktionen verursachen.

Neben diesen qualitativen Übereinstimmungen zeigt ein Vergleich der Temperatureffekte von T1 und  $\phi X-174$  (gemessen mit 2 MeV Protonen) auch quantitative Übereinstimmungen. So beträgt der temperaturabhängige Anteil bei T1  $\sim 35\%$  vom Gesamtwirkungsquerschnitt (gemessen bei  $300^\circ K$ ), bei  $\phi X-174$  beträgt die temperaturabhängige Komponente  $34\%$ . Dies gilt sowohl für cystaminbehandelte Phagen als auch für die Phagen ohne Schutzstoff. Auch die Schutzfaktoren, berechnet aus den  $D_{37}$  der Dosiseffektcurven, stimmen mit  $\sim 1,6$  für T1 und  $\phi X$  überein. Offenbar hat die Tatsache, ob einsträngig oder doppelsträngig, bei Bestrahlung trockener Proben keinen Einfluß auf die Größe des Temperatureffekts. Bestrahlt man dagegen in wässriger Suspension bzw. Eis, so ist der Temperatureffekt für T1 um einen Faktor von 2,2 größer als für  $\phi X-174$  (Hotz 1965). Es sind also für T1 offenbar zwei verschiedene temperaturabhängige Inaktivierungsmechanismen möglich. Im Trockenen ist es der gleiche, der ebenfalls den  $\phi X-174$  inaktiviert, während in wässriger Lösung zusätzlich noch ein anderer hinzutritt, bei dem die Doppelstrangnatur die dominierende Rolle spielt. Dieser zweite Mechanismus könnte z.B. darin bestehen, daß die durch Ionisation eines Komplementärstranges erzeugten H-Radikale, durch die flüssige Phase begünstigt, zum Nachbarstrang diffundieren und mit diesem in Sekundärreaktion treten (Hotz 1965). Im Trockenen sind derartige Vorgänge anscheinend behindert, so daß dann die temperaturabhängigen Reaktionen für T1 und  $\phi X-174$  nach einem für beide gemeinsamen Mechanismus, also vorwiegend an einem Strang ablaufen. Die Inaktivierung eines Zwei-strangphagen durch Läsion nur eines Stranges ist durchaus möglich, wenn man die Hypothese des "kritischen Treffbereichs" von Ginoza und Miller akzeptiert. Wie aber ist dieser Inaktivierungsmechanismus durch Schädigung nur eines Stranges zu denken? Im Kapitel über den Temperatureffekt wurde schon kurz erwähnt, daß die Nukleinsäurebasen bestrahlter Nukleoside durch den Zuckeranteil stark sensibilisiert werden, d.h. ihre Radikalausbeute wird - wahrscheinlich durch Anlagerung von Wasserstoffatomen, die vom Zucker stammen - stark erhöht. Interessanterweise ist diese Sensibilisierung der Base durch H-Radikale vom Zucker bei tiefer Temperatur ( $100^\circ K$ ) um einen Faktor 2 für Cytidin und Adenosin, und einen Faktor von 10 für Thymin kleiner als bei Zimmertemperatur (Müller 1964). Wenn diese Verhältnisse auch

für ganze Nukleinsäure gelten sollten, so kann der Temperatureffekt für beide Phagen im Trockenen mit diesem Mechanismus erklärt werden.

#### 4.8. Vergleich der Cystaminschutzeffekte von $\phi$ X-174 und T1

Aus den 37 %-Dosen der Tabelle 7 berechnen sich die Schutzfaktoren von T1 und  $\phi$ X-174, die durch Cystaminzugabe erreicht werden können, für T1 zu 2 und für  $\phi$ X-174 zu 1,3, gemessen mit 2 MeV Protonen. Dies gilt sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei tiefer Temperatur ( $\sim 110^\circ$  K). Damit ist der Cystaminschutz gegen die Inaktivierung des Zweistrangphagen T1 signifikant größer als die Cystaminwirkung gegen die Inaktivierung des Einstrangphagen  $\phi$ X-174. Dementsprechend wird der Inaktivierungsquerschnitt von T1 durch Cystamin um  $\sim 50\%$ , der von  $\phi$ X-174 um nur  $\sim 22\%$  herabgesetzt. Abb. 17 zeigt die größere Schutzstoffabhängigkeit der T1-Werte in graphischer Darstellung. Da in der Literatur bisher keine Erklärung für diesen Befund vorliegt, soll ein rein spekulativer Deutungsversuch der Ergebnisse angeführt werden.

Nach der H-Donatorhypothese entsteht der schutzstoffabhängige Strahlenschaden nach einem Mechanismus, der in Gleichung (28) dargestellt ist. Das Radikal  $R^\bullet$  wird dann durch den Schutzstoff restituiert. Die Bildung des Radikals  $R^\bullet$  sollte sowohl für T1 als auch für  $\phi$ X-174 pro Volumeneinheit gleich häufig sein. Man kann sich allerdings vorstellen, daß bei  $\phi$ X-174 im Anschluß an die Radikalbildung eine Sekundärreaktion abläuft, die in einem Bruch der einsträngigen DNS-Kette bestehen könnte und darum nicht mehr cystaminreparabel ist. Der Kettenbruch sollte wegen der größeren Instabilität der schon lädierten Einstrang-Kette besonders begünstigt sein.

#### 4.9. Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren

In Tabelle 9 sind die 37 %-Werte für die Inaktivierung von  $\phi$ X-174, gemessen mit 2 MeV Protonen, zusammen mit den Ergebnissen anderer Autoren aufgeführt.

Bei Zimmertemperatur ( $300^\circ$  K) ist die mit 2 MeV Protonen gemessene 37 %-Dosis um einen Faktor von 2 größer als die mit  $\text{Co}^{60}$ - $\gamma$ -Strahlen und Röntgenstrahlen gemessenen Werte. Bei tiefer Temperatur von  $80^\circ$  K dagegen unterscheiden sich die  $D_{37}$ -Werte nicht sehr, besonders wenn man berücksichtigt, daß der für Protonen angegebene Wert für  $80^\circ$  K nicht experimentell bestimmt, sondern nur ungenau nach Gleichung (21)

Tabelle 9: Vergleich der 37 %-Dosen verschiedener Autoren für die Inaktivierung trockener  $\phi$ X-174-Bakteriophagen.

Strahlenart	Temperatur	$D_{37}$	Autor
Röntgenstr.	Zimmertemperatur	390 kR	Ginoza 1963
Gammastr.	"	400 krad	eigene Messung
"	"	440 kR	Hotz 1965
2 MeV p	"	880 krad	eigene Messung
Schwere Ionen*	"	$\approx$ 800 krad	Schambra und Hutchinson 1964
Gammastr.	80° K	1070 kR	Hotz 1965
2 MeV p	80° K	1390 krad	eigene Messung

\* Aus den von Schambra und Hutchinson bestimmten Werten wurde die angegebene Zahl durch Interpolation bei einem LET von  $1,7 \cdot 10^8$  eV  $\text{cm}^2/\text{g}$  erhalten.

extrapoliert wurde, da aus technischen Gründen nur bis zu einer Temperatur von  $110^{\circ}$  K gemessen werden konnte. Die Diskrepanz der Werte bei Zimmertemperatur ist durch den unterschiedlichen LET-Wert der verwendeten Strahlungen verursacht. So konnten Schambra und Hutchinson (1964) für  $\phi$ X-174 zeigen, daß die  $D_{37}$  im Bereich zwischen  $10^7$  und  $10^9$  eV-cm<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> linear ansteigt. Für den LET-Wert der 2 MeV Protonen von  $1,7 \cdot 10^8$  eV-cm<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> berechnet sich unter Zugrundelegung der Schambra'schen Werte eine  $D_{37}$  von  $\sim 800$  krad, was innerhalb der Fehlergrenzen mit unserer Messung übereinstimmt.

### 5. Zusammenfassung

1. Mit 2 MeV Protonen wurde die Temperaturabhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts von trockenen  $\phi$ X-174-Bakteriophagen mit und ohne Schutzstoffzugabe im Bereich zwischen  $110$  und  $300^{\circ}$  K gemessen. Zwischen Inaktivierungsquerschnitt  $\sigma$  und Temperatur T wurde ein Zusammenhang gefunden, der im Rahmen der Meßgenauigkeit zunächst linear erscheint, auf Grund genauerer Analyse jedoch durch die Gleichung

$$\sigma = 1,9 [1 + 3,0 \exp (-1 \text{ kcal/RT})] \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$$

darzustellen ist. Der Wert von  $\sigma$  wird durch Cystaminzugabe um einen Faktor von 0,79 verkleinert, der Temperatureffekt aber durch den Schutzstoff nicht beeinflußt. Damit fanden wir in Übereinstimmung mit Messungen an Bakteriensporen, verschiedenen Enzymen und dem T1-Bakteriophagen auch für  $\phi$ X-174 eine temperaturabhängige und eine temperaturunabhängige Komponente des Inaktivierungsquerschnitts mit einer Aktivierungsenergie von  $\sim 1$  kcal/mol. Mit großer Wahrscheinlichkeit hat damit die Nukleotidkettenanzahl keinen Einfluß auf den Temperatureffekt.

2. Es wurde weiterhin der Schutzeffekt des Strahlenschutzstoffes Cystamin auf die Inaktivierung von  $\phi$ X-174 untersucht, der sich mit  $p = 1,3$  als signifikant kleiner erwies als der des zum Vergleich herangezogenen Zweistrangphagen T1 ( $p = 2$ ). Zur Erklärung des Wirkungsmechanismus wurde eine Hypothese (Pryor 1964) herangezogen, die die Schutzwirkung von Disulfiden durch Thioätherbildung erklärt.

3. Die Strahlenempfindlichkeit trockener  $\phi$ X-174 fanden wir 18 mal (bei Zimmertemperatur) bzw. 35 mal (bei  $110^{\circ}$  K und Cystaminzugabe) größer als die des Zweistrangphagen T1. Dies führten wir darauf zurück,

daß bei  $\phi$ X-174 die genetische Information nur in einfacher Ausführung vorliegt und daher biologische Reparationsmechanismen erschwert werden, was in einer Wirkungswahrscheinlichkeit einer Primärionisation von nahezu 1 zum Ausdruck kommt.



Literaturverzeichnis

- Adams, M.H.: Bacteriophages, Interscience Publish. Inc., New York, 1959.
- Alexander, P., and Charlesby, A.: Physico-chemical methods of protection against ionizing radiation, in: "Radiobiology Symposium 1954", (ed. Z.M. Bacq and P. Alexander) Butterworth, London (1955).
- Alexander, P., Lett, J.T., and Itzhaki, R.: Degradation of dry deoxyribonucleic acid by polonium alpha-particles, Rad. Res. 14, 363 (1961).
- Alexander, P., and Stacey, K.A.: Cross-linking of deoxyribonucleic acid in sperm heads by ionizing radiations, Nature 184, 958 (1959).
- Boyce, R.P., and Howard-Flanders, P.: Genetic control of DNA breakdown and repair in E.coli K 12 treated with mitomycin C or ultraviolet light, Z. Vererbungslehre 95, 345 (1964).
- Braams, R.: A mechanism for the direct action of ionizing radiations, Nature 200, 752 (1963).
- Bresch, C.: Unterscheidung verschiedener Bakteriophagentypen durch Farbindikatornährböden, Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene I Org. 159, 47 (1952).
- Butler, J.A.V.: The action of ionizing radiations on biological materials, facts and theories, Rad. Res. 4, 20 (1956).
- Charlesby, A., Garrat, P.G., and Kopp, P.M.: The use of sulphur as a protecting agent against ionizing radiations, Int. J. Rad. Biol. 5, 439 (1962).
- Cole, T., and Silver, A.H.: Production of hydrogen atoms in teeth by X-irradiation, Nature 200, 700 (1963).
- Dewey, D.L.: The X-ray sensitivity of Serratia marchescens, Rad. Res. 19, 64 (1963).
- Ehrenberg, A., Ehrenberg, L., and Löfroth, G.: Thymidine-like electron spin resonance spectra in gamma-irradiated deoxyribonucleic acid, Nature 200, 376 (1963).
- Ellis, E.L., and Delbrück, M.: The growth of bacteriophage, J. Gen. Physiol. 22, 365 (1939).
- Franck, I., and Rabinowitsch, E.: Some remarks about free radicals and the photochemistry of solutions, Trans. Farad. Soc. 30, 120 (1934).

- Freifelder, D.: Mechanism of inactivation of coliphage T7 by X-rays, Proc. Nat. Ac. Sci. 54, 128 (1965).
- Garrat, P.G., and Ormerod, M.G.: Radiation protection by sulphur in a model system, Int. J. Rad. Biol. 6, 281 (1963).
- Ginoza, W.: Radiosensitive molecular weight of single-stranded virus nucleic acids, Nature 199, 453 (1963).
- Ginoza, W., and Miller, R.C.: Kinetics of X-ray and heat inactivation of  $\phi$ X-174 RF-DNA, Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 551 (1965).
- Gordy, W., Pruden, B., and Snipes, W.: Some radiation effects on DNA and its constituents, Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 53, 751 (1965).
- Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie, 8. Aufl., Schwefel, Teil A, S. 485, Verlag Chemie GmbH., Weinheim, Bergstraße, 1953.
- Hagen, U.: Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der Desoxyribonukleinsäure. II. Die Länge der Nukleotidketten nach Bestrahlung in vitro, Strahlentherapie 124, 428 (1964).
- Handbuch der präparatonischen anorganischen Chemie, 1. Band, S. 312, Herausg. G. Brauer, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1960).
- Hart, E.J., and Platzman, R.L.: Radiation Chemistry. In: Mechanisms in Radiobiology I. General Principles p. 98 (ed. M. Errera and A. Forssberg) Academic Press, New York and London (1961).
- Henriksen, T.: Free radical induced in enzymes by electrons and heavy ions, Workshop Conference on Space Radiation Biology-Berkeley, University of California, UCRL-16358 (1965).
- Henriksen, T., Sanner, T., and Fihl, A.: Transfer of radiation-induced unpaired spins from protein to sulfur compounds, Rad. Res. 18, 163 (1963).
- Hermann, K.O.: Untersuchungen der Wirkung von Protonenstrahlen auf T1-Bakteriophagen. Dissertationsschrift, Heidelberg (1965).
- Hotz, G.: Chemische und physikalische Beeinflussung der Strahlenwirkung auf Coliphagen. Habilitationsschrift, Technische Hochschule Karlsruhe (1965).
- Hotz, G., and Zimmer, K.G.: Experiments in radiation chemistry of T1-phage, Int. J. Rad. Biol. 7, 75 (1963).

- Jen, C.K., Fouer, S.N., Cochran, E.L., and Bowers, V.A.: Electron spin resonance of atomic and molecular free radicals trapped at liqued helium temperature, *Phys. Rev.* 112, 1169 (1958).
- Jung, H.: Untersuchungen zur chemischen und biologischen Wirksamkeit langsamer Protonen, Dissertationsschrift, Heidelberg (1964).
- Kopp, P.M., and Charlesby, A.: Further investigations into the protection of aqueous polymer solutions by colloidal sulphur, *Int. J. Rad. Biol.* 9, 383 (1965).
- Lea, D.E.: Action of radiation on living cells, Univ. Press, Cambridge (1946).
- Luria, S.E., and Latarjet, R.: Ultraviolet irradiation of bacteriophage during intracellular growth. *J. Bacteriol.* 53, 149 (1947).
- Müller, A.: Spektrographische Untersuchungen mittels paramagnetischer Elektronenresonanz über die Wirkung ionisierender Strahlen auf elementare biologische Objekte. Abhandl. Akademie der Wissenschaften u. d. Literatur, Math. Naturwiss. Klasse, Mainz, Jahrg. 1964.
- Patten, R.A., and Gordy, W.: Electron spin resonance investigations of radiation-induced free radicals in DNA and RNA at low temperatures: Effects of water. *Nature* 201, 361 (1964).
- Pershan, P.S., Shulman, R.G., Wyluda, B.J., and Eisinger, J.: Electron spin resonance of irradiated DNA. *Physics* 1, 163 (1964).
- Prévot-Bernas, A.: Agents de transfert de protection chimique contre les rayonnements ionisants, *J. Chim. Phys.* 50, 445 (1953).
- Pryor, W.A., and Guard, H.: Walden inversion by radicals. The reaction of phenyl radicals with disulfides, *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1150 (1964).
- Rauth, A.L., and Hutchinson, F.: Distribution in energy of the primary energy loss events of electrons in condensed media. In: "Biological Effects of Ionizing Radiation at the Molecular Level", p. 25, IAEA, Vienna 1962.
- Salovey, R., Shulman, R.G., and Walsh, W.M. jr.: Electron spin resonance of irradiated DNA, *J. Chem. Phys.* 30, 839 (1963).
- Schambra, P.E., and Hutchinson, F.: The action of fast heavy ions on biological material. II. Effects on T1 and  $\phi$ X-174 bacteriophage and double-strand and single-strand DNA., *Rad. Res.* 23, 514 (1964).

- Semjonow, N.N.: Einige Probleme der chemischen Kinetik und Reaktionsfähigkeit. Akademie Verlag, Berlin (1961).
- Setlow, R.B., and Carrier, M.L.: The disappearance of thymin dimers from DNA: An error correcting mechanism, Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 51, 226 (1964).
- Shields, H., and Gordy, W.: Electron spin resonance studies of radiation damage to the nucleic acid and their constituents, Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 45, 269 (1959).
- Sinsheimer, R.L.: A single-stranded deoxyribonucleic acid from bacteriophage  $\phi$ X-174, J. Mol. Biol. 1, 43 (1956).  
Purification and properties of bacteriophage  $\phi$ X-174, J. Mol. Biol. 1, 37 (1959).
- Stent, G.S.: Molecular Biology of Bacterial Viruses, W.H. Freeman and Co., San Francisco and London (1963).
- Stent, G.S., and Fuerst, C.R.: Inactivation of bacteriophages by decay of incorporated radioactive phosphorus, J. Gen. Physiol. 38, 441 (1955).  
Genetic and physiological effects of the decay of incorporated phosphorus in bacterial viruses and bacteria. Adv. Biol. Med. Physics 7, 1 (1960).
- Tessmann, J.: Some unusual properties of the nucleic acid of bacteriophages S 13 and  $\phi$ X-174, Virology 7, 263 (1959).
- Tessmann, J., Tessmann, E.S., and Stent, G.S.: The relative radiosensitivity of bacteriophages S 13 and T2, Virology 4, 209 (1957).
- Voevodskii, V.V., and Molin, YU.N.: On the radiation stability of solid organic compounds, Rad. Res. 17, 366 (1962).
- Webb, R.B., Powers, E.L., and Ehret, C.F.: Thermorestitution of radiation damage in dry bacterial spores. Rad. Res. 12, 683 (1960).
- Zimmer, K.G.: Evidence for free-radical production in living cells exposed to ionizing radiation, Rad. Res. Suppl. 1, 519 (1959).
- Zimmer, K.G.: Studien zur quantitativen Strahlenbiologie, Abhandl. Akademie der Wissenschaften u.d. Literatur, Math. Naturwiss. Klasse, Mainz, Jahrg. 1960.
- Zimmer, K.G.: Quantitative Strahlenbiologie - ein aktueller Zweig der Grundlagenforschung, Therapie d. Monats 13, 102 (1963).

Abb. 1: Dichteverteilung von  $\Phi X-174$  und  $\Phi X-174$  m (nach 20-stündiger Zentrifugation im CsCl Dichtegradienten bei 134 000 g).

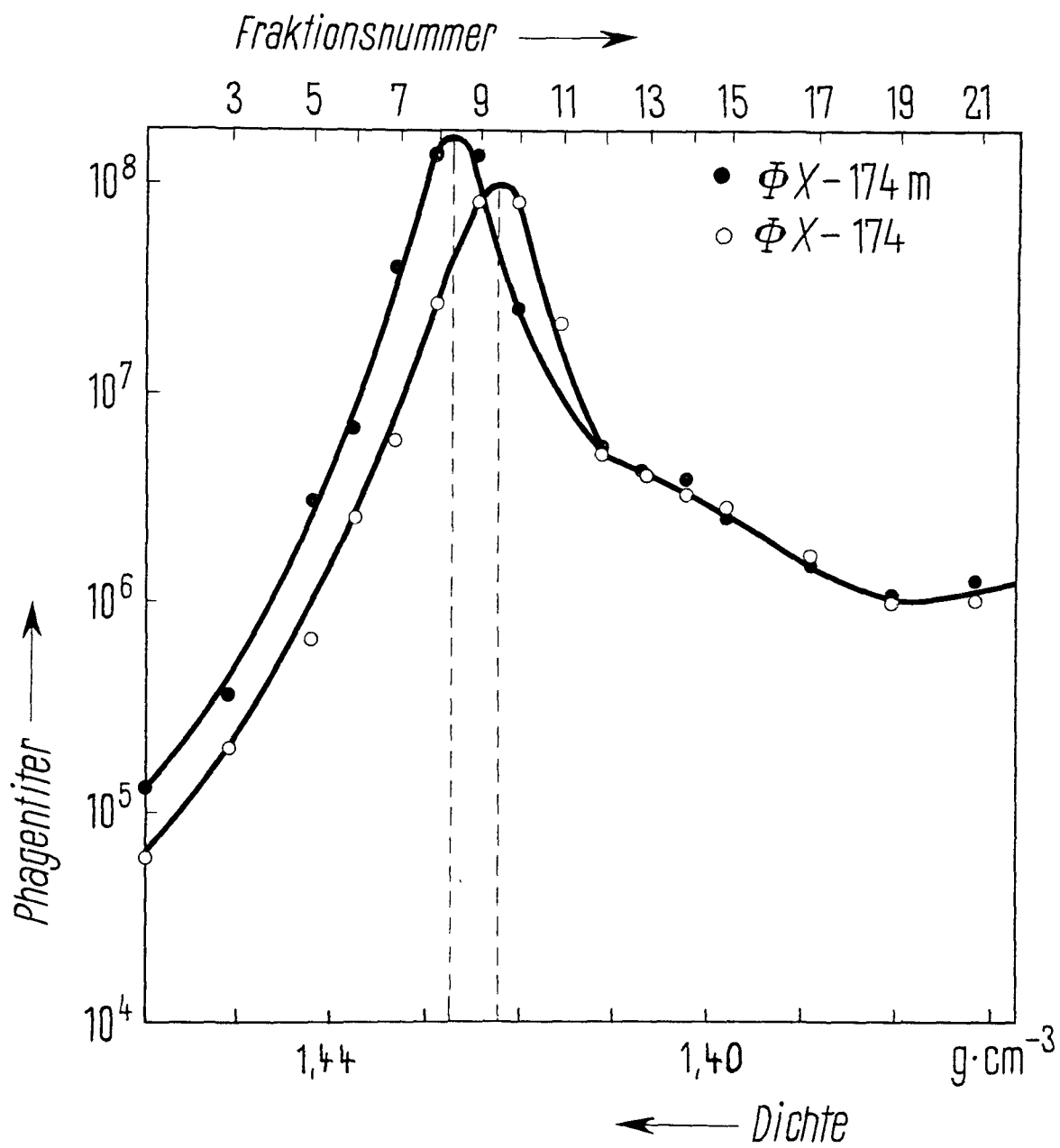


Abb. 2: Inaktivierung von  $\phi$ X-174 und  $\phi$ X-174 m durch 2 MeV Protonen.

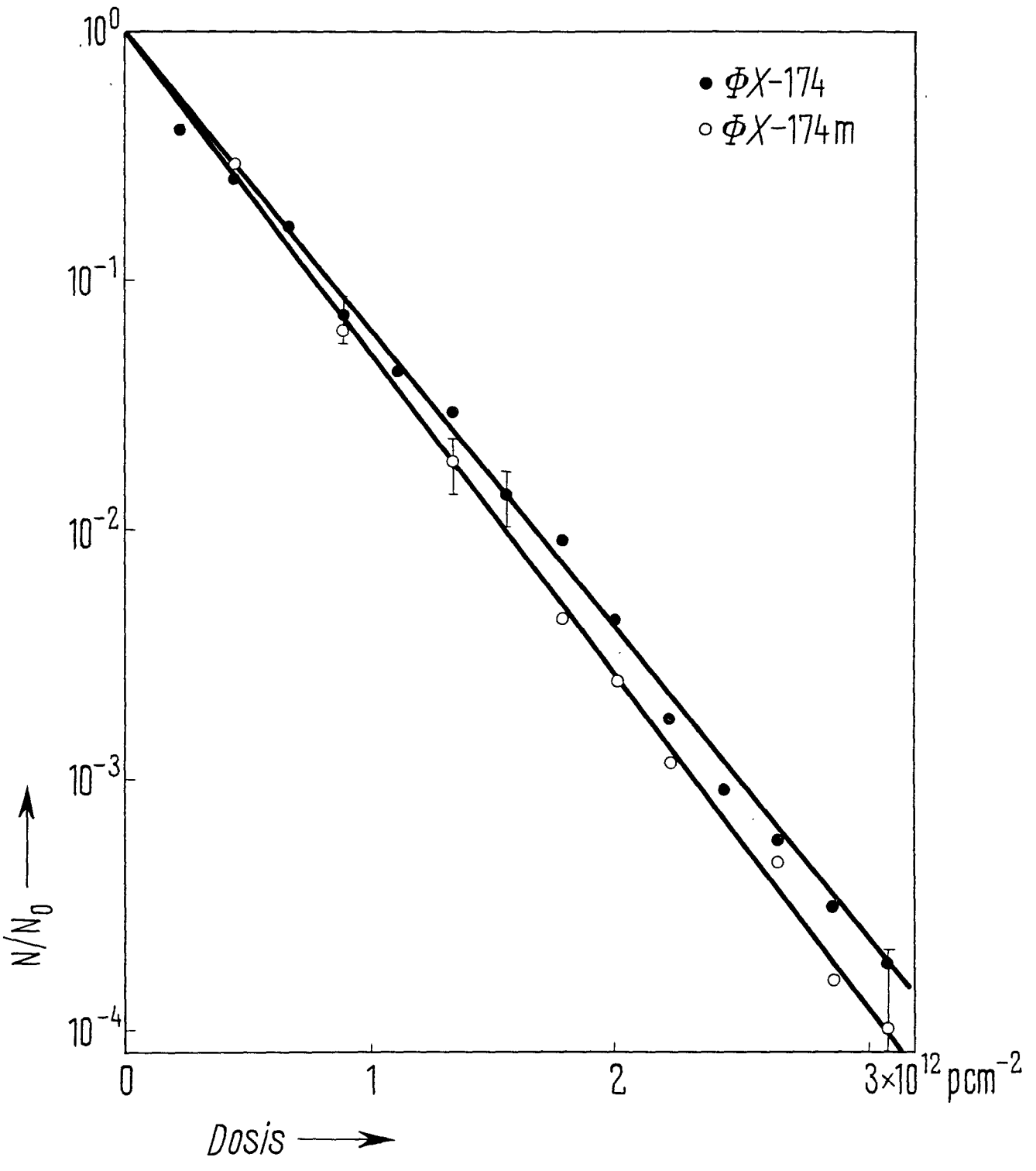




Abb. 3: Inaktivierung von  $\phi X-174$  und  $\phi X-174$  m durch Gammastrahlen.  
Gestrichelte Kurve nach Hotz (1965).

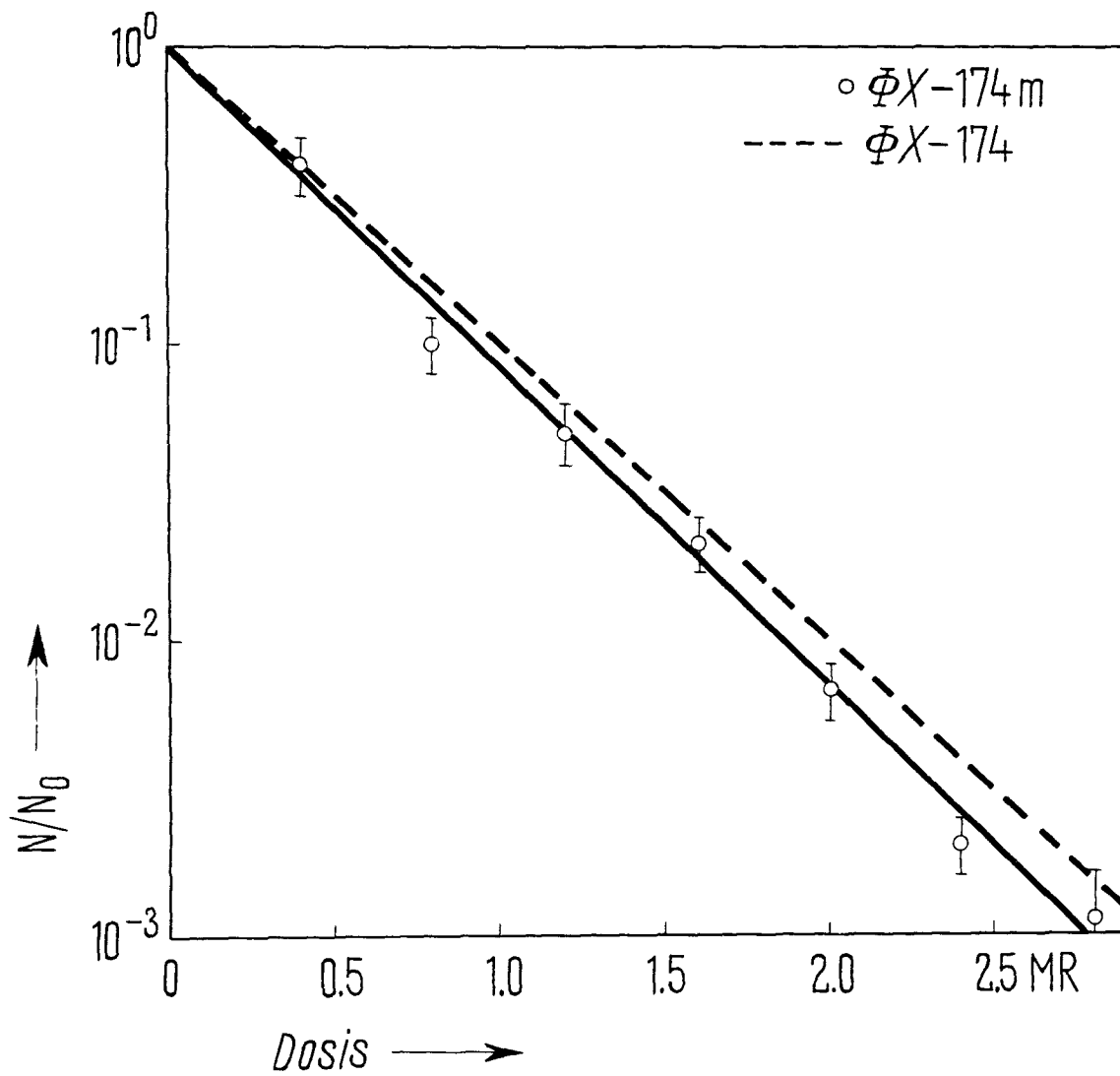


Abb. 4: UV-Inaktivierung von  $\phi X-174$  und  $\phi X-174$  m.

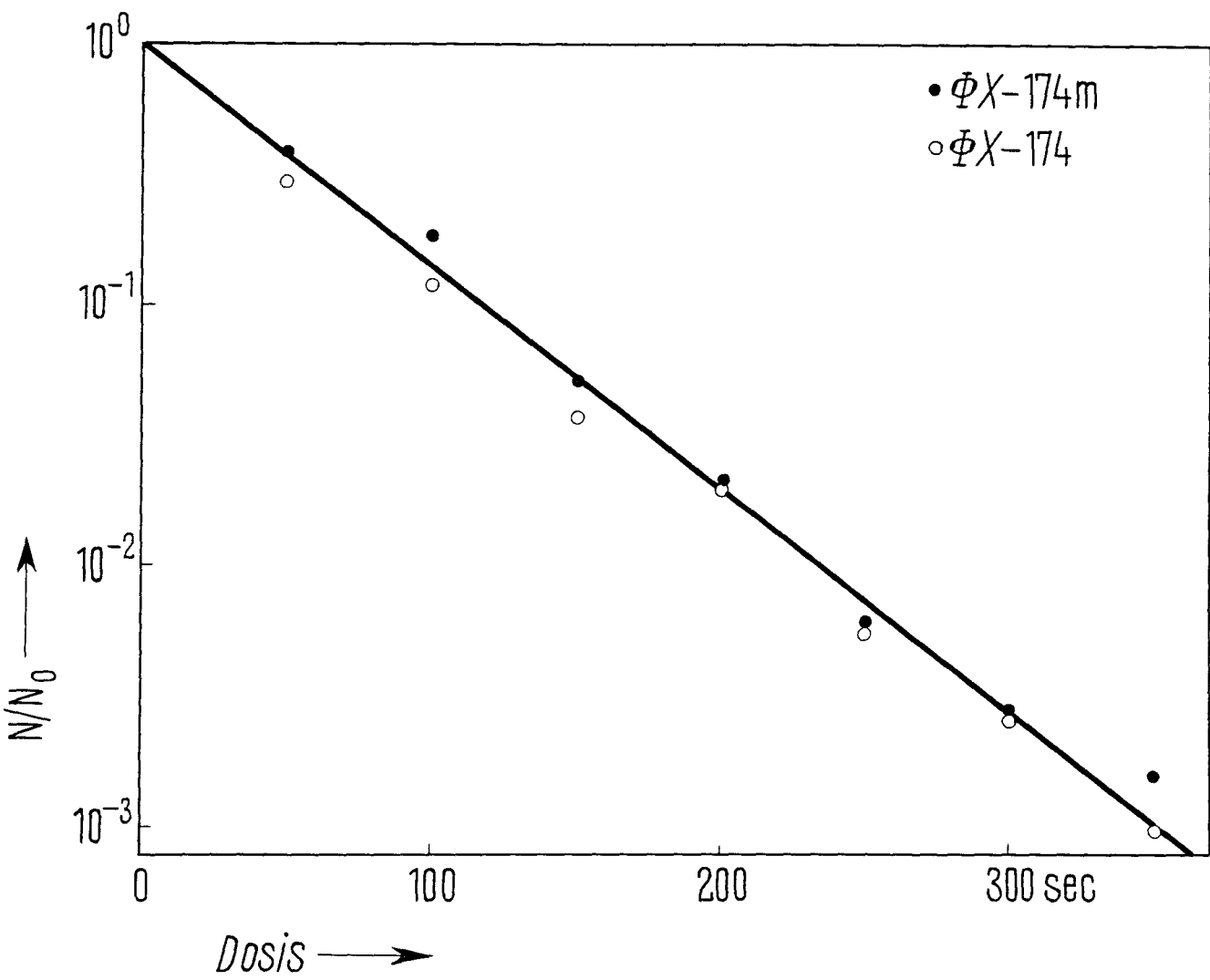


Abb. 5: Versuchsanordnung

(B)	Beschleuniger	(V)	Vakuumventil
(mGH 300)	Diffusionspumpe	(Am)	Ablenkmagnet
(S)	Energiedefinierendes Schlitzsystem	(F)	Folienhalter mit Strahlverschluß
(PL 15)	Leyboldpumpstand PL 15	(K)	Bestrahlungskammer

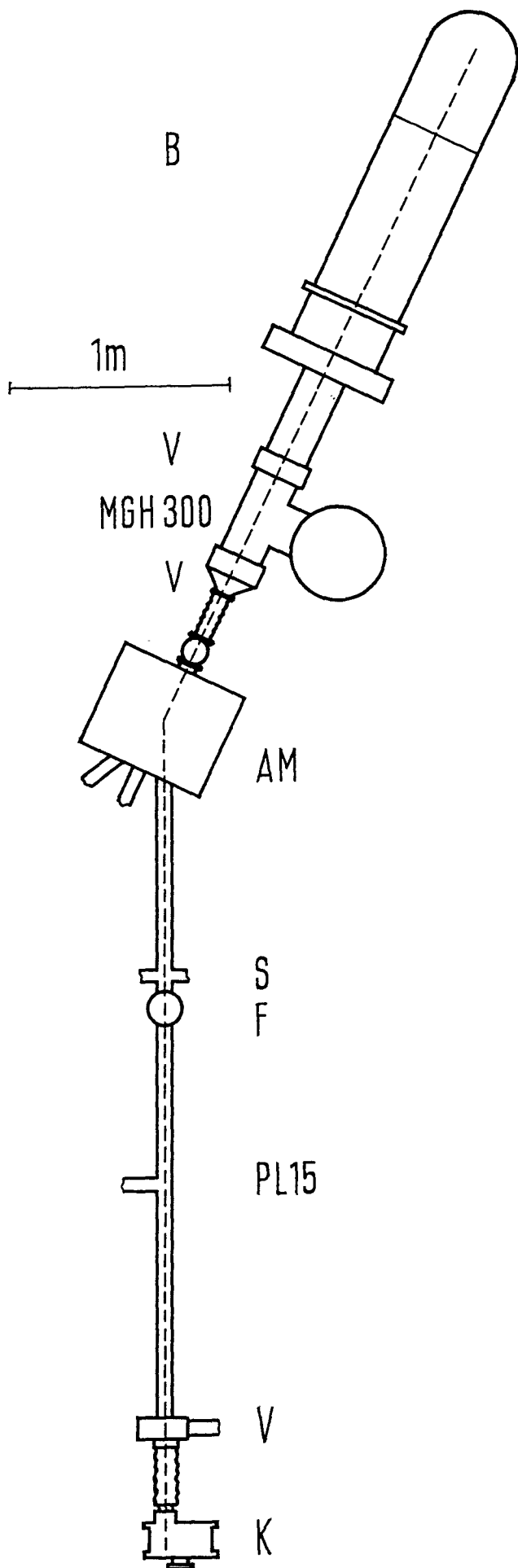
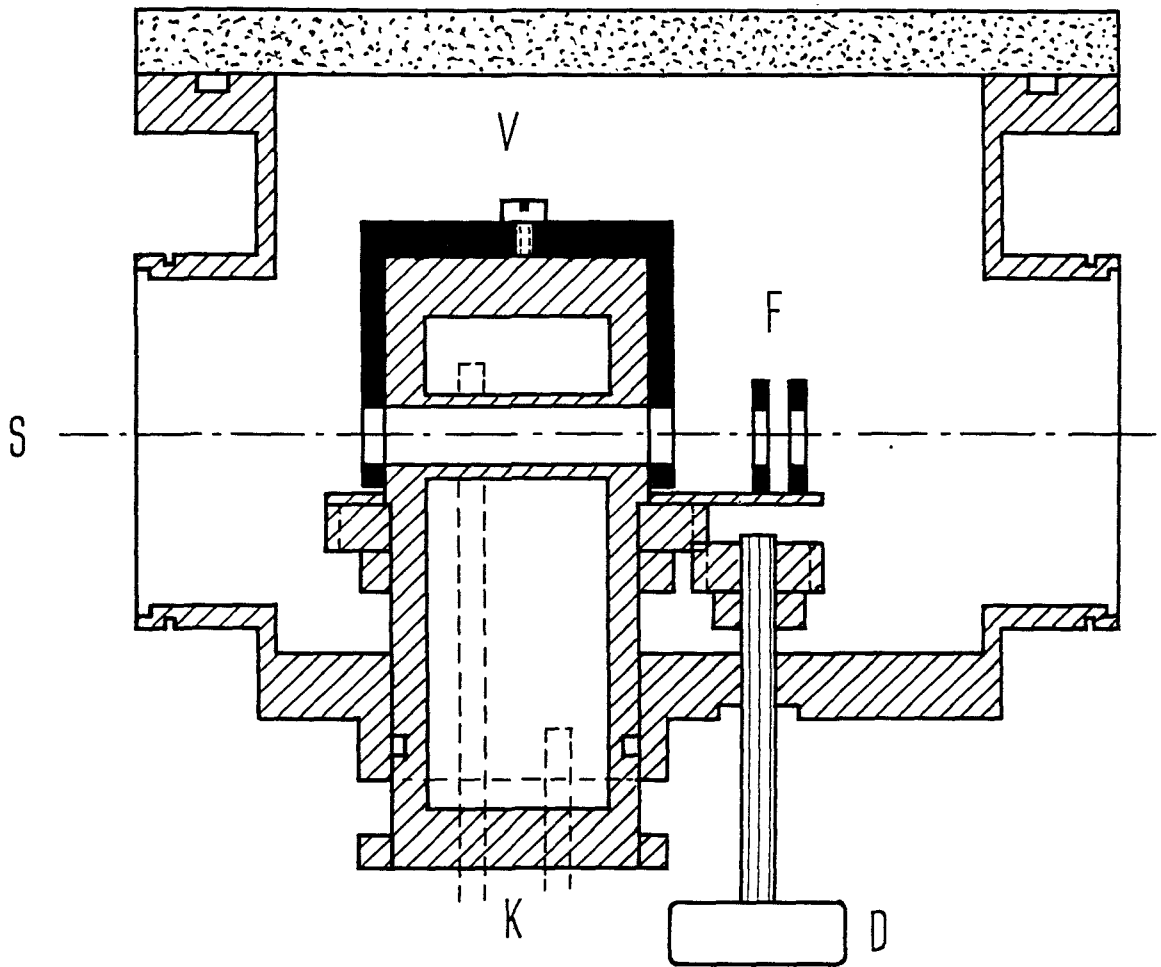


Abb. 6: Folienhalter mit Strahlverschluß

- |                         |  |
|-------------------------|--|
| (S) Strahlachse         | (F) Folienhalter                         |
| (V) Verschluß           | (D) Drehknopf zum Wechseln<br>der Folien |
| (K) Kühlwasserzuführung |  |



 *Glas*

 *Stahl*

 *Aluminium*

 *Messing*






10cm





Abb. 7: Bestrahlungskammer

- |                  |                      |
|------------------|----------------------|
| (S) Strahlachse  | (B) Eintrittsblenden |
| (K) Kühlfalle    | (E) Kühlmittleinlaß  |
| (R) Abdeckplatte | (D) Probenhalter     |
| (P) Proben       | (T) Thermoelement    |
|                  | (F) Absaugstutzen    |

-  V2A
-  Messing
-  Aluminium
-  Teflon
-  PVC

10 cm

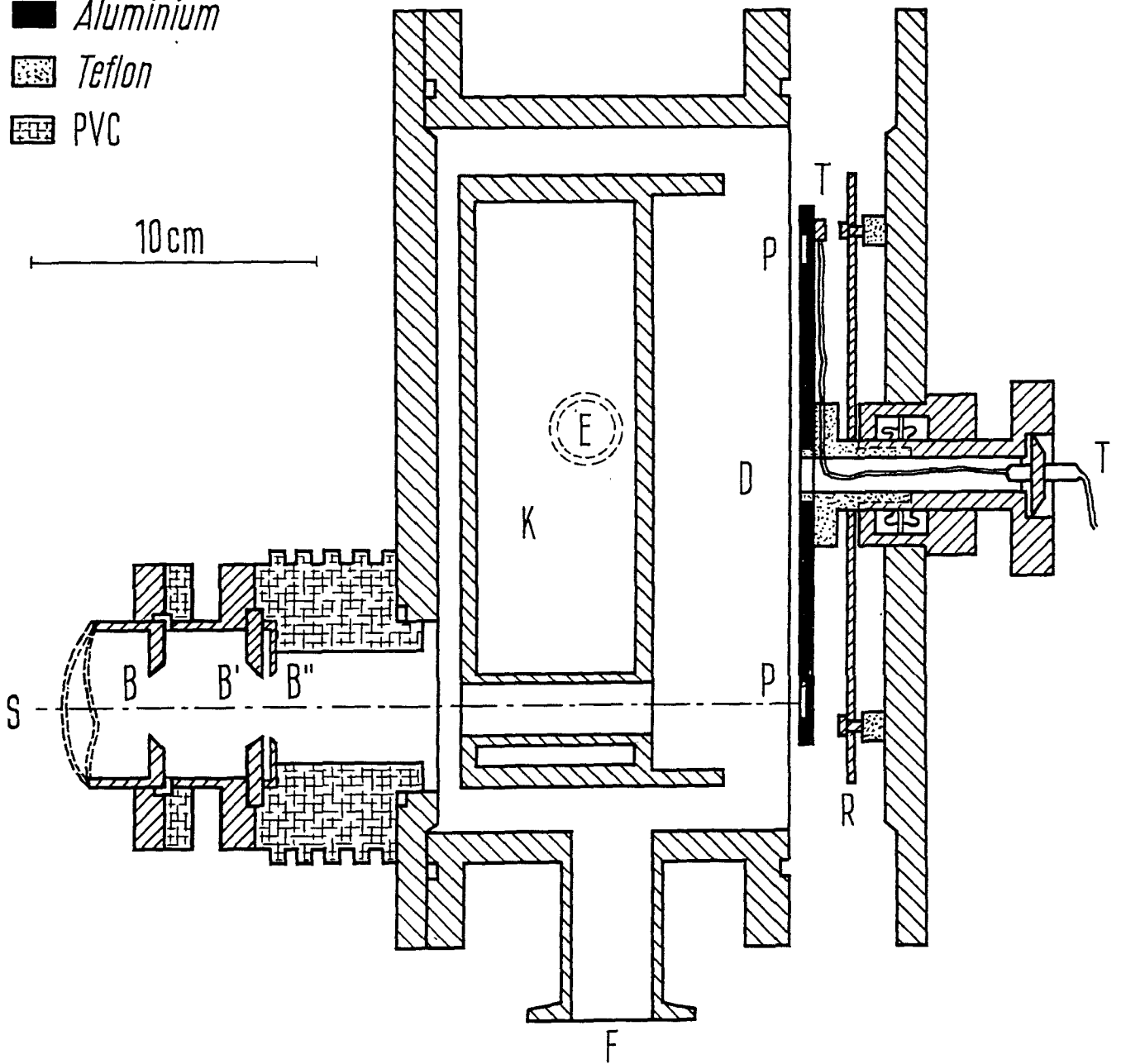
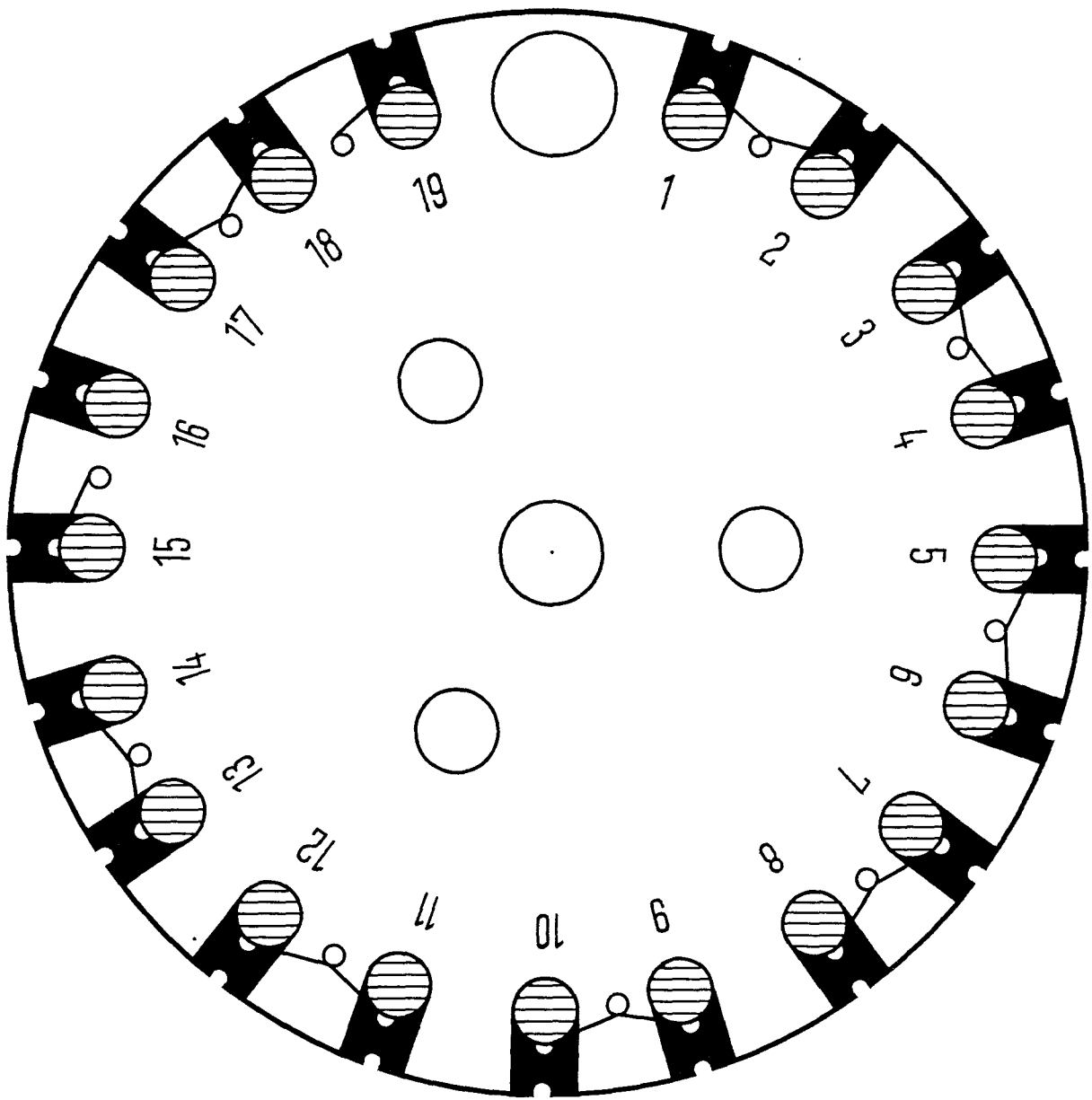


Abb. 8: Probenhalter



 *Goldplättchen*

5cm

Abb. 9: Inaktivierung von  $\phi$ X-174-Bakteriophagen durch 2 MeV Protonen bei verschiedenen Temperaturen.

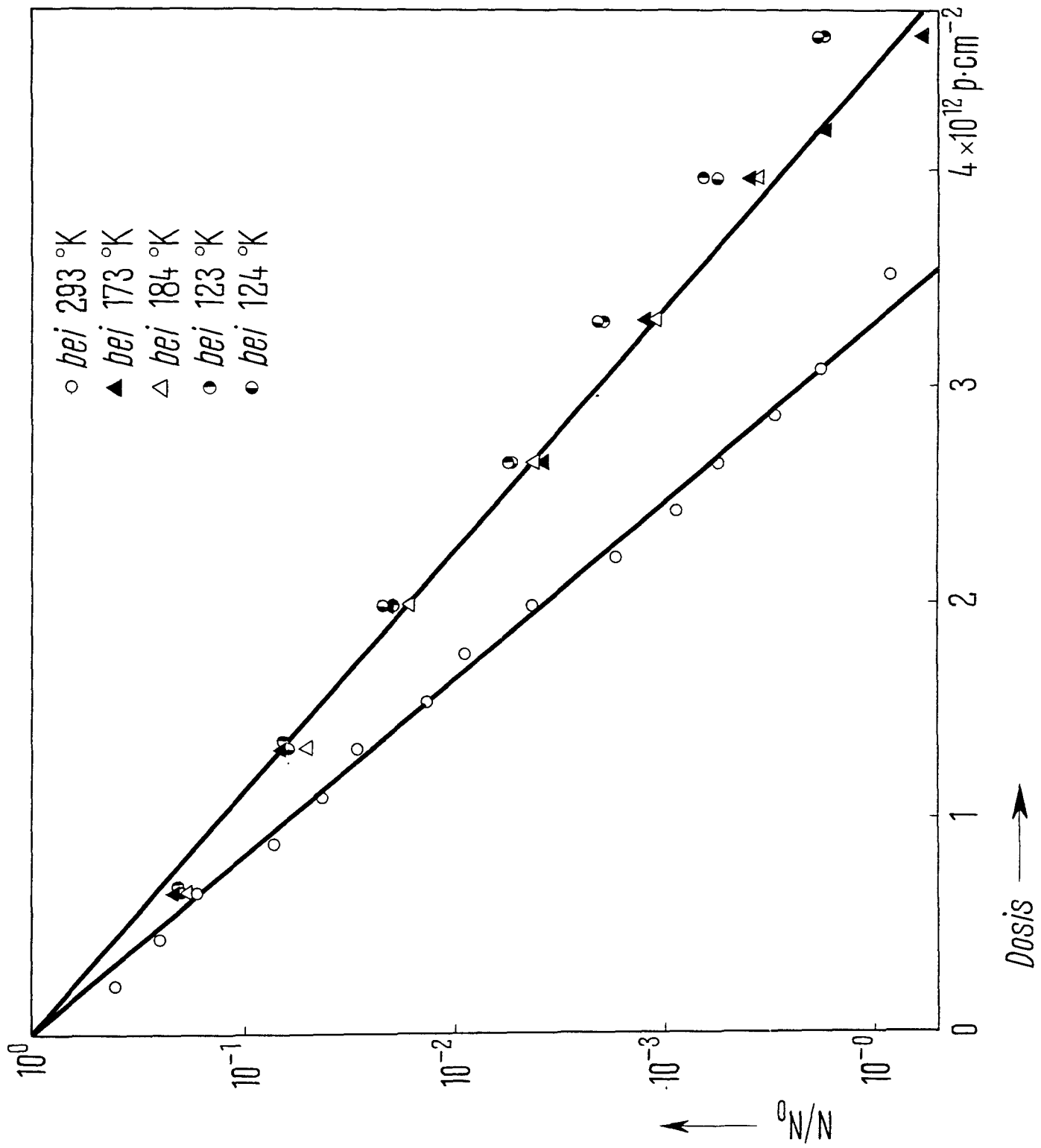


Abb. 10: Inaktivierung von  $\phi$ X-174-Bakteriophagen bei Zimmertemperatur bei verschiedenen Schutzstoffkonzentrationen.

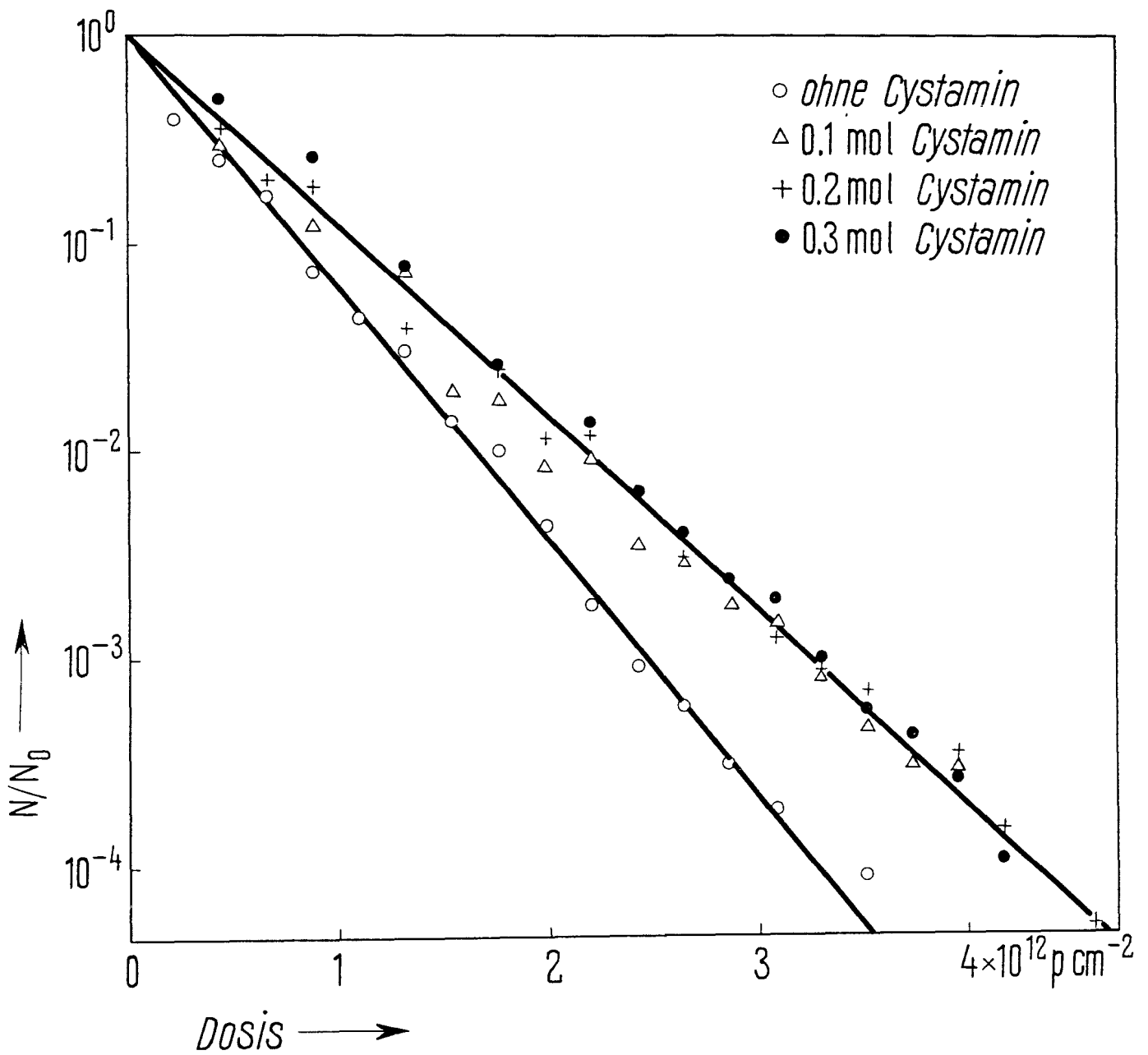




Abb. 11: Inaktivierung von  $\phi X-174$ -Bakteriophagen durch 2 MeV Protonen unter Zusatz von Cystamin bei verschiedenen Temperaturen.

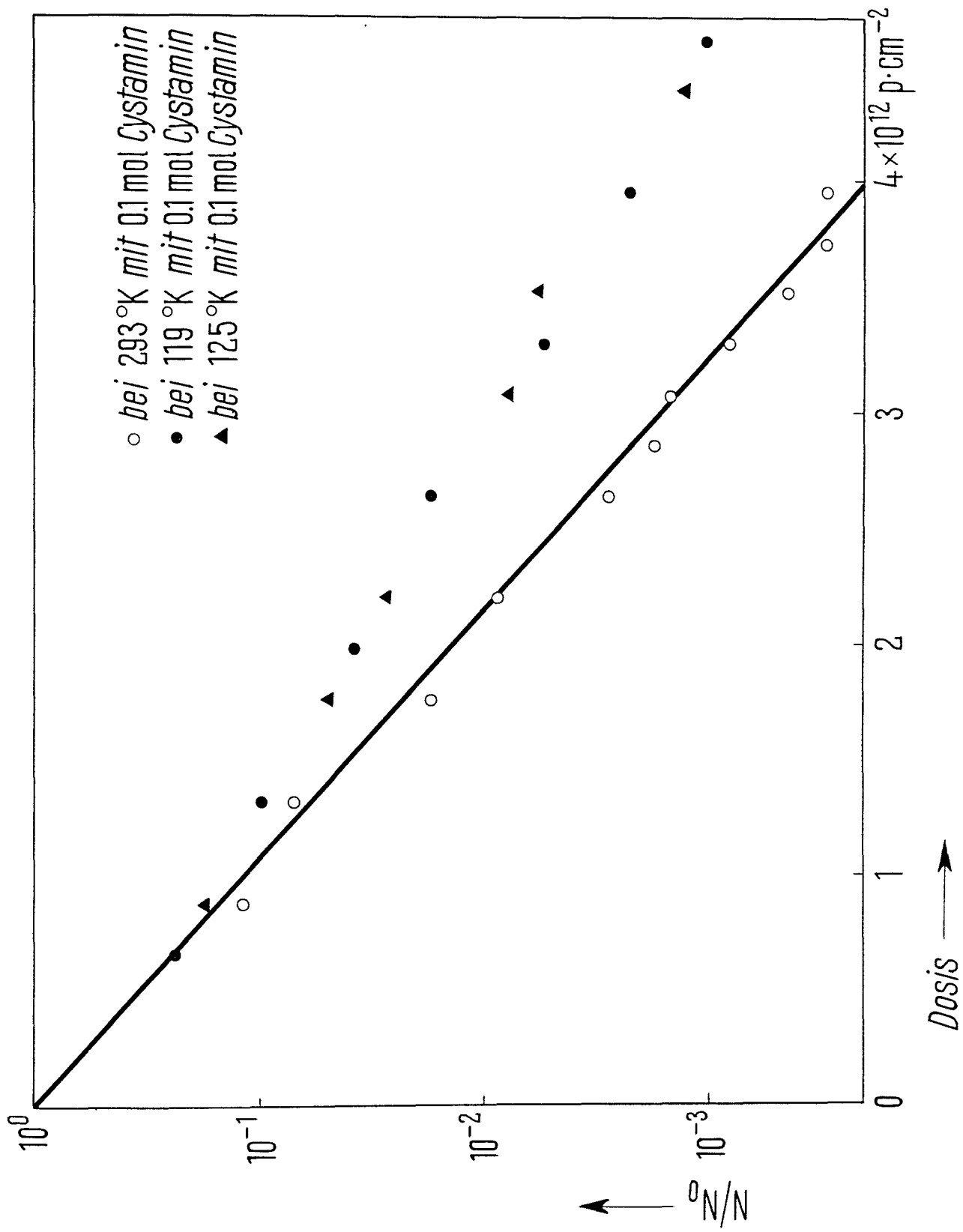


Abb. 12: Verlauf des Inaktivierungsquerschnittes für  $\phi$ X-174-Bakteriophagen mit der Temperatur, gemessen mit 2 MeV Protonen mit und ohne Schutzstoffzusatz.

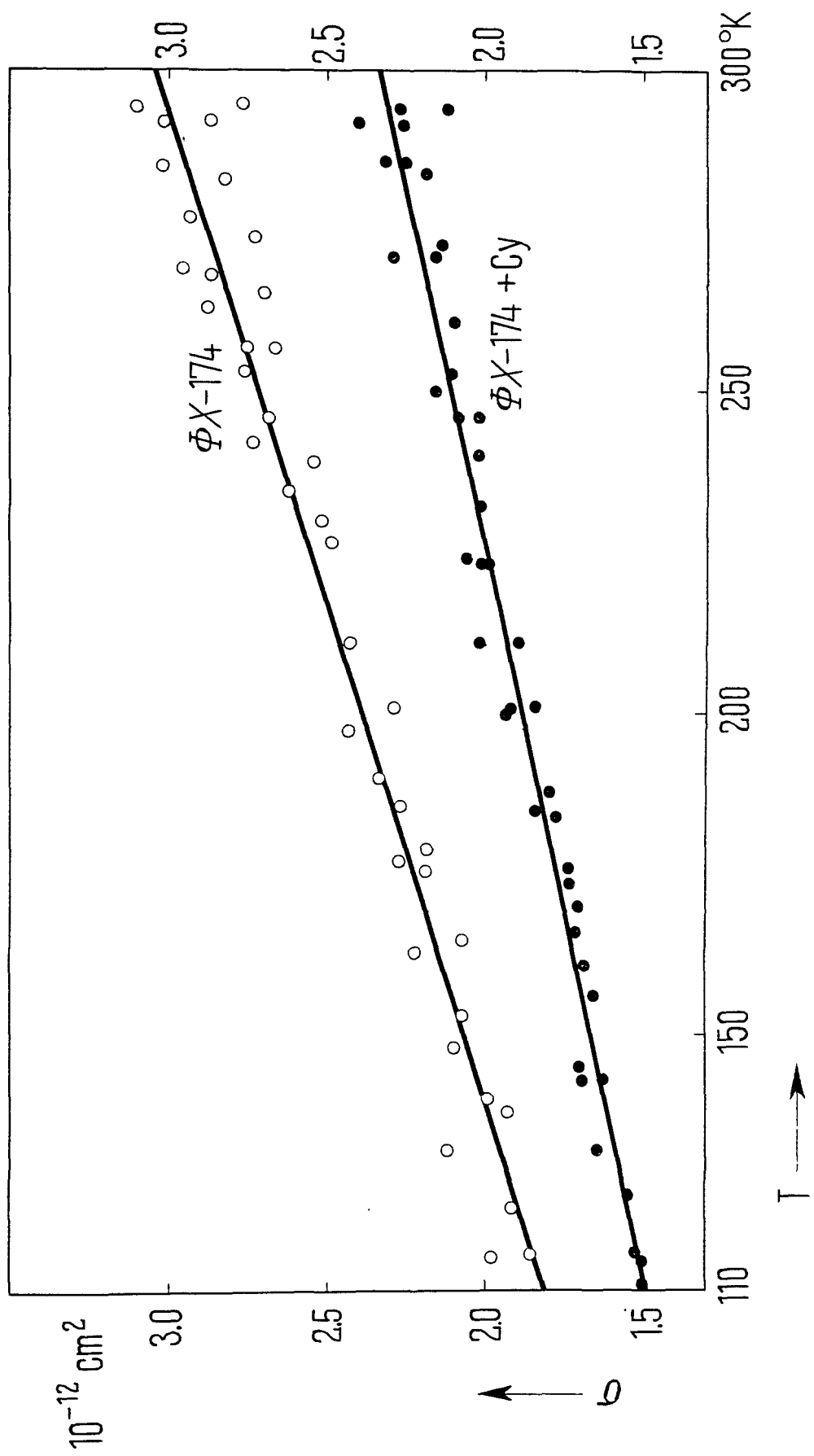


Abb. 13: Inaktivierung von T1-Bakteriophagen durch 2 MeV  
Protonen mit und ohne Zugabe von kolloidalem Schwefel.

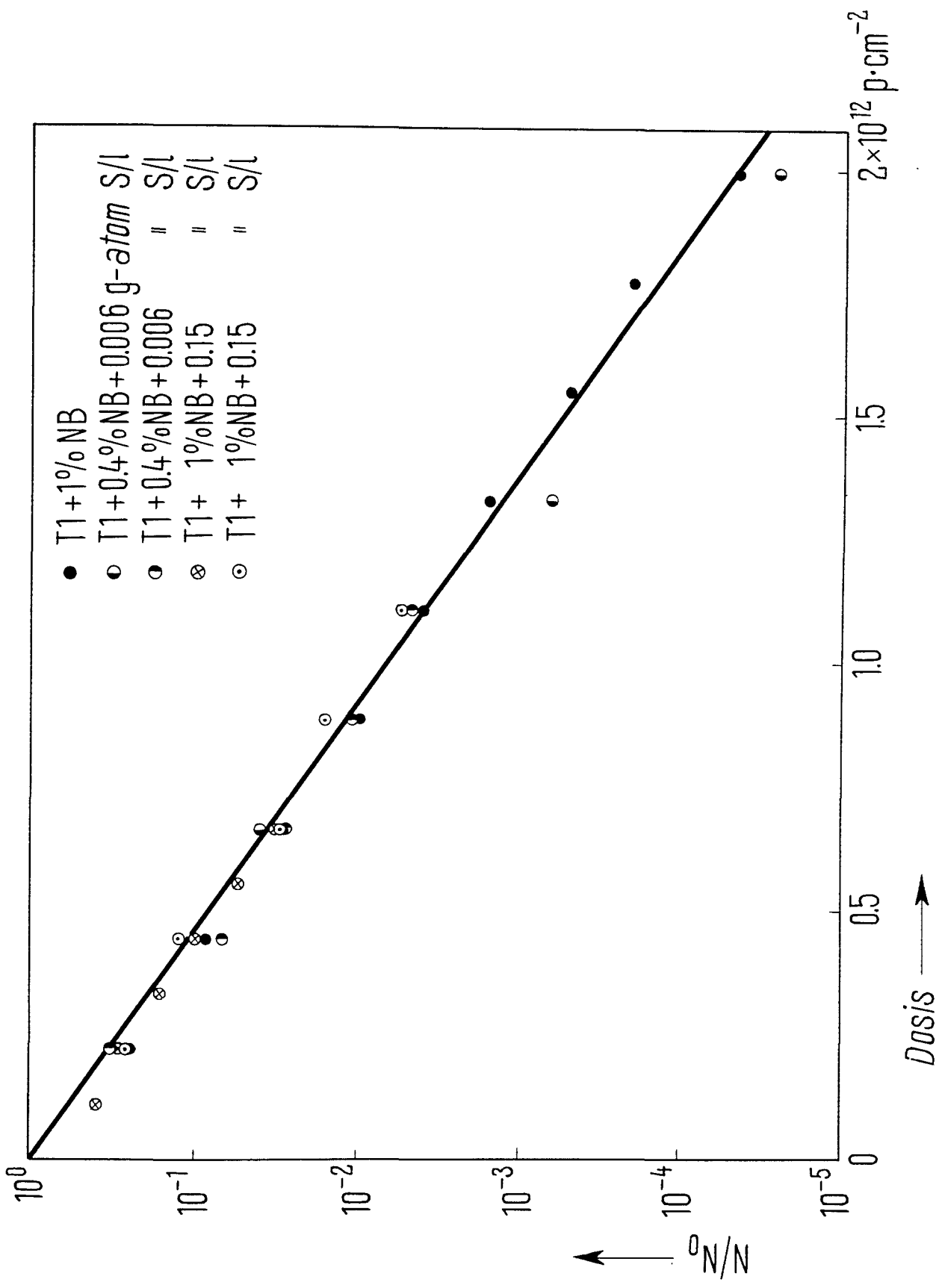


Abb. 14: Inaktivierung in Nahrbouillon (1 %) suspendierter T1-Bakteriophagen durch 2 MeV Protonen ohne und mit Zusatz von kolloidalem Schwefel.

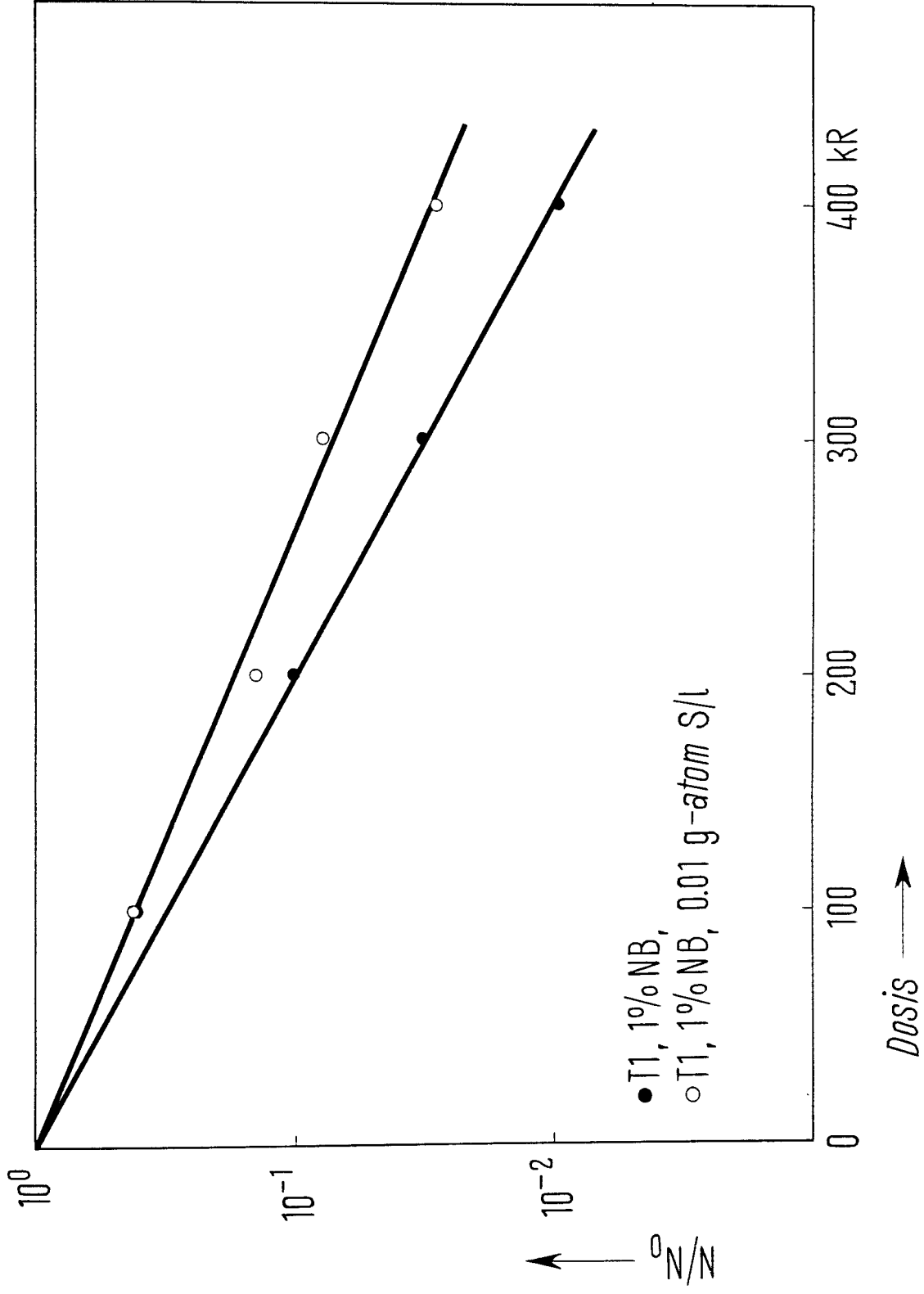




Abb. 15: Inaktivierung in Nährbouillon (4 %) suspendierter T1-Bakteriophagen durch 2 MeV Protonen ohne und mit Zusatz von kolloidalem Schwefel.

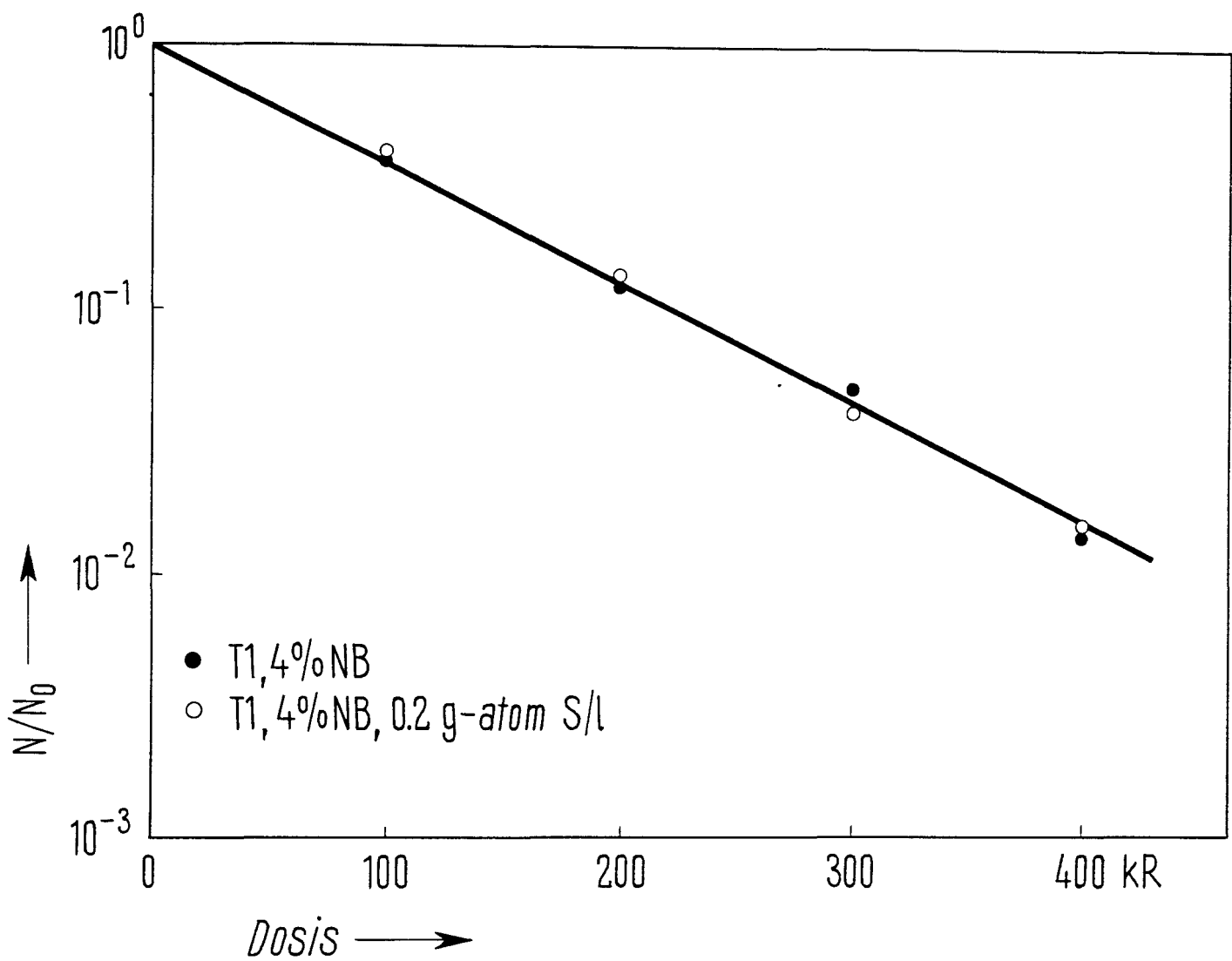


Abb. 16: Verlauf des Inaktivierungsquerschnittes von  $\Phi X-174$ -  
Bakteriophagen ohne (I) bzw. mit Cystaminzugabe (II)  
in Abhängigkeit von der Temperatur, gemessen mit 2 MeV  
Protonen. Auftragung in Form eines sog. Arrheniusplots  
(I u. II) und Abtrennung einer Arrheniusgeraden durch  
Subtraktion eines konstanten Anteils (Ia u. IIa).

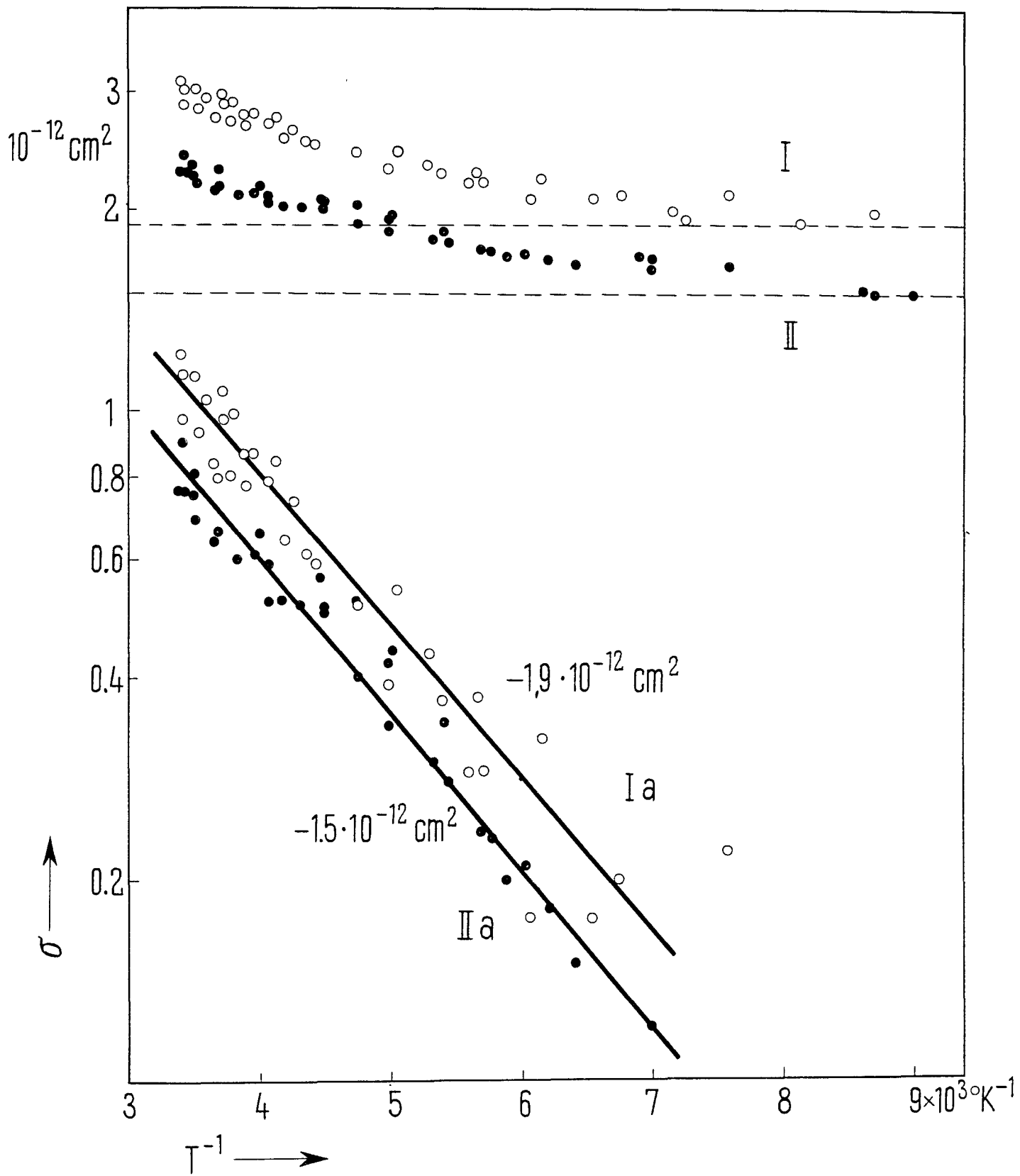


Abb. 17: Einfluß von Cystaminzugabe auf den Verlauf der Inaktivierungsquerschnitte von T1- und 5X-174-Bakteriophagen mit der Temperatur. T1-Werte nach Hermann (1965).

