

KERNFORSCHUNGSZENTRUM

KARLSRUHE

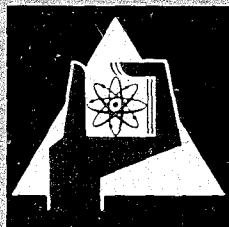
April 1968

KFK 757

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen zur Wirkung von monochromatischer
Vakuum-Ultraviolett-Strahlung auf Desoxyribonukleinsäure

K. U. Berger



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE

Kernforschungszentrum Karlsruhe

April 1968

KFK 757

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen zur Wirkung monochromatischer Vakuum-
Ultraviolett-Strahlung auf Desoxyribonukleinsäure

Karl-Udo Berger

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Der Monochromator	3
2.1 Die Monochromatoranordnung	3
2.2 Die optischen Gitter und ihre Halterung	5
2.3 Die Spalte	8
2.4 Das Auflösungsvermögen des Monochromators	9
2.5 Die Lichtquelle	10
2.6 Die Vakuumanlage	12
2.7 Lichtnachweis und Expositionsmessung	14
3. Bestrahlungsexperimente	18
3.1 Das Objekt der Untersuchungen: DNS	18
3.2 Die Probenbereitung	21
3.3 Der biologische Nachweis der Strahlenschädigung	23
3.4 Experimente und Ergebnisse	24
3.5 Diskussion	27
4. Zusammenfassung	33
5. Anhang	34
5.1 Die Herstellung der Fluoreszenzschirme	34
5.2 Die Herstellung der Oxidkatoden	35
5.3 Die Phenolextraktion der DNS	35
5.4 Die Herstellung der Sphäroplasten	36
6. Literaturverzeichnis	38

1. Einleitung

Es besteht kein Zweifel, daß die Desoxyribonukleinsäure (DNS) als Träger der genetischen Information eine Schlüsselposition im Leben der biologischen Einheiten einnimmt. Zum Verständnis der Wirkung energiereicher Strahlung auf lebende Objekte ist es daher unumgänglich, die strahleninduzierten Veränderungen an der DNS eingehend zu untersuchen. Dabei ist die Erforschung der Primärmechanismen der Strahlenwirkung von grundlegender Bedeutung.

Am Beginn der zum biologischen Schaden führenden Reaktionskette steht das physikalische Absorptionsereignis, die Energiezufuhr an das Biomolekül durch Anregung optischer Niveaus und Ionisierung des Moleküls (Lea 1946, Timoféeff-Ressovsky u. Zimmer 1947). Dieses primäre Ereignis, der Treffer in der Terminologie der Strahlenbiologie, ist das erste Glied in einer Reaktionskette, die ihr Ende im beobachtbaren biologischen Defekt findet. Die einzelnen Reaktionsstufen werden von Parametern der Strahlung und des umgebenden Milieus modifiziert, z.B. durch LET der Strahlung, Temperatur und Sauerstoffgehalt (Zimmer 1967). Der biologische Defekt tritt auf molekularem Niveau in Form von Moleküldissoziationen, Polymerisationen oder Anlagerung von Molekülresten an bis dahin intakte Molekeln in Erscheinung.

Welcher Anteil an der Schädigung allein durch Anregung, durch Ionisation oder durch Zusammenwirken beider Prozesse erzeugt wird, ist weitgehend ungeklärt. Anregungen und Ionisationen werden durch energiereiche Strahlung stets gemeinsam hervorgerufen, wenn auch nicht unbedingt am gleichen Ort. Die Antwort auf die Frage, welcher Energiebetrag einem Biomolekül zugeführt werden muß, um eine bestimmte Veränderung zu erzeugen, läßt sich aus Experimenten mit dieser Strahlung nicht finden. Nur durch Einstrahlung von monochromatischem Licht unterschiedlicher Quan-

tenenergie lassen sich definierte Energieportionen in dem Molekül deponieren. Anregungen optischer Niveaus der Moleküle und Einzelionisationen, die zum Grundzustand des Ions führen, lassen sich damit getrennt voneinander erzeugen. Die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Reaktionsprodukte läßt sich außerdem in vielen Fällen durch die Größe der absorbierten Energiepakete beeinflussen. Der Energieaufwand zur Erzeugung einer bestimmten Veränderung kann so einwandfrei bestimmt werden. Gleichzeitig wird die Identifizierung des Schadens durch das Fehlen störender Nebenprodukte erleichtert.

Die Wirksamkeit von Anregungen des DNS-Moleküls ist im Bereich des UV-Lichts ($\lambda > 2000 \text{ \AA}$) bereits in größerem Umfang geprüft (Smith 1966). Der Bereich hoher Anregungsenergien von mehr als 6 eV ist dagegen bislang fast völlig vernachlässigt worden. Obwohl schon nachdrücklich auf die Bedeutung dieser durch das Vakuum-UV erregbaren Zustände als Mittel zum Studium der Strahlenwirkung hingewiesen wurde (Platzman u. Franck 1958, Zimmer 1960), sind bislang nur ganz vereinzelt Versuche damit an biologischen Objekten unternommen worden. Die bisher aufschlußreichste Untersuchung wurde mit den Enzymen Ribonuclease und Trypsin ausgeführt (Setlow 1959 u. 1960). Es wurde die Inaktivierung der enzymatischen Aktivität und die optische Absorption von 1100 \AA bis 3000 \AA unter Verwendung monochromatischer Strahlung gemessen. Die als Quotient aus den Wirkungsquerschnitten der Inaktivierung und der optischen Absorption ermittelte Quantenausbeute stieg von ca. 10^{-2} bei 3000 \AA auf etwa 1 bei 1100 \AA . Jedes bei 1100 \AA absorbierte Lichtquant ruft also auch einen Schaden an einem Molekül hervor. Der fast sprunghafte Anstieg der Inaktivierungswahrscheinlichkeit und das Auftreten freier Elektronen am kurzwelligen Ende des untersuchten Bereichs ließ das Erreichen der Ionisationsgrenze vermuten. Die Untersuchungen konnten jedoch aus apparativen Gründen nicht auf noch kleinere Wellenlängen ausgedehnt werden.

Weitere biologische Experimente mit monochromatischer Vakuum-UV-Strahlung sind nicht bekannt geworden.

Es sind vor allem experimentelle Schwierigkeiten bei der Arbeit mit Licht dieser Quantenenergien, die solche Untersuchungen behindern. Die Ursache hierfür liegt in der außerordentlichen starken Absorption durch praktisch alle Substanzen und im Fehlen intensiver Lichtquellen in diesem Wellenlängenbereich. Zur Erzeugung monochromatischer Strahlung kommen nur gut evakuierte Monochromatoren mit Reflexionsgittern als dispergierendem Element in Frage. Soll der untersuchte Wellenlängenbereich unter 1100 \AA ausgedehnt werden, ist auch die Verwendung von Fenstern zwischen Lichtquelle und Monochromator unmöglich, da in diesem Bereich kein Material eine nennenswerte Transmission aufweist.

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Vakuum-UV-Monochromator gestattet es, durch seinen fensterlosen Aufbau den Bereich der Untersuchungen bis zu Wellenlängen von etwa 300 \AA zu erweitern.

Damit war die Möglichkeit gegeben, die Wirkung des Vakuum-UV-Ultraviolett auf das Biomolekül DNS über den Bereich, in welchem ausschließlich Anregungen stattfinden, und das Übergangsgebiet zwischen Anregungen und einzelnen Ionisationen hinaus bis zu einem Energiebereich zu untersuchen, der weit über der Ionisierungsgrenze der DNS liegt.

2. Der Monochromator

2.1 Die Monochromatoranordnung

Die ersten spektroskopischen Untersuchungen im Wellenlängenbereich des Vakuum-Ultraviolett machte Viktor Schumann 1885 mit einem Fluorit-Prismenspektrometer. Mit diesem Spektrometer konnte er das einfallende Licht bis hinab zu 1300 \AA spektral zerlegen. Heute liegt die kurzwellige Grenze der Verwendbarkeit von Prismen und Linsensystemen bei 1050 \AA . Diese Wellenlänge ist die Transmis-

sionsgrenze von reinstem, synthetischem Lithiumfluorid. Der Vorteil eines Prismenmonochromators, nämlich die große Lichtstärke, konnte deshalb für unsere Zwecke nicht genutzt werden, da auch der Wellenlängenbereich unterhalb von 1000 \AA untersucht werden sollte. Verwendet man ein Rowlandsches Konkavgitter als dispergierendes Element, so kann mit geeigneten Reflexionsschichten der beobachtbare Wellenlängenbereich bis zu den weichen Röntgenstrahlen hin ausgedehnt werden.

In den letzten Jahren sind verschiedene Spektrometeranordnungen mit Konkavgittern für das Vakuum-UV beschrieben worden. Allen ist gemeinsam, daß sie mit fast senkrechtem Lichteinfall arbeiten. Gitter, Eintrittsspalt und Detektor (Photoplatte) befinden sich auf dem Rowlandkreis. Eine Übersicht über die Eigenschaften der Geräte wird von Tousey (1962) gegeben. Die Verwendung dieser Anordnungen als Monochromatoren bringt aber erhebliche mechanische Schwierigkeiten mit sich. Zur Variation der Wellenlänge im Austrittsspalt wird der Ort eines Spalts festgehalten und der andere, Eintritts- oder Austrittsspalt, längs des Rowlandkreises verschoben. Schwierigkeiten ergeben sich dabei aus dem Umstand, daß das Gerät evakuiert ist. Somit werden derartige Manipulationen mechanisch schwer durchführbar.

Erheblich einfacher ist es, bei fixierten Spalten das Gitter um eine Achse parallel zu den Gitterstrichen rotieren zu lassen (Z-Achse). Dabei tritt allerdings im Austrittsspalt wegen der Bildfeldwölbung eine Defokussierung auf. In Anlehnung an diese letztere Methode der Wellenlängenveränderung hat Seya (1952) eine neuartige Monochromatoranordnung beschrieben und eine Abbildungstheorie dazu aufgestellt, welche von Greiner und Schäffer (1958) vervollständigt wurde. Es zeigt sich, daß es bei Rotation des Gitters um die Z-Achse eine optimale Anordnung der Spalte gibt, bei der sich die Brennweiten in einem gewissen Wellenlängenbereich um weniger als 1 % ändern.

Einfallender und ausfallender Strahl bilden dabei einen Winkel $\alpha - \beta = 70^\circ$, und die Spalte sind außerhalb des Rowland-Kreises angeordnet. Für ein Gitter mit einem Krümmungsradius $R = 1$ m ergeben sich folgende Parameter für optimale Fokussierung:

$$\text{Eintrittslänge } r = 0,8217 \text{ m}$$

$$\text{Austrittslänge } r' = 0,8194 \text{ m}$$

$$\alpha - \beta = 69^\circ 44'$$

$$\text{nutzbarer Gitterdrehwinkel } 0 \leq k \leq 15^\circ$$

Das entspricht bei einer Gitterkonstanten $d = 8333 \text{ \AA}$ einem Wellenlängenbereich $0 < \lambda < 3500 \text{ \AA}$. Das ausfallende Licht ist wegen des relativ großen Einfallswinkels teilweise polarisiert. Die Seya-Anordnung zeichnet sich durch den einfachen mechanischen Aufbau aus, ergibt jedoch einen etwas größeren Astigmatismus bei der Abbildung. Die Vorteile der Anordnung sind aber überwiegend. Deshalb wurde unser Monochromator nach diesem Prinzip erstellt. Abb. 1 gibt einen Überblick über die Anordnung, deren Elemente im Folgenden beschrieben werden.

2.2 Die optischen Gitter und ihre Halterung

Der Monochromator soll das Studium der Wirkung des kurzwelligen ultravioletten Lichts auf biologisch relevante Makromoleküle ermöglichen. Leider gibt es im Bereich des Vakuum-Ultravioletts nur wenige sehr intensive Spektrallinien. Deshalb muß die Transmission des Gerätes möglichst hoch sein, um auch Messungen mit intensitätsarmen Linien durchführen zu können. Zur Transmission tragen drei Eigenschaften des Gitters bei: das Öffnungsverhältnis, das Reflexionsvermögen der Gitteroberfläche und der Glanzwinkel.

Das Öffnungsverhältnis sollte möglichst groß sein. Nun wachsen die Abbildungsfehler z.T. quadratisch mit dem Öffnungsverhältnis (Koma, Linienkrümmung). Es ist daher ein Kompromiß zwischen Lichtstärke und Auflösungsvermögen

zu schließen. Es wurden deshalb Gitter mit 1 m Krümmungsradius und 1200 Furchen pro mm gewählt. Das Öffnungsverhältnis beträgt 1:16.

Das Reflexionsvermögen aller gebräuchlichen Spiegelschichten wird mit abnehmender Wellenlänge kleiner. Oberhalb von 1200 Å zeigt Aluminium eine Reflexion von 80 % und ist damit allen anderen Schichten überlegen. Gegen Oxidation wird die Al-Schicht durch eine etwa 100 Å dicke MgF_2 -Bedampfung geschützt. Unterhalb von 1200 Å ist Platin am besten geeignet. Jedoch wird günstigenfalls 20 % der einfallenden Strahlung reflektiert.

Durch geschickte Formgebung der Furchen des Gitters kann erreicht werden, daß die Intensität eines gewissen Spektralbereichs in einer bestimmten Ordnung des Spektrums konzentriert wird. Bildet die Oberfläche der Furche mit der Gitterfläche den Winkel θ (Glanzwinkel), so erscheint das Licht der Wellenlänge λ besonders intensiv, für die der Reflexionswinkel von der Furchenoberfläche mit dem Beugungswinkel, unter dem sie vom Gitter abgestrahlt wird, übereinstimmt (Abb. 2).

Die Glanzwinkel der verwendeten Gitter wurden hinsichtlich der Wellenlängenbereiche, in denen sie Verwendung finden sollten, wie folgt gewählt:

Gitter 1: Gitterkonstante $d = 8333 \text{ \AA}$
Belag: AL + MgF_2
Krümmungsradius $R = 995 \text{ mm}$
Glanzwinkel $4^\circ 8'$
Für $\alpha - \beta = 70^\circ$ wird $\lambda = 985 \text{ \AA}$ in der
+1. Ordnung verstärkt

Gitter 2: Gitterkonstante $d = 8333 \text{ \AA}$
Belag: Platin
Krümmungsradius 998 mm
Glanzwinkel $2^\circ 45'$
Für $\alpha - \beta = 70^\circ$ wird $\lambda = 655 \text{ \AA}$ in der
+1. Ordnung verstärkt.

Um die Justierung des Geräts in möglichst einfacher Weise vornehmen zu können, muß das Gitter in allen Richtungen präzise bewegt werden können. Zu diesem Zweck wurde ein Gittertisch gebaut, der alle notwendigen Bewegungen zuläßt. Der Gittertisch (Abb. 3) hängt an einer Vakuum-Drehdurchführung D, deren Achse zusätzlich mit einem Stützlager versehen wurde, und ist durch einen seitlichen Flansch (\emptyset 25 cm) des Behälters leicht zugänglich. Die hängende Anordnung ermöglicht eine Gitterreinigung (Abspülen mit Xylol) ohne Demontage des Gitters, was einen Vorteil gegenüber Gitterhalterungen kommerzieller Spektrometer bedeutet. Dadurch kann ohne größeren Aufwand eine etwa durch die Öl-Diffusionspumpen aufgetretene Bedampfung des Gitters beseitigt werden. Der Tisch läßt folgende Bewegungen des Gitters zu:

1. Rotation des Gitters um die Gitterscheitelnormale N um $\pm 15^\circ$ durch Drehen der Schraube S_1
2. Neigung der Gitterscheitelnormalen um $\pm 10^\circ$ um die Achse O durch Drehen der Schraube S_2
3. Translation des Gitters parallel zur horizontalen Gitterscheiteltangente in der Schwalbenschwanz-Führung SF
4. Zusätzlich läßt sich der Flansch F mit der Drehdurchführung zur groben Einstellung des Abstands Eintrittsspalt-Gitter um ± 10 mm gegenüber dem Rezipienten verschieben.
5. Zur Wellenlängenvariation im Austrittsspalt ist der Tisch schließlich um eine Achse parallel zu den Gitterstrichen um 360° drehbar. Die Gitterrotation wird durch einen reversiblen Synchronmotor mit Wechselgetriebe erzeugt.

Die kleinste Geschwindigkeit der Wellenlängenänderung ist $17 \text{ \AA}/\text{min}$.

Die Ablesung der Wellenlängenskala erfolgt über eine Projektionsskala mit Feinteilung (1000 Striche auf einem Kreisbogen von 17°). Die Skala ist über einen Arm starr mit der Gitterdrehachse verbunden. Dadurch geschieht die Ablesung stets völlig spielfrei. Die Projektion erfolgt mit einem Mikroskop auf eine Mattscheibe mit Fadenkreuz. Der Abstand zwischen zwei Skalenstrichen entspricht einer Wellenlängendifferenz $\Delta\lambda = 4,05 \text{ \AA}$ im Austrittsspalt. Es besteht die Möglichkeit zur Anbringung einer Noniusskala und damit noch genauerer Einstellung einer bestimmten Gitterstellung. Die Skala überstreicht einen Wellenlängenbereich von 0 bis 4050 \AA . Die Reproduzierbarkeit einer bestimmten Einstellung entspricht gegenwärtig einer Wellenlängendifferenz von $0,5 \text{ \AA}$ und wird durch das Spiel der Achse in der Drehdurchführung gegeben.

2.3 Die Spalte

Eintritts- und Austrittsspalt sind nur nach Öffnen des Vakuumbehälters einstellbar. Auf eine Einstellung von außen, etwa mittels Mikrometerschraube und Vakuum-Drehdurchführung, wurde verzichtet, da bei Bestrahlungsexperimenten für alle Spektrallinien die gleiche Spaltbreite und damit eine identische Intensitätsverteilung auf der flächenhaften Probe erwünscht war.

Der Eintrittsspalt wird von der Grundplatte einer zylinderförmigen Büchse getragen, die sich im Eingangsloch des ersten Vakuumbehälters befindet. Die Büchse ist drehbar und wird gegen die Wand des Behälters festgeklemmt. Als Spaltbacken dienen ausgesuchte Rasierklingen, deren Schneiden mit einem Mikroskop auf Linearität und Schartenfreiheit geprüft wurden. Die Klingen sind auf 2 Messingplatten befestigt, die einzeln über Hebelmechanismen in einer Führung verschoben werden können (Abb. 4). Die Spaltbreite kann von $0,02 \text{ mm}$ bis $2,5 \text{ mm}$ verändert und mit einem Mikroskop mit Okularmikrometer gemessen werden. Die Spalthöhe beträgt 20 mm .

Der Austrittsspalt befindet sich am Ende einer zylinderförmigen Röhre im Austrittsstrahlrohr. Die Spaltbacken sind aus Messing und haben geschliffene Schneiden. Die Backen sind drehbar an zwei Waagebalken befestigt. Werden die Waagebalken durch eine Feingewindeschraube aus der Horizontalen gedreht, ergibt sich eine Scherbewegung der Backen. Dadurch verringert sich ihr Abstand (Abb. 5). Die Spaltbreite kann so von 0,02 bis 2,5 mm verändert werden.

2.4 Das Auflösungsvermögen des Monochromators

Theoretisch läßt sich in der ersten Ordnung des Spektrums ein Auflösungsvermögen $\lambda/\Delta\lambda = 6 \cdot 10^4$ erzielen. Das entspricht der Zahl der ausgeleuchteten Gitterstriche. Bei Gitterspektrometern mit Konkavgittern für das Vakuum-Ultraviolett wird das Auflösungsvermögen durch die Abbildungsfehler begrenzt, welche sich nur unter erheblichem Intensitätsverlust korrigieren lassen. Die Bestimmung des praktisch erreichten Auflösungsvermögens geschah durch Messung der Halbwertsbreiten der Linien photoelektrisch registrierter Spektren. Um eine möglichst hohe Intensität am Austrittsspalt zur Verfügung zu haben, wurden 20 mm hohe Spalte verwendet. Dann ist die Linienkrümmung der bedeutendste Fehler, der das Auflösungsvermögen begrenzt. Die minimale Halbwertsbreite ergab sich zu $\Delta\lambda = 1,5 \text{ \AA}$. Das bedeutet ein Auflösungsvermögen von 810 bei H-L $_{\alpha}$. Durch Verwendung gekrümmter Spalte läßt sich das Auflösungsvermögen um fast eine Größenordnung verbessern (Bath u. Brehm 1965). Für unsere Arbeiten ist jedoch der erzielte Wert völlig ausreichend. Bei beiden Gittern ergibt sich im Austrittsspalt eine reziproke Dispersion von $16,6 \text{ \AA/mm}$.

2.5 Die Lichtquelle

Zur Inaktivierung der biologischen Aktivität von Makromolekülen mit kurzwelligem UV-Licht werden Expositionen von etwa 1000 erg/cm^2 benötigt. Da bei der spektralen Zerlegung im Gittermonochromator erhebliche Lichtverluste auftreten, können die Bestrahlungszeiten nur durch sehr intensive Lichtquellen in vernünftigen Größen gehalten werden. Als ausreichend intensive Lichtquelle für den Wellenlängenbereich von 500 bis 1700 \AA kommt nur eine fensterlose Gasentladungslampe in Frage. Andere Quellen, z.B. der Vakuumfunke oder die Bremsstrahlung bei Elektronenbeschleunigern (Synchrotronstrahlung) liefern zwar ein äußerst linienreiches bzw. echt kontinuierliches Spektrum, sind aber sehr intensitätsarm (Lemke 1967). Auch hochkomprimierte Plasmen mit großer Stromdichte (pinch) scheiden aus, da die Wiederholfrequenz der Entladung zu klein ist.

Zur Anregung der Elektronenübergänge finden zwei Prinzipien Anwendung, die elektrodenlose Hochfrequenzentladung und die zwischen zwei Elektroden brennende Gasentladung. Zur Beleuchtung des Eintrittsspalts eines Monochromators ist eine Lichtquelle mit möglichst hoher Leuchtdichte erwünscht. Bei den gebräuchlichen HF-Entladungslampen ist zwar der abgegebene Lichtstrom recht hoch, jedoch ist die emittierende Fläche groß, so daß die Beleuchtungsstärke im Eintrittsspalt gering ist. Am besten lassen sich normale Gasentladungen an die Geometrie des Monochromators anpassen. Sehr geeignet sind Lampen, bei denen die Entladung durch eine metallisierte Quarzkapillare zwischen durchbohrten Elektroden brennt. Die Beleuchtung erfolgt in Richtung der Rohrachse. Bei kalter Katode brennen die Entladungen bei hohen Spannungen (über 600 V). Durch Heizen der Katode läßt sich der Katodenfall abbauen und die Entladungsspannung auf etwa 100 Volt senken. Noch größere Leuchtdichten erzielt man durch Einschnürung der positiven Säule einer Entladung mit einer Blende. An der Blende bildet sich dann eine elektrische Doppelschicht,

die zur Beschleunigung der Elektronen auf die Blendenöffnung führt. Dadurch entsteht im Raum vor der Öffnung ein besonders dichtes Plasma, welches intensives Licht abstrahlt.

Derartig eingeschnürte Entladungen werden schon längere Zeit unter dem Namen Unoplasmatron als Ionenquellen benutzt (Ziegler 1958, v.Ardenne 1962). Die Brauchbarkeit als Lichtquelle für das Vakuum-UV wurde durch Samson u. Liebel (1962) und Brehm u. Siegert (1965) gezeigt. Die mit dem Unoplasmatron erzeugten optischen Spektren lassen die Atomlinien (z.B. H-L _{α}) gegenüber den Molekülspektren intensiver auftreten, als es bei den Kapillarentladungen der Fall ist. Für die Experimente standen zwei Lichtquellen zur Verfügung, ein Unoplasmatron und eine Kapillarentladung (Tropel BNH-1). Der Aufbau des Unoplasmatron geht aus Abb. 6 hervor. Die Katode K der Entladungslampe besteht aus einem direkt geheizten Nickelnetz, welches mit Oxidkatodenmaterial bestrichen ist. Das Netz ist zwischen zwei wassergekühlte Stäbe gespannt, über welche die Heizspannung zugeführt wird (5 V, bis 60 A). Der Katodenbelag wurde nach einer bewährten Methode hergestellt (Mönch 1959, MacNair et al. 1953) (s. Anhang S. 35). Zwischen Katode und Anode befindet sich eine winkelförmige Blende B aus Molybdän mit einer spaltförmigen Öffnung (2 x 20 mm). Die Blende wird von einem wassergekühlten, massiven Messingzylinder mit entsprechender Ausfräsung getragen. Messingzylinder und Katodenflansch sind durch ein gekühltes Doppelmantelrohr fest verbunden. Die Blende ist gegen die Anode durch einen Pyrexring, gegen die Katode durch Teflonringe an den Katodendurchführungen isoliert. Die Anode A besteht aus einem Molybdänblech (d = 1 mm), das auf einen ebenfalls wassergekühltem Messingflansch geschraubt ist. Der Anodenflansch besitzt einen Strömungskanal (2 x 20 mm, 38 mm lang), durch den das Füllgas in den Rezipienten strömt. Bei einem Gasdruck von 4 Torr H₂ in der Lampe bildet sich am Eintrittsspalt des Monochromators ein Druck von $2 \cdot 10^{-4}$ Torr aus.

Nachdem sich der Gasdruck in der Lampe eingestellt hat, wird die Katode geheizt (40 - 60 A). Die Zündung der Entladung erfolgt durch kurzzeitige Verbindung von Anode und Blende. Nach Entfernung dieser Verbindung zündet die Entladung durch die Blende zur Anode. In der Blendenöffnung bildet sich dann ein Plasmabläschen, das sehr intensiv leuchtet. Durch den Strömungskanal im Anodenflansch fällt das Licht auf den Eintrittsspalt.

Die Strom-Spannungskennlinie des Unoplasmatron hat eine Bogencharakteristik (Abb. 7). Zur Stabilisierung eines Arbeitspunkts benötigt man also einen Vorwiderstand. Veränderung des Arbeitspunkts erfolgt durch Erhöhen der Betriebsspannung (150 - 350 Volt) oder durch Verringern des Vorwiderstandes (47 - 8,5 Ohm).

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen Spektren von Wasserstoff bzw. Helium, mit deren Linien Bestrahlungsexperimente vorgenommen wurden. Die Intensitäten der Linien sind von den Entladungsparametern der Lampe abhängig. Bei allen Linien ergibt sich ein lineares Anwachsen mit dem Entladestrom. Die Abhängigkeit der Liniengruppe bei 1630 \AA und von $H-L_{\alpha}$ vom Druck in der Lampe ist in Abb. 10 dargestellt. Während die Moleküllinien bei 1630 \AA stetig mit dem Druck ansteigen, durchläuft die Intensität der L_{α} -Linie ein Maximum bei 3 Torr. Die Abnahme der Intensität mit zunehmendem Druck ist auf Selbstabsorption im Gas zurückzuführen. Mischt man dem Wasserstoff einen Teil Helium zu, so läßt sich die Intensität der L_{α} -Linie steigern (Abb. 11 u. 12). Die Intensität der Linien bei 1630 \AA läßt sich dagegen durch He-Beimengung nicht vergrößern.

2.6 Die Vakuumanlage

Der Lichtweg von der Lampe bis zur Bestrahlungskammer beträgt ca. 2 m. Da fast alle Gase im Vakuum-UV starke Absorptionsbanden aufweisen, muß der Luftpartialdruck im Monochromator unter 10^{-4} Torr betragen. Aber auch das Gas der Entladung schwächt die Intensität an vielen Stellen des Spektrums durch Selbstabsorption.

Da die Lichtquelle fensterlos arbeitet, das Gas also auf dem gleichen Weg in den Monochromator gelangt wie das Licht, muß für einen möglichst steilen Druckgradienten zwischen dem Ort der Entladung und dem Monochromator gesorgt werden. Das geschieht durch differentiell Pumpen. Der Rezipient ist auf dem Weg von der Lampe zum Gitter in mehrere Kammern unterteilt, die durch Blenden als Strömungswiderstände miteinander verbunden sind und unabhängig voneinander evakuiert werden. Noch vor dem Eintrittsspalt besteht die Möglichkeit, den größten Teil des Gasstroms aus der Lampe nach Passieren des Strömungskanals einer Roots-pumpe zuzuführen. Davon wird nur bei sehr hohen Gasdrucken in der Lampe über 10 Torr Gebrauch gemacht. Die Kammer K_1 (Abb. 1) hinter dem Eintrittsspalt wird durch eine starke Diffusionspumpe mit einer Saugleistung von 3 Torr l/sec bei 10^{-3} Torr evakuiert. In dieser Kammer bleibt der Druck kleiner als 10^{-3} Torr, wenn der Druck in der Lampe auf 10 Torr eingestellt wird (Abb. 13). Die Gitterkammer K_2 wird durch eine gleichartige Diffusionspumpe versorgt. Zwischen beiden Kammern befindet sich ein Schieberventil, ebenso im Strahlrohr zwischen Gitterkammer und Probenkammer. Dadurch lassen sich die einzelnen Einheiten getrennt belüften. Das ist bei Arbeiten an der Lampe oder beim Einschleusen neuer Proben zur Bestrahlung vorteilhaft. Die Probenkammer (Abb. 14), die bereits an anderer Stelle beschrieben wurde (Hermann 1966), wird durch eine kleinere Diffusionspumpe ($7,5 \cdot 10^{-2}$ Torr l/sec bei 10^{-3} Torr) evakuiert. Alle Diffusionspumpen sind mit Dampfsperren versehen, welche mit Alkohol im Durchfluß auf eine Temperatur von -30°C gekühlt werden. Dadurch wird die Öldampfdiffusion in den Rezipienten praktisch verhindert.

2.7 Lichtnachweis und Expositionsmessung

Vakuum-UV kann durch spezielle Wirkungen, die es hervorruft, nachgewiesen werden, z.B. durch Erwärmung eines schwarzen Auffängers (Thermoelement), Photoeffekt an Gasen oder Metallen, oder durch Erregung von Fluoreszenzstrahlung in geeigneten Substanzen. Exakte Absolutmessungen von Intensitäten sind sehr erschwert, da in diesem Wellenlängenbereich noch keine Strahlungsnormale zur Kalibrierung der Detektoren existieren.

Erwünscht ist ein Nachweissystem, das im gesamten Wellenlängenbereich von 500 Å bis 2000 Å den Nachweis gestattet und möglichst noch einen wellenlängenunabhängigen Wirkungsgrad aufweist. Die Verwendung von Thermoelementen zum Nachweis des Vakuum-UV wurde zuerst von Packer und Lock (1951) beschrieben. Unter der Annahme, daß die ausgezeichneten Eigenschaften im Sichtbaren auch im kurzwelligen Bereich erhalten bleiben, kalibrierten sie ein Thermoelement mit einer Eichlampe im Sichtbaren. Kürzlich zeigte Samson (1964), daß diese Annahme nicht richtig ist. Als schwarzen Belag verwendet man allgemein "Gold-Schwarz", das aus Goldkügelchen von etwa 100 Å Durchmesser besteht. Wegen des im Kurzwelligen beobachteten sehr effektiven Photoeffekts an Metallen entsteht ein nicht unerheblicher Meßfehler durch die Wärme abführende Elektronenemission. Zum qualitativen Nachweis sind Thermoelemente aber geeignet. Der Photoeffekt an Metallen und Gasen hängt stark von der Wellenlänge des einfallenden Lichts ab (Weissler 1956). Zur Messung können Photozellen und Ionisationskammern Verwendung finden. Durch die energiereichen Photonen des Vakuum-UV werden nicht nur Elektronen aus dem Leitungsband der Metalle befreit, sondern auch fester gebundene Elektronen aus den Schalen der Atome. Es ist üblich, in diesem Fall vom Volumen-Photoeffekt zu sprechen, im Gegensatz zum Oberflächen-Photoeffekt bei längerwelligem Licht.

Die Elektronenausbeute, d.h. Zahl der abstrahierten Elektronen pro einfallendem Quant, ist im Vakuum-UV-Bereich in der Größe von einigen Prozent. Sie ist damit um etwa einen Faktor 100 größer als im sichtbaren oder UV-Bereich. Der Volumen-Photoeffekt ist unempfindlicher gegen Verunreinigungen, etwa durch adsorbierte Gase, als der Oberflächen-Photoeffekt (Weissler 1956). Aus diesen Gründen ist es möglich, empfindliche, offene Photozellen als zeitlich konstante Dosimetrienormale zu verwenden. Vorteilhaft sind Katoden aus Metallen mit großer Austrittsarbeit (z.B. Wolfram oder Nickel), da diese unempfindlich gegen langwelliges Streulicht sind. Völlig unempfindlich gegen langwelliges Licht ist die Photoionisation von Edelgasen, weil deren Ionisationspotentiale sehr hoch liegen (z.B. 12,1 eV bei Xe). Oberhalb der Ionisierungsenergie sind bei Edelgasen Absorptions- und Ionisationsquerschnitte identisch, d.h. jedes absorbierte Quant führt zur Ionisation (Po Lee u. Weissler 1955, Wainfan et al. 1955). Es bietet sich deshalb an, eine edelgasgefüllte Ionisationskammer als Absolutmeßinstrument zu verwenden. Dabei ergeben sich jedoch Schwierigkeiten, im wesentlichen finanzieller Art, aus der Notwendigkeit, ohne Fenster im Durchflußverfahren zu arbeiten, da die Rückgewinnung der Gase problematisch ist. Bei Verwendung anderer Gase mit kleinerer Ionisationsarbeit ist wiederum die Identität von Absorptions- und Ionisationsquerschnitt nicht gewährleistet. Aus diesen Gründen finden Ionisationskammern zum Nachweis des Vakuum-UV nur selten Verwendung.

Die zweifellos am häufigsten verwendete Nachweismethode für Vakuum-UV besteht in der Kombination eines Fluoreszenzschirms mit einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV). Als Fluoreszenzsubstanz hat sich Natrium-Salicylat als fast ideal erwiesen. Die Quantenempfindlichkeit ist hoch. Im Mittel erzeugen zwei einfallende Photonen ein Fluoreszenzquant (Nygaard 1964). Die Fluoreszenz erfolgt bei 4200 Å. Der Dampfdruck ist unbedeutend, so daß der Schirm ohne weiteres im Vakuum exponiert werden kann. Die

Ausbeute an Fluoreszenzquanten ist im Wellenlängenbereich von 850 bis 3400 Å konstant. Bei 584 Å ist sie um 15 % kleiner als im längerwelligen Bereich (Watanabe 1953). In Verbindung mit einem SEV mit einer S 11-Photodynode ergibt sich so ein ausgezeichnetes Nachweissystem, das praktisch trägheitslos arbeitet. Allerdings muß der Detektor kalibriert werden. Das geschieht am besten mit einer edelgasgefüllten Ionisationskammer.

Für unsere Zwecke erschien die folgende Anordnung als die zweckmäßigste: Als wellenlängenunabhängiger Detektor wurde ein Fluoreszenzschirm mit Natrium-Salicylat in Verbindung mit einem SEV (Valvo 152 AVP) gewählt. Im Gegensatz zu der häufig gewählten Anordnung, bei der das Salicylat direkt auf den Glaskolben des SEV aufgebracht wird, befindet sich die Fluoreszenzschicht auf einem messinggefaßten Glasplättchen (\emptyset 12mm). Der Schirm bildet gleichzeitig den Vakuumverschluß. Durch diese Anordnung sind SEV und Schirm unabhängig voneinander; der Schirm kann also schnell und einfach ausgewechselt werden. Die Herstellung der Schirme wird im Anhang S.34 beschrieben. Die Schirme wurden mit einer offenen Photozelle mit Nickel-Katode kalibriert. Dabei wurde die Elektronenausbeute von Ni bei 1216 Å ($H-L_{\alpha}$) zu Grunde gelegt (Walker et al. 1955, Hinteregger 1953). Wird die Nickel-Oberfläche nur mit organischen Lösungsmitteln gereinigt, beträgt die Elektronenausbeute bei 1216 Å 2,35 Elektronen pro 100 Quanten. Wegen der Beständigkeit von Nickel gegen Luft wurde die Elektronenausbeute als zeitlich konstant vorausgesetzt. Nach längerem Betrieb des Monochromators wurde die Nickel-Katode mit Aceton abgespült, um eine eventuell aufgetretene Bedampfung mit Pumpenöl zu entfernen. Es wurde jedoch in keinem Fall eine Veränderung der Elektronenemission vor und nach der Behandlung festgestellt.

Die Konstruktion der Photozelle ist aus Abb. 15 ersichtlich. Die Anodenplatte A hat einen Spalt (1 x 11 mm), durch den das Licht auf die Nickel-Katoden K_1 und K_2

fällt. Die drei Elektroden sind über Trolitul-Stäbe mit der Grundplatte G verbunden. Die beiden Katoden K_1 und K_2 haben voneinander 1 mm Abstand. Der Abstand zur Anode beträgt 8 mm. Die Strom-Spannungs-Charakteristik erreicht bereits bei $U = 1$ V den Sättigungswert. Die Betriebsspannung wurde auf 40 V gelegt. Die Spannungszuführung zu Anode und Katoden erfolgt über vakuumdichte Trolitul-durchführungen. Katoden und Anode können wahlweise geerdet werden. Hinter den Katoden befindet sich der Na-Salicylat-schirm S. Durch die geschlitzte Anode und den dazu senkrecht verlaufenden Spalt zwischen den Katoden wird ein Strahlenbündel ($1 \times 1 \text{ mm}^2$) ausgeblendet und fällt durch ein Loch in der Grundplatte G auf den Fluoreszenzschirm. Photokatoden und Schirm werden so gleichzeitig beleuchtet. Bei richtiger Justierung ist die beleuchtete Fläche der Photozelle genau zehnmal so groß wie die des Schirms. Photozelle und Fluoreszenzschirm sind auf einem Trovidur-Flansch befestigt, der an die Rückwand der Bestrahlungskammer (Abb. 14) von außen angeschraubt wird. Die Photozelle ragt durch ein Loch L_2 in der Kammerrückwand in die Kammer. Der Abstand der Anode von der Probenplatte P beträgt 5 mm. Die Beleuchtung der Zelle erfolgt durch einen kreisförmigen Ausschnitt L_1 ($\varnothing 20 \text{ mm}$) in der Probenplatte.

Der verwendete SEV 152 AVP ist ein end-on-Typ, d.h. die Beleuchtung der Photodynode durch den Fluoreszenzschirm erfolgt durch die Stirnfläche des Kolbens. Der Spannungsabfall über dem Anodenwiderstand (100 K Ohm) wird mit einem mV-Meter (Philips GM 6020) gemessen oder direkt auf den Schreibereingang (Metrawatt "Servogor") gegeben. Im Eingang E (Abb. 14) der Bestrahlungskammer befindet sich eine zweite Photozelle mit Nickel-Katoden (Abb. 16). Die Katoden werden während einer Probenbestrahlung stets von einem gewissen Teil des einfallenden Lichts beleuchtet. Diese Photozelle dient als Monitor während der Bestrahlung. Der Photozellenstrom wird nach Verstärkung mit einem Vibron-Elektrometerverstärker (EIL 33 B) durch einen Schreiber aufgezeichnet. Die Exposition der Proben erhält

man, unter Berücksichtigung eines Eichfaktors, durch Integration der kalibrierten Schreiberaufzeichnungen. Es können so Intensitätsschwankungen bzw. Unterbrechungen der Bestrahlung leicht berücksichtigt werden. Gleichzeitig dient die geerdete Anode der Photozelle als Blende am Kammereingang und verhindert, daß die Proben von Streulicht getroffen werden. Die gewählte Anordnung der Detektoren ermöglicht es, an Stelle des SEV andere Detektoren, z.B. eine Ionisationskammer anzubringen.

3. Bestrahlungsexperimente

3.1 Das Objekt der Untersuchungen: DNS

Die Desoxyribonukleinsäure (DNS) ist ein unverzweigtes, hochpolymeres Kettenmolekül. Die Kette ist alternierend aus Phosphatgruppen und Desoxyribose aufgebaut (3'-5'-Phosphodiesterbindung). An jedes Zuckermolekül ist am 1'-Kohlenstoff eine der vier Basen Thymin, Cytosin, Guanin oder Adenin gebunden (N-Glycosidbindung). Im allgemeinen tritt die DNS als Doppelmolekül auf. Dabei erscheinen die beiden Stränge in der Basensequenz komplementär in der Art, daß stets Thymin und Adenin bzw. Cytosin und Guanin sich gegenüberstehen und über Wasserstoffbrücken eine Bindung zwischen beiden Strängen herstellen (Abb. 17).

Die Basensequenz enthält die Vorschrift für die Proteinsynthese. Je ein Triplet von Basen veranlaßt den Einbau eines bestimmten Aminosäurerests in eine Polypeptidkette. Jede Änderung der Basensequenz oder Veränderung einer Base stellt einen Codefehler dar, der sich in einer Veränderung gewisser Eigenschaften des Systems äußern kann (Mutation). Als Steuermolekül und "Rezeptbuch" nimmt die DNS eine Schlüsselposition im Leben der biologischen Einheiten ein. Ihre Zerstörung bedeutet den Untergang der Einheit z.B. einer Zelle. Die besondere Bedeutung der DNS für die Aufrechterhaltung des Lebens erklärt sich also

aus ihrer Doppelrolle: Einmal erfolgt die Übermittlung aller lebenswichtigen Informationen an Nachkommen (Vererbung) durch die Weitergabe von DNS als Informationsspeicher. Zum anderen übernimmt die DNS in der einzelnen Zelle die Steuerfunktion für den Stoffwechsel. Der Verlust ihrer Funktionstüchtigkeit als Folge einer Strahleneinwirkung läßt sich in manchen Fällen schon durch veränderte physikalische Eigenschaften zeigen. So lassen sich Strangbrüche bei Molekulargewichtsbestimmungen aus dem Sedimentationsverhalten bei Ultrazentrifugation erkennen oder Basenveränderungen durch Änderung der Absorption von elektromagnetischer Strahlung (optische Spektroskopie). Der zuletzt genannte Effekt gestattet unter gewissen Voraussetzungen auch das Auffinden von Zwischenprodukten der Reaktionskette in Form von Radikalzuständen (ESR).

Ein Beweis der biologischen Relevanz einer Veränderung läßt sich schließlich nur durch Korrelation mit dem Verlust der biologischen Funktion erbringen. Das geschieht am besten mit einfachen natürlichen biologischen Systemen, die beiden Untersuchungsmethoden zugänglich sind. Hier haben sich DNS enthaltende Viren als besonders geeignet erwiesen. Ihr molekularer Aufbau ist sehr übersichtlich. Ein großer Teil ihrer Masse besteht aus Nukleinsäure, welche von einer Hülle aus Protein umschlossen ist. Die Virus-DNS ist bei den meisten Viren aus den gleichen Bausteinen aufgebaut wie z.B. die DNS in den Chromosomen des Menschen. Die an Viren gewonnenen Versuchsergebnisse behalten also auch für das menschliche Erbgut ihre Gültigkeit, naturgemäß ohne direkt übertragbar zu sein. Aber im Gegensatz zum komplizierten Chromosom stellt Virus-DNS mit ihrem sehr geringen Informationsgehalt eine sehr übersichtliche biologische Elementareinheit dar.

Der einfachste biologische Nachweis der Unversehrtheit der Virus-DNS besteht in der Prüfung der Vermehrungsfä-

higkeit der Viren. Diese Vermehrung ist nicht selbständig und wird in der Wirtszelle vorgenommen. Der Infektionsmechanismus ist noch nicht genau bekannt. Ganz sicher spielen die Virusproteine dabei eine wichtige Rolle. Nur die DNS dringt in die Zelle ein und benutzt den biochemischen Syntheseapparat der Wirtszelle zur Erzeugung neuer Viren.

Viren, die nur für Bakterien pathogen sind, werden Bakteriophagen genannt. Von den Phagen des Bakteriums *Escherichia coli* ist das Virus ϕ X-174 besonders interessant. Seine Gestalt ist kugelig (\varnothing 250 Å). Das Hüllenprotein besteht aus 12 im Elektronenmikroskop erkennbaren Einheiten (MacLean 1962). 25,5 % seiner Masse ist DNS in Einzelstrangform (MGW $1,7 \cdot 10^6$) (Sinsheimer 1959), der Rest ist Protein. Die etwa 5500 Nukleotide sind zu einem ringförmigen Molekül verbunden. Legt man den Triplett-Code zu Grunde, läßt sich mit 5500 Nukleotiden die Folge von etwa 1800 Aminosäureresten in Proteinen codieren. Damit lassen sich etwa sieben Proteinarten (MGW $3 \cdot 10^4$) aufbauen. Der Informationsgehalt dieser DNS ist also besonders gering.

Von besonderem Interesse ist der Umstand, daß auch die ihrer Proteinhülle entledigte DNS dieses Phagen in der Lage ist, die Synthese kompletter Viren zu induzieren. Durch das Fehlen der Proteinhülle ist dieser sogenannten infektiösen DNS allerdings der Mechanismus zum Eindringen in die Bakterienzelle verloren gegangen. Der Zutritt zum Zellinnern des Wirts muß deshalb durch künstliches Perforieren seiner Zellwand mit Hilfe der Enzyme Lysozym verschafft werden, deren Wirkung auf das Lipopolysaccharid der Zellwand durch den Komplexbildner ÄDTA unterstützt wird. Derart behandelte Bakterien verlieren ihre Stäbchenform und aktive Beweglichkeit und nehmen Kugelform an ("Sphäroplasten"). Der Stoffwechsel des Bakteriums wird dadurch nicht beeinträchtigt. Gelingt es einem infektiösen DNS-Molekül in den Sphäroplasten einzudringen,

unterscheidet es sich in seinem Verhalten nicht von einem auf natürlichem Weg, d.h. unter Mithilfe der Proteinhülle in ein intaktes Bakterium hineingekommenes Molekül.

Wegen der Proportionalität der Zahl der erzeugten Phagen zur Zahl der ursprünglich vorhandenen DNS-Molekel ist dieser biologische Nachweis der Phagen ein brauchbares und empfindliches Maß für die Funktionstüchtigkeit der bestrahlten freien DNS.

3.2 Die Probenbereitung

Freie DNS wurde durch Phenolbehandlung einer Suspension von ØX-174 in Borat-Puffer ($2 \cdot 10^{11}$ Phagen/ml) gewonnen (Anhang S. 35) (Mandell u. Hershey 1960). Nach der Extraktion wird durch Dialyse der Borat-Puffer gegen NCE-Puffer ausgetauscht. Dieser Puffer behindert durch den Gehalt an komplexbildenden Verbindungen die enzymatische Zerstörung der DNS durch das Enzym DNase. Als Suspension in NCE-Pufferlösung ist die DNS über Monate im Kühlschrank haltbar, wenn bei der Entnahme einer Probe sorgfältig auf sterile Arbeitsweise geachtet wird. Es war deshalb möglich, die im folgenden beschriebenen Bestrahlungsexperimente mit einer einzigen DNS-Fraktion durchzuführen. Aus dieser Lösung wurde für jeden Versuch eine kleine Menge entnommen und im Verhältnis 1:500 mit doppelt-destilliertem Wasser (pH 7,0 mit Ammoniak eingestellt) verdünnt. Dadurch wird die Salzkonzentration stark herabgesetzt. Versuche, den Salzgehalt auf andere Weise zu verringern, z.B. durch Dialyse gegen Wasser, waren nicht erfolgreich. Zwar ließ sich die Salzkonzentration verringern, aber die DNS war während der 24-stündigen Dialyse einer zu großen Gefahr ausgesetzt, enzymatisch zerstört zu werden. Der Gehalt an intakter DNS nahm mit der Dauer der Dialyse laufend ab.

Aus der Verdünnung wurden je 0,01 ml auf Glasronden (\emptyset 12 mm) aufpipettiert und sofort auf CO_2 -Eis eingefroren. Die Proben wurden anschließend 8 - 12 Stunden aus dem

gefrorenen Zustand im Vakuum bei ca. 10^{-2} Torr getrocknet. Durch die Methode der Gefriertrocknung wurde die Bildung von Trocknungsringen vermieden, da das Wasser aus dem Eiszustand absublimiert. Die DNS-Schicht wird dabei gleichmäßiger als bei Trocknung im Exsikkator. Während sich ØX-DNS aus Pufferlösung praktisch ohne Verlust der Infektiosität trocknen läßt, werden aus der Verdünnung bereits 50 bis 60 % der Molekeln durch das Trocknen inaktiviert oder können nicht wieder vom Glas abgelöst werden.

Die der Strahlung ausgesetzten Substanzen sind sehr klein. Jedes Glasplättchen trägt etwa $9 \cdot 10^{-12}$ g DNS und $3 \cdot 10^{-7}$ g Salze. Der Anteil an Fremdstoffen ist also noch recht hoch. Jedoch zeigten mikroskopische Untersuchungen der Proben, daß sich das Salz in Form von winzigen Kristallnestern (etwa 2 bis 3 pro Probe) anhäuft, so daß in den Zwischenräumen die DNS praktisch unbedeckt vorliegt. Diese Annahme wird durch experimentelle Befunde gestützt. Einmal ist die Größe des konstanten Anteils bei den Inaktivierungskurven praktisch unabhängig von der Wellenlänge des inaktivierenden Lichts, zum anderen ist sie proportional zur Salzkonzentration der Proben. In den Salznestern wird ein geringer Teil der DNS-Molekeln eingeschlossen. Die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Form der Inaktivierungskurven werden später diskutiert.

Zur Bestrahlung wurden jeweils 19 Proben auf dem äußersten Kreis der Bestrahlungsplatte befestigt. Diese Probenträgerplatte hat einen Abstand von 46 cm vom Austrittsspalt des Monochromators. Dadurch ist eine weitgehend homogene Ausleuchtung der Proben gesichert. Unter der Annahme, daß die Intensitätsverteilung eine Normalverteilung ist, ergibt sich bei einer Spaltweite 2mm (30 \AA Bandbreite) ein Intensitätsabfall von der Mitte zum Rand der Probe (\varnothing 5mm) von weniger als 3 %. Bei jeder Bestrahlungsserie wurden 5 bis 6 Proben als unbestrahlte Kontrollen auf einem Objektträger an lichtgeschützter Stelle in der Bestrahlungskammer deponiert.

Nach erfolgter Bestrahlung wurden die Plättchen in je 0,5 ml Tris-Pufferlösung (0,05 M, pH 8,1) gebracht und die DNS abgelöst. Die Ablösung ist nach ca. 10 min praktisch beendet, jedoch wurden die Plättchen während der anschließenden Infektion der Sphäroplasten in den Reagenzgläsern belassen.

3.3 Der biologische Nachweis der Strahlenschädigung

Aus einer Lösung infektiöser ØX-DNS in Tris-Puffer (pH 8,1) werden 0,5 ml mit der gleichen Menge Sphäroplastensuspension (E.coli K 12) vereinigt und bei 35 °C im Wasserbad inkubiert. Die Herstellung der Sphäroplasten (s. Anhang) erfolgte meist erst kurz vor dem Versuchsbeginn. Nach 20 min Inkubationszeit ist der Infektionsvorgang abgeschlossen. Etwa 0,1 % der DNS-Molekeln ist infektiös (Guthrie u. Sinsheimer 1963). Durch Zugabe von 1 ml PAM-Nährmedium wird der Stoffwechsel der Sphäroplasten aktiviert und die Produktion der Phagen beginnt. Häufiges Schütteln der Probenröhrchen bewirkte eine gute Durchmischung und Belüftung. Nach 400 min verdünnten wir 1:10 mit destilliertem Wasser, um durch osmotischen Schock die Lysis der Zellen zu vervollständigen. Von der Verdünnung werden 0,1 ml mit einigen Tropfen einer Flüssigkultur von E.coli C/1 auf einen festen Agarnährboden ausgestrichen (Adams 1959), bei Zimmertemperatur bis zum Einsickern der Flüssigkeit in den Agar gewartet und anschließend 8 h bei 37 °C im Wärmeschrank bebrütet. Es bildet sich ein dichter Bakterienrasen, der nur an den Stellen, an denen sich ein Virus befunden hat, ein kreisförmiges Loch durch Zerstörung der Bakterien aufweist. Zum besseren Erkennen der Löcher verwendeten wir einen Agar, der durch die Stoffwechselprodukte der Bakterien eine Blaufärbung erhält (Bresch 1952). Der Zusammenhang zwischen der Zahl infektiöser DNS-Molekeln in der Ausgangssuspension und der Zahl der später nachgewiesenen Phagen ist bei den verwendeten Sphäroplasten- und DNS-Konzentrationen linear (Abb. 18).

3.4 Experimente und Ergebnisse

Die Abnahme der biologischen Aktivität von Enzymen und isolierten DNS-Molekeln durch Strahleneinwirkung folgt im allgemeinen einer exponentiellen Funktion der verabreichten Dosis:

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

N/N_0 ist der Bruchteil der nach der Dosis D noch funktionsfähigen Moleküle. Der Inaktivierungsquerschnitt σ ist ein Maß für die Inaktivierungswahrscheinlichkeit. Bei $N/N_0 = e^{-1} = 0,37$ ergibt sich σ aus der 37 %-Dosis (D_{37}) zu $\sigma = 1/D_{37}$. In der Praxis wird der Inaktivierungsquerschnitt mit größerer Genauigkeit aus der Steigung der Inaktivierungskurve ermittelt, die bei halblogarithmischer Auftragung eine Gerade ergibt: $\ln N/N_0 = -\sigma \cdot D$.

In manchen Fällen findet man Inaktivierungskurven, die erst bei höheren Dosen in eine Exponentialkurve einmünden. Unter der Annahme quantenhafter Energieabsorption durchgeführte Betrachtungen des Inaktivierungsvorgangs lassen erkennen, daß sich auch bei diesen Mehrtreffbereichskurven aus der Steigung bei hohen Dosen der Inaktivierungsquerschnitt gewinnen läßt (Zimmer 1960)

$$\ln N/N_0 = \ln m - \sigma D.$$

Die Konstante m wird durch Rück-Extrapolation auf $D = 0$ erhalten (Extrapolationszahl).

In den Abbildungen 19a und 20a sind zwei für Vakuum-UV-Bestrahlung typische Inaktivierungskurven dargestellt. Der Anteil der aktiven Molekeln nimmt mit wachsender Dosis ab und strebt schließlich bei hohen Dosen einem konstanten Wert zu. Ein gewisser Teil der DNS-Moleküle ist also nicht inaktivierbar. Der Grund für diesen Effekt ist in der bereits erwähnten Anwesenheit von Salzresten auf den Probenplättchen zu finden. Von den im Vergleich zur geringen Durchdringungsfähigkeit des Va-

kuum-UV großen Salzkristallen wird ein gewisser Teil der DNS bedeckt und ist für das inaktivierende Licht nicht erreichbar. Der nichtinaktivierbare Anteil beträgt bei der gewählten 1:500 Verdünnung im Mittel 30 % und ist unterhalb von 1700 \AA nicht von der Wellenlänge des Lichts abhängig.

Erst nach Abzug des konstanten Anteils ergeben sich die eigentlichen Inaktivierungskurven (Abb. 19b u. 20b), aus denen der Inaktivierungsquerschnitt ermittelt wird. In Abb. 21 ist die Schar der so erhaltenen Inaktivierungskurven für Bestrahlung mit Licht verschiedener Wellenlänge dargestellt. Die einzelnen Meßpunkte sind mit relativen Fehlern von 5 bis 10 % behaftet. Um die erhöhte Wirksamkeit des Vakuum-UV gegenüber dem normalen UV zu demonstrieren, wurde auch eine Bestrahlung mit 2537 \AA Wellenlänge durchgeführt (Abb. 22). Die erhaltene Inaktivierungskurve ist zum Vergleich in Abb. 21 mit aufgetragen. Mit zunehmender Quantenenergie des Lichts sind zur Inaktivierung immer kleinere Expositionen ausreichend. Überraschend ist, daß sich vom Längerwelligen ausgehend, der Typ der Inaktivierungskurven ändert. Bei 2537 und 1630 \AA ergeben sich exponentielle Kurven. Bei 1216 und 1110 \AA erscheint eine Schulter bei kleinen Dosen, während bei sehr kleinen Wellenlängen (584 \AA) die Inaktivierung wieder im gesamten Dosisbereich exponentiellen Verlauf zeigt. Auch bei den Schulterkurven ergibt sich bei hohen Dosen eine Verträglichkeit der Meßpunkte mit einer Exponentialkurve. Deshalb erschien es gerechtfertigt, auch in diesem Fall aus der Steigung der Kurve den Inaktivierungsquerschnitt zu ermitteln.

In Tabelle I sind die numerischen Werte der durch Regression errechneten Inaktivierungsquerschnitte aufgeführt und in Abb. 23 graphisch dargestellt. Auffällig ist der steile Anstieg zwischen 9 und 11 eV. Diese Stufe und das gleichzeitige Auftreten des Schultertyps der Inaktivierungskurven sind ein deutlicher Hinweis, daß in diesem

Bereich ein neuer, sehr wirksamer Inaktivierungsmechanismus auftritt. Es ist sehr naheliegend, hier Schädigung infolge von Ionisation zu vermuten.

Es wurde deshalb der Versuch unternommen, die Ionisierung direkt nachzuweisen. Die Bestrahlung einer DNS-Schicht mit Licht ausreichender Photonenenergie muß zur Emission von Elektronen aus der Oberfläche führen. Diese lassen sich durch eine Zugspannung auf einer Anode sammeln. Die Anordnung entspricht einer Photozelle mit DNS-Katode. Den experimentellen Aufbau zeigt Abb. 24. Vom Monochromator kommend fällt das Licht durch ein Loch in einer geerdeten Al-Scheibe auf ein Stück gefriergetrockneter DNS. Der DNS-Brocken ist an einem Kupferdraht befestigt, über den die Katodenspannung zugeführt wird. Da sich für diesen Versuch ØX -DNS in ausreichender Menge nicht beschaffen ließ, wurde Kalbsthymus-DNS verwendet. Unterschiede hinsichtlich der Ionisierung sind nicht zu erwarten, da kein qualitativer Unterschied zur ØX -DNS vorliegt.

Eine ausgezeichnete mechanische und elektrische Verbindung der DNS zum spannungszuführenden Draht ergab die folgende Präparationsmethode. Von einer Kalbsthymus-DNS-Lösung (2,1 mg/ml) wurden 0,15 ml auf eine polierte Nickelscheibe getropft. Es bildete sich ein halbkugeliger Tropfen, in den der blanke Draht hineingesteckt wurde. Der Tropfen wurde dann auf CO_2 -Eis eingefroren und 12 Stunden bei 10^{-2} Torr unter weiterer Kühlung mit CO_2 -Eis-Azetongemisch gefriergetrocknet. Auch nach dem Trocknen behielt der DNS-Brocken die linsenförmige Gestalt und ließ sich mit dem fest "eingekitteten" Draht leicht von der glatten Nickeloberfläche abheben und als Katode in der Photozelle anbringen. Nach Montage der Photozelle in der Bestrahlungskammer wurde für verschiedene Wellenlängen die pro erg auffallende Strahlung emittierte Zahl der Elektronen gemessen. Dazu wurde der Photozellenstrom mittels Elektrometerverstärker registriert. Bei 1750 \AA (7,1 eV) sank der Strom unter die Nachweisgrenze (10^{-14} A).

Die graphische Darstellung der Abhängigkeit von Elektronenemission pro eingestrahlem Quant zeigte große Ähnlichkeit mit dem Verlauf des Inaktivierungsquerschnitts. Beide Kurven wurden normalisiert aufgetragen (Abb. 25). Von 10 eV aufwärts zeigt die Kurve für die Elektronenemission den gleichen Verlauf wie die für den Inaktivierungsquerschnitt. In diesem Bereich besteht also ein enger Zusammenhang zwischen Ionisation und Inaktivierung. Unterhalb von 10 eV streben die Kurven auseinander. Es ist noch eine deutliche Inaktivierung feststellbar, während die Ionisation sehr stark abnimmt. In diesem Bereich erfolgt die Inaktivierung nur noch durch Anregungen der Moleküle.

3.5 Diskussion

Anregung und Ionisation eines Moleküls sind häufig Anlaß zu einer Änderung der Molekülstruktur, die sich im Fall des DNS-Moleküls meist als Verlust der biologischen Aktivität bemerkbar macht. Die einfachste Folge dieser Primärprozesse der Strahlenwirkung, nämlich Abgabe der Anregungsenergie oder der bei Rekombination von Ion und Elektron freiwerdenden Bindungsenergie des Elektrons als Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzstrahlung hinterläßt keine bleibende Wirkung. An bleibenden Veränderungen beobachtet man Vernetzungen von DNS-Strängen (Setlow u. Doyle 1954, Alexander u. Stacey 1959, Hagen 1965), Strangbrüche (Freifelder 1965, Hagen 1967) und Basenveränderungen (Müller 1964, Pershan et al. 1964, Müller 1968). Diese Schäden machen die Replikation der DNS oder die Ablesung der Information unmöglich oder führen zu einer Fehlablesung. Da es erst nach Zuführung einer Mindestenergie zur Abstraktion eines Elektrons kommt, führt die Absorption von Licht mit einer Quantenenergie unterhalb dieser Mindestenergie ausschließlich zur Anregung der Moleküle. Dies geschieht stets in Form einer Resonanzabsorption. Mittlere Anregungsenergien werden bevorzugt von schwachbindenden Elektronen absorbiert. So erfolgt die UV-Absorption der DNS fast ausschließlich durch die

schwachbindenden π -Elektronen der zyklischen Basen. Dadurch induzierte Veränderungen bleiben auf die Basen beschränkt. Es ergeben sich Dimerisierungen direkt benachbarter Pyrimidinbasen z.B. Thymin unter Öffnung der Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C5 und C6 (Beukers et al. 1959). Aber bereits im kurzwelligen Bereich des normalen UV-Lichts dissoziieren die Dimere bereits wieder, so daß der Schaden dort keine Bedeutung erlangen kann. Die wellenlängenabhängige Verteilung des Inaktivierungsquerschnitts für Dimerisierung verläuft parallel zur Verteilung der optischen Absorption durch die π -Elektronen. Bei 2600 Å ergibt sich ein Maximum der Wirkung (maximaler Inaktivierungsquerschnitt), bei 2350 Å ein Minimum (Setlow 1961).

Bei noch kürzeren Wellen erfolgt wieder ein Anstieg der Inaktivierungswahrscheinlichkeit, der sich in den Bereich des Vakuum-UV fortsetzt (Abb. 23). In diesem Bereich werden die σ -Elektronen angeregt. Infolge des bindenden Charakters der σ -Elektronen ist die Wahrscheinlichkeit der Dissoziation des Moleküls bei ihrer Anregung groß. Dissoziation dürfte also in diesem Bereich der auf die Anregung folgende Schritt der Reaktionskette und damit wesentliche Ursache des Molekülschadens sein. Die Häufigkeit des Prozesses nimmt mit wachsender Anregungsenergie zu. Entsprechend vergrößert sich der Inaktivierungsquerschnitt. Beim Übergang von Anregung durch 2537 Å Wellenlänge zur Anregung mit 1630 Å nimmt der Inaktivierungsquerschnitt um einen Faktor 6 zu (Tabelle I).

Verfolgt man den Verlauf des Inaktivierungsquerschnitts in Abb. 23 zu noch kürzeren Wellen hin, ergibt sich ein steiler Anstieg bei Bestrahlung mit Licht von Quantenenergien oberhalb um 9 eV. Da der Verlauf des Inaktivierungsquerschnitts mit dem der Elektronenausbeute in diesem Bereich ausgezeichnet übereinstimmt, kann geschlossen werden, daß hier die Ionisation die wesentliche Ursache der Inaktivierung darstellt. Der steile Anstieg

der Elektronenemission legt außerdem die Annahme einer Schwellenenergie für die Ionisation der DNS bei etwa 9 eV nahe. Es ist aber zu bedenken, daß bei vielatomigen Molekülen nicht ohne weiteres von einer Ionisierungsenergie gesprochen werden darf, da eine Vielzahl von Elektronen mit unterschiedlichen Bindungsstärken zur Molekülstruktur beiträgt. Die Abtrennung nichtbindender Elektronen (einsame Elektronenpaare) berührt das Molekül zunächst nicht. Ebenso ist die Abstraktion der delokalisierten π -Elektronen nur von geringer Bedeutung. In beiden Fällen kann jedoch bei der Rekombination von Elektron und Ion, die im allgemeinen nicht zum Grundzustand des Moleküls führt, die verbleibende Anregungsenergie zur Dissoziation führen.

Dagegen stellt die Abtrennung eines starkbindenden σ -Elektrons einen erheblich stärkeren Eingriff in die Molekülstruktur dar und führt zwangsläufig zum Zerbrechen des Moleküls. Letztlich dürfte also auch bei der Ionisation, wie bei den hohen Anregungen, die Dissoziation eine häufige, zur Inaktivierung der DNS führende Folgereaktion sein. Dieser Schluß wird auch durch Untersuchungen an Kohlenwasserstoffen bestätigt. Ditchburn (1955) konnte nachweisen, daß im Bereich des kurzwelligen Vakuum-UV Ionisierung zusammen mit Dissoziation der Moleküle erfolgt.

Auffällig an den Inaktivierungskurven der O_2 -DNS (Abb. 21) ist das Auftreten von Schultern im Bereich kleiner Dosen bei den Kurven für Bestrahlung mit 1216 Å und 1110 Å Wellenlänge, d.h. oberhalb der Ionisierungsgrenze der DNS. Dagegen zeigt die Inaktivierungskurve bei Bestrahlung mit Photonen von 584 Å Wellenlänge im ganzen Dosisbereich einen exponentiellen Verlauf. Schulterkurven deuten auf eine Reaktionskinetik höherer Ordnung hin. Die bislang erarbeiteten Daten lassen noch keine eindeutige Erklärung des Effekts zu. Ohne zusätzliche Informationen ist es deshalb auch nicht statthaft, durch eine Kurvenanalyse auf Grund des treffertheoretischen Modells

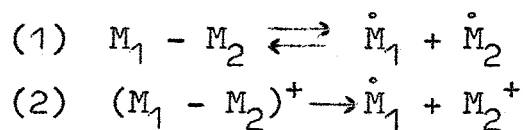
Beweise für einen Reaktionsmechanismus zu führen, etwa einen Mehrtreffervorgang zu postulieren. Die Annahme einer Zweifachionisierung als Voraussetzung zur Inaktivierung der DNS im Bereich des ionisierenden Vakuum-UV ist möglich, bedarf aber einer eingehenden Prüfung. Dieser Prozeß könnte bei Bestrahlung mit Lichtquanten von 21 eV (584 Å Wellenlänge) nach einem Absorptionsereignis erfolgen und damit den Wegfall der Schulter erklären. Die Ermittlung der Quantenausbeute für DNS als Quotient der Wirkungsquerschnitte der Inaktivierung und der optischen Absorption im Bereich des kurzwelligen Vakuum-UV konnte noch nicht vorgenommen werden. Zur Bestimmung der optischen Absorption müssen sehr dünne DNS-Filme mit homogener Massenbelegung hergestellt werden. Da DNS nur in Wasser löslich ist, scheidet das hygroskopische LiF, das wegen seiner optischen Eigenschaften bis 1100 Å Verwendung finden könnte, als Träger für einen DNS-Film aus. Die Herstellung trägerfreier und ausreichend lichtdurchlässiger DNS-Filme ist bisher noch nicht zufriedenstellend gelungen. Nur im längerwelligen Bereich bis 1500 Å sind bereits Absorptionsquerschnitte von DNS-Filmen auf CaF_2 -Trägern bestimmt worden (Preiss u. Setlow 1956). Mit diesen Werten und den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Inaktivierungsquerschnitten läßt sich eine Abschätzung der zu erwartenden Quantenausbeuten vornehmen. Danach steigt die Quantenausbeute von $7 \cdot 10^{-3}$ bei 2537 Å auf $26 \cdot 10^{-3}$ bei 1630 Å. Es ist jedoch zu bedenken, daß die von Preiss und Setlow ermittelten Absorptionsquerschnitte hinsichtlich der Lichtstreuung nicht korrigiert sind. Außerdem könnte die Einzelsträngigkeit und das geringere Molekulargewicht der ϕ X-DNS zu einem, gegenüber der von Preiss u. Setlow benutzten DNS unterschiedlichen Absorptionsverhalten führen.

Es ist nun zu prüfen, inwieweit sich die beobachteten und eingangs erwähnten Schäden an der DNS, nämlich Vernetzungen, Strangbrüche und Basenänderungen, mit der Annahme der Dissoziation als der zum Schaden führenden Fol-

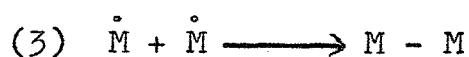
gereaktion der primären Energieabsorption erklären lassen. Eine solche Erklärung liegt auf der Hand im Fall der Strangbrüche, da im Grunde der Strangbruch die Dissoziation der DNS-Kette bedeutet.

Der naheliegende Angriffspunkt für diese Reaktion ist wohl die Zucker-Phosphat-Bindung. So ist etwa nach Abstraktion des H-Atoms am C3'-Kohlenstoff des Zuckers (Abb. 17) die Bindung zur Phosphatgruppe nicht mehr aufrecht zu erhalten. Ebenso ist ein Teil der beobachteten Basenveränderungen durch Dissoziation z.B. einer N-H-Bindung entstanden (Cook et al. 1967).

Dagegen lassen sich die Vernetzungen nicht in so direkter Weise darauf zurückführen. Ein Zusammenhang wird jedoch bei genauerer Betrachtung des Dissoziationsvorgangs nahegelegt. Beim Öffnen einer kovalenten Bindung, der bei organischen Molekülen häufigsten Bindungsart, ist das Auftreten von Molekülresten mit ungepaartem Elektronenspin (Radikale) zu erwarten. Die Existenz solcher Radikale nach Bestrahlung von Biomolekülen ist durch die Methode der Elektronenspinresonanzspektroskopie nachgewiesen (Zimmer u. Müller 1965, Müller 1967). Die Dissoziation eines Makromoleküls in radikalische Molekülreste \dot{M}_1 und \dot{M}_2 kann sowohl nach Anregung (1) als auch nach Ionisation (2) erfolgen:



Die Rückreaktion (1) kann unterbleiben, wenn eines der Radikale \dot{M}_1 , \dot{M}_2 diffusibel ist, wie z.B. der atomare Wasserstoff. Zurück bleibt eine in wasserfreier Präparation sehr langlebige Radikalstelle der DNS. Durch Kombination zweier solcher Radikalstellen auf verschiedenen DNS-Strängen kann das Zustandekommen einer Vernetzung erklärt werden (3).



Aus der langen Lebensdauer der Radikale im Trockenen ist zu schließen, daß die Reaktion (3) im Bestrahlungsexperiment, welches häufig unter Wasserausschluß durchgeführt wird, erst bei der Überführung der DNS in Lösung zustande kommt. Somit bietet die Dissoziation auch eine Erklärungsmöglichkeit für das Auftreten der Vernetzungen. Die Reaktion der erwähnten diffusiblen Radikale (H-Radikale) mit intakten Molekülen bringt eine weitere Schädigung der DNS mit sich (Braams 1963, Pruden et al. 1965, Dertinger 1967), auf die aber hier nicht im einzelnen eingegangen werden soll.

Die bisherigen Untersuchungen mit Vakuum-UV lassen noch keine Schlüsse auf die Relevanz der diskutierten Arten von Schäden in diesem Gebiet zu. Es ist jedoch als sicher anzunehmen, daß in dem untersuchten Wellenlängenbereich sowohl Vernetzungen als auch Basenveränderungen auftreten. Beide Schäden konnten bei den mittleren Anregungsenergien des UV nachgewiesen werden (Setlow u. Doyle 1954, Pershan et al. 1964). Auf Grund der steigenden Dissoziationswahrscheinlichkeit mit wachsenden Anregungsenergien (σ -Elektronen-Anregung) wird die Häufigkeit beider Prozesse im Bereich des Vakuum-UV zunehmen.

Hinsichtlich des Auftretens von Strangbrüchen ist jedoch noch keine Aussage möglich, da bisher keine genauen Vorstellungen darüber bestehen, welcher Energiebetrag aufgewendet werden muß, um den Bruch der DNS-Kette herbeizuführen. Bei Anregungsenergien von etwa 5 eV treten praktisch keine Brüche auf (Hagen 1968). Dagegen stellen Strangbrüche bei γ -bestrahlter DNS einen der häufigsten Schäden dar.

Eine eingehende Untersuchung gerade dieses Problems ist daher von besonderem Interesse. Vakuum-UV-Untersuchungen in Verbindung mit einer verbesserten Molekulargewichtsbestimmung mit der Ultrazentrifuge (Hagen 1968) können die Frage einer Klärung näherbringen, ob bereits die

hohen Anregungsenergien des nicht ionisierenden Vakuum-UV genügen, um Brüche zu erzeugen, oder ob dazu unbedingt Einzel- oder gar Mehrfachionisierungen benötigt werden.

Daneben besteht auch die Möglichkeit, daß zumindest ein Teil der Strangbrüche durch Einwirkung der diffusiblen H-Radikale veruraacht wird, etwa durch Abstraktion des Wasserstoffatoms am 3'-Kohlenstoff des Zuckers unter H₂-Bildung. Das könnte durch Variation der Bestrahlungstemperatur geprüft werden. Die schützende Wirkung tiefer Temperaturen (100 °K) gegenüber Strahlenwirkung (Hermann 1966) wird nach einer Hypothese von Braams (1963) mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Rekombination der H-Radikale mit der gleichzeitig entstehenden Radikalstelle an DNS-Molekül gedeutet. Läßt sich eine temperaturunabhängige Strangbruchrate finden, wären diese Brüche auf direkt nach Strahleneinwirkung erfolgende Dissoziation des DNS-Stranges zurückzuführen.

4. Zusammenfassung

- 1) In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen der Strahlenempfindlichkeit von infektiöser DNS des Bakteriophagen ØX-174 gegenüber extrem kurzwelligem Licht berichtet.
- 2) Um diese Untersuchungen zu ermöglichen, wurde ein leistungsfähiger Vakuum-Ultraviolett-Monochromator mit einer intensiven Lichtquelle konstruiert und gebaut.
- 3) Da sich im Strahlengang des Monochromators keine Fenster befinden, konnten die Messungen bis in das ferne Vakuum-Ultraviolett (584 Å) ausgedehnt werden. Es ist damit die Möglichkeit gegeben, die Schädigung der biologischen Aktivität durch hohe Anregungsenergien und durch einzelne Ionisationen getrennt voneinander zu untersuchen.

4) Erste Bestrahlungsexperimente mit OX-DNS in dünnen Schichten ($3 \cdot 10^{-11} \text{ g cm}^{-2}$) zeigten deutlich eine erheblich größere Wirksamkeit von Ionisationen im Vergleich zu Anregungen optischer Niveaus.

5) Die mittlere Exposition zur Erzeugung eines inaktivierenden Schadens ist bei Einstrahlung von Licht der Wellenlänge 584 \AA um einen Faktor 55 kleiner als bei 2537 \AA .

6) Durch Registrierung der von der Strahlung durch Photoeffekt abgetrennten Elektronen konnte eindeutig gezeigt werden, daß der Anstieg der Inaktivierungswahrscheinlichkeit bei Photonenenergien von etwa 9 eV mit dem Anstieg der Ionisierungswahrscheinlichkeit korrelierbar ist.

7) Der Verlauf der Elektronenemission in Abhängigkeit von der Quantenenergie des auslösenden Lichts legt die Annahme einer Schwellenenergie für die Ionisation der DNS bei 9 eV nahe.

5. Anhang

5.1 Die Herstellung der Fluoreszenzschirme

Kristallines Na-Salicylat wird in Methanol gelöst oder in einer Reibschale fein zerrieben und in Benzin aufgeschwemmt. Die Massenbelegung des Schirms soll 1 bis 5 mg/cm^2 sein, um eine optimale Fluoreszenzausbeute zu erzielen (Nygaard 1964). Eine entsprechende Menge Suspension oder Lösung wird auf den Glasträger getropft und an Luft getrocknet. Aus der Lösung kristallisiert das Salz aus und bildet eine gleichmäßige Kristallschicht. Auf diese Art hergestellte Schirme zeigen eine geringe Fluoreszenzausbeute, sind aber sehr haltbar. Sie eignen sich gut als Referenzschirm. Nachdem sie einmal kalibriert sind, werden sie im Exsikkator aufbewahrt und sind als Kontrollschirme verwendbar. Eine andere Herstellungsart ist das Aufsprühen der Lösung oder Suspension auf vorgewärmte

Glasplättchen mittels Zerstäuber. Auf diese Art werden Schirme mit homogener, mikrokristalliner Schicht erhalten, die hohe Fluoreszenzausbeute zeigen. Beide Verfahren wurden angewendet.

5.2 Die Herstellung der Oxidkatoden

Katoden mit Erdalkalioxidbelag zeichnen sich durch hohes Emissionsvermögen aus.

Nach einem von Mönch (1959) angegebenen Rezept wurden die Mischoxide folgendermaßen hergestellt:

In 650 ml Wasser wurden 46,5 g Bariumnitrat, 26,8 g Strontiumnitrat und 18,4 g Kalziumnitrat gelöst und auf 100 °C erwärmt. In 100 ml Wasser wurden 55 g Ammoniumkarbonat gelöst und unter Umrühren langsam zur Nitratlösung zugegeben. Der entstehende Niederschlag von Karbonat-Mischkristallen wurde abgefiltert, mit heißem Wasser ausgewaschen und 12 Stunden bei 120 °C im Trockenschrank getrocknet. Die getrockneten Karbonate wurden in einer Reibschale fein zerrieben und im Gewichtsverhältnis 1:4 mit Karbonylnickel gemischt (MacNair et al. 1953). Diese Mischung wurde mit Amylacetat zu einem dicken Brei angerührt und auf einen Streifen (20 x 5 mm) aus Nickelnetz (Maschenweite 0,5 mm) aufgetragen. Nach dem Trocknen erfolgte die Umwandlung der Karbonate in Oxide durch Erhitzen im Vakuum. Anschließendes Sintern bei etwa 1200 °C ergibt einen festhaftenden Belag. Die so erhaltenen Katoden sind sehr stabil und an Luft beständig.

5.3 Die Phenolextraktion der DNS

Die Ablösung der Proteinhülle der Phagen wurde durch Phenolextraktion bei 4 °C vorgenommen (Mandell 1960). Von einer Suspension aus ØX-Phagen in Borat-Puffer werden 1 ml mit der gleichen Menge Phenol, das mit Na-tetraborat gesättigt ist, versetzt und durchmischt. Nach 5 min Inkubation bei 4 °C wird bei 4000 U/min zentrifugiert. Die Phenolphase sammelt sich unter der wässrigen Phase. Mit

einer Spritze wird die obere DNS-haltige Schicht durchstoßen und das Phenol mit dem darin gelösten Protein abgesaugt.

Nachdem der Vorgang 4 mal wiederholt wurde, werden nach der letzten Phenolentfernung 4 ml Äther zugegeben und mit der wässrigen Phase durchmischt. Das restliche Phenol sammelt sich im Äther und kann nach Zentrifugation (4000 U/min) mit der Ätherphase abgesaugt werden.

Die Ätherextraktion des Phenols wird 6 mal wiederholt. Die DNS-Lösung wird anschließend 24 h gegen NCE-Pufferlösung bei 4 °C dialysiert.

NCE-Puffer enthält pro Liter 9 g NaCl, 3,87 g Na-Citrat und 0,482 g ÄDTA.

5.4 Die Herstellung der Sphäroplasten

Sphäroplasten wurden nach einer von Guthrie und Sinsheimer (1963) beschriebenen Methode aus Bakterien des Stammes E.coli K 12 hergestellt.

Unter Belüftung läßt man die Bakterien in 3 x D-Medium (Frazer, Jerrell 1953) bis zu einem Titer von $4 \cdot 10^8$ /ml wachsen. Der Titer wird spektrometrisch durch Extinktionsmessung bei 550 nm bestimmt. Die Eichkurve für diese Bestimmung ist in Abb. 25 dargestellt. 80 ml der Zellsuspension werden 15 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Sediment mit 1,4 ml Sucrose (1,5 M) resuspendiert. Dann werden nacheinander 0,68 ml BSA (30 %), 0,08 ml Lysozym (2 mg gelöst in 1 ml 0,25 M Tris-Puffer), 0,16 ml ÄDTA und 10 ml PA-Medium zugegeben. Nach 15 min Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 0,8 ml $MgSO_4$ (10 %) beendet. Die Sphäroplastensuspension wurde meist kurz vor der Infektion mit ØX-DNS hergestellt. Der Arbeitsgang wurde dazu geteilt. Die Bakterien wurden nach der Zentrifugation in Sucrose unter Zugabe von BSA resuspendiert und im Kühlschrank bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Die nur wenig Zeit in Anspruch nehmende Lysozymbehandlung erfolgte dann kurz vor der Infektion. Jedoch ist auch die

fertige Sphäroplastensuspension mehrere Tage im Kühlschrank haltbar (Kürzinger 1967). Mit der Dauer der Lagerung regenerieren sie allerdings ihre Zellwand, wodurch sich die Zahl der infizierbaren Zellen verringert (mikroskopischer Befund).

Bei den meist verwendeten geringen DNS-Konzentrationen sind aber auch nach mehreren Tagen noch ausreichend Sphäroplasten in der Suspension vorhanden.

6. Literaturverzeichnis

Adams, M.H. (1959)

Bacteriophages.

Interscience Publish Inc., New York

Alexander, P. u. Stacey, K.A. (1959)

Cross-Linking of Deoxyribonucleic Acid in Sperm Heads
by Ionizing Radiation.

Nature 184, 958-960

v. Ardenne, M. (1962)

Tabellen zur angewandten Physik. Bad. I, S. 652

V.E.B. Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin

Bath, K.L. u. Brehm, B (1965)

Ein Seya-Gitterspektrometer mit 0,2 Å Auflösung.

Z. f. angew. Physik 19, 39-40

Beukers, R., Ijlstra, J. u. Berends, W. (1959)

The effect of UV-light on some components of the nucleic
acids.

Rev. trav. chim. 78, 883-887

Braams, R. (1963)

A mechanism for the direct action of ionizing radiations.

Nature 200, 752-754

Brehm, B. u. Siegert, H. (1965)

Eine intensive H₂-Entladungslampe für das ferne Vakuum
Ultraviolett.

Z. f. angew. Phys. 19, 244-246

Bresch, C. (1952)

Unterscheidung verschiedener Bakteriophagentypen durch
Farbindikatornährböden.

Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infek-
tionskrankh. und Hygiene. I Org. 159, 43

Cook, G.B., Elliott, J.P. u. Wyard, S.G. (1967)
Electron spin resonance of an irradiated single-crystal
of cytosin.

Molecular Physics 13, 49-64

Dertinger, H. (1967)

Der Ursprung des ESR-Dubletts in der Nucleinsäure Cytosin:
Eine Einkristallstudie bei 8 mm Wellenlänge.

Z. f. Naturf. 22b, 1266-1269

Ditchburn, R.W. (1955)

Absorption cross-sections in the vacuum ultraviolet.

Proc. Roy. Soc. A 229, 44-62

Frazer, D. u. Jerrel, E.A. (1953)

The amino acid composition of T3 bacteriophage.

J. Biol. Chem. 205, 291-295

Freifelder, D. (1965)

Mechanism of inactivation of coliphage T7 by X-rays.

Proc. Natl. Acad. Sci. 54, 128-134

Greiner, H. u. Schäffer, E. (1958)

Theorie eines Konkavgitter-Spektrometers.

Optik 15, 51-62

Guthrie, G.D. u. Sinsheimer, R.L. (1963)

Observations on the infection of bacterial protoplasts
with deoxyribonucleic acid of bacteriophage ØX-174.

Biochim. Biophys. Acta 72, 290-297

Hagen, U. u. Wellstein, H. (1965)

Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der
Desoxyribonukleinsäure.

Strahlentherapie 128, 565-576

Hagen, U. (1968)

in Vorbereitung

Hagen, U. (1967)

Bestimmung von Einzel- und Doppelbrüchen in bestrahlter Desoxyribonukleinsäure durch die Molekulargewichtsverteilung.

Biochim. Biophys. Acta 134, 45-58

Hermann, K.O. (1966)

Der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von T1-Bakteriophagen.

Z. Naturforsch. 21b, 678-682

Hinteregger, H.E. u. Watanabe, K. (1953)

Photoelectric Cells for the Vacuum Ultraviolet.

J. Opt. Soc. Am. 43, 604-608

Kürzinger, K. (1967)

private Mitteilung.

Lea, D.E. (1946)

Actions of radiation on living cells.

Cambridge-University Press

Lemke, D. u. Labs, D. (1967)

The Synchrotron Radiation of the 6 GeV DESY Machine as a Fundamental Radiometric Standard.

Appl. Optics 6, 1043-1048

MacLean, E.C. u. Hall, C.E. (1962)

Studies on Bacteriophage ϕ X-174 and its DNA by Electron Microscopy.

J. Mol. Biol. 4, 173-178

MacNair, D. u. Lynch, R.T. (1953)

Molded Thermoionic Cathodes.

J. appl. Phys. 24, 1335-36

Mandell, J.D. u. Hershey, A.D. (1960)

A Fractionating Column for Analysis of Nucleic Acids.

Analytical Biochemistry 1, 66-77

Mönch, G.C. (1959)

Neues und Bewährtes aus der Hochvakuumtechnik.
VEB W. Knapp Verlag, Halle

Müller, A. (1964)

Spektrographische Untersuchungen mittels paramagnetischer
Elektronenresonanz über die Wirkung ionisierender Strahlen
auf elementare biologische Objekte.
Akadem. der Wiss. u. Lit. (math.-nat.-Klasse) Nr. 5

Müller, A. (1967)

The formation of radicals in nucleic acids, nucleoproteins,
and their constituents by ionizing radiations.
Progress in Biophysics and Molecular Biology. Vol. 17.
Pergamon Press New York, S. 99-147

Müller, A. (1968)

in Vorbereitung.

Nygaard, K.J. (1964)

The variation of the quantum efficiency of sodium
salicylate with thickness of material.
Brit. J. Appl. Phys. 15, 597-599

Packer, D.M. u. Lock, Ch. (1951)

Thermocouple Measurements of Spectral Intensities in the
Vacuum Ultraviolet.
J. Opt. Soc. Am. 41, 699-701

Pershan, P.S., Shulman, R.G., Wyluda, B.G. u. Eisinger, J. (1964)

Electron spin resonance of irradiated DNA.
Physics Vol. 1, 163-182

Platzman, R. u. Franck, J. (1958)

A physical mechanism for the inactivation of proteins by
ionizing radiation.
In: Symposium on Information Theory in Biology.
(ed. Yockey, Platzman, Quastler) Pergamon Press, London

- Po Lee u. Weissler, G.L. (1955)
Absorption Cross Section of Helium and Argon in the
Extreme UV.
Phys. Rev. 99, 540-542
- Preiss, J.W. u. Setlow, R. (1956)
Spectra of Some Amino Acids, Peptides, Nucleic Acids,
and Protein in the Vacuum Ultraviolet.
J. Chem. Phys. 25, 138-141
- Pruden, B.L., Snipes, W. u. Gordy, W. (1965)
Electron spin resonance of an irradiated single crystal
of thymidine.
Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 917-24
- Samson, J.A.R. u. Liebel, H. (1962)
Duoplasmatron as a Vacuum UV Light Source.
Rev. of Sci. Instr. 33, 1340-1343
- Samson, J.A.R. (1964)
Absolute Intensity Measurements in the Vacuum Ultra-
violet.
J. Opt. Soc. Am. 54, 6-15
- Setlow, R. u. Doyle, B. (1954)
The action of radiation on dry desoxyribonucleic acid.
Biochim. Biophys. Acta 15, 117-125
- Setlow, R.B. (1959)
Inactivation of Proteins by Vacuum Ultraviolet Radiation.
Proc. of the First National Biophys. Conference.
Yale University Press, New Haven, Connecticut, 174-183
- Setlow, R.B. (1960)
Ultraviolet Wave-Length-Dependent Effects on Proteins and
Nucleic Acids.
Rad. Res. 2, 276-289

Setlow, R. (1961)

The action spectrum for the reversal of the dimerization of thymine induced by ultraviolet light.

Biochim. Biophys. Acta 49, 237-238

Seya, M. (1952)

A New Mounting of Concave Grating Suitable for a Spectrometer.

Science of Light 2, 8-17

Sinsheimer, R.L. (1959)

A Single-Stranded Deoxyribonucleic Acid from Bacteriophage ϕ X-174.

J. Mol. Biol. 1, 43-53

Smith, K.C. (1966)

Physical and Chemical Changes Induced in Nucleic Acids by Ultraviolet Light.

Rad. Res. 6, 54-79

Timoféeff-Ressovsky, N.W. u. Zimmer, K.G. (1947)

Biophysik I. Das Trefferprinzip in der Biologie.

S. Hirzel Verlag, Leipzig

Tousey, R. (1962)

The Extreme Ultraviolet-Past and Future.

Appl. Optics 1, 679-694

Wainfan, W., Walker, W.C. u. Weissler, G.L. (1955)

Photoionization Efficiencies and Cross Sections in O_2 , CO_2 , A, H_2O , H_2 and CH_4 .

Phys. Rev. 99, 542-549

Walker, W.C., Wainfan, N. u. Weissler, G.L. (1955)

Photoelectric Yields in the Vacuum Ultraviolet.

J. Appl. Phys. 26, 1366-1371

Wantanabe, K. u. Inn, E.Y. (1953)

Intensity Measurements in the Vacuum Ultraviolet.

J. Opt. Soc. Am. 43, 32-35

Weissler, G.L. (1956)

Handbuch der Physik (S. Flügge).

Bd. 21, 304-382, Springer-Verlag

Ziegler, A. (1958)

Eine neue Methode zur Plasmaerzeugung für Ionenquellen.

Z. f. angew. Phys. 10, 185-186

Zimmer, K.G. u. Müller, A. (1965)

New light on radiation biology from electron spin resonance studies.

Current Topics in Radiation Research (ed. M. Ebert u. A. Howard) Vol. 1, 2-47

Zimmer, K.G. (1960)

Studien zur quantitativen Strahlenbiologie.

Abh. der Wiss. u. Lit. mathem.-naturw. Klasse Nr. 3

Franz Steiner Verlag, Wiesbaden

Zimmer, K.G. (1967)

Entwicklung und einige aktuelle Probleme der molekularen Strahlenbiologie.

Strahlentherapie 134, 161-174

Tabelle I: Parameter der Inaktivierungskurven für verschiedene Wellenlängen des auffallenden Lichts.

Wellenlänge [Å]	Quantenenergie [eV]	D_0 [erg/cm ²]	Extrapolations- zahl m	Inaktivierungsquerschnitt	
				[cm ² /erg]x10 ⁴	[cm ² /Photon]x10 ¹⁶
584	21,2	162,1 ± 6,5	1,00 ± 0,04	61,7 ± 2,5	2100 ± 85
1110	11,2	232 ± 15	1,40 ± 0,09	43,1 ± 2,8	774 ± 51
1216	10,2	473 ± 41	1,80 ± 0,20	21,1 ± 1,8	344 ± 29
1630	7,6	2183 ± 234	0,98 ± 0,07	4,58 ± 0,49	55,6 ± 6,0
2537	4,9	9230 ± 670	0,97 ± 0,06	1,08 ± 0,07	8,5 ± 0,6

Abb. 1: Schematische Darstellung des Vakuum-UV-Monochromators.

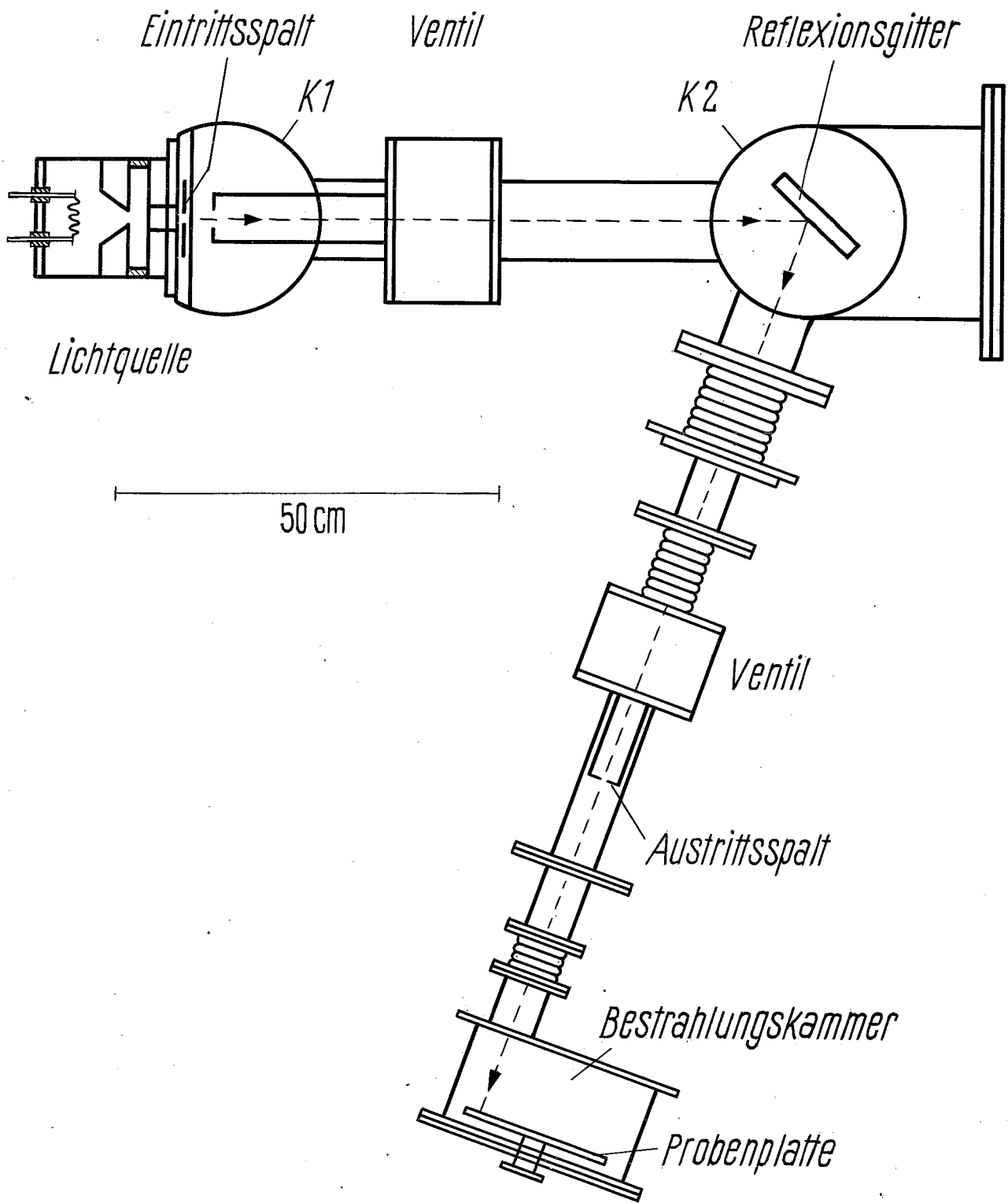
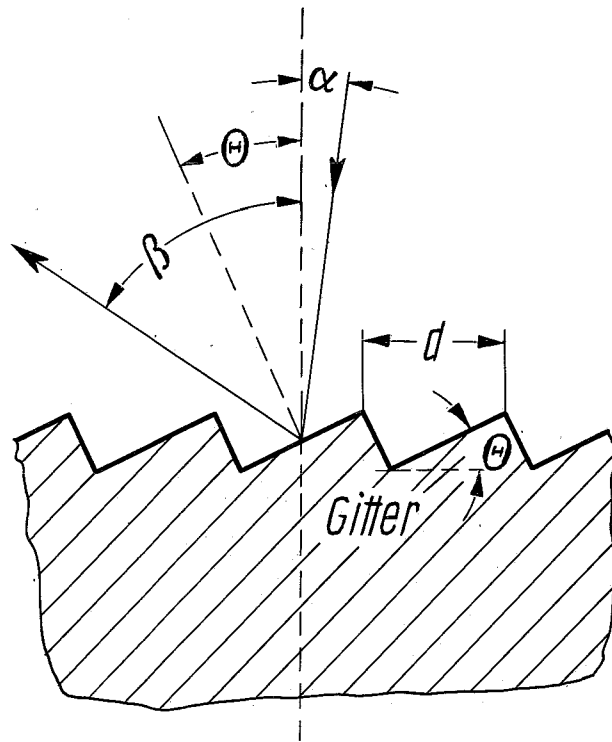


Abb. 2: Gitteroberfläche und Glanzwinkel.



- θ Glanzwinkel
- α Einfallswinkel
- β Beugungswinkel der Glanzwellenlänge
- d Gitterkonstante

Abb. 3: Schematische Darstellung der Gitterhalterung.

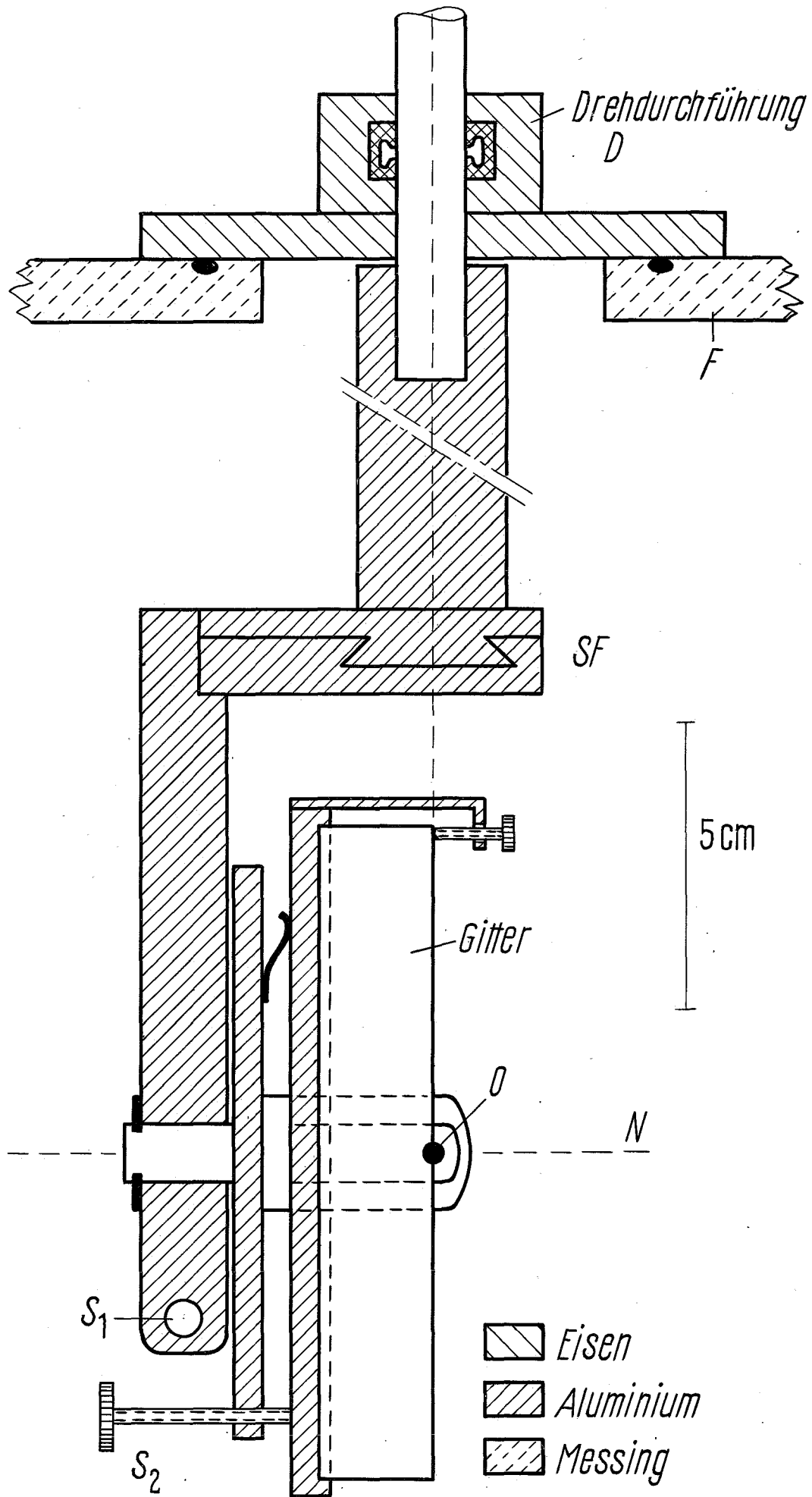
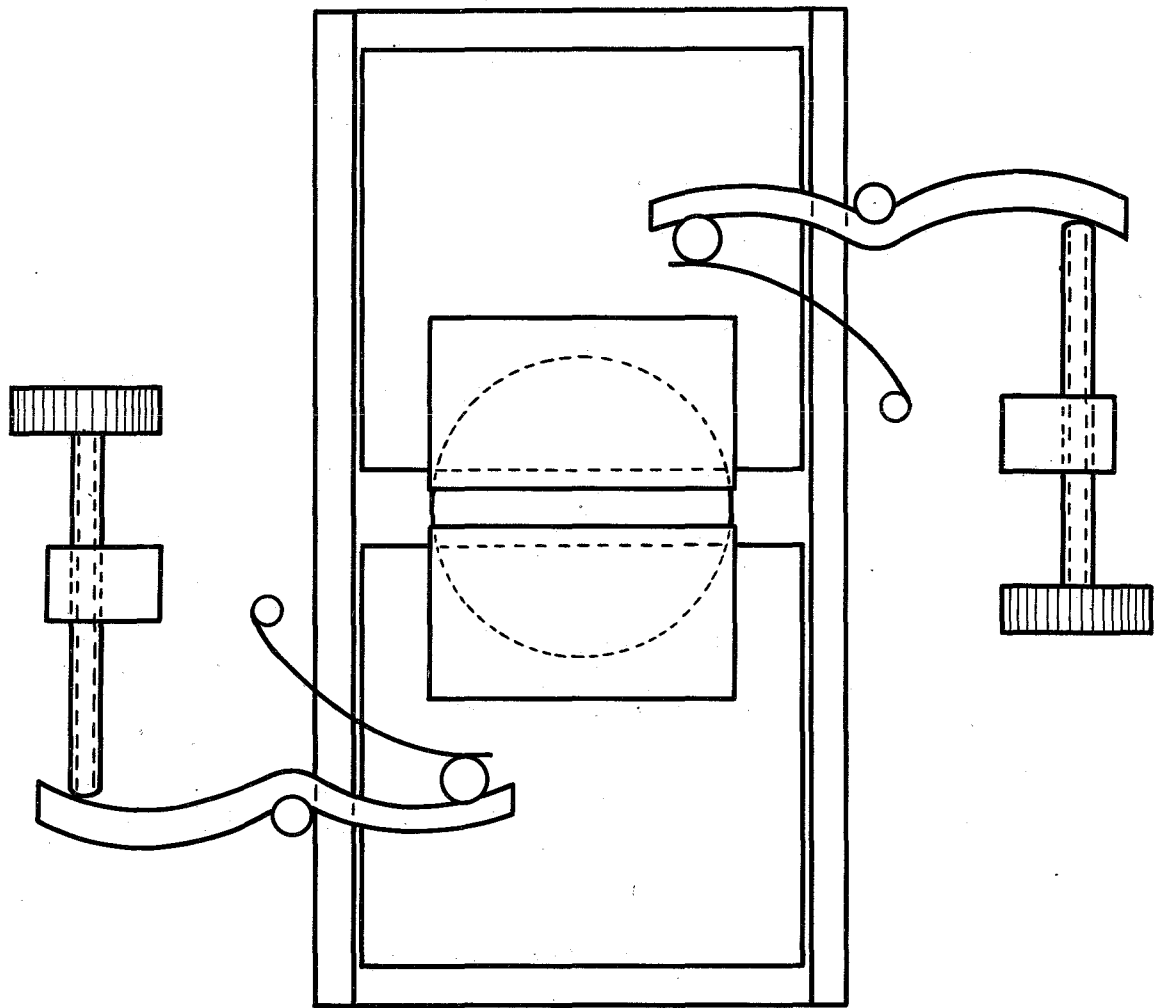
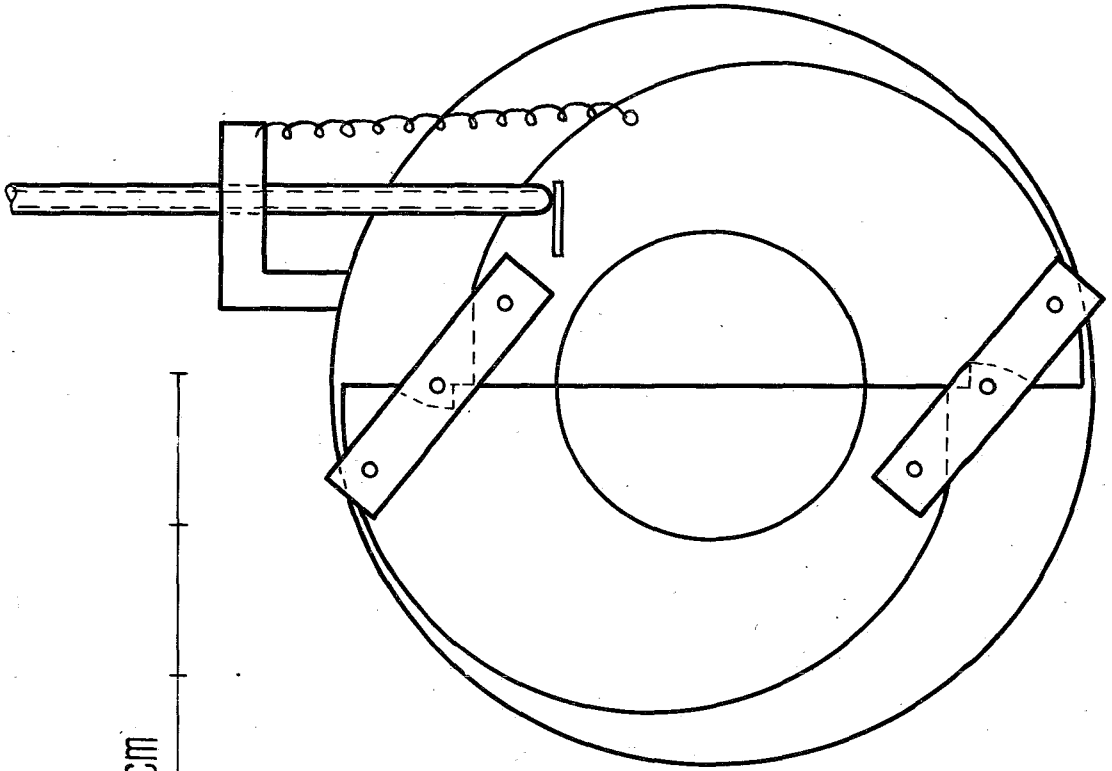


Abb. 4: Der Eintrittspalt.



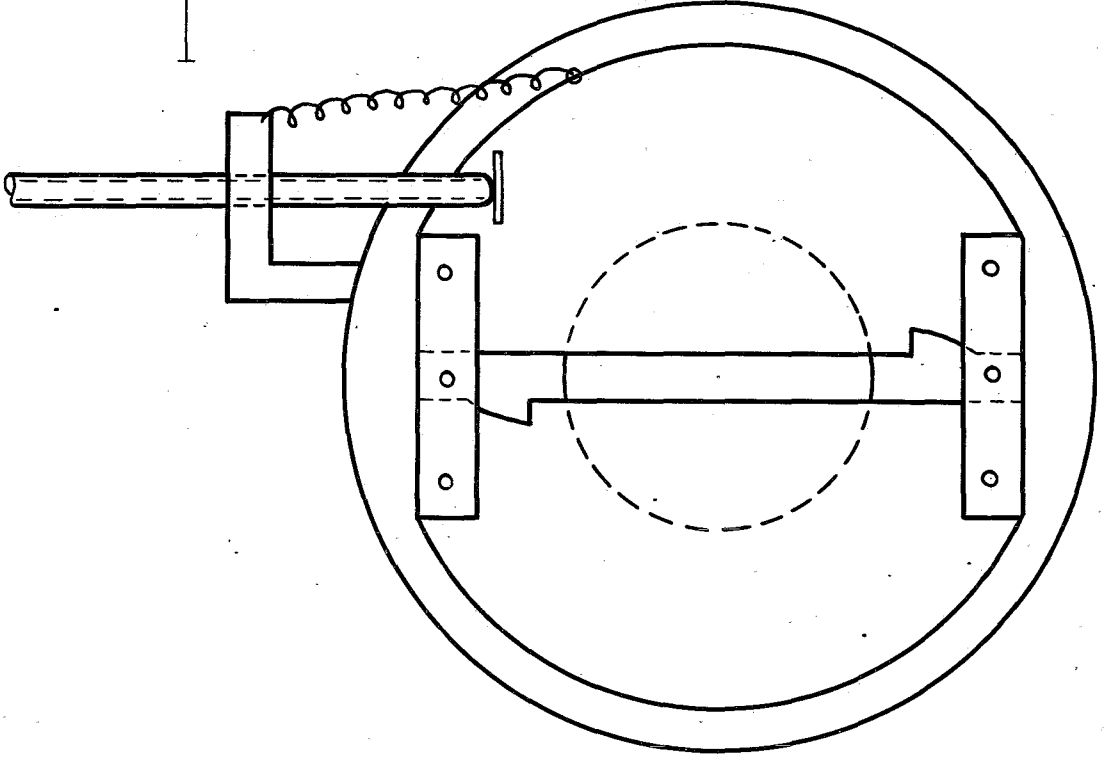
5 cm

Abb. 5: Der Austrittsspalt.



geschlossen

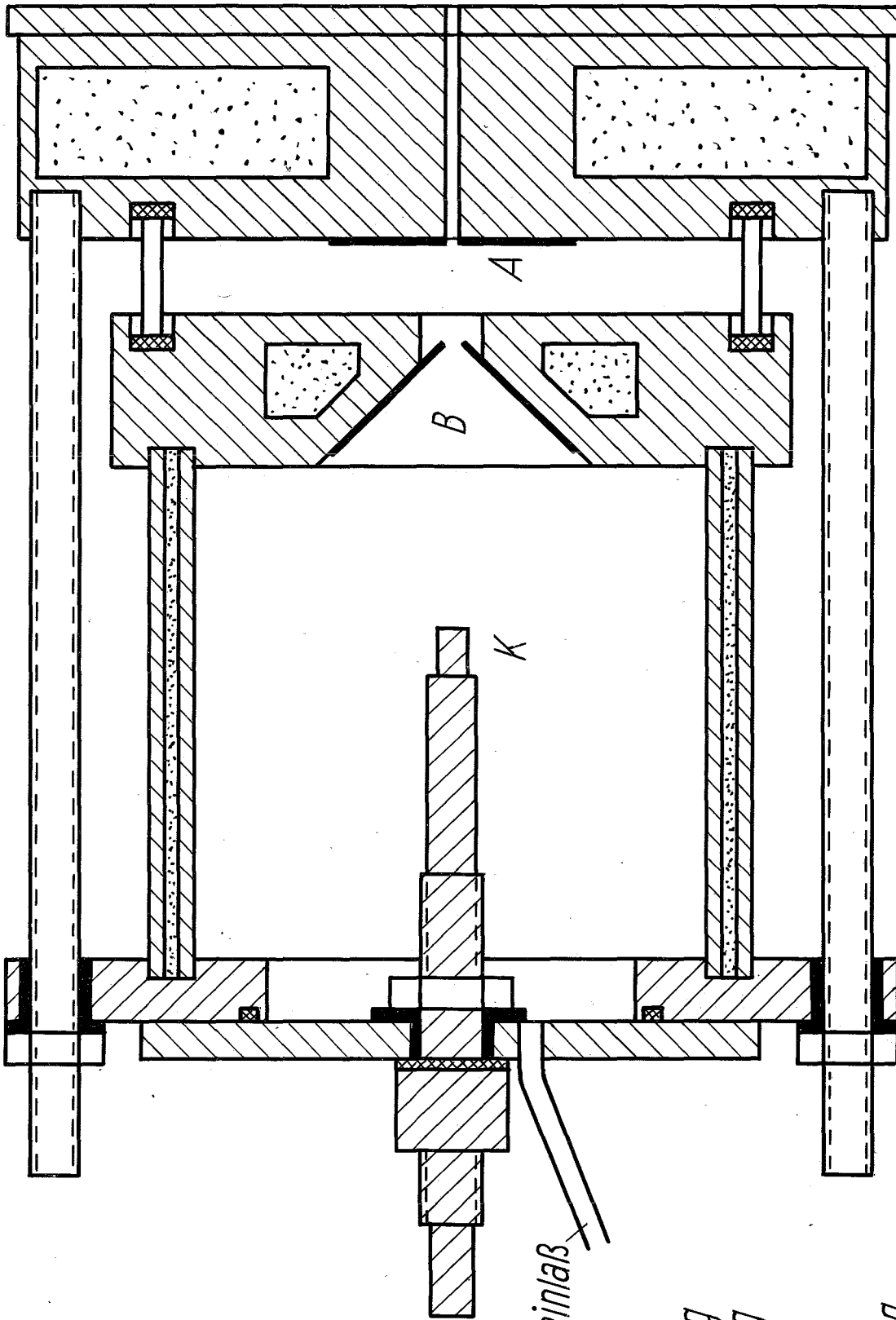
5cm



geöffnet

Abb. 6: Schematische Darstellung der Lichtquelle.
(Unoplasmatron)

Monochromator








Pyrex

K

B

A

Gaseinlaß

-  Messing
-  Messing
-  Wasser
-  Teflon
-  Dichtung

5cm

Abb. 7: Strom-Spannungs-Kennlinien des Unoplasmatrons.

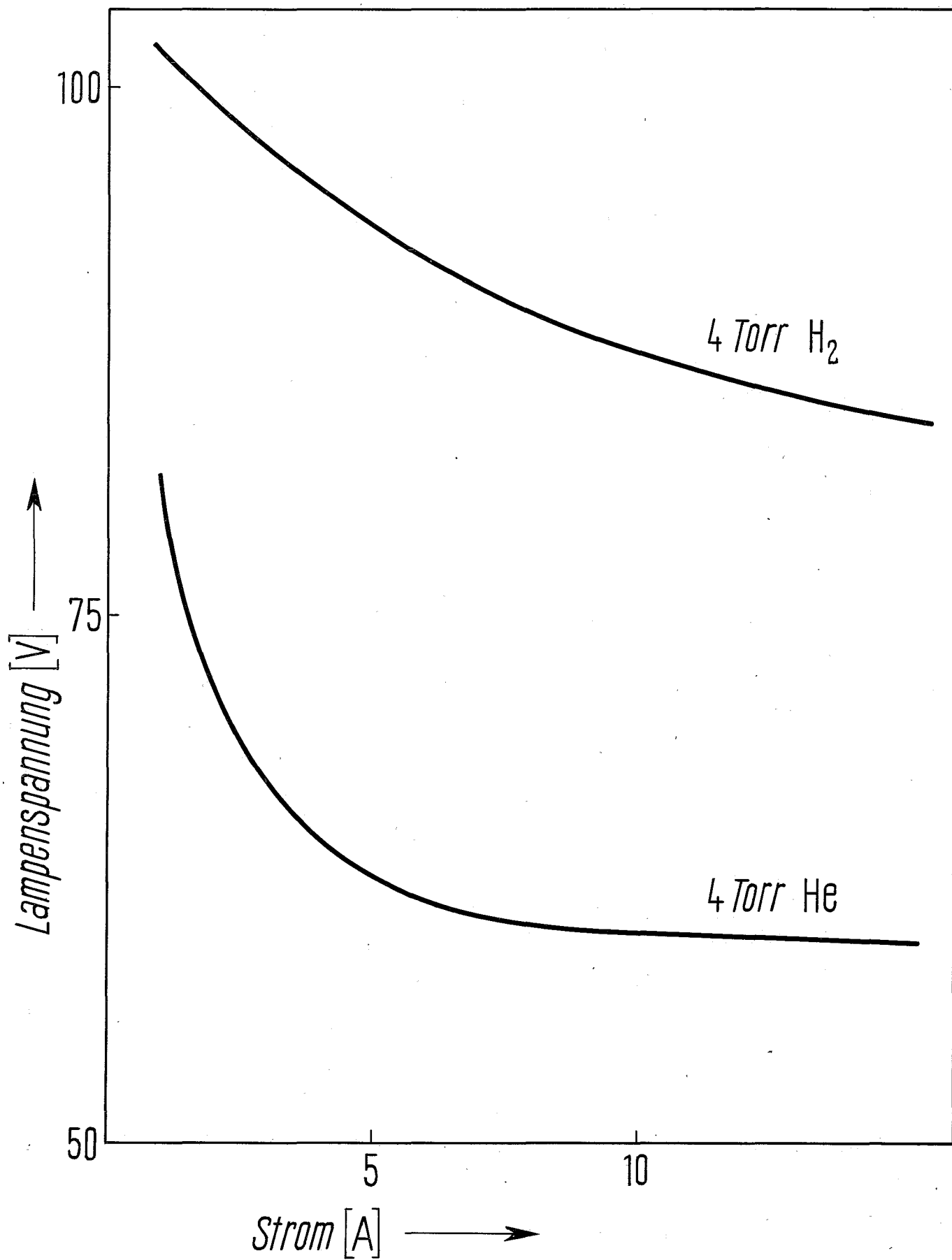


Abb. 8: Wasserstoffspektrum im Bereich des Vakuum-UV.

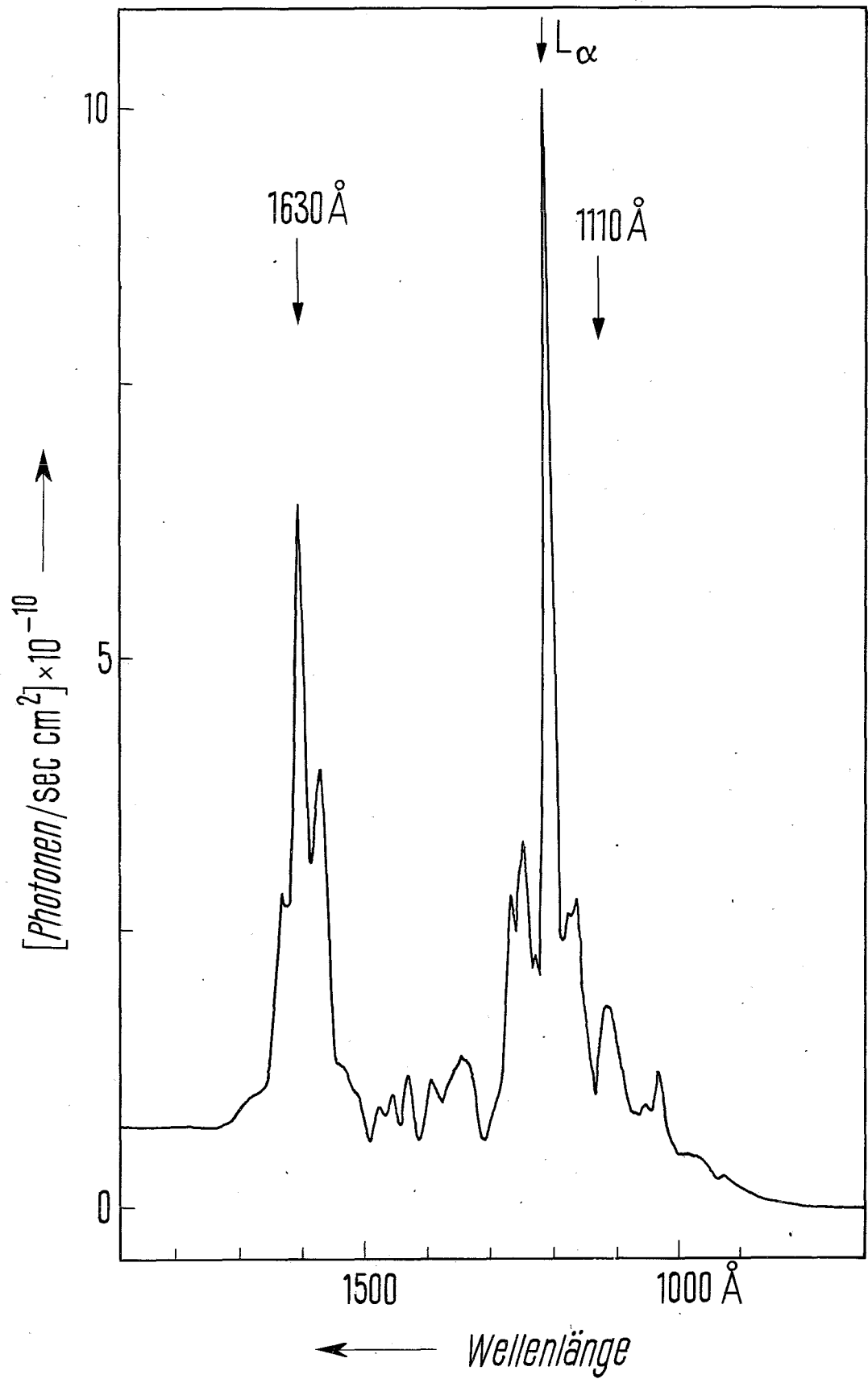


Abb. 9: Heliumspektrum im Bereich des extremen
Vakuum-UV.

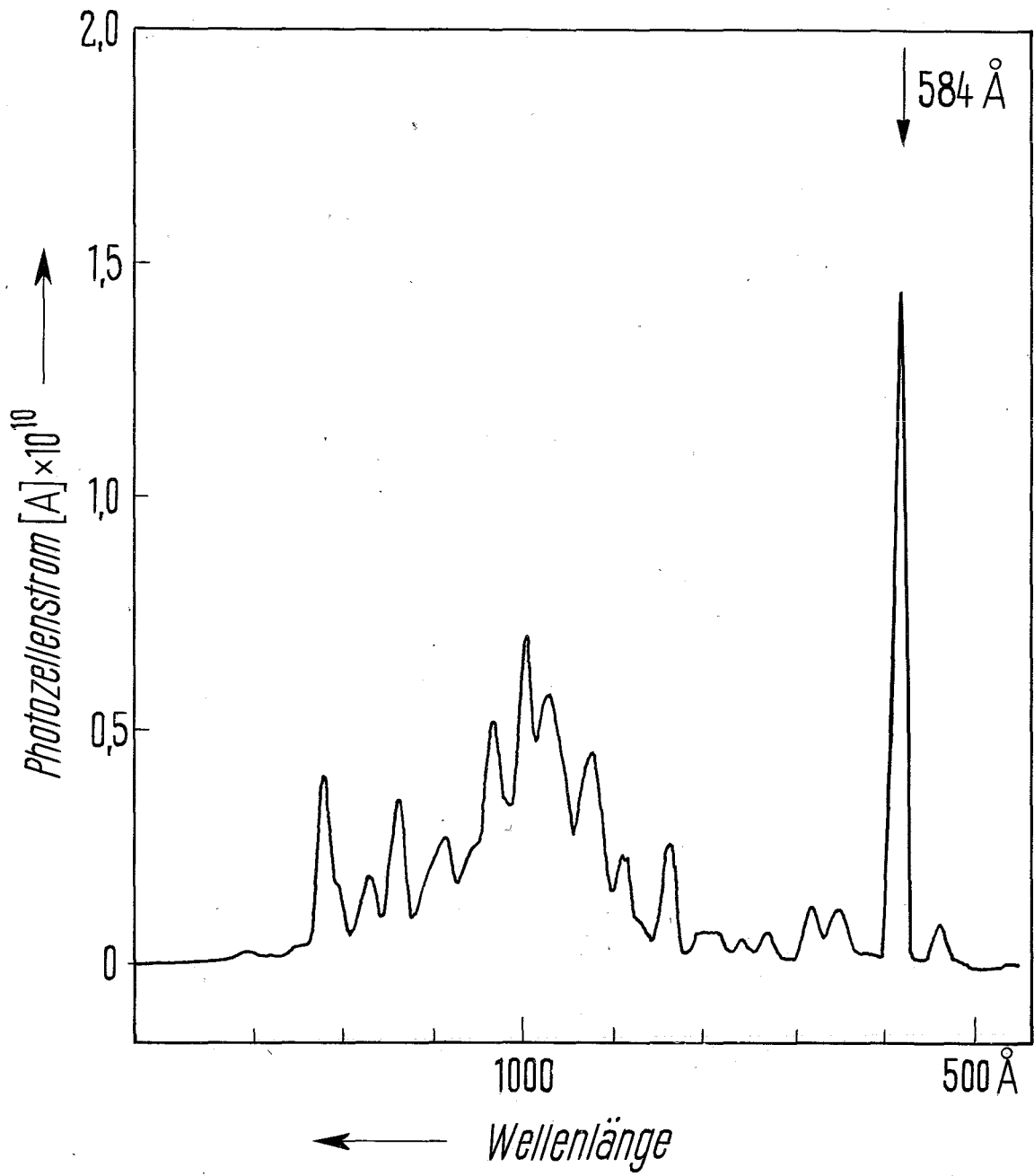


Abb. 10: Abhängigkeit der Intensität der Spektrallinien bei 1630 \AA (H_2) und bei 1216 \AA (H-L_α) vom Gasdruck p_L in der Lampe.

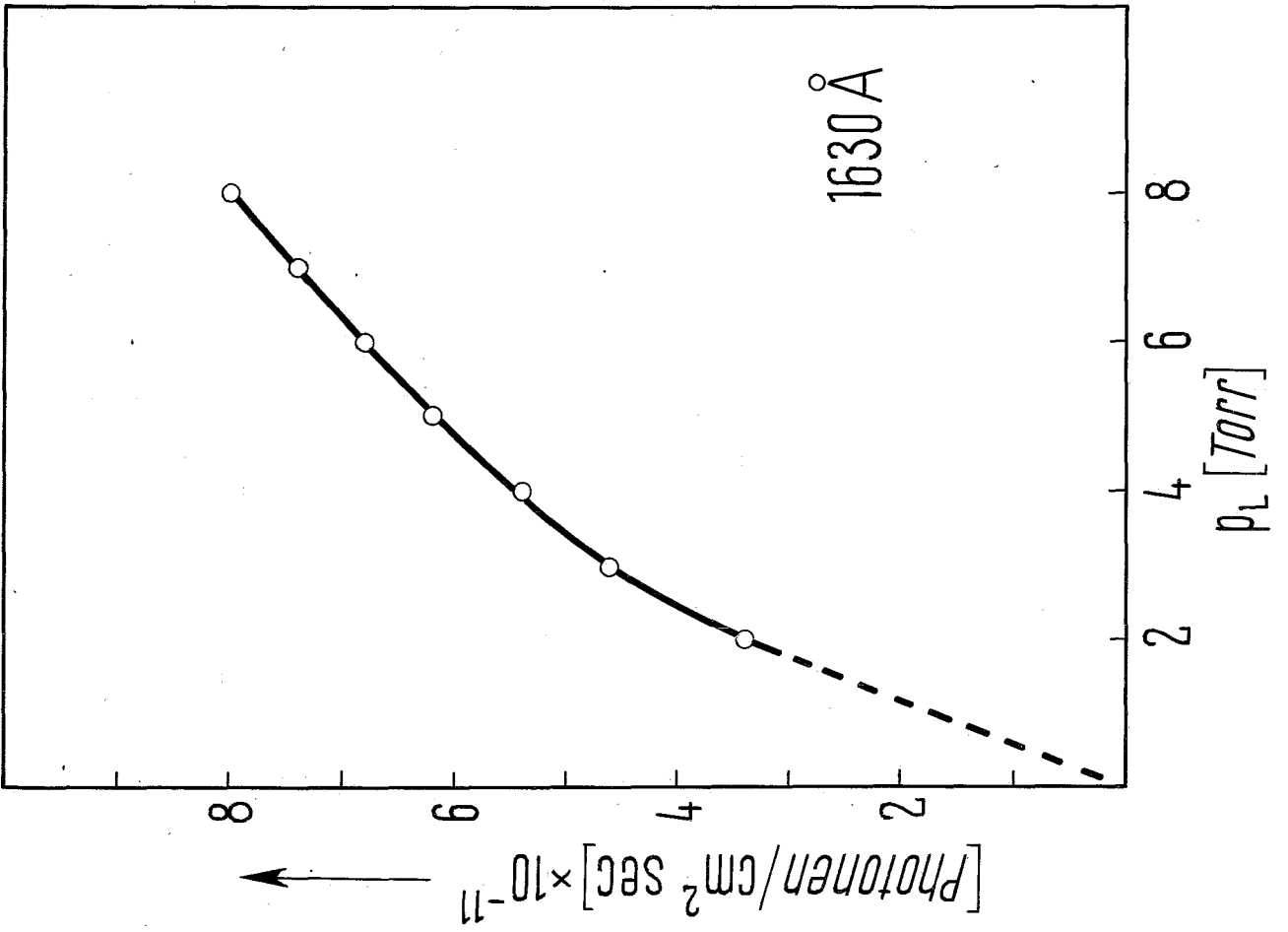
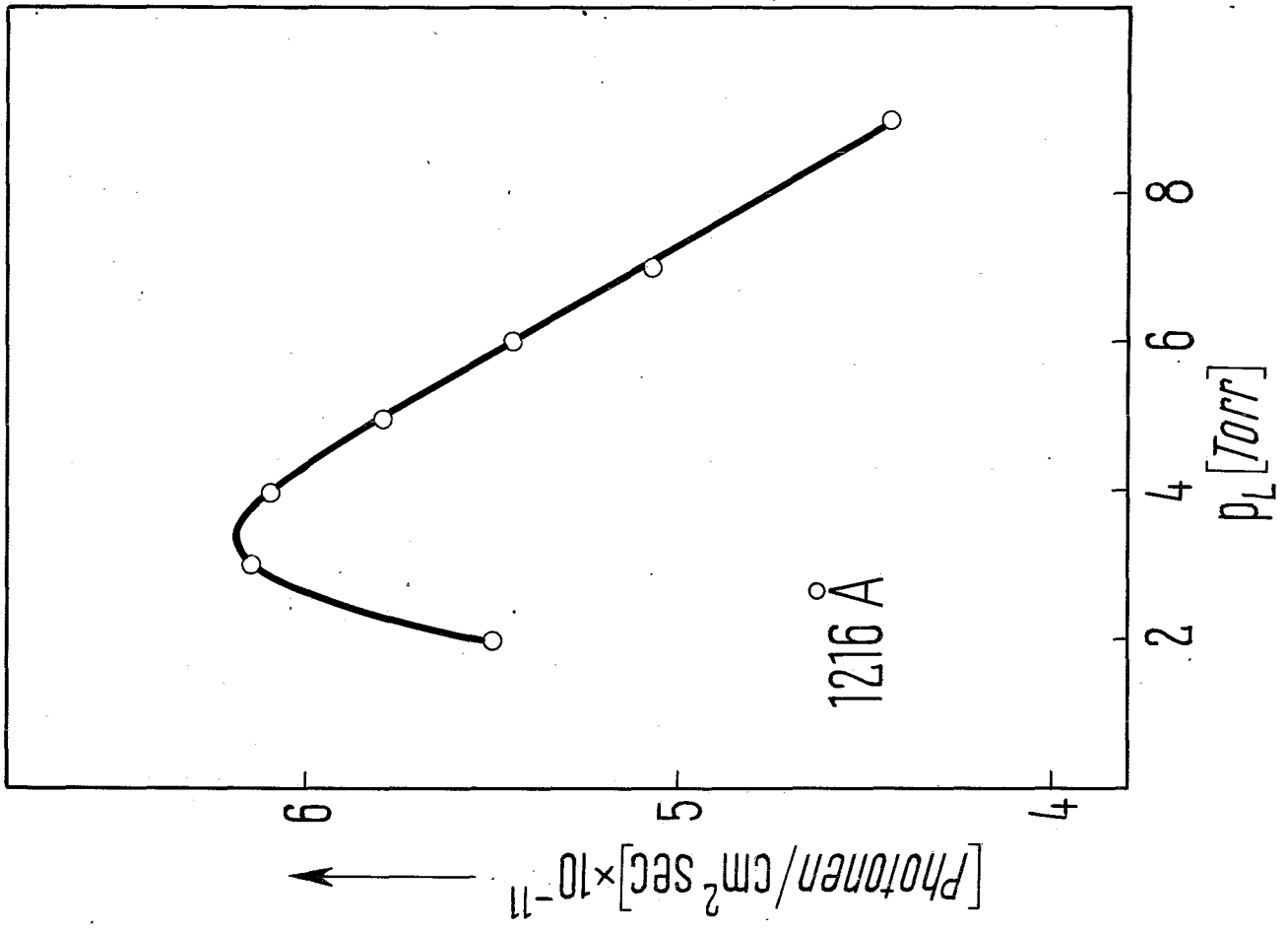


Abb. 11: Intensitätssteigerung der L_{α} -Linie von Wasserstoff durch Helium-Beimischung.

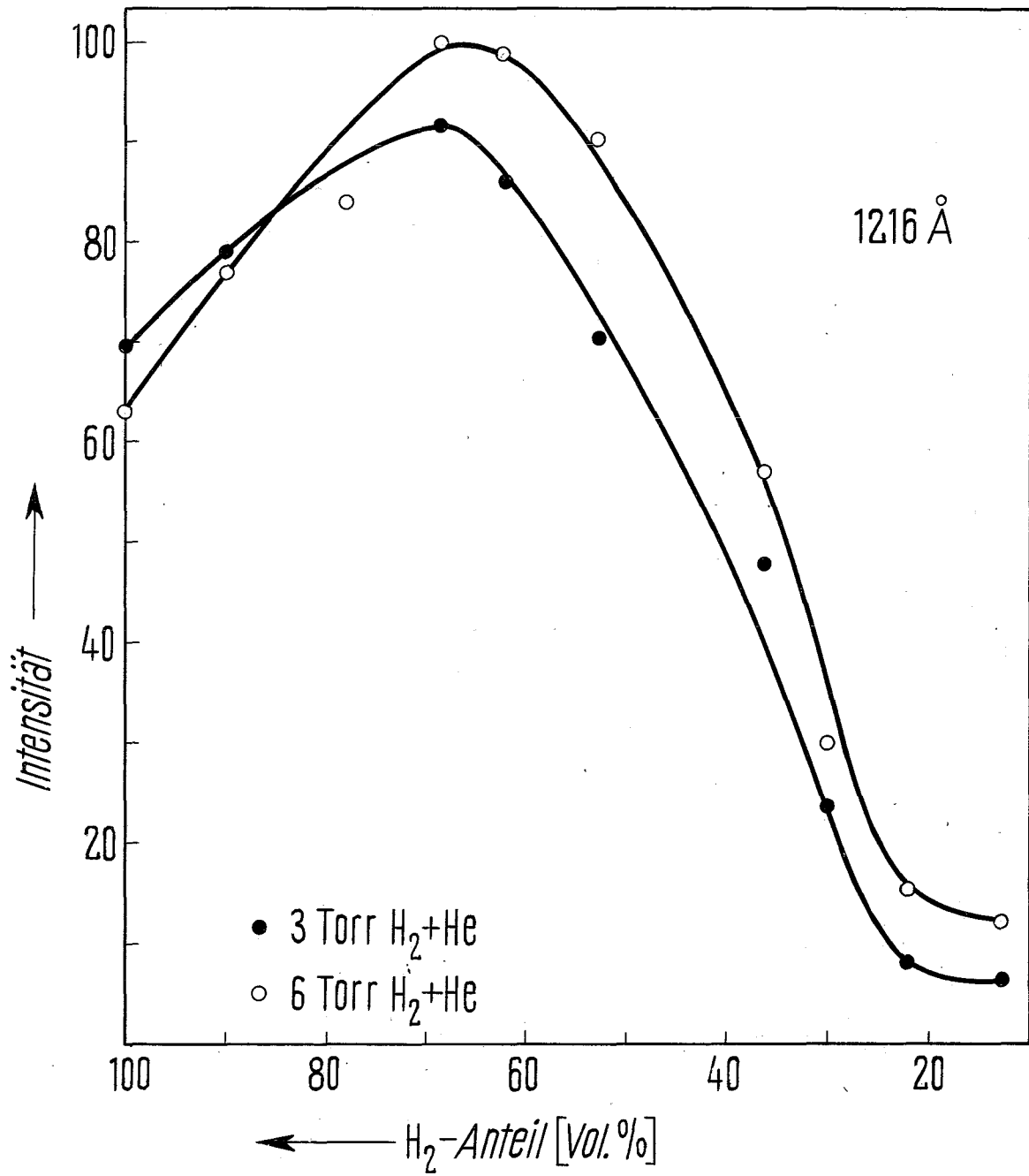


Abb. 12: Abhängigkeit der Intensität der Spektrallinien bei 1630 \AA (H_2) vom H_2 -Partialdruck einer He- H_2 -Mischung.

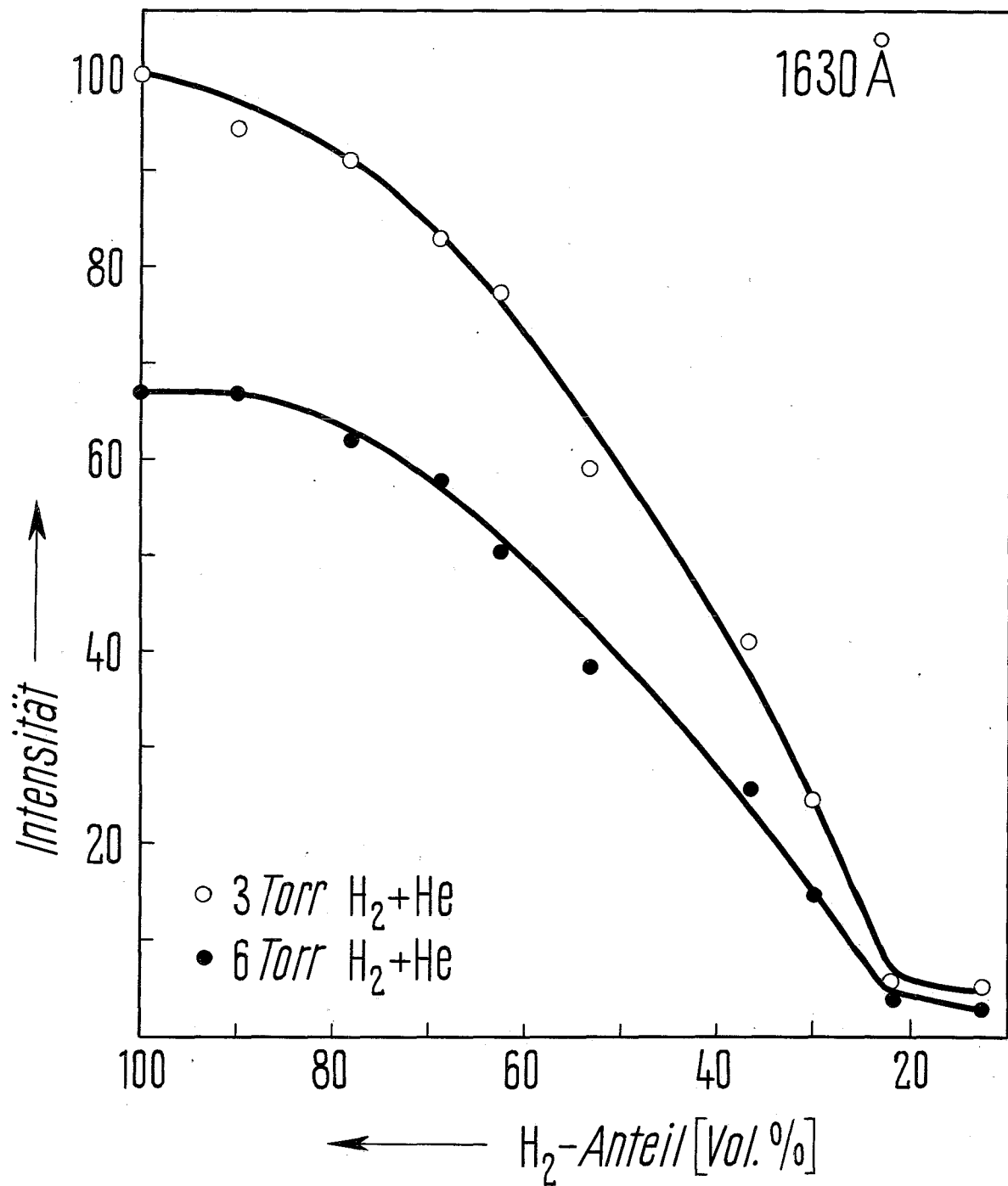


Abb. 13: Wirksamkeit des differentiellen Pumpens.
Abhängigkeit des Drucks p_{ES} hinter dem Eintrittsspalt des Monochromators und des Drucks p_{AS} hinter dem Austrittsspalt vom Druck p_L in der Lampe.

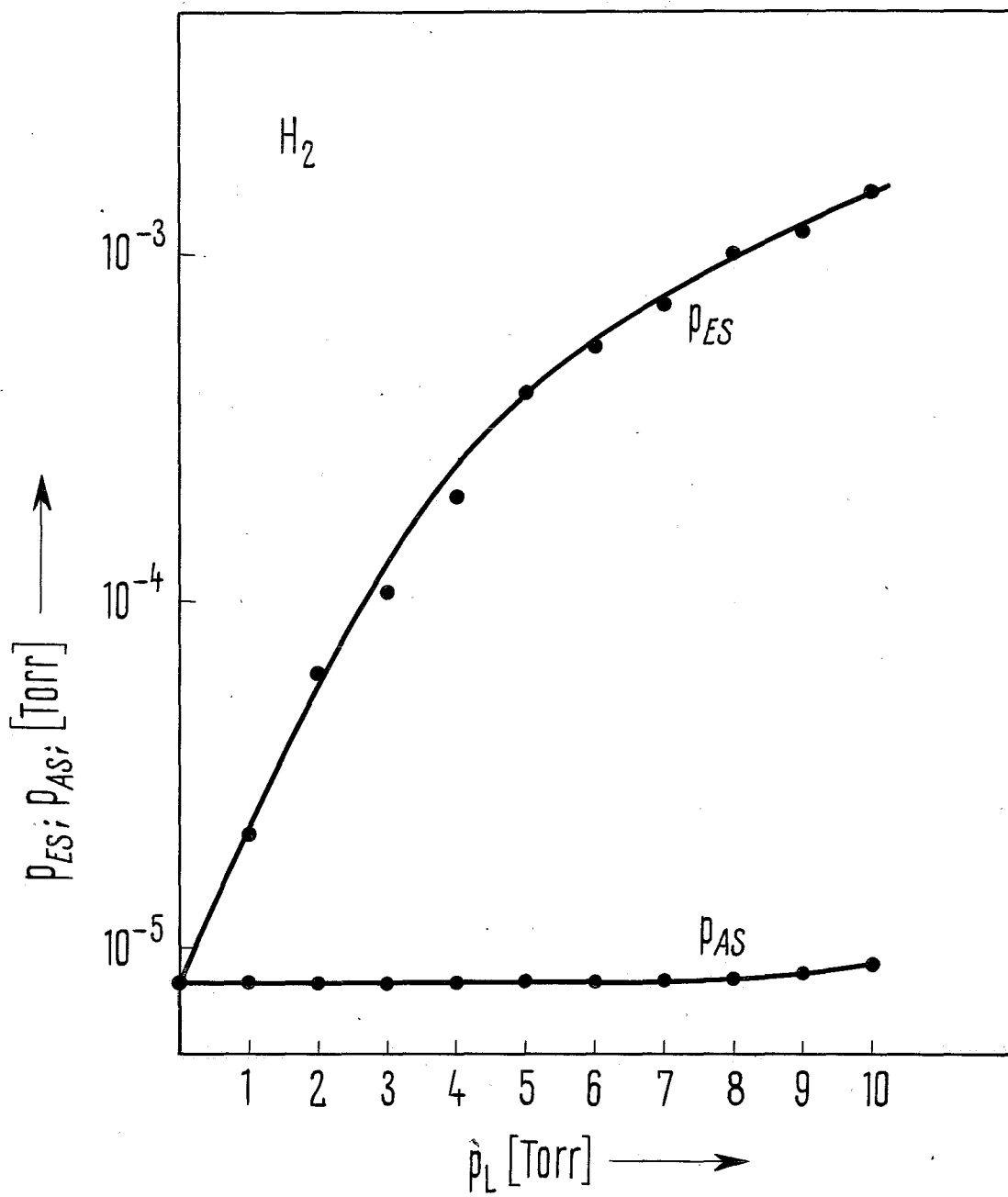
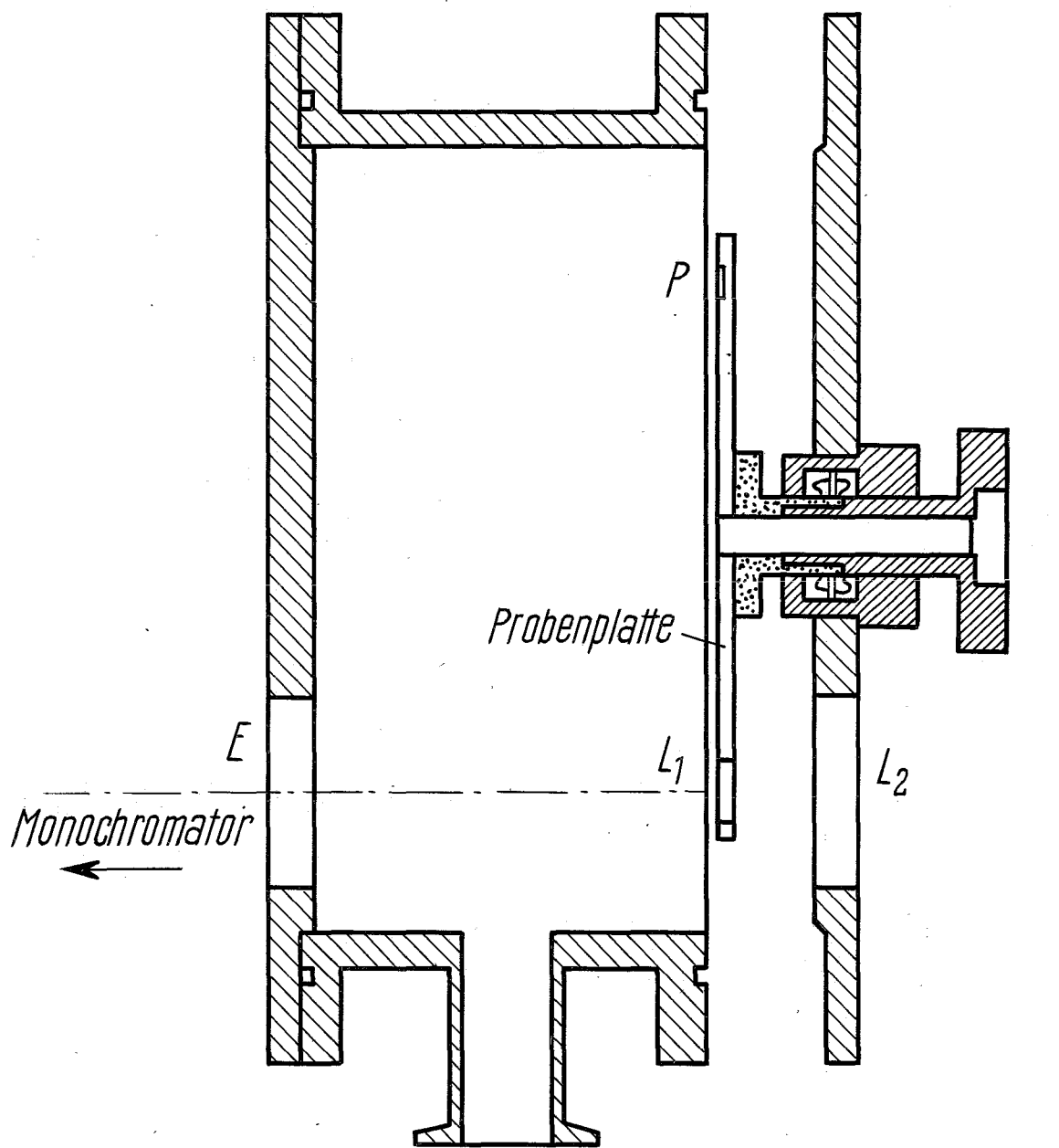


Abb. 14: Bestrahlungskammer (K.O. Hermann 1966).



10 cm





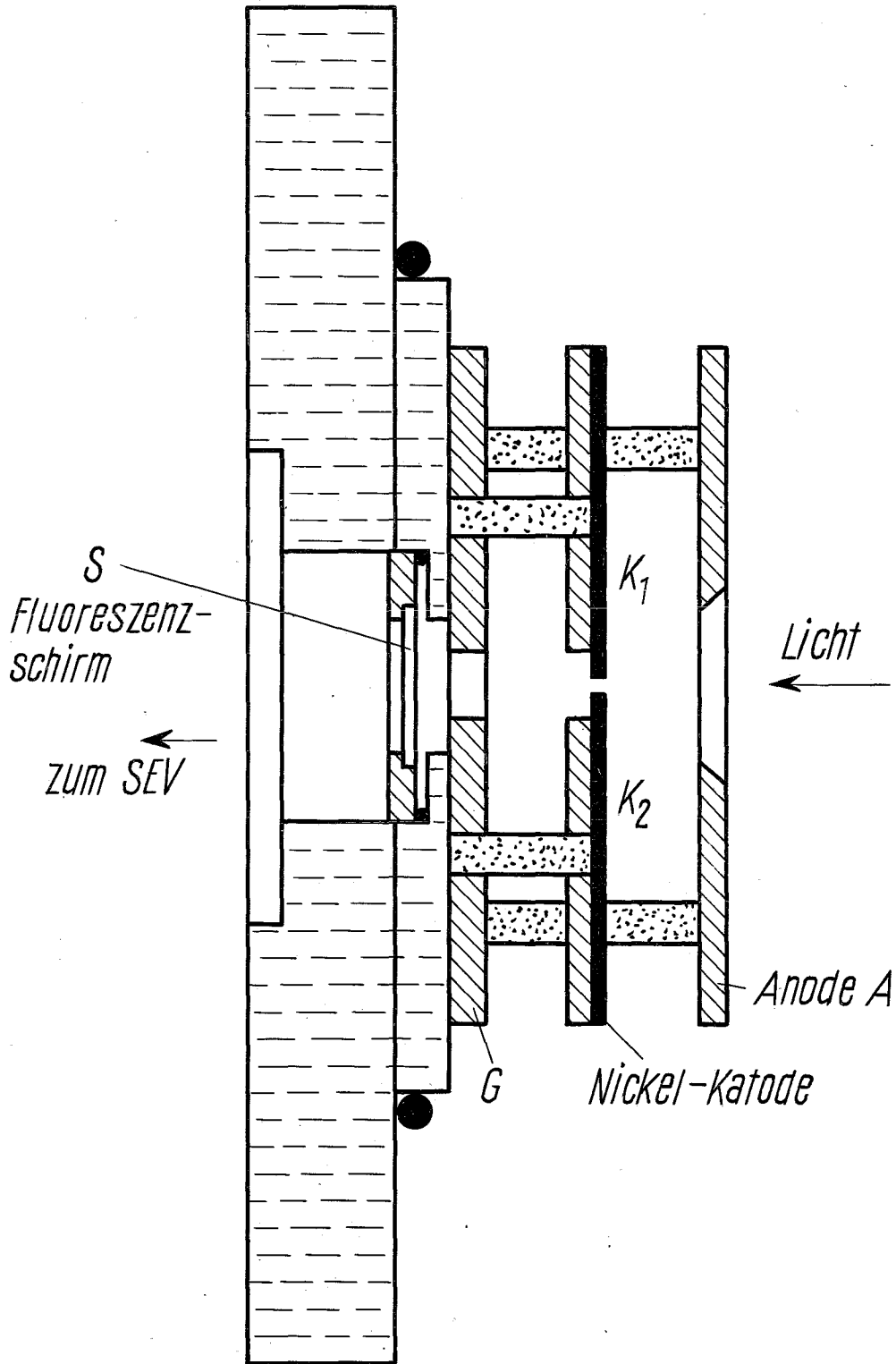
-  V2A
-  Messing
-  Aluminium
-  Teflon

Abb. 15: Aufbau der Photozelle und Anordnung des
Fluoreszenzschirms.



3 cm





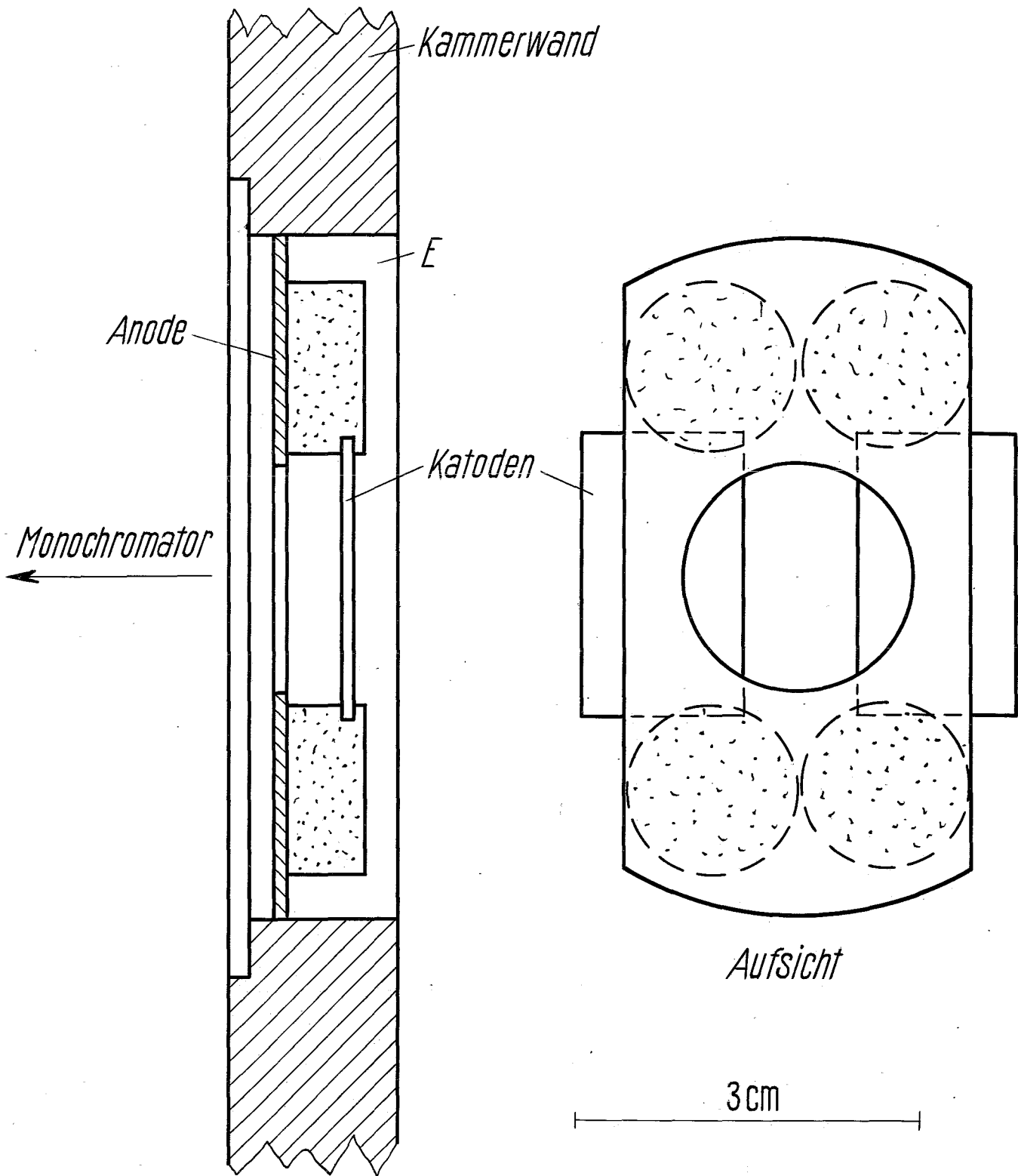
-  Trolitul
-  Trovidur
-  Messing
-  Nickel

Abb. 16: Aufbau der Photozelle am Eingang der Bestrahlungskammer.



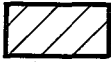



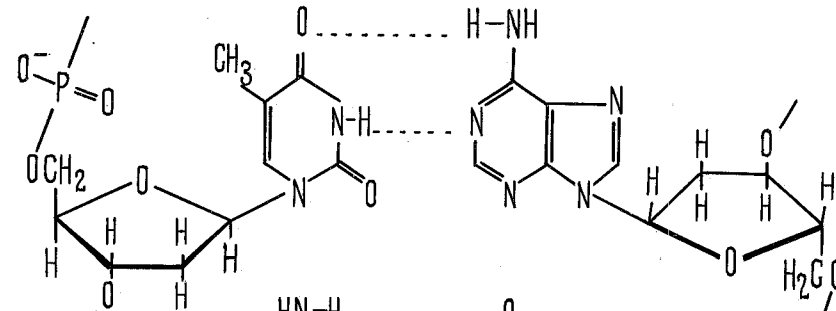
- | | |
|---|--|
|  V2A |  Teflon |
|  Messing |  Nickel |

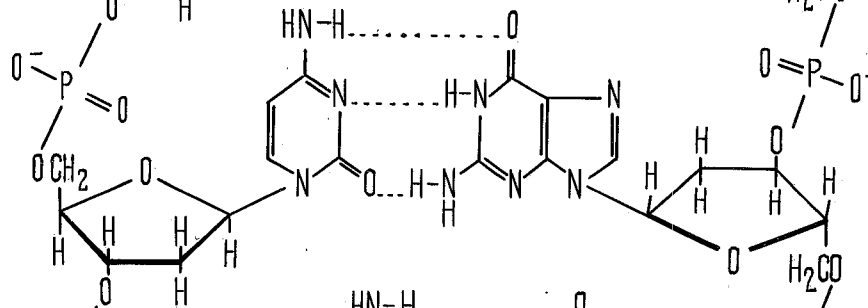
Abb. 17: Ausschnitt aus der DNS-Struktur.

Thymidin-
monophosphat



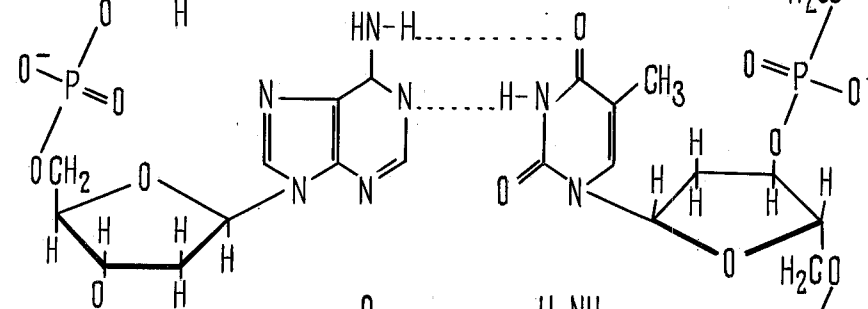
Desoxyadenosin-
monophosphat

Desoxycytidin-
monophosphat



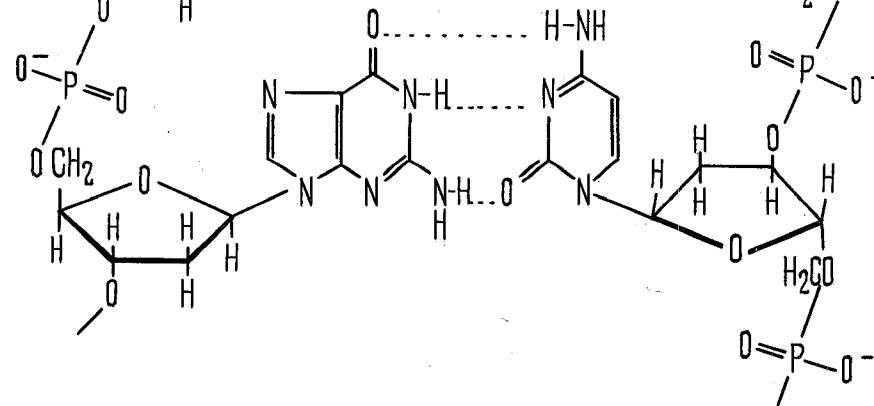
Desoxyguanosin-
monophosphat

Desoxyadenosin-
monophosphat



Thymidin-
monophosphat

Desoxyguanosin-
monophosphat



Desoxycytidin-
monophosphat

Abb. 18: Abhängigkeit der Zahl der produzierten ØX-Phagen
von der Konzentration der infektiösen DNS.

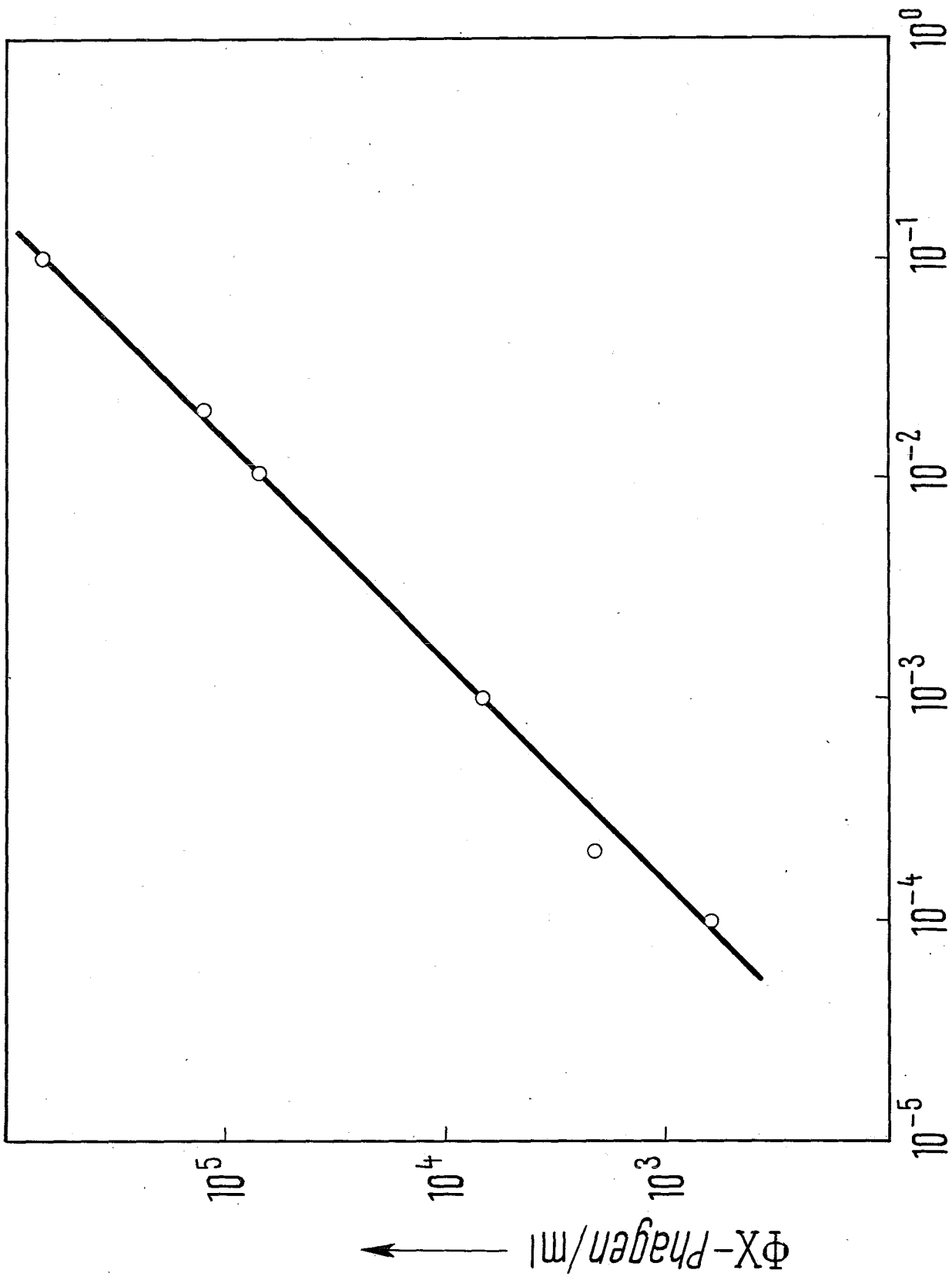


Abb. 19a u. b: Überlebenskurve von infektiöser ØX-DNS vor und nach Abzug des nicht inaktivierbaren Anteils bei Bestrahlung mit Photonen der Quantenenergie 11,2 eV ($\lambda = 1110 \text{ \AA}$).

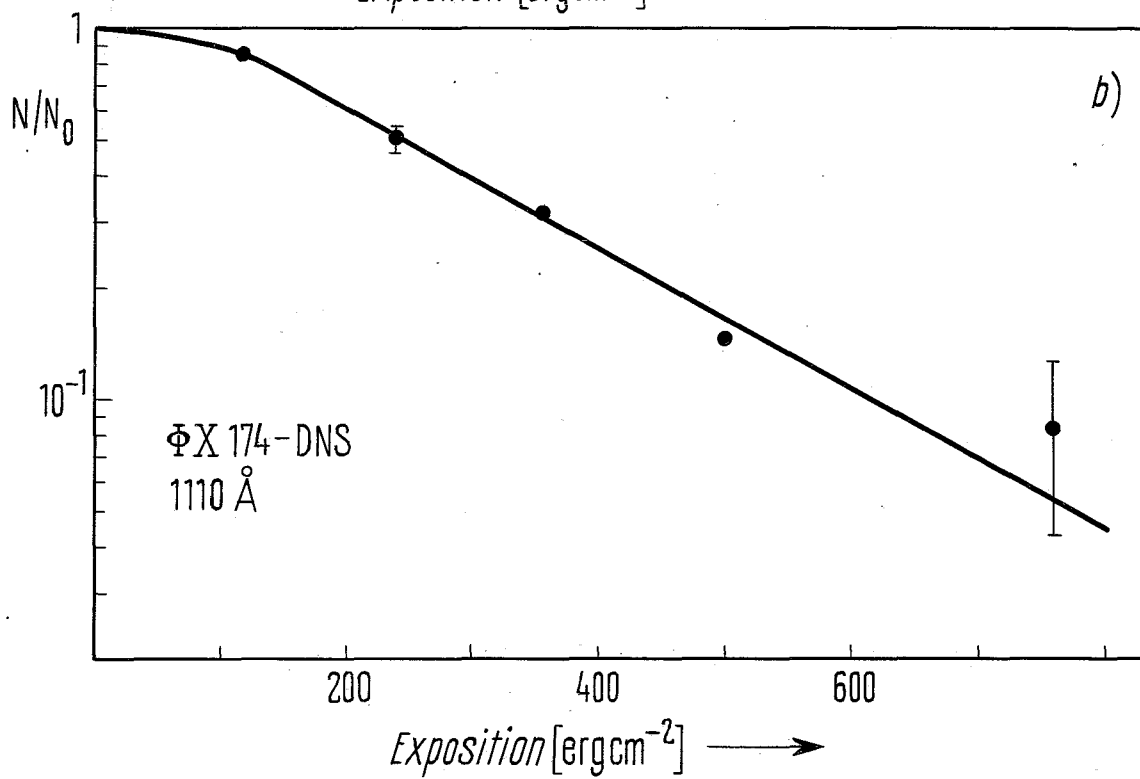
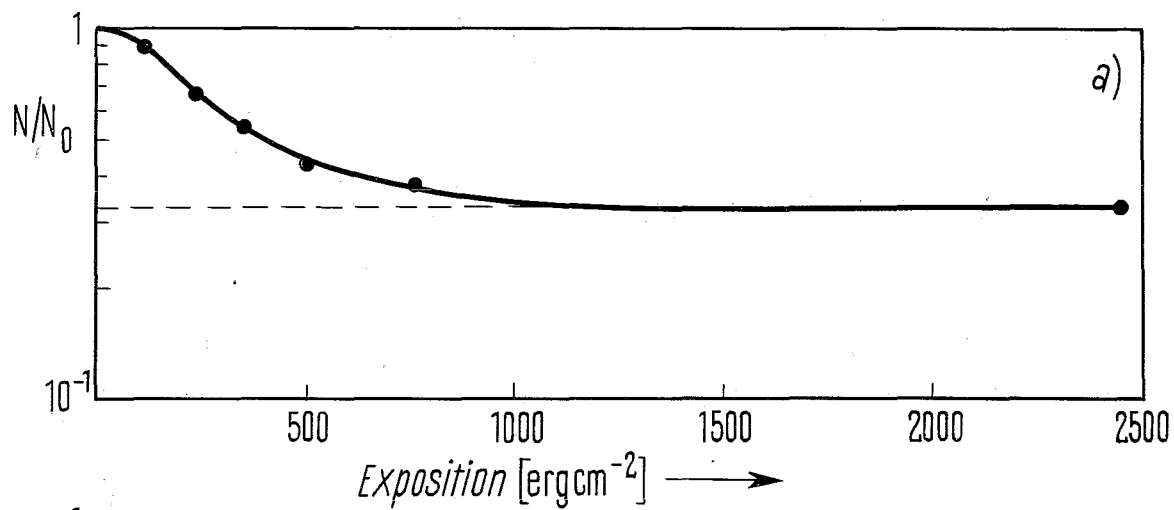


Abb. 20a u. b: Überlebenskurve von infektiöser ØX-DNS vor und nach Abzug des nicht inaktivierbaren Anteils bei Bestrahlung mit Photonen der Quantenenergie 21,2 eV ($\lambda = 584 \text{ \AA}$).

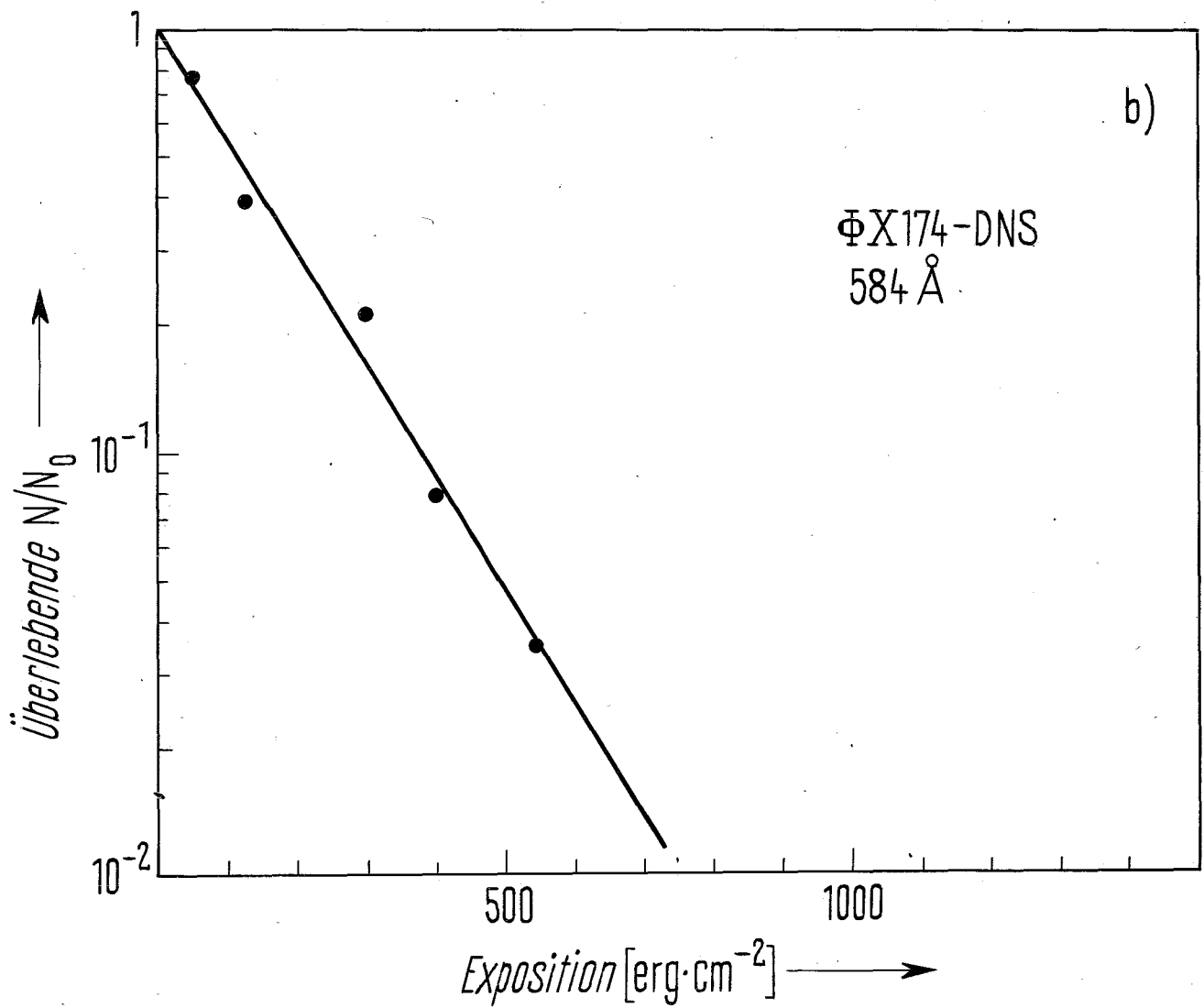
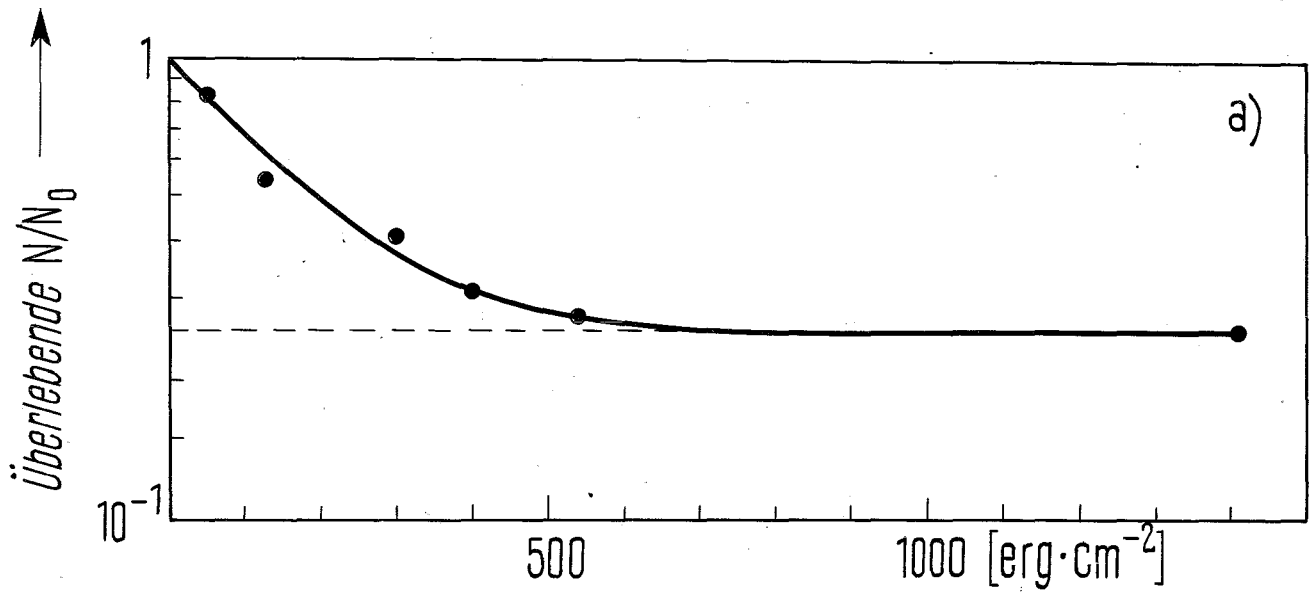


Abb. 21: Inaktivierung von infektiöser ØX-DNS mit Licht
verschiedener Wellenlänge.

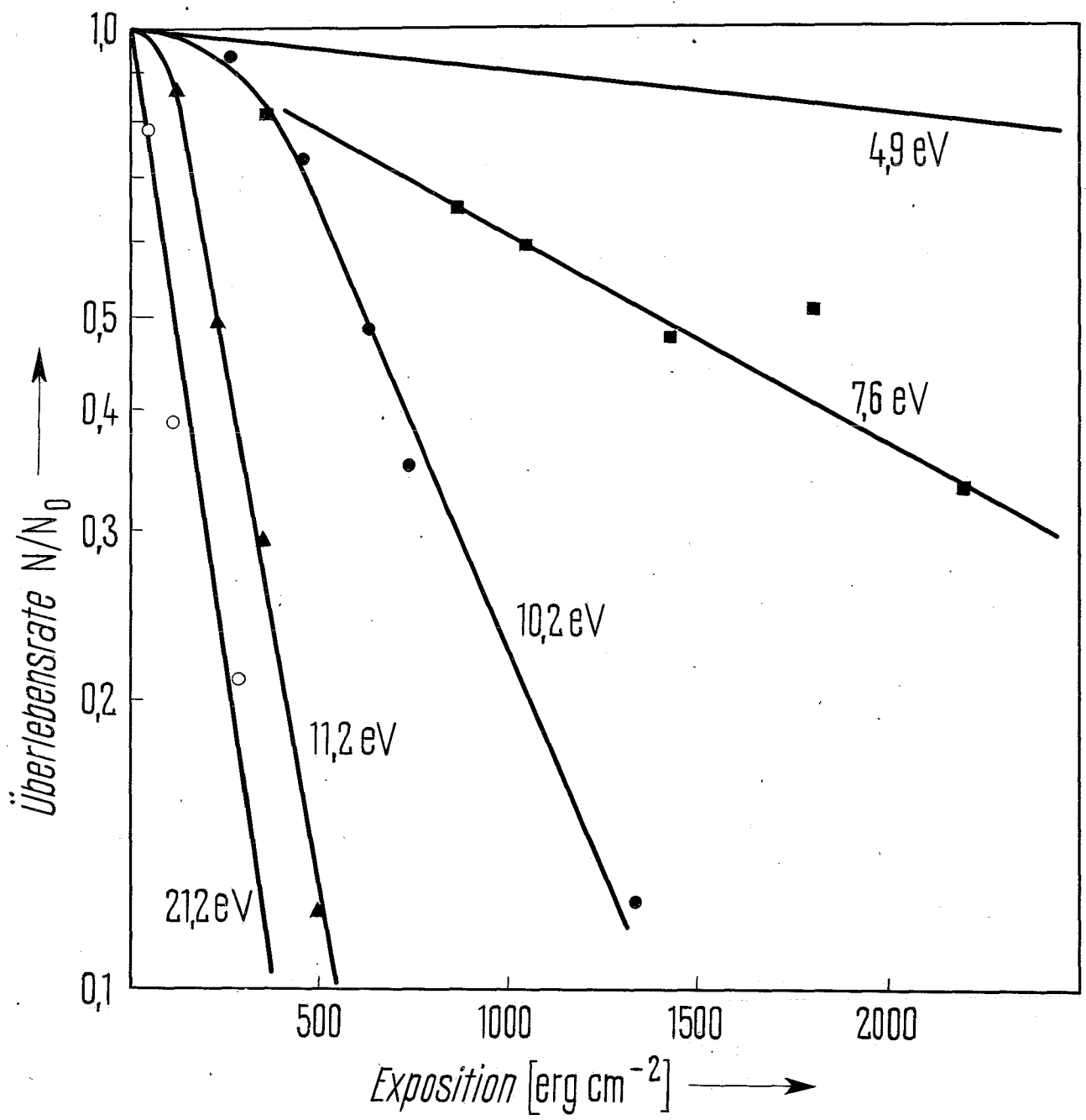


Abb. 22: Überlebenskurve von infektiöser ØX-DNS durch
Licht der Quantenenergie 4,9 eV ($\lambda = 2537 \text{ \AA}$).

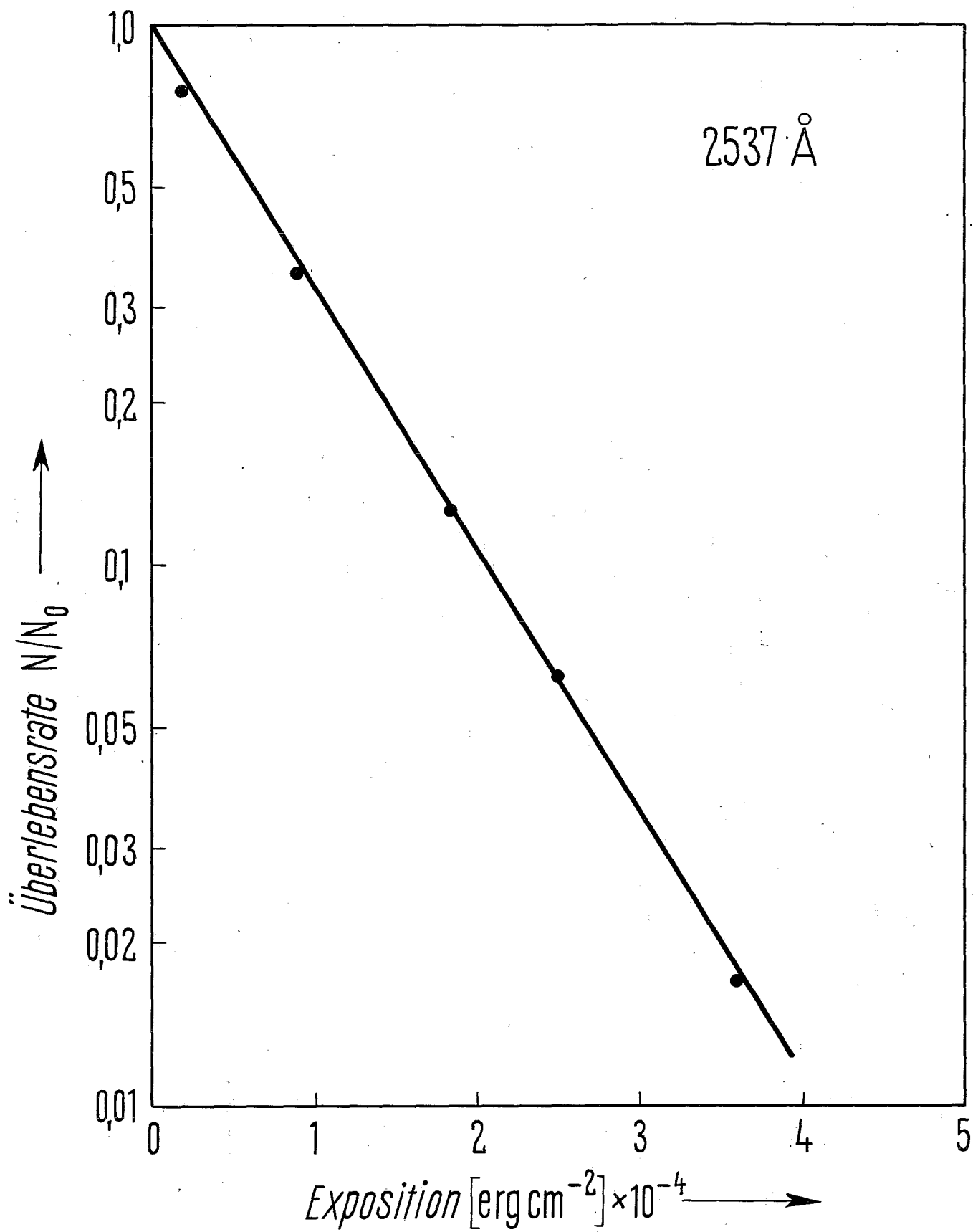


Abb. 23: Abhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts
von der Quantenenergie des eingestrahnten Lichts.

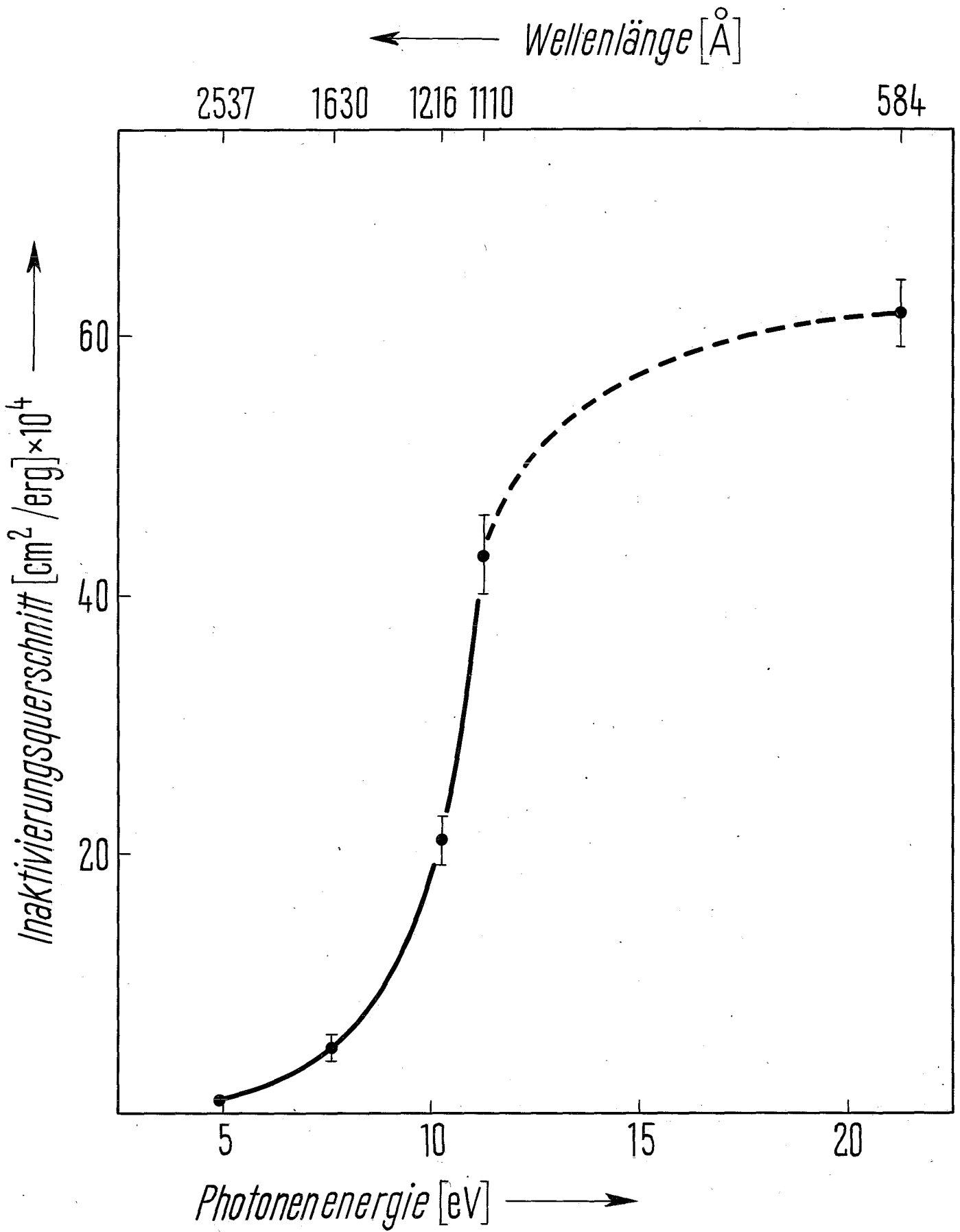


Abb. 24: Photozelle mit Katode aus Kalbsthymus-DNS.

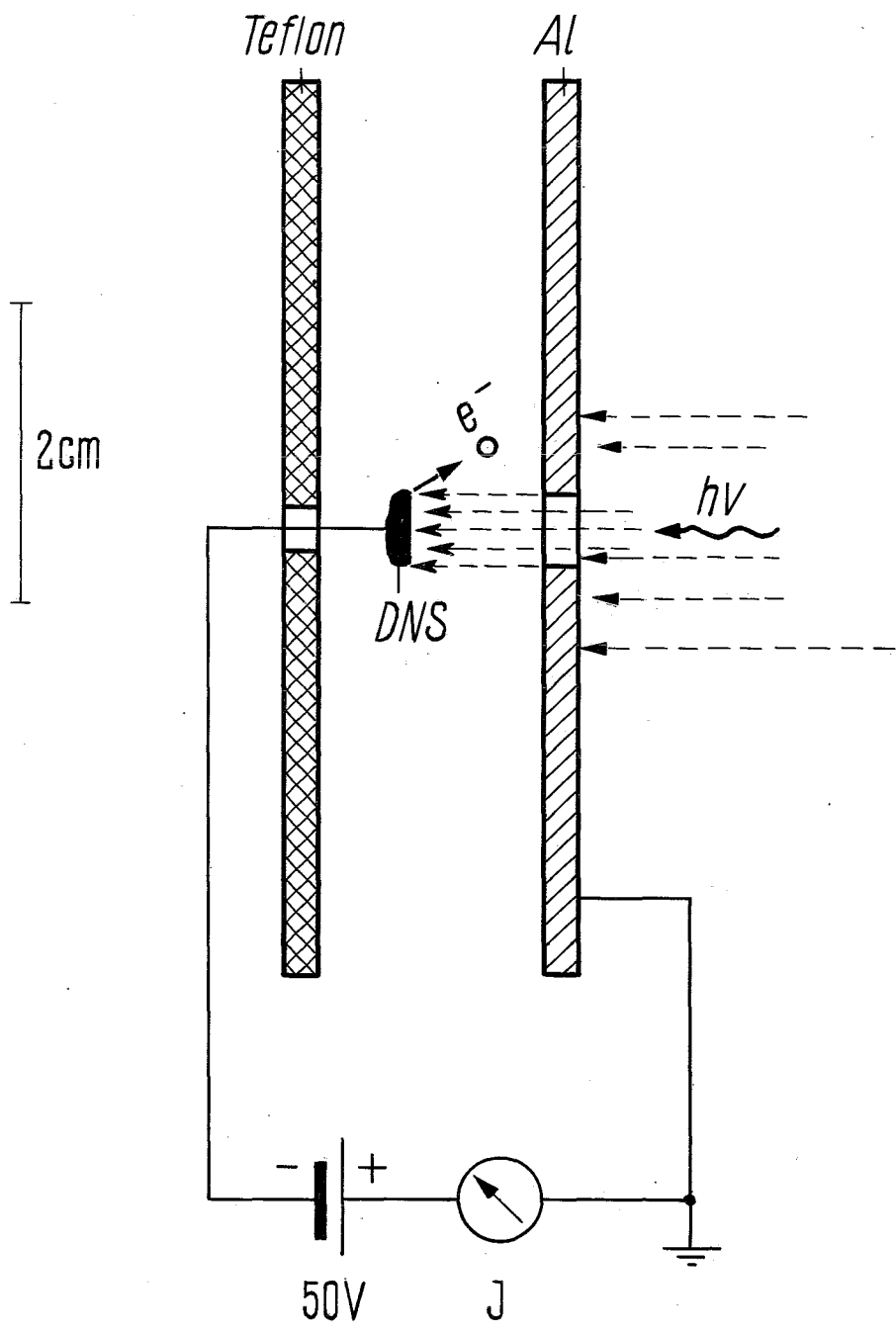
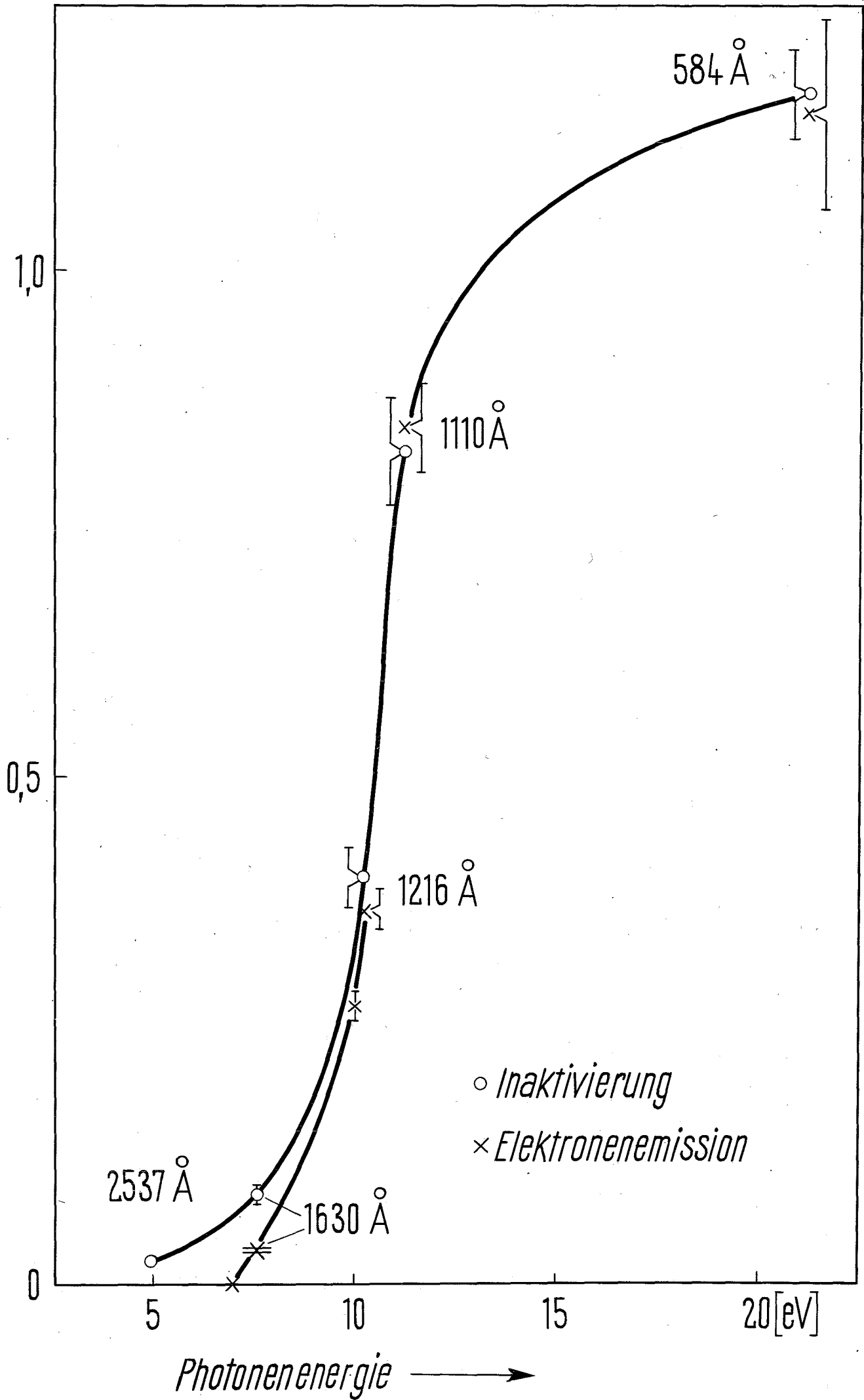


Abb. 25: Inaktivierungsquerschnitt und Elektronenemission in Abhängigkeit von der Quantenenergie des eingestrahlten Lichts.

Relative Einheiten



○ Inaktivierung

× Elektronenemission

Photonenenergie

[eV]

Abb. 26: Zusammenhang von Extinktion bei 550 nm und der Konzentration der Bakterien in einer Flüssigkultur von E.coli K 12.

