

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM**

**KARLSRUHE**

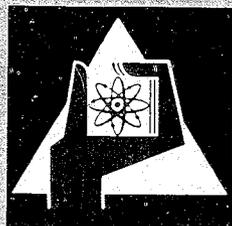
April 1968

KFK 760

Institut für Strahlenbiologie

Wirkungen von Anregungen, Ionisationen, elastischen  
Kernstößen und atomarem Wasserstoff auf DNS

H. Jung



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE



Kernforschungszentrum Karlsruhe

April 1968

KFK 760

Institut für Strahlenbiologie

Wirkungen von Anregungen, Ionisationen, elastischen  
Kernstößen und atomarem Wasserstoff auf DNS

Horst Jung

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe



## Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
I. <u>Einleitung</u>	1
1. Die zeitlichen Phasen der Strahlenwirkung	1
2. Die verschiedenen Epochen der Strahlenbiologie	3
3. Die Bedeutung der physiko-chemischen Phase	6
4. Energieübertragung bei der Strahlenabsorption	8
5. Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung	12
II. <u>Material und Methoden</u>	18
1. Vakuum-UV-Monochromator	18
2. Protonenbeschleuniger	20
3. Bestrahlungen	22
4. Erzeugung von atomarem Wasserstoff	24
5. Probenbereitung	26
6. Infektiöse DNS	27
7. Sphäroplasten und DNS-Nachweis	27
8. T1-Bakteriophagen	29
9. Ribonuclease	30
III. <u>Wirkungen von Anregungen und Ionisationen</u>	32
1. Problemstellung	32
2. Ergebnisse	36
3. Diskussion	38
IV. <u>Wirkungen von elastischen Kernstößen</u>	40
1. Problemstellung	40
2. Ergebnisse	45
3. Diskussion	50
4. Modifizierende Parameter	54
V. <u>Einfluß der Temperatur auf die     Strahlenempfindlichkeit</u>	57
1. Problemstellung	57
2. Ergebnisse	61
3. Diskussion	66
VI. <u>Wirkungen von atomarem Wasserstoff</u>	75
1. Problemstellung	75
2. Ergebnisse	78
3. Diskussion	80
VII. <u>Zusammenfassende Diskussion und     Schlußfolgerungen</u>	85
VIII. <u>Literaturverzeichnis</u>	98
IX. <u>Abbildungen</u>	126

## I. Einleitung

### 1. Die zeitlichen Phasen der Strahlenwirkung

In der naturwissenschaftlich orientierten Strahlenbiologie werden Strahlenwirkungen als Funktion der Dosis untersucht. Je nach Anlage des Experiments können sehr verschiedenartige Effekte als Kriterium für das Auftreten einer Strahlenwirkung angesehen werden: z.B. die Inaktivierung eines Enzymmoleküls, der Verlust der Replikationsfähigkeit von DNS oder Viren, das Auslösen einer Mutation, das Abtöten einer Zelle oder eines Organismus, usw. Bis es jedoch zu einer beobachtbaren Veränderung eines Makromoleküls oder einer Zelle kommt, läuft im Anschluß an die Strahlenabsorption eine ganze Reihe von Reaktionen nacheinander wie auch nebeneinander ab, wodurch recht komplizierte Ereignisketten zustandekommen. Bei dem Versuch, die Entwicklung eines Strahlenschadens in möglichst vielen Einzelheiten zu verfolgen, ist es interessant und aufschlußreich, diese komplexe Folge von Reaktionen zwischen Strahlenabsorption und beobachtetem biologischem Schaden in charakteristische zeitliche Abschnitte zu zerlegen (Platzman 1958, Hart u. Platzman 1961, Platzman 1962a): Während der ersten oder physikalischen Phase (vgl. Abb.1) der Strahlenwirkung wird von elektrisch geladenen schnell bewegten Teilchen Energie an die durchstrahlte Materie übertragen. Dabei entstehen zum überwiegenden Teil elektronisch angeregte oder ionisierte Moleküle, die sich in einer äußerst ungleichmäßigen räumlichen Verteilung befinden.

Diese Primärprodukte sind gewöhnlich sehr instabil und reagieren sofort weiter entweder spontan oder bei Stößen mit Molekülen ihrer Umgebung, wobei reaktionsfähige Produkte, gewöhnlich freie Atome und Radikale entstehen. Diese zweite oder physiko-chemische Phase kann aus einer einzigen Reaktion bestehen oder aus einer komplexen Folge von Reaktionen. Viele der beteiligten Wechselwirkungen

treten in anderen Zweigen von Physik und Chemie nicht auf, einige wenige sind von der Photochemie her bekannt.

Wenn das System schließlich das thermische Gleichgewicht erreicht hat, tritt es damit in die dritte oder chemische Phase ein. Hier setzen die aktivierten Moleküle die Reaktion untereinander oder mit ihrer Umgebung fort. Wenn diese Veränderungen im zu untersuchenden Objekt selbst, z.B. in einem DNS-Molekül, als Folge der Strahlenabsorption auftreten, dann bezeichnet man das als direkte Strahlenwirkung. Es können aber auch reaktionsfähige Produkte in der Umgebung eines Makromoleküls entstehen; falls sich die betrachteten Moleküle in wässriger Lösung befinden, sind das z.B. Wasserradikale und hydratisierte Elektronen. Diese reaktionsfähigen Species diffundieren zu den gelösten Makromolekülen und reagieren mit ihnen unter Ausbildung einer Schädigung. In diesem Fall spricht man von indirekter Strahlenwirkung (vgl. Abb. 1).

Unabhängig davon, auf welchem Weg sie erzeugt wurden, können molekulare Veränderungen, falls sie in einem biologischen Objekt auftreten, dieses System stören oder verändern, wobei sich im Verlauf der biologischen Phase die schließlich zu beobachtende biologische Wirkung ausbildet (vgl. "Verstärkertheorie der Organismen", Jordan 1948). In dieser Phase kommt dem Stoffwechsel des betroffenen Organismus bei der Entwicklung eines Strahlenschadens eine besonders große Bedeutung zu (vgl. Abb. 1); die Primärprozesse der Strahlenabsorption spielen hier nur noch die Rolle von kleinen Defekten innerhalb des Gesamtorganismus, wobei Art und Größe einer Strahlenschädigung sehr stark davon abhängen, ob diese Defekte repariert werden oder ob sie vergrößert werden, wenn die "Maschine" versucht, unter gestörten Bedingungen zu arbeiten.

Die einzelnen Phasen sind selbstverständlich nicht streng von einander abzugrenzen. Sie sind aber trotzdem eine gute Hilfe, die komplexe Folge von Prozessen, die nach der Absorption von energiereichen Strahlen abläuft, etwas

überschaubarer und damit der Diskussion leichter zugänglich zu machen. Charakteristisch ist, daß jede Phase sehr kurz ist im Vergleich zu der nachfolgenden, doch hängt die Zeitdauer der einzelnen Phasen sehr stark von dem bestrahlten System ab. Die nachfolgende Zusammenstellung vermittelt einen Eindruck von der Größenordnung dieser Zeiten in einem wässrigen System:

- Physikalische Phase, Dauer etwa  $10^{-13}$  sec
- Physiko-chemische Phase, Dauer etwa  $10^{-10}$  sec
- Chemische Phase, Dauer etwa  $10^{-6}$  sec
- Biologische Phase, Dauer bis zu mehreren Jahren

Die ideale strahlenbiologische Untersuchung müßte eine eingehende Analyse enthalten, welche Primärprodukte in der physikalischen Phase gebildet werden und welche Folgereaktionen während der physiko-chemischen und chemischen Phase auftreten. Ferner müßte eine solche Untersuchung erklären können, auf welche Weise die zu Ende der chemischen Phase als Folge der Strahlenabsorption entstandenen molekularen Veränderungen die Lebensvorgänge eines biologischen Objektes beeinflussen und wie es zur Ausbildung eines beobachtbaren Strahlenschadens kommt.

## 2. Die verschiedenen Epochen der Strahlenbiologie

Obwohl eine solche vollständige Beschreibung aller am Zustandekommen einer Strahlenschädigung beteiligten Prozesse bis heute niemals erreicht worden ist, bleibt sie nach wie vor das erklärte Ziel strahlenbiologischer Forschung. In der Vergangenheit benutzte man recht unterschiedliche Untersuchungsmethoden, um dieses angestrebte Ziel zu erreichen. Je nach Art des Vorgehens lassen sich verschiedene Epochen der Strahlenbiologie unterscheiden.

Wie zu Beginn einer jeden neuen Forschungsrichtung herrschte in der Anfangszeit der Strahlenbiologie die rein deskriptive Arbeitsweise vor. Diese qualitative Strahlenbiologie erlangte jedoch keine besondere Bedeutung, weil man

relativ frühzeitig anfang, quantitativ zu arbeiten.

Die Entstehung der quantitativen Strahlenbiologie könnte man auf die Zeit kurz nach der Jahrhundertwende datieren, etwa auf das Jahr 1908, in dem die Arbeiten von Bardeen, Gager, Guilleminot u. von Regaud und Dubreuil erschienen. Maßgebliche Impulse erhielt diese Entwicklung nach 1922, als mathematisch-statistische Methoden in die bis dahin überwiegend biologisch orientierte Forschungsrichtung Eingang fanden (Blau und Altenburger 1922; Dessauer 1922, 1931). Stark vereinfacht ließe sich die Arbeitsweise folgendermaßen beschreiben: Man untersuchte Strahlenwirkungen als Funktion der absorbierten Strahlungsenergie, d.h. als Funktion der Dosis. Aus der Form der erhaltenen Dosis-Effekt-Kurven versuchte man durch Anwendung mathematischer Methoden Rückschlüsse auf die wirksamen Mechanismen zu ziehen. Dieses Vorgehen führte zur Entstehung der Treffertheorie, die sich in der Folgezeit, nachdem die physikalischen Prozesse der Strahlenabsorption genauer bekannt waren, zur Treffbereichstheorie weiterentwickelte. Diese Entwicklung erreichte ihren Höhepunkt 1946/47, als die beiden aus gemeinsamen Diskussionen aber dann wegen der Kriegsergebnisse unabhängig entstandenen Bücher von Lea (1946) und von Timoféeff-Ressovsky und Zimmer (1947) erschienen, wodurch sich die Strahlenbiologie endgültig als unabhängiger Zweig naturwissenschaftlicher Forschung etablierte. Obwohl die quantitative Strahlenbiologie unser Wissen von den Wirkungen ionisierender Strahlen ungemein erweiterte -- es sei hier nur an die glänzenden Erfolge der klassischen Strahlengenetik erinnert --, wurde schließlich klar, daß diese Art des Vorgehens nicht geeignet war, die zwischen Strahlenabsorption und biologischem Effekt ablaufenden Reaktionsschritte vollständig aufzuklären.

Es bildete sich daraufhin eine Forschungsrichtung aus, die man als Strahlenbiologie der modifizierenden Parameter bezeichnen könnte. Der Beginn dieser Entwicklung ist etwa auf das Jahr 1945 zu datieren, wobei jedoch zu erwähnen ist,

daß bis zu diesem Zeitpunkt schon zahlreiche Untersuchungen zu diesem Problemkreis bekanntgeworden waren. Diese Arbeitsrichtung basiert auf folgender Überlegung: Man greift in den normalen Ablauf der Ereigniskette ein und analysiert, wie sich die Endprodukte mit der Art des Eingriffs verändern, in der Absicht, daraus den ungestörten Zustand der Reaktionskette zu erschließen. In der Praxis führte dieses Konzept dazu, daß man die Einwirkung von Strahlen auf biologische Objekte in ihrer Abhängigkeit von verschiedenen Parametern untersuchte, um durch Zusammenstellung aller Befunde ein mosaikartiges Bild vom Zustandekommen einer Strahlenschädigung zu konstruieren. In einigen Laboratorien, wo diese Forschungsrichtung besonders konsequent verfolgt wurde, konzentrierten sich größere Arbeitsgruppen auf ein einziges Untersuchungsobjekt (z.B. Sporen von *B. megaterium*), um daran alle nur denkbaren physikalischen und chemischen Parameter durchzutesten (vgl. Powers 1962).

Welche Fülle von Parametern bei Untersuchungen dieser Art zu berücksichtigen ist, zeigt eindrucksvoll eine von Korogodin (1966) zusammengestellte Tabelle (nach Zimmer 1967). In diesem auf Abb. 2 wiedergegebenen Reaktionsschema entspricht der erste Schritt bei der Entwicklung eines Strahlenschadens etwa der physikalischen und physikochemischen Phase (vgl. Abb. 1), der zweite der chemischen Phase, während die beiden letzten als biologische Phase anzusehen sind. Wie diese Zusammenstellung zeigt, gibt es eine solche Vielfalt der Möglichkeiten, Strahlenwirkungen durch Variation der Versuchsbedingungen zu modifizieren, daß das angestrebte Ziel, die Aufklärung der Mechanismen der Strahlenwirkung, nicht erreicht werden konnte. Das ist insbesondere deshalb der Fall, weil von Art zu Art der untersuchten Lebewesen ganz verschiedene der vielen Parameter und überdies in unterschiedlichem Maße wirksam werden. Aus diesem Grunde verglich Hollaender (zitiert bei Zimmer 1961) vor wenigen Jahren die Entwicklung der Strahlenbiologie mit der "Geschichte eines Schlachtfeldes, auf

dem nur Schlachten verloren wurden", und 1966 zeigte Haynes, daß selbst bei Einsatz modernster Computer keine eindeutigen Interpretationen gefundener Ergebnisse möglich sind.

### 3. Bedeutung der physiko-chemischen Phase

Die vorstehend geschilderten Arbeitsmethoden haben den gemeinsamen Nachteil, daß man von den beobachteten Endeffekten einer Strahlenwirkung ausgeht und daraus rückwärts die zeitliche Reihenfolge der abgelaufenen Reaktionen zu erschließen versucht. Selbst wenn man relativ einfache Moleküle als Untersuchungsobjekte verwendet, kommt man mit dieser Methode selten weiter zurück als bis zum Beginn der chemischen Phase. Da hier in fast allen Fällen die Grenze liegt, wird der Eindruck immer weiter verbreitet, daß die Absorption energiereicher Strahlung direkt zur chemischen Phase führt, d.h. zur Bildung von Molekülfragmenten im thermischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung; doch hat Platzman (1962) nachdrücklich darauf hingewiesen, daß diese Auffassung nicht richtig ist. Auf der anderen Seite sind die während der physikalischen Phase ablaufenden Prozesse für die Zwecke der Strahlenbiologie mit hinreichender Genauigkeit bekannt, und Bacq und Alexander (1961) halten es für unwahrscheinlich, daß die weitere Entwicklung der Strahlenphysik einen besonderen Einfluß auf die Strahlenbiologie gewinnen wird. Dadurch ist die Situation entstanden, daß die ersten Schritte der Strahlenabsorption relativ genau bekannt sind und die zu Ende der chemischen Phase vorliegenden Endprodukte wenigstens in einigen einfachen Systemen quantitativ bestimmt werden können. Dennoch ist es bisher nicht möglich gewesen, daraus die gesamte Ereigniskette zu erschließen, weil die dazwischen ablaufenden Reaktionsschritte so komplexer Natur sind und von so vielen Parametern abhängen (vgl. Abb. 2), daß die zur Verfügung stehende Information zu einem solchen Schluß nicht ausreicht.

Auf Grund dieser Situation suchte man längere Zeit nach geeigneten Untersuchungsmethoden, um mehr über die unmittelbar auf die Strahlenabsorption folgenden physikochemischen Reaktionen zu erfahren (vgl. Zimmer 1958, 1960). Als eine solche Methode erwies sich die Elektron-Spin-Resonanz-Spektrographie (ESR), die 1955 zum ersten Mal auf Biochemikalien (Gordy, Ard und Shields 1955) und zwei Jahre später auf biologische Objekte (Zimmer, Ehrenberg und Ehrenberg 1957) angewandt wurde. Wie umfangreich das während des letzten Jahrzehnts von dieser Forschungsrichtung erarbeitete Material ist und welche allgemeingültigen Folgerungen für die Aufklärung der Mechanismen der Strahlenwirkung aus diesen Befunden gezogen werden können, ist in einem Übersichtsreferat von Zimmer und Müller (1965) ausführlich beschrieben worden. Es gibt allerdings einen grundsätzlichen und schwerwiegenden Einwand, der gelegentlich gegen diese Art von Experimenten erhoben wird: Es verstreichen nämlich zwischen der Erzeugung der freien Radikale und ihrer Messung mindestens einige Minuten, so daß die primär erzeugten sehr reaktionsfähigen Radikale schon abreagiert haben, ehe ihr Nachweis möglich ist und nur die langlebigen Radikale durch die Messung erfaßt werden. Die Durchführung schneller Elektron-Spin-Resonanz-Messungen während der Bestrahlung, die diese Schwierigkeit zum Teil umgehen könnten, sind bei gleichzeitig hoher Empfindlichkeit technisch sehr schwierig, wenn nicht unmöglich. Damit bleibt das Problem ungeklärt, ob die mit der ESR-Methode nachweisbaren Radikale mit denjenigen identisch sind, die den beobachteten biologischen Schaden hervorbringen, oder ob diese langlebigen Radikale nur harmlose Nebenprodukte der Bestrahlung sind. Zur Lösung dieses Problems wurde kürzlich von Zimmer (1967) vorgeschlagen, die Bestrahlung und die ersten Messungen bei der Temperatur des flüssigen Heliums durchzuführen und dann unter langsamem Anwärmen den weiteren Reaktionsverlauf qualitativ und quantitativ messend zu verfolgen.

#### 4. Energieübertragung bei der Strahlenabsorption

Eine andere Möglichkeit, um Information über die physikalische und physiko-chemische Phase der Strahlenwirkung zu sammeln, besteht darin, die Wirkungen der verschiedenen Primärprozesse der Energieabsorption in biologischen Systemen zu untersuchen. Dazu ist es notwendig, kurz auf die einzelnen Primärprozesse einzugehen, die während der physikalischen Phase von Bedeutung sein können.

Anregungen und Ionisationen: Bei den meisten strahlenbiologischen Versuchen rühren die zu beobachtenden Veränderungen unabhängig von der Art der Primärstrahlung praktisch ausschließlich von geladenen Teilchen her. Denn die Energie von Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung wird über verschiedene Prozesse (Photoeffekt, Comptoneffekt, Paarbildung) in kinetische Energie von Elektronen umgewandelt, und Neutronen übertragen ihre Energie in elastischen Stößen an Atomkerne. Von diesen schnellen geladenen Teilchen wirkt eine elektrostatische Kraft für kurze Zeit auf die in der Nähe der Teilchenbahn gelegenen Moleküle ein. Die dabei übertragene Energie wird praktisch ausschließlich zur elektronischen Anregung, bzw. Ionisation der betreffenden Moleküle verwendet. Zwar können von einem geladenen Teilchen auch Vibrations- und Rotationsniveaus direkt angeregt werden, doch sind die entsprechenden Wirkungsquerschnitte um mehrere Größenordnungen kleiner als bei Elektronenanregung, da die zu bewegenden Massen der Atome groß gegen die Elektronenmasse sind. Überdies sind die in beiden Prozessen übertragenen Energiebeträge um einen Faktor von  $10^2$  bzw.  $10^4$  kleiner als die elektronischen Anregungsenergien, so daß die direkte Anregung von Vibrations- und Rotationsniveaus eine bei der Diskussion biologischer Strahlenschäden völlig unbedeutende Art der Aktivierung darstellt. Angeregte und ionisierte Moleküle sind folglich die häufigsten Primärprodukte, die in der physikalischen Phase gebildet werden. Dabei sind Anregung und Ionisation der Valenzschale wesentlich häufiger als Über-

gänge in inneren Schalen, was sich mit Hilfe der sog. optischen Näherung leicht zeigen läßt (vgl. Platzman 1962a). Die Einzelheiten der beteiligten physikalischen Prozesse sind weitgehend bekannt und in zahlreichen zusammenfassenden Arbeiten dargestellt (Fano 1952, 1954, 1963; Platzman 1958, 1962a, 1967; Hart und Platzman 1961; Hutchinson und Pollard 1961 ; Boag 1963, 1967).

Elastische Kernstöße: Neben den beiden dominierenden Primärprozessen, Anregung und Ionisation, gibt es noch weitere Arten der Energieübertragung, mit denen man sich in der Strahlenbiologie bisher noch nicht befaßt hatte, wie z.B. Energieübertragung durch elastische Kernstöße. Schon bald nach der Entdeckung der Uranspaltung zeigten Corson und Thornton (1939) und Joliot (1939) an Nebelkammeraufnahmen, daß die von Kernspaltungsfragmenten herührenden Spuren sich durch eine äußerst hohe Ionisierungsdichte sowie durch starke Verzweigung auszeichnen. Die Verzweigung der Spuren wurde elastischen Stößen zwischen den schnell bewegten geladenen Spaltfragmenten und Atomen des Füllgases zugeschrieben. Broström, Bøggild und Lauritsen (1940) untersuchten die Häufigkeit der auftretenden Winkel in Abhängigkeit von der Länge der Teilchenbahn zwischen Stoßort und dem Ende der Reichweite, d.h. in Abhängigkeit von der Energie der Teilchen. Auf Grund dieser Messungen erarbeitete Bohr (1940, 1941) die Grundlagen für das theoretische Verständnis des Beitrags, den elastische Stöße bei der Absorption schneller geladener Teilchen in Materie leisten. Die in der Folgezeit weiter ausgearbeitete Theorie (Bohr 1948) wurde später von Lindhard, Scharff und Mitarbeitern (Nielsen 1956, Lindhard und Scharff 1961, Lindhard, Nielsen, Scharff u. Thomsen 1963, Lindhard, Scharff und Schiøtt 1963) weiterentwickelt und verfeinert. Die letztgenannten Autoren (Lindhard, Scharff und Schiøtt 1963) leiteten eine universelle Formel für das Kern-Abbremsvermögen ab, wobei sie ein Thomas-Fermi-Modell zur Bestimmung der Abschirm-Effekte benutzten. In jüngster Zeit beschäftigt sich eine Gruppe um Kistemaker ausführ-

lich mit der Physik elastischer Kernstöße (Kistemaker, de Heer, Sanders und Snoek 1967).

Bei elastischen Stößen zwischen Atomen erfolgt die Wechselwirkung zwischen dem (abgeschirmten) Coulombfeld des einfallenden Teilchens und dem (abgeschirmten) Coulombfeld des Kerns des beim Stoß beteiligten Atoms. Aus diesem Grunde wird der angeführte Prozeß im allgemeinen als "Kernstoß" bezeichnet. Gelegentlich wird unter "Kernstoß" (nuclear collision) auch die Auslösung einer Kernumwandlung durch Beschuß mit schnellen Teilchen verstanden (Fano 1954). Da "Kernstöße" und "Kernreaktionen" aber so völlig verschiedene Vorgänge sind, erscheint es vorteilhaft, sie auch in sprachlicher Hinsicht eindeutig zu unterscheiden. Kernstöße werden häufig auch als "elastische Stöße" bezeichnet. Sie sind elastisch in dem Sinne, daß die gesamte kinetische Energie des einfallenden und des gestoßenen Atoms erhalten bleibt, was aber nicht bedeutet, daß das einfallende Teilchen ohne Energieverlust gestreut wird.

Bei hohen Geschwindigkeiten  $v \gg v_0$  (Bohr'sche Geschwindigkeit  $v_0 = c/137 = e^2/\hbar = 2.183 \cdot 10^8$  cm/sec = Geschwindigkeit eines Elektrons in der tiefsten Bahn des Wasserstoffatoms) verliert ein schweres geladenes Teilchen beim Durchgang durch Materie nur sehr wenig seiner Energie bei elastischen Kernstößen. Dies gilt nicht mehr, wenn sich das Teilchen so langsam bewegt ( $v \sim v_0$ ), daß seine Durchschnittsladung sich an Null annähert. In diesem Energiebereich nimmt das elektronische Abbremsvermögen mit kleiner werdender Ionengeschwindigkeit ab, da die Stöße mit den Atomelektronen in zunehmendem Maße adiabatisch werden. Im Gegensatz dazu nimmt der Energieverlust pro Weglänge durch elastische Stöße stark zu, und zwar ungefähr wie  $\beta^{-2}$  ( $\beta = v/c$ ). Es wird folglich bei kleinen Ionengeschwindigkeiten eine kritische Geschwindigkeit geben, unterhalb der durch elastische Stöße mehr Energie dissipiert wird als durch Wechselwirkung zwischen dem einfallenden Ion und den

Atomelektronen der durchstrahlten Materie. Nicht nur schwere Ionen, auch Elektronen können durch elastische Stöße Energie verlieren. Allerdings sind die Stöße, bei denen genügend Impuls übertragen wird, um ein Atom aus seinem Molekülverband zu lösen, äußerst selten. Das gilt auch dann noch, wenn die Energie der Elektronen so groß ist, daß ihre Masse die Ruhmasse bei weitem übersteigt. Für Elektronen mit Energien unterhalb von 100 keV ist die Schädigung eines Moleküls durch Kernstoß energetisch nicht mehr möglich. Für Neutronen sind elastische Stöße mit Atomkernen des durchstrahlten Materials der wichtigste Primärprozeß bei der Energieabgabe, nur erfolgt hier die Wechselwirkung nicht über Coulomb- sondern über Kernkräfte. Aus diesem Grunde kommt der Verwendung von Neutronen zur Erzeugung von Versetzungen in Festkörpern besondere Bedeutung zu.

Andere Prozesse: Neben Anregungen, Ionisationen und elastischen Kernstößen gibt es noch eine Reihe weiterer Prozesse, über die Strahlungsenergie an Materie übertragen wird: z.B. Ionisierung der inneren Schalen mit nachfolgender Auger-Kaskade; Umladeprozesse an positiven Ionen, wobei das einfallende Teilchen ein Elektron in eine äußere Bahn aufnimmt, um es bei nachfolgenden Wechselwirkungen wieder abzugeben; Mehrfachanregungen und Mehrfachionisationen, worunter im allgemeinen die gleichzeitige Anregung (bzw. Ionisierung) mehrerer Elektronen in einem einzigen Molekül durch dasselbe geladene Teilchen verstanden wird. Die biologischen Wirkungen dieser Prozesse sind bis jetzt noch nicht experimentell untersucht worden, obwohl ihre Bedeutung für die Strahlenbiologie auf Grund theoretischer Überlegungen bereits mehrfach diskutiert wurde (Platzman 1952; Hart und Platzman 1961; Ore 1967).

## 5. Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung

Die vorangegangene Betrachtung zeigt, daß der erste Schritt in dem auf Abb. 1 dargestellten Schema, d.h. die Absorption der Strahlung im bestrahlten Objekt, über mehrere verschiedenartige Primärprozesse verläuft. Damit entsteht bereits zu Anfang der Ereigniskette eine Mehrdeutigkeit, und man muß annehmen, daß auf die verschiedenen Arten der Energieübertragung auch unterschiedliche Reaktionsketten folgen werden. Damit rühren die zu Ende der chemischen Phase nachweisbaren Veränderungen von mehreren Reaktionsketten her, so daß die Ermittlung der wirksamen Mechanismen außerordentlich erschwert wird. Um diese Mehrdeutigkeit auszuschließen, unternahmen wir den Versuch, die einzelnen Primärprozesse zu trennen, um sie von einander unabhängig untersuchen zu können. Dazu mußten zunächst die experimentellen Voraussetzungen geschaffen werden, um aus den "normalerweise" gemeinsam auftretenden Primärprozessen alle bis auf einen einzigen zu eliminieren, so daß die zu beobachtenden Wirkungen als Produkte einer einzigen, wenn vielleicht auch verzweigten Reaktionskette anzusehen sind. Durch dieses Vorgehen versuchten wir, das Reaktionsschema auf Abb. 1 zumindest in der physikalischen Phase wesentlich zu vereinfachen und die Möglichkeit zu schaffen, Unterschiede in den Wirkungen der verschiedenen Primärprozesse aufzuklären. Um weitere Aufschlüsse über die in der physiko-chemischen und chemischen Phase ablaufenden Reaktionen zu erhalten, untersuchten wir außerdem den Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit. Die dabei gewonnenen Resultate legten den Schluß nahe, daß diffusible Radikale, wie z.B. atomarer Wasserstoff, bei der Strahlenschädigung biologischer Objekte eine Rolle spielen könnten. Diese Schlußfolgerung wurde daraufhin experimentell nachgeprüft; die entsprechenden Versuche, die im abschließenden Kapitel VI beschrieben sind, erbrachten den Nachweis, daß strahleninduzierte diffusible Radikale und atomarer Wasserstoff in identischer Weise auf biologische Objekte

einwirken, was weitere interessante Aufschlüsse über die physiko-chemische und chemische Phase der Strahlenwirkung vermittelte.

Bei der Wahl des Untersuchungsobjektes ließen wir uns von folgenden Überlegungen leiten: Wie das Schema auf Abb. 1 zeigt, werden alle Reaktionsschritte unterhalb der molekularen Veränderungen vom Stoffwechsel des bestrahlten Organismus beeinflusst, so daß die zu beobachtenden Strahlenwirkungen von einer großen Zahl komplizierter biochemischer Reaktionen abhängen. Wenn man sich für die Mechanismen der Strahlenwirkung interessiert -- und Mechanismen aufklären heißt in diesem Zusammenhang ja nichts anderes, als die Entstehung eines Strahlenschadens auf bekannte physikalische und chemische Prozesse zurückzuführen -- dann erscheint es zweckmäßig, die Untersuchungen auf relativ einfache biologische Objekte ohne Nervensystem und ohne komplizierte Physiologie zu beschränken.

Als Untersuchungsobjekt wählten wir Desoxyribonucleinsäure (DNS); denn auf Grund zahlreicher Befunde steht außer Zweifel, daß in Viren, Zellen und höheren Organismen der überwiegende Teil des Strahlenschadens primär von einer Veränderung der DNS herrührt. Bereits die Anwendung der Treffbereichstheorie führte zu dem Befund, daß die verschiedenen Strukturen in einer Zelle für deren Strahlenempfindlichkeit von ganz unterschiedlicher Bedeutung sind (Lea 1946; Timoféeff-Ressovsky und Zimmer 1947). Später versuchte man, durch Anwendung besonderer Meß- und Auswertemethoden nicht nur die Größe, sondern auch die Form des mutmaßlichen Treffbereichs zu erschließen (Pollard, Guild, Hutchinson und Setlow 1955; Jagger und Pollard 1956; Klein und Preiss 1958; Preiss und Klein 1958; Wilson und Pollard 1958; McCrea, Preiss und O'Loughlin 1960; Preiss und Pollard 1961). Dieses letztgenannte Ziel konnte nicht erreicht werden, dagegen ergab sich aus dem an einer großen Zahl verschiedener biologischer Objekte gesammelten Material ein charakteristischer Zusammenhang zwischen dem Nuklein-

säuregehalt und der Strahlenempfindlichkeit von Viren, Bakterien, Säugetier- und Pflanzenzellen (Terzi 1964, 1965; Kaplan und Moses 1964; Sparrow, Underbrink und Sparrow 1967), nachdem eine solche Korrelation zwischen Virusgröße und Strahlenempfindlichkeit bereits von Lea (1946) und zwischen DNS- bzw. RNS-Gehalt eines Virus und seiner Strahlenempfindlichkeit später von Epstein (1953) aufgefunden worden war. Nach der Einteilung von Kaplan und Moses (1964) existieren vier Gruppen von Organismen, die hinsichtlich ihrer Strahlenempfindlichkeit deutlich unterschieden werden können, und zwar: (1) Viren mit einzelsträngiger DNS; (2) Viren mit doppelsträngiger DNS; (3) haploide Bakterien und Hefezellen und (4) diploide Zellen von Säugetieren, Vögeln und Hefen. Innerhalb jeder Gruppe ist die Strahlenempfindlichkeit dem DNS-Gehalt oder der Chromosomengröße annähernd proportional (Anstieg mit  $N^{0,81}$ ;  $N$  = Nucleinsäuregehalt), was zunächst als Beweis dafür anzusehen ist, daß die DNS in den verschiedenen Organismen den ausschlaggebenden Treffbereich darstellt.

Die erwähnte Einteilung enthält aber noch weitere Information: Die mittlere Zahl der zur Inaktivierung notwendigen Primärisationen beträgt etwa 1 für Einzelstrang-Viren, größenordnungsmäßig 10 für Doppelstrang-Viren, 50 - 100 für die DNS haploider Mikroorganismen, 1000 und mehr für diploide Säugetierzellen. Diese zunehmende Strahlenresistenz der höheren Organismen steht nicht nur im Widerspruch zur Treffbereichstheorie, sondern auch zur modernen Molekularbiologie, die fordert, daß zur Aufrechterhaltung ihrer Funktionsfähigkeit die Struktur der DNS innerhalb sehr enger Grenzen unversehrt sein muß. In den letzten Jahren ist durch Untersuchungen an Bakterienzellen deutlich geworden, daß die DNS Information zur Reparatur strahleninduzierter Schäden enthält (Haynes, Wolff und Till, 1966). Diese Fähigkeit der Zellen zur Eliminierung genetischer Schäden gilt nicht nur für künstlich (durch Strahlung oder Chemikalien) hervorgerufene Schäden, sondern auch für Fehlleistungen, die der Zelle während des

ungestörten Replikationsprozesses unterlaufen, was die relativ geringe Zahl spontaner Mutationen erklären könnte (Hanawalt und Haynes 1967). Aus den angegebenen relativen Empfindlichkeiten der verschiedenen Gruppen folgt, daß etwa 90 % der durch ionisierende Strahlen in Zweistrang-DNS erzeugten Schäden nicht zur Wirkung kommen und sich somit dem direkten Nachweis entziehen (vgl. Kap. VII). Wenn in einem solchen Molekül durch Bestrahlung z.B. mehrere Einzelbrüche entstanden sind, dann ist es gegen physikalische und chemische Einflüsse (Scherkräfte, thermische Energien, geringe Ionenstärke, usw.) viel empfindlicher als der intakte Doppelstrang, so daß die Behandlung der DNS nach der Bestrahlung einen großen Einfluß auf die Zahl der überlebenden Moleküle besitzt und überdies noch von zahlreichen unkontrollierten Parametern abhängt.

Aus diesem Grunde wählten wir die DNS des Bakteriophagen ØX 174 als Untersuchungsobjekt. Infolge ihres kleinen Molekulargewichtes von  $1,7 \cdot 10^6$  Dalton (Sinsheimer 1959b) ist sie gegenüber hydrodynamischen Scherkräften weitgehend unempfindlich. Das Molekül ist einsträngig (Sinsheimer 1959b) und besitzt Ringstruktur (Fiers und Sinsheimer 1962), was auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden konnte (Freifelder, Kleinschmidt und Sinsheimer 1964). Es ist ferner bekannt, daß seine biologische Funktionsfähigkeit durch einen einzigen durch DNase-Einwirkung hervorgerufenen Strangbruch (Fiers und Sinsheimer 1962), durch ein einziges Depurinierungsereignis (Ginoza, Hoelle, Vessey und Cormack 1964) oder durch das Auftreten einer einzigen Primärionisation irgendwo im Molekül (Ginoza 1963) verlorengeht. Von ganz besonderer Bedeutung war die Tatsache, daß für ØX 174-DNS eine Methode bekannt war, mit deren Hilfe die Unversehrtheit der genetischen Information nachgewiesen werden kann (Guthrie und Sinsheimer 1963). Als Kriterium für die Funktionstüchtigkeit des Moleküls gilt dabei die Fähigkeit der DNS, intakte ØX-Bakteriophagen hervorzubringen. Zum Nachweis wird die DNS mit sog. Sphäroplasten zusammengebracht, das

sind Bakterien, bei denen durch Lysozym-Behandlung ein Teil der Zellwand entfernt wurde. Dadurch kann die DNS in das Innere des Bakteriums eindringen und veranlaßt das Bakterium, komplette Bakteriophagen zu produzieren. 20 - 30 Minuten nach der Infektion platzt die Bakterienzelle (Lyse) und entläßt durchschnittlich 180 infektiöse ØX 174-Bakteriophagen pro Zelle (Denhardt und Sinsheimer 1965a). Um zu verhindern, daß die freigesetzten Phagen weitere Sphäroplasten lysieren, verwendet man zur Sphäroplasten-Herstellung Bakterien, wie z.B. die Mutante E.coli K 12, die vom ganzen Virus nicht infiziert werden (Guthrie und Sinsheimer 1960). Die nach dem ersten Vermehrungszyklus in der Reaktionslösung vorhandenen ØX-Phagen werden entsprechend den von Adams (1959) angegebenen Vorschriften auf E.coli C plattiert. Auf Indikator-nährböden (Bresch 1952) bilden die Bakterien einen blau gefärbten Rasen, in dem die gleichzeitig mit den Bakterien aufgebracht Phagen während der etwa 15 Stunden dauernden Bebrütung runde Löcher (= Plaques) bilden. Es ist bekannt, daß die Zahl der Plaques proportional zur Phagenkonzentration ist (Ellis und Delbrück 1939). - Für einige Experimente wurden je nach Problemstellung neben der ØX-DNS auch T1-Bakteriophagen, die zweisträngige DNS enthalten, oder das Enzym Ribonuclease verwendet, dessen Verhalten bei Einwirkung ionisierender Strahlen in einer an anderer Stelle beschriebenen Serie von Experimenten von uns ausführlich untersucht wurde (Jung und Schüßler 1966, 1968a, 1968b; Schüßler und Jung 1967, 1968).

Die Abhängigkeit der Inaktivierung von ØX 174-DNS, T1-Bakteriophagen und Ribonuclease folgt in der überwiegenden Zahl der Fälle einer exponentiellen Dosis-Wirkungs-Kurve, die durch den Ausdruck

$$N / N_0 = e^{-SD} \quad (1)$$

beschrieben werden kann. Dabei repräsentiert  $N/N_0$  den Anteil der Biomoleküle, der nach Bestrahlung mit der Dosis  $D$

noch funktionsfähig ist; S nennt man Inaktivierungskonstante ( $\text{rad}^{-1}$ ) oder Inaktivierungsquerschnitt ( $\text{cm}^2$ ), je nachdem ob D die Dosis (in rad) oder den Teilchenfluß (in Teilchen/ $\text{cm}^2$ ) bedeutet. Für den Fall  $N/N_0 = e^{-1} = 0,37$  ergibt sich die Inaktivierungskonstante zu  $S = 1/D_{37}$ . Da dieser Wert leicht zu ermitteln und für statistische Analysen besonders geeignet ist, hat es sich eingebürgert, die 37 %-Dosis ( $D_{37}$ ) als Maß für die Strahlenempfindlichkeit anzugeben. Änderungen in der Strahlenempfindlichkeit können durch das Verhältnis der betreffenden 37 %-Dosen beschrieben werden. Verläuft eine Kurve flacher als eine Vergleichskurve, so spricht man von einem Schutzfaktor (p), hat sie dagegen einen steileren Verlauf, von einem Sensibilisierungsfaktor (s).

Obwohl es eine Selbstverständlichkeit ist, soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß die an reiner DNS erhobenen Befunde und die auf ihnen beruhenden Vorstellungen über die Wirkungsmechanismen ionisierender Strahlen und modifizierender Faktoren nicht ohne weitere experimentelle Nachprüfung auf andere biologische Objekte übertragen werden dürfen. Untersuchungen an reinen DNS-Präparaten haben dennoch eine besondere Bedeutung, weil eine vollständigere Kenntnis der Strahlenwirkung auf das Erbgut nach dem heutigen Stand unseres Wissens nur auf molekularer Ebene mit Aussicht auf Erfolg gesucht werden kann. Nicht nur die praktische Anwendung von Strahlen, beispielsweise zur Sterilisierung von Lebensmitteln und Geräten oder die Erzeugung neuer Sorten von Kulturpflanzen, sondern auch die Vermeidung von Erbschädigungen durch Strahlung sowie die angestrebte Entwicklung von Heilmitteln auf diesem Gebiet wird durch genauere Kenntnis des molekularen Geschehens in bestrahlter DNS zweifellos sehr erleichtert.

## II. Material und Methoden

### 1. Vakuum-UV-Monochromator

Für die Experimente zur Einwirkung von monochromatischem Vakuum-Ultraviolett auf DNS wurde ein Monochromator konstruiert, dessen wesentliche Merkmale aus Abb. 3 ersichtlich sind. Um Messungen bei Wellenlängen unterhalb von  $1000 \text{ \AA}$  zu ermöglichen, wurde kein Prisma als dispergierendes Element verwendet, da das verwendete kurzwellige UV-Licht von allen Substanzen äußerst stark absorbiert wird. Aus dem gleichen Grund war auch die Anbringung von Linsen oder Fenstern im Strahlengang nicht möglich, so daß der Druckabfall zwischen Lichtquelle und Bestrahlungskammer durch differentielles Pumpen aufrechterhalten wurde. Das Grundprinzip der benutzten Anlage geht auf Seya (1952) zurück. Das entscheidende Kriterium besteht darin, daß Eintritts- und Austrittsspalt feststehen und die Wellenlängenänderung allein durch Drehen des Gitters bewirkt wird. Diese Anordnung bringt gegenüber den Spektrometertypen, bei denen der Austrittsspalt entlang des Rowlandkreises verschoben werden muß, so große konstruktive Vorteile, daß die etwas größeren Abbildungsfehler bei weitem aufgewogen werden. Nach der Abbildungstheorie von Seya (1952), die später von Greiner und Schäffer (1958) weitergeführt und verfeinert wurde, existiert eine optimale Anordnung der Spalte, bei der eine Änderung der Wellenlänge nur eine geringe Änderung der Brennweiten zur Folge hat: Bei einem Krümmungsradius des Gitters von 1 m beträgt die Eintrittslänge 821,7 mm und die Austrittslänge 819,4 mm; einfallender und ausfallender Strahl bilden einen Winkel von  $69^{\circ}44'$ .

Als Lichtquelle wurde ein "Plasmatron" (von Ardenne 1962) mit direkt geheizter Kathode verwendet, dessen wesentliche Konstruktionsmerkmale von Brehm und Siegert (1965) beschrieben wurden. Die Entladung, die je nach der gewünschten Wellenlänge in Wasserstoff oder Helium bei 4 Torr betrieben wurde, kann durch Anbringen einer Zwischenblende

(B<sub>1</sub>, Abb. 3) auf die Blendenöffnung konzentriert werden. Die dort auftretenden großen Stromdichten erzeugen ein Plasma, das Atomspektren hoher Intensität emittiert. Das Licht fällt durch einen Strömungskanal in den Monochromator. Der Strömungswiderstand dieses Kanals ist genügend groß, um bei Verwendung einer 2000 ltr-Diffusionspumpe (P<sub>1</sub>) im ersten Teil der Anlage einen Druck von  $10^{-3}$  Torr zu ermöglichen. Die Breite der Spalte kann kontinuierlich zwischen 0,02 und 2,5 mm variiert werden. Durch eine Blende (B<sub>2</sub>), die als Strömungskanal fungiert, fällt das Licht auf das Konkavgitter. Dieses ist dreh-, schwenk- und verschiebbar aufgehängt, so daß sowohl die Entfernung zu den Spalten als auch die Neigung gegenüber dem Strahl justiert werden können. Außerdem ermöglicht die hängende Anordnung eine leichte Reinigung der Gitteroberfläche durch Eintauchen in Xylol ohne Demontage und Dejustierung. Die Wellenlängenablesung erfolgt über eine starr mit der Drehachse verbundene Projektionsskala. Die Reproduzierbarkeit der Einstellung beträgt  $0,5 \text{ \AA}$ . Je nach Wellenlängenbereich wurden zwei verschiedene Gitter benutzt, die beide einen Krümmungsradius von 1 m und 1200 Furchen pro Millimeter hatten. Das oberhalb von  $1200 \text{ \AA}$  verwendete Gitter besaß einen Belag aus Aluminium mit MgF<sub>2</sub>-Bedampfung und einen Glanzwinkel von  $4^{\circ} 8'$ , wodurch Wellenlängen um  $985 \text{ \AA}$  in der 1. Ordnung besonders intensiv reflektiert werden. Das zweite Gitter hatte einen Platinbelag und einen Glanzwinkel von  $2^{\circ} 45'$ ; damit wird der Bereich um  $655 \text{ \AA}$  in erster Ordnung verstärkt. Vom Gitter fällt das Licht auf den Austrittsspalt. Die hier beschriebenen Experimente (vgl. Kap. III. 2) wurden bei einer Spaltbreite von 1,8 mm durchgeführt, was einer Auflösung von  $30 \text{ \AA}$  entspricht. Die zu bestrahlenden Proben befanden sich in einer Entfernung von 45 cm hinter dem Austrittsspalt, so daß der divergierende Strahl eine Breite von 2,5 Zentimetern erreichte, wodurch eine homogene Ausleuchtung der Proben sichergestellt wurde (vgl. Abb. 3). Die verwendete Bestrahlungskammer, die auch bei unseren Tieftemperatur-Versuchen

mit 2 MeV-Protonen Anwendung fand, ist in Kap. II. 3 näher beschrieben. Durch eine 2000 ltr-Diffusionspumpe ( $P_2$ ) unterhalb des Gitters und eine weitere 100 ltr-Pumpe ( $P_3$ ) hinter dem Austrittsspalt konnte in der Bestrahlungskammer ein Druck von  $5 \cdot 10^{-6}$  Torr aufrechterhalten werden.

Der Nachweis der Lichtintensität erfolgte mit einem Natrium-salicylat-Leuchtschirm, dessen Quantenausbeute nach Watanabe und Inn (1953) zwischen  $500 \text{ \AA}$  und  $3000 \text{ \AA}$  von der Wellenlänge unabhängig ist. Das von dem Leuchtschirm emittierte Licht wurde auf einen Photomultiplier gegeben, dessen Anodenstrom über einen Elektrometerverstärker mit einem Schreiber registriert wurde. Da der Querschnitt des Lichtbündels breiter war als der Querschnitt der zu bestrahlenden Probe, konnte ein ausgeblendeter Teil davon während der Bestrahlung registriert werden, was eine kontinuierliche Kontrolle der Lichtintensität ermöglichte.

## 2. Protonenbeschleuniger

Zur Untersuchung der biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße wurde ein Beschleuniger konstruiert, der Protonen bis zu einer Maximalenergie von 60 keV liefert. Seine wesentlichen Merkmale sind in Abb. 4 schematisch dargestellt. Die Beschleunigungsspannung ( $U$ ) wurde im Bereich zwischen 500 und 5000 Volt von einem Hochspannungs-Netzgerät (Nucletron, Type 2 x NU - 1250) geliefert, dessen Konstanz  $5 \cdot 10^{-5}$  und dessen Einstellgenauigkeit 0,1 Volt beträgt. Für höhere Beschleunigungsspannungen stand eine Greinacher-Kaskade (AEG-Zeiss, Type HA 60) zur Verfügung, die positive Spannungen zwischen 5 und 60 kV liefert. Die Spannungsanzeige erfolgt über ein Mikroamperemeter, das mit mehreren geeichten hochohmigen Widerständen in Reihe geschaltet ist. Die Genauigkeit der Spannungsanzeige beträgt  $\pm 5$  Prozent. Die Protonen wurden in einer Penning-Ionenquelle ( $I_q$ ) nach Keller (1949) erzeugt. Die Beschleunigungsstrecke bestand aus drei zylindrischen Messingröhren ( $R_1, R_2, R_3$ ), die auf verschiedenen Potentialen gehalten wurden. Sie hatten den

Zweck, den Protonenstrahl aufzufächern, um so eine homogene "Ausleuchtung" der bestrahlten Probe zu gewährleisten. Kurz hinter der Beschleunigungsstrecke passiert der Ionenstrahl eine Blende mit einer Öffnung von 15 mm Durchmesser (B 1). Diese verhindert, daß der Strahl beim starken Aufzähern so breit wird, daß die magnetische Auftrennung in seine verschiedenen Komponenten versagt. In einem homogenen Magnetfeld (M) werden unerwünschte Komponenten des Strahls, wie  $H_2^+$ - und  $H_3^+$ -Ionen, von den Protonen abgetrennt.

Der Aufbau der Bestrahlungskammer geht aus Abb. 5 hervor. Vor der Kammer befindet sich eine Blende von 15 mm lichter Weite (B 2). Sie wird auf -300 V gehalten und verwehrt somit den von den Protonen ausgelösten Sekundärelektronen den Austritt aus der Bestrahlungskammer. Die Bestrahlungskammer ist isoliert aufgehängt, so daß die Strahlintensität durch Messung des Ionenstroms mit einem Nanoampere-meter (Knick, Type H 21) oder mit einem Stromintegrator (Elcor, Type A 309 B) bestimmt werden kann. Die Kammerrückwand enthält eine Drehdurchführung (D), deren Achse eine Stahlscheibe von 150 mm Durchmesser, die "Bestrahlungsplatte" (BP), trägt. Auf dieser Scheibe sind auf einem Radius von 60 mm 12 Einfräsungen (HP) für die zu bestrahlenden Proben angebracht; weiter innen gibt es 8 entsprechende Vertiefungen (HK) für die unbestrahlten Kontrollproben. Um eine größere Fläche homogen bestrahlen zu können, muß die Teilchenflußdichte im Protonenstrahl über die gesamte bestrahlte Fläche konstant sein. Durch Einbringen von unterschiedlich weiten Blenden in den Strahlengang, lassen sich Teile des Protonenstrahls ausblenden. Diese werden mit einem Faraday-Becher (FB), der an der Kammerrückwand angebracht ist, aufgefangen und mit einem Nanoampere-meter gemessen. Für Beschleunigungsspannungen zwischen 0,6 und 60 kV steigt der gemessene Protonenstrom linear mit der Fläche der Blendenöffnung an (vgl. Jung 1965). Für die Bestrahlungen bei tiefen Temperaturen wurde eine Bestrahlungskammer mit Kühlfalle verwendet, die im folgenden Abschnitt II. 3 beschrieben

wird (vgl. Abb. 6). Die gesamte Apparatur wird bei einem Druck unter  $10^{-5}$  Torr gehalten. Durch die Verwendung von Quecksilberpumpen läßt sich die Möglichkeit ausschließen, daß durch den Ionenstrahl Ölmoleküle aufgespalten werden und die dabei gebildeten organischen Radikale mit den zu bestrahlenden organischen Makromolekülen unter Modifizierung der direkten Strahlenwirkung reagieren.

### 3. Bestrahlungen

Bestrahlung mit 2 MeV-Protonen: Für die Experimente mit 2 MeV-Protonen und 2 MeV-Deuteronen stand ein van-de-Graaff-Beschleuniger (High Voltage Eng. Corp., Burlington, Mass.) zur Verfügung. Der Protonenstrahl wurde durch magnetische Ablenkung von unerwünschten Strahlbestandteilen befreit und durch zwei  $0,5 \mu$  starke Nickelfolien derartig aufgefächert, daß eine homogene Probenausleuchtung erzielt wurde. Den Aufbau der verwendeten Bestrahlungskammer zeigt Abb. 6. Der von außen drehbare Probenhalter (D) bestand aus einer schwarzen Aluminiumscheibe mit 19 Probenpositionen. In der Kammer befand sich eine Kühlfalle (K), die es erlaubte, Bestrahlungen bei Temperaturen bis zu  $100^\circ\text{K}$  durchzuführen. Die Kühlfalle war so konstruiert, daß der Probenhalter bis auf die Öffnung für den Protonenstrahl ringsum von gekühlten schwarzen Wänden umgeben war. Bei Verwendung von flüssigem Stickstoff als Kühlmittel erreichte man innerhalb von 3 Stunden eine Abkühlung auf etwa  $100^\circ\text{K}$ . Für Bestrahlungen bei erhöhten Temperaturen wurde die "Kühlfalle" mit heißem Öl durchspült, das mit Hilfe eines Thermostaten bei jeweils konstanter Temperatur gehalten wurde. Abkühlung bzw. Aufheizen der Proben erfolgte somit über Wärmestrahlung. Dadurch wurde sichergestellt, daß sich die Proben bei der gleichen Temperatur wie ihre Trägerplatte befanden. Bei Aufheizung bzw. Kühlung durch Wärmeleitung ist dies infolge des hohen Isolationsvermögens der bestrahlten Substanzen nicht ohne weiteres zu erreichen (Bube und Shrader 1954; Augenstein, Brustad und Mason 1964). Die

Temperatur des Probenhalters wurde mit einem Thermoelement gemessen, das vor jeder Bestrahlung geeicht wurde. Die Erwärmung der Proben durch die Bestrahlung beträgt bei einer Dosis von 1 Mrad  $2,4^{\circ}\text{K}$  (bei Zimmertemperatur) und liegt damit innerhalb der Meßfehlergrenzen. Eine nennenswerte Erwärmung der Proben im Verlauf der Bestrahlung sollte sich dadurch bemerkbar machen, daß bei höheren Dosen oder erhöhter Dosisrate die Steigung der Inaktivierungskurven zunimmt; doch wurde dies nicht beobachtet. Zur Bestimmung der Dosis war die Kammer als Faraday-Käfig ausgebildet, so daß die in die Kammer gelangende Ladungsmenge mittels eines Integrators ermittelt werden konnte. War die vorgewählte Ladung erreicht, betätigte der Integrator einen Verschuß, der den Protonenstrahl unterbrach. Nach Ende der Bestrahlung wurden die Proben durch Entfernung des Kühlmittels, bzw. durch Abkühlung des die Kühlfalle durchströmenden Öls wieder auf Zimmertemperatur gebracht, ehe die Kammer belüftet wurde. Der Beitrag der bei erhöhten Temperaturen einsetzenden thermischen Inaktivierung wurde dadurch eliminiert, daß die Kontrollen zusammen mit den bestrahlten Proben erwärmt und nach erfolgter Bestrahlung wieder abgekühlt wurden.

$\gamma$ -Bestrahlung: Die Bestrahlungen mit  $\gamma$ -Strahlen wurden in  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Quellen (Gammacell 220) bei Dosisraten von 0,6 bzw. 1,3 Mrad/Stde. durchgeführt. Um mehrere Proben auf kleinem Raum unterzubringen, wurden jeweils 6 - 8 Mikroskop-Deckgläschen zwischen die Windungen einer Drahtspirale geklemmt. Zur Bestrahlung im Vakuum wurden die Spiralen mit den Plättchen in Ampullen aus Pyrexglas mehrere Stunden auf  $10^{-5}$  Torr evakuiert und anschließend darin eingeschmolzen. Um zu verhindern, daß hierbei Gaseinschlüsse aus dem Glas freiwerden könnten, waren die Ampullen in leerem Zustand ausgeglüht worden. Zur Bestrahlung in Sauerstoff-Atmosphäre wurden die Proben zunächst einige Stunden lang im Vakuum entgast; dann wurde getrockneter Sauerstoff durch die Ampullen geleitet und diese abgeschmolzen. Zur Bestrahlung bei tiefen Temperaturen wurden die Ampullen

in einem Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff, Kohlen-säureschnee oder mit Hilfe eines Kryostaten bei der ge-wünschten Temperatur gehalten. Die von den Herstellern der  $\gamma$ -Quellen angegebenen Dosis-Eichkurven bzw. Isodosen-kurven wurde mit Hilfe der von Fricke und Morse (1927) entwickelten chemischen Dosimetrie, mit der die Oxydation von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  unter dem Einfluß der Strahlung gemessen wird, nachgeprüft.

UV-Bestrahlung: Für die Bestrahlung von T1-Bakteriophagen mit ultraviolettem Licht, wurde ein Quecksilber-Nieder-druckbrenner (6 Watt, Quarzlampen-Ges. Hanau, Modell 6/20) verwendet, der den überwiegenden Teil des Lichts bei 2537 Å emittiert. Da durch diese Versuche lediglich die relativen Empfindlichkeiten von T1- und BU-T1-Phagen mit-einander verglichen werden sollten (vgl. Kap. VI. 2), konnte auf eine absolute Dosimetrie verzichtet werden.

#### 4. Erzeugung von atomarem Wasserstoff

Hochfrequenz-Entladung: Um die Wirkung von atomarem Was-serstoff auf verschiedene Biomoleküle zu untersuchen, wur-den zwei unterschiedliche Systeme benutzt. Methode I be-stand aus einer elektrodenlosen Hochfrequenz-Entladung, deren Versuchsaufbau aus Abb. 1 ersichtlich ist. Durch ein Glasrohr strömt Wasserstoffgas unter einem Druck von 16 Torr. Eine hochfrequente Hochspannung (30 kV, 30 kHz) erhält zwischen zwei ringförmigen Elektroden eine Entla-dung aufrecht, in der Elektronen, Ionen und Wasserstoff-atome entstehen. Da die Entfernung zwischen Entladung und Proben etwa 10 cm beträgt, haben die geladenen Kompo-nenten genügend Zeit zu rekombinieren. Besonders wesent-lich ist es bei einer solchen Versuchsanordnung, das in der Entladung und bei Rekombinationsprozessen entstehende UV-Licht von den Proben fernzuhalten. Durch den relativ hohen Gasdruck von 16 Torr im Entladungsrohr wird erreicht, daß die Entladung auf die Strecke von 1,5 cm zwischen den Elektroden begrenzt wird, während bei kleineren Wasserstoff-

drücken die Entladung bis weit in den senkrechten Teil des Entladungsrohres brennt. Aber selbst bei 16 Torr entsteht durch Rekombination im senkrechten Glasrohr so viel UV-Licht, daß sein Beitrag zur Inaktivierung von Proben, die sich unmittelbar unter dem senkrechten Glasrohr befinden, nicht vernachlässigt werden darf. Deshalb wurden die Proben senkrecht gestellt, so daß das Volumen, in dem durch Rekombination UV-Quanten entstehen und auf die Proben fallen konnten, auf ein Minimum verringert wurde. Bei dieser Anordnung liegt der Beitrag des UV-Lichts zur Inaktivierung der mit H-Atomen behandelten Proben innerhalb unserer Meßgenauigkeit (vgl. Diskussion Kap. VI. 3). Eine Dosimetrie wurde nicht durchgeführt; die Entladung brannte aber so konstant, daß die Dosis proportional zur Expositionszeit angesetzt werden konnte.

"Kondensator"-Experiment: Unsere zweite Methode soll nicht nur zeigen, daß atomarer Wasserstoff biologisch wirksam ist; sie soll darüber hinaus demonstrieren, daß H-Atome beim Bestrahlen wasserstoffhaltiger Substanzen mit großer Ausbeute entstehen. In einer Anordnung, die einige Ähnlichkeit mit einem Plattenkondensator hat, stehen sich eine Folie aus Polyäthylenterephthalat (Handelsname: Hostaphan) und die mit Wasserstoff zu behandelnden Proben gegenüber (Abb. 8). Die Anordnung befindet sich am Strahlrohrende eines van-de-Graaff-Beschleunigers und wird auf einem Druck von  $5 \cdot 10^{-6}$  Torr gehalten. 2 MeV-Protonen fallen durch ein Blendensystem auf die  $10 \mu$  dicke Hostaphanfolie, die gegenüber dem Protonenstrahl eine Neigung von 9 Grad aufweist. Durch die Bestrahlung werden aus der Oberfläche der Folie Wasserstoffatome ausgelöst, die mit den gegenüberliegenden Proben reagieren können. Eine Dosismessung wurde nicht durchgeführt. Die Intensität des Protonenstrahls schwankte jedoch so wenig, daß die Zahl der auf die Proben auftreffenden H-Atome als direkt proportional zur Zeit angenommen werden konnte. Die von den Protonen freigesetzten Sekundärelektronen werden durch

ein Schirmgitter mit negativer Vorspannung (-520 Volt) von den Proben ferngehalten. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Proton des Primärstrahls nach Streuung wieder aus der Folie austritt, ist kleiner als  $10^{-7}$ , wie sich nach der Vielfachstreuungstheorie von Molière (1948) abschätzen läßt. Aus unseren Resultaten geht ferner eindeutig hervor, daß der Anteil der durch Sekundärelektronen und rückgestreute Protonen inaktivierten Objekte kleiner ist als die Streubreite unserer Meßergebnisse (vgl. Diskussion, Kap. VI. 3).

### 5. Probenbreitung

Die bei der vorliegenden Untersuchung verwendeten kurzwelligen UV-Quanten, niederenergetischen Protonen und thermischen Wasserstoffatome haben eine äußerst geringe Eindringtiefe. Das erforderte die Verwendung von möglichst dünnen und homogenen Materialschichten. Eine zweite Bedingung galt für die Bestrahlungen mit geladenen Teilchen, besonders bei Anwendung langsamer Protonen: Die das Probenmaterial tragende Unterlage mußte metallisch sein, um ein elektrostatisches Aufladen derselben während der Bestrahlung zu vermeiden. Da die Unterlage außerdem noch möglichst glatt sein sollte und nur eine geringe chemische Affinität gegen Sauerstoff besitzen sollte, wurden Ronden aus glanzgewalztem Feingoldblech (10 und 12 mm Durchmesser) für diese Experimente verwendet. Zum Reinigen wurden die Goldplättchen 1 Stunde einer Waschlösung aus 120 g NaOH, 120 ml Wasser und 760 ml Äthanol (Deering 1960) ausgesetzt. Anschließend verblieben sie mehrere Stunden in fließendem Leitungswasser und wurden darauf mit destilliertem und schließlich mit doppelt-quarzdestilliertem Wasser abgespült. Für die Versuche mit Vakuum-UV,  $\gamma$ -Strahlung, ultraviolettem Licht und atomarem Wasserstoff wurden Mikroskop-Deckgläschen von 12 mm Durchmesser verwendet. Jeweils 0,01 ml der für den betreffenden Versuch verwendeten Lösung wurde mit Hilfe einer Vorrichtung zum Arbeiten mit 0,1 ml-Pipetten mit einer Genauigkeit von  $\pm 4,5\%$  auf die Gold- bzw. Glasplättchen aufpipettiert

und über die gesamte Oberfläche der einen Seite verteilt. Die Plättchen wurden dann auf einen Messingblock gesetzt, der zuvor mit Kohlendioxidschnee auf  $-78^{\circ}\text{C}$  abgekühlt worden war. Die Proben wurden bei  $10^{-2}$  Torr gefriergetrocknet, wobei die Temperatur der Unterlage und der die Proben umgebenden Flächen langsam erhöht wurde. Gefriertrocknen lieferte wesentlich homogenere Probenschichten als z.B. Eintrocknen der aufpipettierten Lösung im Exsiccator, wie durch Vorversuche mit langsamen Protonen gezeigt werden konnte.

#### 6. Infektiöse DNS

Die ØX 174-Bakteriophagen wurden nach einem von Sinsheimer (1959a) angegebenen Verfahren hergestellt und durch Ausfällen mit Ammoniumphosphat, mehrfaches Zentrifugieren und Dialysieren gereinigt. Die Einzelstrang-DNS wurde durch dreimalige Extraktion mit heißem Puffer-gesättigtem Phenol nach Guthrie und Sinsheimer (1963) isoliert, das Phenol mit Äther entfernt und schließlich der Äther durch Stickstoff ausgetrieben. Nach der Extraktion wurde die Boratlösung gegen NCE-Puffer dialysiert. Für die Versuche wurde die DNS 1:1000 mit bidest. Wasser verdünnt, dessen pH-Wert mit Ammoniak auf pH 7,6 eingestellt worden war, und jeweils 0,01 ml davon in der bereits beschriebenen Weise gefriergetrocknet. Die Überlebensrate bei der Gefriertrocknung lag bei etwa 50 %.

#### 7. Sphäroplasten und DNS-Nachweis

Zur Herstellung der Sphäroplasten wurde ein Stamm von E.coli K 12 benutzt, den Dr. G. Hotz 1962 von Dr. P. Starlinger, Köln, erhalten hat. Unser Herstellungsverfahren ist eine Modifizierung der Methode von Guthrie und Sinsheimer (1963): Die Bakterien wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem 3XD - Medium nach Frazer und Jerell (1953) bis zu einer Konzentration von ca.  $10^9$  Zellen/ml vermehrt. Jeweils 80 ml Zell-Suspension wurden 15 Minuten

bei 5000 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1,4 ml 1,5 m Sucrose aufgenommen und zusammen mit 0,68 ml Rinder-Serum-Albumin (30 %), 0,08 ml Lysozym (2 mg/ml in 0,25 m Tris-Puffer, pH 8,1), 0,16 ml EDTA (4 %) und 10 ml PA-Medium (Guthrie und Sinsheimer 1963) 15 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und schließlich die Lysozym-Reaktion durch Zugabe von 0,8 ml  $MgSO_4$  (10 %) abgebrochen. Diese Sphäroplasten-Suspension wurde ohne weitere Behandlung direkt für die Infektion benutzt; sie bleibt bei Aufbewahrung im Kühlschrank über mehrere Wochen hinweg verwendbar. Das hier beschriebene Verfahren besitzt gegenüber der Originalmethode den entscheidenden Vorteil, daß auf die langwierige Reinigung der Sphäroplasten durch Sedimentation in eine Säule aus mehreren Lösungen unterschiedlicher Dichte verzichtet werden kann, wodurch sich die für eine DNS-Bestimmung benötigte Zeit ohne Empfindlichkeits-einbuße auf einen Bruchteil verringern läßt. Zum Nachweis der Infektiösität wurde die DNS mit 0,5 ml Tris-Puffer (0,05 m, pH 8,1) von den Trägerplättchen abgelöst und bei 37 °C zunächst 20 Minuten lang mit 0,5 ml Sphäroplasten-Suspension und nach Zugabe von 1 ml auf 37 °C vorgewärmtem PAM-Medium (Guthrie und Sinsheimer 1963) weitere 100 Minuten inkubiert. Nach entsprechender Verdünnung mit Borat-Puffer wurden jeweils 0,1 ml zusammen mit der entsprechenden Menge einer sog. Übernachtskultur von E.coli C mit Hilfe einer Pipette (0,1 ml) auf einem Indikator-Nährboden (Bresch 1952) gleichmäßig verteilt und 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Abb. 9 zeigt eine Kalibrierungskurve für unsere Nachweismethode. Die nach Dialysieren gegen NCE-Puffer erhaltene DNS-Lösung wurde  $1:10^3$  bis  $1:10^9$  mit Tris-Puffer verdünnt und jeweils 0,5 ml davon für die Infektion benutzt. Wie aus Abb. 9 hervorgeht, ergibt sich über mindestens 6 Dekaden hinweg ein linearer Zusammenhang zwischen DNS-Konzentration und der Zahl der erhaltenen Phagen.

### 8. T1-Bakteriophagen

Zur Herstellung hochgereinigter Phagensuspensionen verwendeten wir ein sog. M 9-Medium (Zusammensetzung s. Hotz 1965), das als alleinige organische Substanz und Energiequelle für die Wirtsbakterien Glucose enthält. Nach Ausfällen mit Ammoniumsulfat wurden die Lysate nach der von Hotz (1965) modifizierten Methode von Herriott und Barlow (1953) gereinigt, sodann im CsCl-Gradienten konzentriert und anschließend das CsCl durch Dialyse gegen Tris-Puffer entfernt. Der Einbau von 5-Bromdesoxyuridin anstelle des normalerweise im DNS-Molekül vorhandenen Thymins erfolgte nach einer von Stahl u. Mitarb. (1961) angegebenen Vorschrift. Die quantitative Analyse der Basensubstitution nach Hotz (1963) zeigte, daß ca. 65 % des Thymins durch Bromuracil (BU) ersetzt worden war. Für die Versuche wurden Suspensionen entsprechender Phagenkonzentration 1:1000 mit bidest. Wasser (pH 7,6 durch  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) verdünnt und jeweils 0,01 ml davon wie bereits beschrieben gefriergetrocknet. Einige in früheren Arbeiten unternommene Versuche, in destilliertem Wasser oder in Puffer suspendierte Phagen zu trocknen, scheiterten an der äußerst geringen Überlebensrate nach Trocknung und Resuspension. Die gewöhnlich als Ausweg verbleibende Möglichkeit, die Phagen aus Nährbouillon einzutrocknen (Adams und Pollard 1952; Bachofer et al. 1953; Fluke et al. 1960; Fluke und Forro 1960; Brustad 1961; Hotz und Zimmer 1963; Hermann 1966; Günther und Hermann 1967; Hotz und Müller 1968; Uenzelmann 1968) war bei der vorliegenden Arbeit wegen der geringen Eindringtiefe der verwendeten Strahlenarten und H-Atome nicht anwendbar, und es bereitete erhebliche Schwierigkeiten, von DNS und T1-Phagen Proben zu erhalten, die den gestellten Anforderungen genügten und die nach Gefrier Trocknung noch eine ausreichende Überlebensrate zeigten. Bei ØX 174-Phagen, die für einige Fragestellungen als Untersuchungsobjekt sehr geeignet gewesen wären, schlugen alle Trocknungsversuche aus extrem verdünnten Lösungen fehl. Die Überle-

bensraten für T1- und BU-T1-Phagen lagen in den meisten Experimenten bei etwa 50 %. Wie vergleichende Versuche ergaben, wird durch  $1:10^5$ -Verdünnung in Ammoniakwasser oder durch  $1:1000$ -Verdünnung in 0,001 %ige Lösungen von Gelatine oder Rinderserumalbumin (BSA) die Empfindlichkeit gegen H-Atome nicht beeinflusst; die Überlebensrate bei der Gefriertrocknung wird durch Gelatine oder BSA allerdings geringfügig erhöht. Nach Ende der Bestrahlung bzw. der Wasserstoffeinwirkung wurden die Phagen mit 1 ml Trypton-Brühe von den Plättchen abgelöst und der Anteil der überlebenden Phagen durch Plattieren auf E.coli K 12 bestimmt.

### 9. Ribonuclease

Für einen Teil der Experimente wurde käufliche Ribonuclease (RNase) von Sigma Chemical Company, St. Louis, USA, ohne weitere Reinigung verwendet. Diese RNase wird aus Rinder-Pancreas gewonnen, ist fünfmal umkristallisiert und frei von Salzen und Protease. Ein weiterer Teil der Experimente wurde mit reiner Ribonuclease A (Hirs, Moore und Stein 1953) durchgeführt. Durch Chromatographie über eine Säule (4 · 35 cm) von Amberlite IRC-50 (XE-64) mit 0,2 m Phosphatpuffer (pH 6,47) konnte die Ribonuclease A von Verunreinigungen und den übrigen RNase-Komponenten abgetrennt werden. Das im Eluat enthaltene Phosphat wurde mit 0,1 m Essigsäure über Sephadex G-25/fein (Säule: 3 x 50 cm) vom Enzym abgetrennt. Die Fraktionen, die Ribonuclease enthielten und in denen sich kein Phosphat mehr nachweisen ließ (Methode nach Bodansky und Schwartz 1961), wurden gefriergetrocknet. Die so gewonnene Ribonuclease A wurde in einem weiteren chromatographischen Trennverfahren auf ihre Einheitlichkeit geprüft. Dazu wurden 5 mg RNase über Amberlite IRC-50/XE-64 (Säule: 1 · 30 cm) mit einem Gradienten von 3 · 35 ml 0,15 m (pH 6,40) und 1,35 ml 1,0 m (pH 6,47) Phosphatpuffer aufgetrennt (Rupley und Scheraga 1963) und die Anfärbung des Eluats mit Ninhydrin mit Hilfe eines Autoanalyzers (Technicon Chromatography Corp., Chauncey, New York) automatisch registriert. Nur

Präparate, die sich als einheitlich erwiesen, kamen für die Experimente zur Verwendung. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte nach einer bereits beschriebenen (Jung 1965) Modifikation der Methode von Kalnitsky et al. (1959): Nach Ende der Bestrahlung bzw. Wasserstoffeinwirkung wurde die Ribonuclease mit 1 ml 0,1-m Acetatpuffer (pH 5,0) von den Trägerplättchen abgelöst und durch Zugabe von 1 ml einer 1-proz. Lösung von Natriumnucleinat (Merck, Darmstadt) in 0,1-m Acetatpuffer (pH 5,0) die Reaktion zwischen Enzym und Substrat eingeleitet. Dabei befand sich die Reaktionsmischung bei einer konstanten Temperatur von 30,0 °C. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die unverbrauchte RNS durch Zugabe von 1 ml einer 0,75-proz. Lösung von Uranylacetat in 25-proz. Perchlorsäure ausgefällt, das Gemisch sofort im Eisbad auf 0 °C abgekühlt und der Niederschlag nach weiteren 20 Minuten bei 6000 UpM abzentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde mit dest. Wasser 1:3 verdünnt und die Absorption dieser Lösung bei 260 m $\mu$  in einem Spektralphotometer (Zeiss, PMO II) gegen eine entsprechend behandelte Kontrolle ohne Enzym bestimmt.

Zur Kalibrierung der Nachweismethode wurde die Reaktionszeit zwischen jeweils 1  $\mu$ g Ribonuclease und 1 ml Substrat zwischen 5 und 30 Minuten variiert. Im untersuchten Bereich nahm die Extinktion bei 260 m $\mu$  linear mit der Inkubationszeit zu (Abb. 10). Das zeigt, daß bis zu Reaktionszeiten von 30 Min. noch keine Verarmung an spaltbarer RNS auftritt. In einem entsprechenden Versuch wurde bei einer Inkubationszeit von 30 min. die verwendete RNase-Menge zwischen 0,2 und 1,0  $\mu$ g variiert. Wie aus Abb. 10 hervorgeht, ist die bei 260 m $\mu$  gemessene Extinktionsänderung proportional zur verwendeten Enzymmenge. Bei diesen Kalibrierungsversuchen ist besondere Sorgfalt notwendig; denn Ribonuclease adsorbiert sich leicht an Glas (Shapira 1959; Deering 1960), wodurch beim Benutzen von Pipetten und Glasgefäßen zum Verdünnen der Enzymlösungen auf die gewünschten Konzentrationen leicht erhebliche Fehler ent-

stehen können, besonders in den Fällen, wo mit geringen Enzymkonzentrationen gearbeitet wird. Diese Einschränkung trifft auf den Nachweis getrockneter Proben nicht zu. Die Trägerplättchen verblieben während des gesamten Verlaufs der Enzymbestimmung in der Reaktionslösung und wurden erst unmittelbar vor dem Abzentrifugieren der ausgefällten RNS daraus entfernt. Damit konnte auch der Anteil der RNase zur Reaktion beitragen, der unvollständig von den Gold- oder Glasplättchen abgelöst oder an die Wand der Zentrifugengläser adsorbiert war.

### III. Wirkungen von Anregungen und Ionisationen

#### 1. Problemstellung

Bei der Absorption schneller geladener Teilchen sind Anregungen und Ionisationen die häufigsten Primärprozesse der Energieabsorption (vgl. Kap. I. 4). Obwohl formal die Ionisation in gewissem Sinn nur eine Variante der Anregung ist, wird das Verhalten des betroffenen Moleküls durch die aus einer Ionisation resultierende elektrische Ladung so stark verändert, daß auf Grund ihrer unterschiedlichen chemischen und biologischen Konsequenzen die getrennte Betrachtung von Anregungen und Ionisationen angebracht erscheint.

Der Unterschied in der Wirkung der beiden zur Diskussion stehenden Primärprozesse wird durch die Befunde deutlich demonstriert, daß beim Bestrahlen von Enzymen mit ultraviolettem Licht von  $2537 \text{ \AA}$  Wellenlänge größenordnungsmäßig 100 Quanten pro Molekül absorbiert werden müssen, ehe die enzymatische Aktivität verlorenght (McLaren 1949), während das Auftreten einer Ionisation in einem Biomolekül dieses mit einer Wahrscheinlichkeit nahe 1 inaktiviert (Pollard, Guild, Hutchinson und Setlow 1955). Diese unterschiedliche Wirksamkeit hat nichts mit der insgesamt absorbierten Energie zu tun; denn 100 Quanten von  $2537 \text{ \AA}$  Wellenlänge stellen einen Energiebetrag von 500 eV dar, während für ein Ionenpaar bzw. eine Primäriodisation 33

bzw. 60 eV aufzuwenden sind. Von ausschlaggebender Bedeutung ist also der pro Elementarakt übertragene Energiebetrag; denn er beeinflußt ganz entscheidend die Art und Weise, wie die Energie nach der Absorption innerhalb des Moleküls verteilt wird. Die Energie eines einzelnen UV-Quants reicht wohl zur Inaktivierung eines Enzym-Moleküls aus, doch wird die absorbierte Energie in den meisten Fällen in eine Form überführt, die nicht zur irreversiblen Schädigung des Moleküls geeignet ist. Eine unschädliche Verteilung der absorbierten Strahlungsenergie innerhalb des Moleküls ist offensichtlich dann nicht mehr möglich, wenn die übertragene Energie zur Ionisation ausreicht.

Da Anregungen und Ionisationen - wie die vorangehende Betrachtung zeigt - hinsichtlich ihrer Wirkungsweise sehr verschieden sind, hielten wir es für interessant, die biologischen Wirkungen der beiden diskutierten Primärprozesse von einander getrennt zu untersuchen. Eine solche Trennung ist bei Verwendung geladener Teilchen nicht möglich, da die Häufigkeitsverteilung der aufgenommenen Energiebeträge ausschließlich von der Oszillatorstärke der bestrahlten Moleküle, aber nicht von der verwendeten Strahlenart abhängt. Die Verteilung der Oszillatorstärke von DNS ist nicht bekannt; eine grobe Vorstellung davon geben aber die von Johnson und Rymer (1967) aufgenommenen Spektren der Energieverluste von Elektronen in dünnen Folien aus trockener Nucleinsäure. Diese Spektren zeigen, daß mit großer Wahrscheinlichkeit auch Zustände angeregt werden, deren Energie oberhalb des Ionisationspotentials liegen. Die Energie solcher hochangeregten Zustände wird durch Ionisation oder Dissoziation des Moleküls wieder abgegeben (vgl. Platzman 1962a). Weitgehend unabhängig von der Art und Geschwindigkeit eines einfallenden Teilchens werden immer die gleichen Zustände mit jeweils der gleichen Häufigkeit angeregt, so daß man auf molekularem Niveau durch Anwendung verschiedener energiereicher Strahlen keinen Einfluß nehmen

kann auf Art und Häufigkeit der entstehenden Primärprodukte.

Eine Einflußnahme auf die Verteilung der Primärprodukte ist aber möglich, wenn definierte Energiebeträge von den bestrahlten Molekülen aufgenommen werden; das ist der Fall, wenn man monochromatische elektromagnetische Quantenstrahlung für solche Versuche benutzt. Da die Ionisierungsenergie der meisten stabilen Moleküle um oder über 10 eV liegt, ist es notwendig, mit sehr kurzwelligem ultraviolettem Licht zu arbeiten. Diese Bedingung bringt verschiedene experimentelle Schwierigkeiten mit sich. Bereits bei Wellenlängen unterhalb von  $1850 \text{ \AA}$  ist die Absorption in Luft so stark, daß die Versuche im Vakuum durchgeführt werden müssen. Aus diesem Grund nennt man UV-Licht mit Wellenlängen  $< 1850 \text{ \AA}$  Vakuum-Ultraviolet. Unterhalb von  $1050 \text{ \AA}$ , der Transmissionsgrenze von synthetischem Lithiumfluorid, ist die Verwendung von Fenstern, Linsen und Prismen nicht mehr möglich, da dieses kurzwellige Licht von allen Substanzen äußerst stark absorbiert wird. Folglich müssen Reflexionsgitter verwendet werden, was gegenüber der Anwendung von Prismen und Linsensystemen eine gewaltige Intensitätseinbuße mit sich bringt. Dadurch wird die Intensität der Lichtquelle zu einem entscheidenden Kriterium für die Anwendbarkeit einer Anlage. Als weitere Schwierigkeit tritt hinzu, daß infolge der starken Absorption die Primärprozesse sich überwiegend in Oberflächenregionen der bestrahlten Objekte ereignen, woraus ein ungünstiges Verhältnis von verändertem zu unverändertem Material resultiert. Aus diesen Gründen wurden bisher nur sehr wenige Versuche in diesem Wellenlängenbereich unternommen, obwohl schon 1954 von Franck und Platzman darauf hingewiesen wurde, daß solche Experimente im Hinblick auf die überragende Rolle der Ionisationen bei strahlenbiologischen Prozessen von besonderer Bedeutung wären und eine Basis für das Verständnis strahlenchemischer und strahlenbiologischer Befunde schaffen könnten.

Im Gegensatz dazu war die Wirkung von langwelligem UV-Licht ( $\lambda > 2000 \text{ \AA}$ ) auf DNS und DNS-Bausteine Thema zahlreicher Untersuchungen und mehrerer Übersichtsartikel (z.B. Wacker 1963; Wacker et al. 1964; Smith 1964, 1966).

Die einzigen Untersuchungen, die bisher mit Vakuum-Ultraviolett an Biomolekülen durchgeführt wurden, stammen von Setlow und Mitarbeitern (Preiss und Setlow 1956; Setlow, Silvermann und Watts 1958; Setlow, Watts und Douglas 1959; Setlow 1959, 1960), die die Quantenausbeute für die Inaktivierung von Trypsin, Chymotrypsin und Ribonuclease als Funktion der Wellenlänge des verwendeten UV-Lichts bestimmten. Die Quantenausbeute bezeichnet die Zahl der inaktivierten Moleküle pro absorbiertem Quant. Um diesen Wert zu erhalten, muß die Abhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts von der Wellenlänge (das Wirkungsspektrum) und das Absorptionsspektrum bekannt sein. Besondere Schwierigkeiten bereitet die Messung des letzteren Wertes. Preiss und Setlow (1956), die für verschiedene Aminosäuren, Proteine, Nucleotide und DNS die Absorptionsspektren zwischen 1450 und 2300  $\text{\AA}$  aufnahmen, trockneten die zu untersuchenden Substanzen aus wässriger Lösung auf Calciumfluorid-Fenstern ein und registrierten das Absorptionsspektrum des Films im Innern des beim Evaporieren des Wassers entstandenen Trockenringes. Bei diesem Verfahren ist die Dicke der durchstrahlten Schicht nicht genau bekannt, so daß die Absolutwerte der Absorption nicht exakt angegeben werden konnten. Werden diese Resultate mit dem Wirkungsspektrum korreliert, so ergibt sich im Intervall zwischen 1600 und 3100  $\text{\AA}$  für Trypsin und Chymotrypsin eine Quantenausbeute von etwa 0,01 (Setlow, Watts und Douglas 1959). D.h. bis es zu einer Inaktivierung eines Trypsin-Moleküls kommt, werden im Durchschnitt pro Molekül etwa 100 Quanten absorbiert. Zwischen 1600 und 1215  $\text{\AA}$  erfolgt ein steiler Anstieg der Quantenausbeute auf 0,1. DNase zeigt ein ähnliches Verhalten wie Trypsin und Chymotrypsin, doch nimmt die Quantenausbeute zwischen 1600 und 1215  $\text{\AA}$  nur um einen Faktor von 3 zu (Setlow,

Silvermann und Watts 1958). Die Inaktivierungswahrscheinlichkeit pro absorbiertem UV-Quant für Ribonuclease beträgt bei 3000 Å ca. 0,01, im Intervall zwischen 1400 und 1900 Å etwa 0,1 und bei 1090 Å 1,6. Allerdings kann bei der Streuung der Meßwerte nicht sicher entschieden werden, ob die Quantenausbeute bei der kürzesten Wellenlänge signifikant größer als 1 ist, d.h. ob von einem absorbierten Quant im Mittel mehr als ein RNase-Molekül inaktiviert wird. Es war aus apparativen Gründen nicht möglich, die Untersuchungen auf kleinere Wellenlängen auszudehnen; denn es gibt keine Substanzen mit so geringer Absorption, daß sie als Trägermaterial bei der Bestimmung der Absorptionsspektren im Bereich solch kurzer Wellenlängen verwendet werden können.

Da wir bei unseren Untersuchungen an DNS auch den Wellenlängenbereich unter 1000 Å erfassen wollten, strebten wir nicht die Bestimmung von Quantenausbeuten an, sondern versuchten, den Inaktivierungsquerschnitt mit der relativen Ionisierungswahrscheinlichkeit in Beziehung zu setzen. Durch dieses Verfahren hofften wir bestimmen zu können, in welchem Wellenlängenbereich ausschließlich Anregungen auftreten, welcher Mindestenergiebetrag zur Ionisation von DNS benötigt wird und von welchen Quantenenergien an die beobachteten Wirkungen zum überwiegenden Maße von Ionisationen herrühren.

## 2. Ergebnisse

Trotz Verwendung geringster Mengen gefrieretrockneter ØX-DNS aus stark verdünnten Lösungen war infolge der starken Absorption des Vakuum-Ultravioletts die Dicke der bestrahlten Schicht größer als die Eindringtiefe der eingestrahlten UV-Quanten. Dies macht sich dadurch bemerkbar, daß mit zunehmender Dosis der Anteil der noch funktionsfähigen DNS-Moleküle zunächst abnimmt, um bei hohen Dosen einem konstanten Wert zuzustreben. Dosis-Effekt-Kurven dieser Art hatten wir schon früher bei unseren Versuchen mit Protonen geringer Reichweite er-

halten (Jung 1964) und wir werden ihnen sowohl in Kap. IV (Inaktivierung von DNS und RNase durch langsame Protonen) als auch in Kap. VI (Inaktivierung von DNS, Bakteriophagen und RNase durch thermische Wasserstoffatome) wieder begegnen (vgl. Abb. 31). Wenn dieser "unzerstörbare" Anteil, der durch zahlreiche Langzeitbestrahlungen mit guter Statistik ermittelt wurde, von den einzelnen Meßpunkten abgezogen wird, dann ergeben sich die auf Abb. 11 dargestellten Inaktivierungskurven. Infolge des Fehlens eines geeigneten Trägermaterials (vgl. Kap. III. 1) konnte das Absorptionsspektrum von DNS bisher nur oberhalb von  $1450 \text{ \AA}$  bestimmt werden (Preiss und Setlow 1956). Da dies mit dem hier verwendeten kurzwelligeren UV-Licht nicht möglich war, sind in Abb. 11 die Meßwerte nicht über der Dosis in  $\text{erg/g DNS}$ , sondern über dem Energiefluß in  $\text{erg/cm}^2$  aufgetragen; doch halten wir dieses Verfahren als eine erste und grobe Näherung durchaus für geeignet, um die Wirksamkeiten der verschiedenen Wellenlängen zu ermitteln, zumal die Streuung der einfallenden Quanten innerhalb des untersuchten Wellenlängenbereiches weitgehend konstant sein sollte. Bemerkenswerterweise zeigen die bei  $1216$  und  $1110 \text{ \AA}$  aufgenommenen Inaktivierungskurven eine Schulter, während bei  $2537$ ,  $1630$  und  $584 \text{ \AA}$  die Inaktivierung nach einer Kinetik erster Ordnung verläuft. Aus der Abbildung wird deutlich, daß die Neigung der Kurven um so steiler wird, je größer die Energie der eingestrahelten Photonen ist. Aus dem exponentiellen Teil der Dosis-Effekt-Kurven wurde die Inaktivierungswahrscheinlichkeit ermittelt und in Abb. 12 über der Quantenenergie des eingestrahelten UV-Lichts aufgetragen.

Neben der Inaktivierung der  $\phi X$ -DNS wurde die Auslösung von Elektronen aus DNS durch UV-Licht verschiedener Wellenlänge untersucht. Dazu wurde eine Probe aus gefriergetrockneter DNS von  $10 \text{ mm}$  Durchmesser und ca.  $1 \text{ mm}$  Dicke mit einem ausgeblendeten Lichtbündel von  $5 \text{ mm}$  Querschnitt bestrahlt. Damit wurde sichergestellt, daß weder die Unterlage noch die Umgebung der Probe von UV-Licht getrof-

fen wurde. Für diese Messungen wurde gereinigte und dialysierte DNS aus Kalbsthymus benutzt, da bei der erforderlichen Materialmenge die Verwendung von  $\emptyset$ X-DNS zu kostspielig gewesen wäre, doch ist auf Grund der nicht zu unterschiedlichen Basenzusammensetzung ( $\emptyset$ X-DNS: Adenin: Thymin: Guanin: Cytosin = 1:1,31:1,02:0,70, Sinsheimer 1959b; Thymus-DNS: A:T:G:C = 1:1:0,72:0,72, Marmur und Doty 1962) zu erwarten, daß zwischen der Ionisierungswahrscheinlichkeit von Thymus-DNS und der von  $\emptyset$ X-DNS kein wesentlicher Unterschied besteht. Die ausgelösten Elektronen wurden mit einer auf + 50 Volt gehaltenen ringförmigen Elektrode gesammelt und mit einem Elektrometer gemessen. Die bei verschiedenen Wellenlängen ermittelten Elektronenausbeuten sind in Abb. 12 zusammen mit den Resultaten der Inaktivierungsversuche dargestellt, wobei die bei 584 Å erhaltenen Meßwerte gleich 1 gesetzt wurden. Bei Quantenenergien oberhalb von 10,2 Elektronvolt (1216 Å) fallen die Kurven für Elektronenemission und Inaktivierung zusammen, während sie im Bereich kleiner Energien einen unterschiedlichen Verlauf aufweisen. Unterhalb von 7,1 eV (entspr. 1750 Å) war innerhalb unserer Meßgenauigkeit keine Elektronenemission mehr festzustellen.

### 3. Diskussion

Wie Abb. 12 zeigt, sind UV-Quanten mit Energien unter 7,1 Elektronvolt nicht mehr in der Lage, DNS-Moleküle zu ionisieren. Diese Quanten sind aber dennoch fähig, die biologische Funktionsfähigkeit der DNS zu zerstören; als wirksame Primärprozesse kommen im betrachteten Energiebereich ausschließlich Anregungen in Frage. Die Ähnlichkeit des Kurvenverlaufes von Inaktivierung und Elektronenemission zwischen 1216 und 584 Å weist auf der anderen Seite darauf hin, daß im Bereich kleinerer Wellenlängen die Inaktivierung zum überwiegenden Maße von Ionisationen herrührt. Im Intervall zwischen dem Überwiegen von Anregungen und dem Überwiegen von Ionisationen, das bisher an DNS noch nicht untersucht worden war, treten Inaktivierungskurven

auf, die bei kleinen Dosen eine Schulter aufweisen. Die Ursachen für das Zustandekommen dieser Schulter sind noch nicht bekannt. Zwar wurden für T2- und T4-Bakteriophagen nach Einwirkung von ultraviolettem Licht des Wellenlängenbereiches zwischen 2250 und 3020 Å ebenfalls Inaktivierungskurven mit einer Schulter gefunden (Winkler, Johns und Kellenberger 1962), doch konnte eine solche Kurvenform beim ØX 174-Phagen und seiner DNS weder bei Bestrahlung mit UV-Licht (Setlow und Boyce 1960 bzw. Sinsheimer et al. 1962) noch bei Einwirkung ionisierender Strahlen (Hotz und Müller 1961 bzw. Ginoza 1963) beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ergaben sich bei intrazellulärer Bestrahlung von ØX-DNS wenige Minuten nach der Infektion Inaktivierungskurven mit einer ausgeprägten Schulter (Sauerbier 1964a; Denhardt und Sinsheimer 1965b). Dieser Befund kann damit erklärt werden, daß zu diesem Zeitpunkt ein Teil der DNS bereits in die doppelsträngige replikative Form (RF) überführt worden ist, wodurch Wirtszellreaktivation möglich wird, die im Gegensatz zu RF weder beim ganzen ØX-Phagen (Sauerbier 1964a) noch bei seiner Einstrang-DNS (Yarus und Sinsheimer 1964) auftritt. Die Tatsache, daß die bei 1110 und 1216 Å erhaltenen Inaktivierungskurven eine Schulter zeigen und es darüber hinaus nicht möglich ist, die Ursachen für ihr Zustandekommen anzugeben, unterstreicht nachdrücklich die Bedeutung, die zukünftigen strahlenbiologischen Experimenten in diesem Übergangsbereich zwischen Anregungen und Ionisationen zukommt.

Unsere Untersuchungen über die Wirkung von Vakuum-UV auf DNS sind in keiner Weise abgeschlossen oder vollständig. Sie stellen eher eine erste Annäherung an das Problem dar, wodurch der Nachweis erbracht wurde, daß die UV-Inaktivierung von DNS im Bereich kurzer Wellenlängen mit Aussicht auf Erfolg untersucht werden kann. Solche Versuche dürften besonders dann interessante Informationen zum Mechanismus der Strahlenwirkung liefern, wenn die Messung

der DNS-Inaktivierung mit dem Studium anderer Phänomene am gleichen Material kombiniert werden. Die Anwendbarkeit der hier beschriebenen Meßmethode bei Experimenten der genannten Art wird in Kap. VII ausführlicher diskutiert.

#### IV. Wirkungen von elastischen Kernstößen

##### 1. Problemstellung

Bereits im Jahre 1950 wies Platzman (1952) nachdrücklich auf die Tatsache hin, daß es neben den beiden dominierenden Primärprozessen Anregung und Ionisation noch weitere Mechanismen der Energieübertragung gibt und es somit unvorsichtig ist zu behaupten, daß chemische und biologische Wirkungen ausschließlich über Anregungen und Ionisationen zustandekommen. Auf Grund theoretischer Überlegungen kam er zu dem Schluß, daß in bestimmten Fällen Kernstöße durchaus eine signifikante Rolle spielen könnten. Allerdings war es früher niemals gelungen, die strahlenbiologische Wirksamkeit dieses Prozesses eindeutig experimentell nachzuweisen. Diese Tatsache ist bemerkenswert; denn die Bedeutung elastischer Kernstöße beispielsweise zur Erzeugung von Strahlendefekten in Festkörpern ist seit vielen Jahren unbestritten. Daß ein entsprechender Nachweis für strahlenbiologische Systeme bis jetzt noch nicht erbracht werden konnte, liegt vor allem daran, daß diese Systeme - im Gegensatz zu den Festkörpern - sehr empfindlich gegenüber Ionisationen sind. Außerdem übersteigt bei den im allgemeinen verwendeten Strahlenarten die Zahl der von einem Teilchen ausgelösten Ionisationen die Zahl der Kernstöße um mehrere Größenordnungen. Nach Platzman (1952) wird von einem 10 MeV-Alpha-Teilchen in Luft eine Energie von etwa 8 keV in elastischen Stößen übertragen, davon etwa 1 keV ganz am Ende seiner Reichweite. Bei etwa zwei Dritteln der insgesamt in einem leichten Medium ausgelösten Kernstöße wird genügend Energie übertragen, um ein Atom aus seinem Molekülverband herauszuschlagen. Damit läßt sich die Gesamtzahl der von einem 10 MeV-Alpha-Teilchen

aus ihren Molekülen entfernten Atome abschätzen: sie beträgt - einschließlich der in sekundären Stößen ausgelösten Atome - etwa 100. Da ein 10 MeV-Alpha-Teilchen etwa  $10^6$  Atome anregt oder ionisiert und diese im allgemeinen chemisch wirksam sind, so ist bei gewöhnlichen "ionisierenden" Strahlen die Wirkung der Kernstöße verschwindend klein gegenüber der Ionisationswirkung, so daß eine Trennung der beiden Effekte nicht möglich ist.

Neben Platzman, der die wesentlichen theoretischen Aspekte für die mögliche Bedeutung der Kernstöße in Strahlenchemie und Strahlenbiologie erarbeitet hat (Platzman 1952, 1958, Franck und Platzman 1954, Hart und Platzman 1961), vertraten auch Fano (1954), Zimmer (1956a) und Riehl (1956) die Ansicht, daß Kernstöße zur Auslösung biologischer Veränderungen sich als sehr wirkungsvoll erweisen könnten. Daß dieser Primärprozeß für die Dosimetrie epithermischer Neutronen und darüber hinaus für die Festlegung der Toleranzdosen für epithermische Neutronen von außerordentlicher Bedeutung ist, wurde von Zimmer (1956a) ausführlich diskutiert. Alle Autoren wiesen auf die Notwendigkeit hin, Experimente zur Aufklärung der strahlenbiologischen Wirksamkeit der Kernstöße durchzuführen.

Trotz dieser zahlreichen Hinweise wurde das Problem der elastischen Kernstöße bisher nur von wenigen Experimentatoren aufgegriffen. Ehrenberg und Mitarb. (Ahnström, Ehrenberg und Zimmer 1960; Ahnström und Ehrenberg 1961) versuchten, die Wirkung elastischer Kernstöße auf Plexiglas nachzuweisen, um diese Substanz zur Dosismessung gemischter Reaktorstrahlung, bestehend aus schnellen und epithermischen Neutronen und Gammastrahlung, zu verwenden. Bei diesen Experimenten wurde Plexiglas mit Deuteronen zwischen 5 und 100 keV Energie bestrahlt und die Änderung der optischen Absorption bei  $295 \text{ m}\mu$  bestimmt. Die Extinktionsänderung pro Dosiseneinheit erwies sich als weitgehend unabhängig von der Energie der eingestrahelten Deuteronen. Im Gegensatz dazu erbrachten unsere eigenen Unter-

suchungen an dünnen Folien aus Polyterephthalsäureester (Hostaphan) das Resultat, daß die Wirkungen von langsamen Protonen mit Energien zwischen 2 und 12 keV aus einem breiten Absorptionsmaximum bei 250 m $\mu$  und einem scharfen Peak bei 308 m $\mu$  bestehen, während 2 MeV-Protonen und 3,4 MeV- $\alpha$ -Teilchen nur das Absorptionsmaximum bei 308 m $\mu$  hervorrufen (Jung 1966b). Dies war ein erster Hinweis darauf, daß die chemischen Wirkungen der Kernstöße sich von den Wirkungen der Ionisationen unterscheiden.

Um die biologische Wirksamkeit der elastischen Kernstöße nachzuweisen, untersuchte Kühn (1960a) den Verlauf des Wirkungsquerschnitts für die Inaktivierung von Milchsäure-Dehydrogenase als Funktion der Protonenenergie. Bei diesen Experimenten war die Dicke der bestrahlten Enzymschicht jeweils um einen Faktor von 2 größer als die Reichweite der eingestrahnten Protonen, so daß die ermittelten Wirkungsquerschnitte stets als Integralwerte für das Energiespektrum zwischen Null und der Einfallsenergie der Protonen anzusehen sind. Für Protonen des untersuchten Energiebereichs zwischen 18,5 und 79 keV konnte keine Energieabhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts festgestellt werden. Der Mittelwert der nach Kühn (1960b) korrigierten Inaktivierungsquerschnitte beträgt für das untersuchte Energieintervall  $7 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2$ .

Der Grund dafür, daß das Problem der elastischen Kernstöße bisher noch nicht ausführlicher untersucht worden ist, dürfte im wesentlichen in experimentellen Schwierigkeiten zu suchen sein. Wie schon erwähnt, sind schnelle geladene Teilchen für solche Versuche nicht geeignet, da bei ihnen angeregte und ionisierte Moleküle viel zahlreicher sind als Kernstoßprozesse. Auch die Verwendung von Neutronen dürfte große Schwierigkeiten mit sich bringen, obwohl diese ihre gesamte kinetische Energie über elastische Stöße mit Atomkernen an das bestrahlte Medium abgeben. Allerdings werden die biologischen Wirkungen der Kernstöße bei Verwendung von schnellen Neutronen durch

die Ionisationswirkung der von diesen Neutronen ausgelösten Rückstoßprotonen überdeckt und damit dem direkten Nachweis entzogen; und strahlenbiologische Experimente mit epithermischen Neutronen, die diese Schwierigkeit zum Teil umgehen könnten, sind bis jetzt noch nicht bekannt geworden. Außerdem treten beim Bestrahlen mit langsamen Neutronen Kernreaktionen auf, so daß man in solchen Experimenten stets die Summe der Wirkungen der von den Neutronen erzeugten Rückstoßprotonen und der bei Kernreaktionen entstehenden Strahlungen erfaßt. Prinzipiell könnte man für solche Experimente auch Systeme verwenden, in denen Kernumwandlungen stattfinden. Bei der Emission eines Alpha-Teilchens beträgt die kinetische Energie des rückgestoßenen Kerns größenordnungsmäßig 100 keV und bei Beta-Zerfällen 10 bis 100 eV. Die Rückstoßkerne verlieren ihre Energie entlang einer sehr kurzen Strecke, und zwar wegen ihrer geringen Geschwindigkeit fast ausschließlich über elastische Stöße. Allerdings besteht auch hier die Schwierigkeit, die Wirkungen der elastischen Stöße der rückgestoßenen Kerne von den Wirkungen der Ionisationen der emittierten Teilchen zu trennen.

Damit verbleibt als beste Möglichkeit, um die Wirkung der Kernstöße unabhängig von anderen Mechanismen der Energieübertragung zu untersuchen, die Verwendung niederenergetischer geladener Teilchen. Abb. 13 zeigt die Wirkungsquerschnitte für den Energieverlust durch Elektronenwechselwirkung ( $\sigma_e$ ) bzw. durch elastische Kernstöße ( $\sigma_n$ ), die von Neufeld und Snyder (1961) für die Abbremsung von Protonen in Gewebe berechnet wurden. Die Ionisierungsdichte  $\sigma_e$  nimmt mit abnehmender Protonenenergie zu, erreicht bei 60 - 100 keV ein Maximum (das sog. Bragg-Maximum) und verringert sich nach kleineren Protonenenergien hin. Da im gleichen Energieintervall der Wirkungsquerschnitt für Kernstöße  $\sigma_n$  gleichzeitig ansteigt, gibt es eine Grenze, unterhalb der über elastische Kernstöße mehr Energie übertragen wird als über Anregungen und Ionisa-

tionen. Nach Snyder und Neufeld (1957) liegt dieser Wert bei einer Protonenenergie von 1,5 keV. Dienes und Vineyard (1957) schätzten die Energiegrenze zwischen Kernstößen und Ionisationen nach einer von Seitz (1949) und Kinchin und Pease (1955) angegebenen Formel ab. Sie gaben als Faustformel an, daß Ionisationen immer dann unwichtig werden, wenn die Energie des bewegten Teilchens (in keV) geringer als sein Atomgewicht wird. Wie getrennte Berechnungen für Metalle und Isolatoren zeigten, ist dieser Wert weitgehend unabhängig von der Art des bestrahlten Materials. Nach diesen beiden Abschätzungen (Snyder und Neufeld 1957; Dienes und Vineyard 1957) ist somit zu erwarten, daß unterhalb von 1 - 1,5 keV der Beitrag der Kernstöße zur Energieabgabe von Protonen größer ist als der Beitrag von Anregungen und Ionisationen.

Die Experimente laufen also darauf hinaus, die differentielle biologische Wirksamkeit langsamer Protonen in Abhängigkeit von ihrer Energie zu messen. Zu diesem Zweck muß das biologische Indikatorsystem in seinen Abmessungen klein sein gegen die Reichweite der Protonen. Da die Eindringtiefe eines Protons von 1 keV in biologischem Material größenordnungsmäßig etwa  $100 \text{ \AA}$  beträgt (Person 1956; Person, Hutchinson und Marvin 1963), ist mit diesem Wert die Dicke der für diese Experimente in Frage kommenden Schichten festgelegt. Wenn nur Ionisationen für die Inaktivierung des biologischen Materials von Bedeutung sind, dann ist zu erwarten, daß der experimentell bestimmte Inaktivierungsquerschnitt einen ähnlichen Verlauf zeigt wie die Ionisierungswahrscheinlichkeit  $\sigma_e$  (vgl. Abb. 13). Wenn dagegen neben den Ionisationen auch die Kernstöße einen Beitrag zur beobachteten Wirkung leisten, dann ist unterhalb von 60 keV mit abnehmender Protonenenergie zunächst eine Abnahme des Inaktivierungsquerschnitts zu erwarten; bei kleinen Energien, wenn sich der Einfluß der Kernstöße bemerkbar macht, ist mit einem Ansteigen der Inaktivierungswahrscheinlichkeit zu rechnen.

## 2. Ergebnisse

Experimente mit DNS: Bei der Bestrahlung von  $\phi$ X-DNS mit niederenergetischen Protonen nimmt die Überlebensrate mit zunehmender Dosis ab und strebt im Bereich hoher Dosen einem Sättigungswert zu (Kurvenform wie auf Abb. 31), ein Befund, der auch bei den Experimenten mit Vakuum-Ultraviolett (vgl. Kap. III. 2) und mit thermischen H-Atomen (vgl. Kap. VI. 2) erhalten wurde. Die Größe des Sättigungswertes, die von der Art der Probenherstellung abhängt, lag im Energiebereich unterhalb von 10 keV zwischen 20 und 40 %. Im gleichen Energieintervall konnte keine Abhängigkeit des konstanten Anteils von der Protonenenergie festgestellt werden. 60 - 80 Prozent der DNS liegen folglich in einer Schicht vor, deren Dicke klein ist gegen die Reichweite der eingestrahelten Protonen, während der verbleibende Rest offensichtlich in winzige Salzkriställchen eingebettet ist, welche die langsamen Protonen nicht durchdringen können. Die Salzspuren lassen sich zwar durch Chromatographie über Sephadex von der DNS abtrennen, doch verliert dabei die DNS aus unbekanntem Gründen ihre Infektiösität, so daß dieses Verfahren nicht angewandt werden konnte. Die Anwesenheit von minimalen Salzmen gen ist jedoch nicht als schwerwiegende Einschränkung dieser Untersuchungsmethode anzusehen; denn subtrahiert man den konstanten Anteil von den einzelnen Meßpunkten, dann liegen die daraus resultierenden Werte bei halblogarithmischer Auftragung auf einer Geraden. Wie Abb. 14 zeigt, weisen die bei Protonenenergien von 0,8, 1,2 und 35 keV ermittelten Dosis-Effekt-Kurven nur geringfügige Unterschiede in ihrer Neigung auf; d.h. die Wirksamkeit der langsamen Protonen zur Inaktivierung von DNS hängt nur schwach von ihrer kinetischen Energie ab (vgl. Kürzinger und Jung 1968b).

Dieser Befund geht klarer aus Abb. 15 hervor, auf der die experimentell ermittelten Inaktivierungsquerschnitte über

der Energie der eingestrahelten Protonen aufgetragen sind. Der Wirkungsquerschnitt ist bei höheren Energien praktisch konstant, erreicht zwischen 1 und 1,5 keV ein flaches Minimum und steigt unterhalb dieser Energie wieder geringfügig an. Der Kurvenverlauf auf Abb. 15 weist darauf hin, daß unabhängig von seiner Energie beinahe jedes Teilchen, das ein DNS-Molekül durchquert, in diesem mindestens ein inaktivierendes Ereignis auslöst (vgl. Diskussion, Kap. IV. 3). Deshalb haben wir diese Experimente mit dem Enzym Ribonuclease weitergeführt, das ein relativ kleines Molekulargewicht von MG = 13680 (Hirs, Moore und Stein 1960) besitzt und für das wir eine empfindliche Nachweismethode ausgearbeitet haben (Jung 1964), die Substanzmengen von einigen  $10^{-8}$  g sicher zu bestimmen gestattet.

Experimente mit Ribonuclease: Werden 0,5 µg Ribonuclease mit Protonen von 0,8 keV Energie bestrahlt, dann nimmt die verbleibende Enzymaktivität mit zunehmender Dosis ab und strebt bei hohen Dosen einem Sättigungswert zu (Abb. 16, untere Kurve), da offenbar an einigen Stellen die Dicke der bestrahlten RNase-Schicht die Reichweite der eingestrahelten Protonen übersteigt. Nach Subtrahieren dieses konstanten Anteils erfolgt die Abnahme der RNase-Aktivität nach einer Kinetik erster Ordnung (Abb. 16, obere Kurve). Ganz entsprechende Kurvenformen wurden bereits bei der Einwirkung von kurzwelligem UV-Licht (vgl. Kap. III. 2) und von langsamen Protonen (vgl. voranstehenden Abschnitt) auf DNS erhalten. Die aus der Neigung der Kurve bestimmte 37 %-Dosis ( $D_{37}$ ) beträgt  $(8,2 \pm 1,7) \cdot 10^{12}$  p/cm<sup>2</sup>. Da die Protonen in der Enzymschicht völlig abgebremst werden, ist dieser  $D_{37}$ -Wert dem Energieintervall zwischen 0 und 0,8 keV zuzuordnen. Zu entsprechenden Resultaten führten die Bestrahlungen mit 1 keV-Protonen bei Schichtdicken von 1,3 µg/cm<sup>2</sup> und mit 1,2 keV-Protonen bei Schichtdicken von 5 µg/cm<sup>2</sup>. In beiden Fällen übersteigt die Dicke der Enzymschicht die Reichweite der Protonen. Die bei diesen Experimenten nach Ab-

zug eines konstanten "unzerstörbaren" Anteils ermittelten 37 %-Werte von  $(7,8 \pm 1,3) \cdot 10^{12}$  p/cm<sup>2</sup> bzw.  $(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^{13}$  p/cm<sup>2</sup> sind somit ebenfalls als integrale Werte für das Energieintervall zwischen 0 und 1 keV, bzw. zwischen 0 und 1,2 keV anzusehen. Sie sind deshalb einer "mittleren Protonenenergie" von  $(0,5 \pm 0,5)$  keV bzw.  $(0,6 \pm 0,6)$  keV zugeordnet worden (vgl. Tab. 1, S. 48 und Abb. 19).

Beim Bestrahlen von jeweils 1 µg RNase mit 1,2 keV-Protonen bleibt bei hohen Dosen kein konstanter Anteil übrig (Abb. 17). Dies zeigt, daß 1,2 keV-Protonen eine RNase-Schicht von 1,3 µg/cm<sup>2</sup> ganz durchdringen können. Der Wert für die  $D_{37}$  von  $(1,9 \pm 0,15) \cdot 10^{13}$  p/cm<sup>2</sup> stimmt innerhalb unserer Versuchsgenauigkeit mit der bei großer Schichtdicke erhaltenen 37 %-Dosis überein. Bei Verwendung von jeweils 0,5 µg RNase pro Goldplättchen ergibt sich dagegen eine  $D_{37}$  von  $(3,4 \pm 0,3) \cdot 10^{13}$  p/cm<sup>2</sup> (Abb. 17), was deutlich zeigt, daß der  $D_{37}$ -Wert stark von der Dicke der bestrahlten RNase-Schicht abhängt, die ihrerseits das Energiespektrum der die Enzymschicht durchquerenden Protonen bestimmt. Man kann deshalb darauf schließen, daß in dem betrachteten Energieintervall die  $D_{37}$  außerordentlich stark energieabhängig ist.

In entsprechender Weise wurden mit Protonen verschiedener Energie dünne Schichten von Ribonuclease bestrahlt und aus den Inaktivierungskurven die 37 %-Dosen auf graphischem Wege ermittelt. Auf Abb. 18 sind Dosis-Effekt-Kurven wiedergegeben, die mit 0,5 µg RNase bei Protonenenergien von 1,4 und 50 keV aufgenommen wurden. Aus der Darstellung wird deutlich, daß auch bei höheren Protonenenergien die  $D_{37}$ -Werte stark von der Energie der eingestrahlten Protonen abhängen.

In Tab. 1 sind die 37 %-Dosen für die Inaktivierung von Ribonuclease durch Protonen verschiedener Energie zusammengestellt. Außerdem ist die für den betreffenden Ver-

Tabelle 1

37 %-Dosen ( $D_{37}$ ) für die Inaktivierung von Ribonuclease durch Protonen verschiedener Energie

Energie der einfallenden Protonen [keV]	Ribonuclease-menge [ $\mu\text{g}$ ]	Energieverlust in der RNase-Schicht [keV]	$D_{37}$ [ $10^{13}$ p/cm <sup>2</sup> ]
0,8 <sup>a</sup>	0,5	0,8	0,82 ± 0,17
1,0	0,5	1,0	0,78 ± 0,13
1,0	0,7 <sup>c</sup>	1,0	1,02 ± 0,2
1,2	4,0	1,2	1,8 ± 0,3
1,2	1,0	1,0	1,9 ± 0,15
1,2	0,5	0,5	3,4 ± 0,3
1,4	0,7 <sup>c</sup>	0,7	4,15 ± 0,4
1,4	0,5	0,5	4,25 ± 0,4
2,2	1,0	1,0	3,55 ± 0,35
2,2	0,5	0,5	3,45 ± 0,35
2,7	0,7 <sup>c</sup>	0,7	2,7 ± 0,35
3,0	0,5	0,5	2,4 ± 0,2
5,0	1,0	1,0	2,03 ± 0,16
6,4	0,5	0,5	1,55 ± 0,16
10,2 <sup>b</sup>	1,0	1,0	1,15 ± 0,10
11,8	0,5 <sup>c</sup>	0,5	1,0 ± 0,07
15,2	0,5	0,5	0,79 ± 0,06
22	0,5	0,5	0,74 ± 0,05
50	0,5	0,5	0,65 ± 0,04
60	0,5	0,5	0,60 ± 0,04

<sup>a</sup> Mittlere Protonenenergie (0,4 ± 0,4) keV

<sup>b</sup> Mittlere Protonenenergie (9,7 ± 0,5) keV

<sup>c</sup> Verwendung von chromatographisch gereinigter RNase

such verwendete Ribonucleasemenge und der Energieverlust der Protonen in der Enzymschicht angegeben. Der letztere Wert, der nur eine grobe Abschätzung darstellt, wurde durch Differenzierung der von Person (Person 1956;; Person, Hutchinson und Marvin 1963) ermittelten Energie-Reichweite-Kurve für langsame Protonen in Protein ermittelt und aus Berechnungen von Neufeld und Snyder (1961). Nach Persons Ergebnissen nimmt zwischen 10 und 60 keV  $dE/dx$  mit zunehmender Protonenenergie ab, während nach Neufeld und Snyder  $dE/dx$  im gleichen Intervall ansteigt. Deshalb wurde eine konstante Energieabgabe von  $1 \text{ keV}/100 \text{ \AA}$  angenommen, um den Energieverlust der einfallenden Protonen in der Enzymschicht abzuschätzen. Tabelle 1 zeigt, daß bei höheren Protonenenergien die 37 %-Dosis nur wenig energieabhängig ist. Nach kleineren Energien hin nimmt sie stetig zu und erreicht bei 1,4 keV ein Maximum. Besonders zu erwähnen ist die Tatsache, daß unterhalb von 1,4 keV die  $D_{37}$  steil abfällt, was nichts anderes heißt, als daß die Wirksamkeit der Protonen zur Inaktivierung von Ribonuclease in diesem Energieintervall mit abnehmender Protonenenergie stark zunimmt.

Das ausgeprägte Maximum bei Energien um 1 - 1,5 keV und den steilen Abfall bei niedrigeren Energien zeigt Abb. 19, auf welcher der Verlauf der 37 %-Dosen für die Inaktivierung von Ribonuclease in Abhängigkeit von der "mittleren Protonenenergie" für das Energieintervall zwischen 0 und 12 keV dargestellt ist. Die mittlere Protonenenergie bedeutet den Mittelwert zwischen der Energie der einfallenden Protonen und der Energie, mit der die Protonen die RNase-Schicht wieder verlassen. Die in Abb. 19 angegebenen horizontalen Fehlerbalken bezeichnen somit den Energieverlust der Protonen beim Durchqueren der Enzymschicht, die vertikalen den mittleren Fehler bei der Bestimmung der  $D_{37}$ . Aus der Abbildung geht hervor, daß käufliche Ribonuclease und chromatographisch gereinigte RNase A gegenüber langsamen Protonen gleiche Strahlenempfindlichkeit besitzen.

Abb. 20 zeigt den Verlauf des Wirkungsquerschnitts für die Inaktivierung von Ribonuclease durch Protonen verschiedener Energie. Zur deutlicheren Darstellung des niederenergetischen Bereichs ist die Protonenenergie in logarithmischer Skala aufgeführt. Die angegebenen Fehler bezeichnen den Energieverlust der Protonen in der RNase-Schicht bzw. den mittleren Fehler bei der Bestimmung der Inaktivierungsquerschnitte, die durch Bildung des Inversen aus den 37 %-Dosen erhalten wurden. Unterhalb von 0,9 keV sind die Energieverluste der Protonen in der RNase-Schicht vergleichbar mit der Bestrahlungsenergie; es ist somit schwierig, in diesem Bereich die experimentell ermittelten Inaktivierungsquerschnitte ihren entsprechenden Protonenenergien zuzuordnen (Abb. 20, unterbrochener Teil der Kurve). Dennoch geht aus der Abbildung deutlich hervor, daß unterhalb von 1,2 keV die Inaktivierungswahrscheinlichkeit mit abnehmender Protonenenergie stark ansteigt. Auch nach höheren Protonenenergien hin nimmt der Inaktivierungsquerschnitt zu; bei 50 bis 60 keV scheint er einem Sättigungswert zuzustreben.

### 3. Diskussion

Der Verlauf des Inaktivierungsquerschnitts von Ribonuclease auf Abb. 20 läßt sich im Bereich höherer Protonenenergien ohne weiteres durch die Tatsache erklären, daß die Ionisierungswahrscheinlichkeit der Protonen unterhalb von 60 keV mit abnehmender Protonenenergie geringer wird und deshalb die Inaktivierungswahrscheinlichkeit in entsprechender Weise abnimmt. Das starke Ansteigen des Wirkungsquerschnitts bei Energien unterhalb von 1,2 keV beweist, daß in diesem Energieintervall ein Mechanismus der Energieübertragung einsetzt, der mit abnehmender Protonenenergie stark anwächst. Als Inaktivierungsmechanismus kommt in diesem Energiebereich praktisch nur die Schädigung der RNase-Moleküle durch elastische Stöße der einfallenden langsamen Protonen mit den in der Ribonuclease enthaltenen Atomen in Frage.

Einen quantitativen Vergleich ermöglichen die in Abb. 13 aufgeführten Berechnungen von Neufeld und Snyder (1961) über die Energieverluste von Protonen in Gewebe durch Elektronen-Wechselwirkung ( $\sigma_e$ ) und durch elastische Kernstöße ( $\sigma_n$ ). Der Verlauf beider Wirkungsquerschnitte ist in Abb. 21 als Funktion der Protonenenergie angegeben (durchgezogene Kurven  $\sigma_e$  und  $\sigma_n$ , rechte Skala). Außerdem sind die experimentell ermittelten Inaktivierungsquerschnitte für Ribonuclease (Kreuze, unterbrochene Kurve S, linke Skala) in die Abbildung eingetragen. Um die Übersichtlichkeit der Darstellung zu erhöhen, sind keine Fehlergrenzen angegeben; diese sind jedoch aus Abb. 20 ersichtlich. Die experimentell bestimmte Kurve S kann als Summe der Wirkungen von Ionisationen und Kernstößen aufgefaßt werden:  $S = S_e + S_n$ . Bei einer Protonenenergie von 60 keV ist der Wirkungsquerschnitt für Kernstöße  $\sigma_n$  um einen Faktor von 500 kleiner als der Energieverlust durch Wechselwirkung mit den Atomelektronen  $\sigma_e$ . Man kann folglich davon ausgehen, daß bei dieser Protonenenergie der Beitrag der Kernstöße gegenüber den wesentlich häufigeren Ionisationen zu vernachlässigen ist (60 keV:  $S_n = 0$ ,  $S = S_e$ ). Deshalb sind auf Abb. 21 die beiden verschiedenen Skalen für den Inaktivierungsquerschnitt S und den Abbremsquerschnitt  $\sigma$  so gegeneinander angeordnet, daß bei 60 keV, wo praktisch ausschließlich Elektronenwechselwirkung vorliegt, die Kurven S und  $\sigma_e$  zusammenfallen. Wenn im gesamten untersuchten Energiebereich keine Inaktivierung der RNase durch Kernstöße auftritt, dann sollte man erwarten, daß nach kleinen Protonenenergien hin die Inaktivierungswahrscheinlichkeit S in gleichem Maße abnimmt wie die Ionisierungswahrscheinlichkeit  $\sigma_e$  (bei allen Energien:  $S_n = 0$ ; folglich  $S = S_e = \sigma_e$ ). Bei dieser Argumentation ist allerdings vorausgesetzt, daß in einem RNase-Molekül beim Durchgang eines Protons nur in relativ seltenen Fällen mehrere inaktivierende Ereignisse ausgelöst werden. Diese Bedingung ist für Ribonuclease erfüllt, aber nicht für  $\phi$ X-DNS, wie im folgenden Abschnitt bei der Dis-

kussion der mit DNS erhaltenen Ergebnisse noch deutlich werden wird. Wie aus Abb. 21 ersichtlich, fällt  $S$  nicht mit  $\sigma_e = S_e$  zusammen,  $S_n$  ist also von Null verschieden. Um die Wirkung der Kernstöße von den Wirkungen der Ionisationen zu trennen, ist in Abb. 21 die Differenz zwischen den experimentellen Werten und der Kurve  $S_e$  aufgetragen (Punkte, Kurve  $S_n$ ). Diese Kurve  $S_n$ , welche die Inaktivierung von Ribonuclease durch elastische Kernstöße als Funktion der Protonenenergie beschreibt, liegt um einen Faktor von etwa 4 über der Kurve  $\sigma_n$ . Das zeigt, daß die Inaktivierung von RNase durch Kernstöße mit größerer Energieausbeute erfolgt als durch Ionisationen. Ob dieser Faktor von 4 dadurch zu erklären ist, daß der mittlere Energieaufwand für eine Inaktivierung durch Kernstoß kleiner ist als der für eine Primärionisation, oder ob ein Kernstoß ein RNase-Molekül mit größerer Wahrscheinlichkeit inaktiviert, läßt sich aus den vorliegenden Experimenten nicht ermitteln.

Eine entsprechende Analyse unserer an DNS erhaltenen Resultate ist nicht möglich, da offensichtlich die ihr zugrundeliegende Voraussetzung nicht erfüllt ist, daß beim Durchgang eines Protons durch ein Molekül im Mittel weniger als ein inaktivierendes Ereignis ausgelöst wird. Dies ist auch der Grund dafür, daß die Inaktivierungsquerschnitte von DNS und RNase in unterschiedlicher Weise von der Protonenenergie abhängen (vgl. Abb. 15 und 20). Wir werden deshalb den nach der Treffbereichstheorie zu erwartenden Kurvenverlauf berechnen und ihn mit den experimentell erhaltenen Werten vergleichen: Nach Fano (1938) und Zimmer (1943a, b) läßt sich der Verlauf des Inaktivierungsquerschnitts  $S$  in Abhängigkeit von der Ionisierungsdichte der einfallenden Partikelstrahlung durch die Beziehung

$$S = S_0 (1 - e^{-id}) \quad (2)$$

beschreiben. Dabei bedeutet  $S_0$  den geometrischen Querschnitt und  $d$  die mittlere Dicke des bestrahlten Moleküls.

In der bisher benutzten Form von Gl.(2) bedeutet  $i$  die mittlere Zahl der Primärionisationen pro Zentimeter. Da wir aber nicht nur Ionisationen, sondern auch elastische Kernstöße bezüglich ihrer biologischen Wirksamkeit diskutieren wollen, bezeichnet  $i$  hier die mittlere Anzahl der inaktivierenden Ereignisse, die von einem Proton pro Zentimeter Wegstrecke ausgelöst werden. Gemäß Gl. (2) wächst der Inaktivierungsquerschnitt  $S$  mit zunehmender Ionisierungsdichte der verwendeten Teilchen an und nähert sich bei hohen Werten von  $i$  an den geometrischen Querschnitt  $S_0$  an. Da nicht genau bekannt ist, welche Form die DNS-Moleküle nach der Gefriertrocknung aufweisen, wird  $S_0$  aus Abb. 15 entnommen: Oberhalb von 5 keV ist der Inaktivierungsquerschnitt nur noch wenig energieabhängig und strebt einem Sättigungswert von  $S_0 = 6,2 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$  zu. Aus diesem Wert, dem Molekulargewicht von  $1,7 \cdot 10^6$  (Sinsheimer 1959b) und der Dichte von  $1,7 \text{ g/cm}^3$  errechnet sich für das DNS-Molekül ein Volumen von  $1,67 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^3$  und daraus eine mittlere Dicke von 27 Å.

Um  $i$  als Funktion der Protonenenergie zu berechnen, können wieder die von Neufeld und Snyder (1961) angegebenen Wirkungsquerschnitte  $\sigma_e$  und  $\sigma_n$  (vgl. Abb. 13) herangezogen werden. Um aus diesen Werten, die in  $\text{MeV} \cdot \text{cm}^2 / \text{Atom}$  angegeben sind, die Energieabgabe pro Wegstrecke zu bestimmen, benötigt man die Zahl der Atome pro Kubikzentimeter. Dieser Wert beträgt  $1,05 \cdot 10^{23} \text{ Atome/cm}^3$ ; er wurde mit Hilfe der von Sinsheimer (1959b) mitgeteilten molaren Häufigkeiten der verschiedenen DNS-Basen (Adenin: Thymin: Guanin: Cytosin = 1,0 : 1,31 : 1,02 : 0,79) für eine Dichte von  $1,7 \text{ g/cm}^3$  errechnet. Aus der Energieabgabe pro Längeneinheit kann unter Verwendung eines mittleren Energieaufwands von 60 eV pro Primärereignis der Wert von  $i$  als Funktion der Protonenenergie angegeben werden. Benutzt man nur den Wirkungsquerschnitt für Elektronenwechselwirkung  $\sigma_e$ , so erhält man daraus den zu erwartenden Verlauf des Inaktivierungsquerschnitts für den Fall, daß ausschließlich Ionisationen zur Inaktivierung der DNS be-

fähigt sind (Abb. 22, Kurve I). Wenn Ionisationen und Kernstöße mit gleicher Energieausbeute an der insgesamt beobachteten Wirkung beteiligt sind, sollte der Inaktivierungsquerschnitt wie Kurve II (Abb. 22) von der Protonenenergie abhängen; Kurve III wurde unter der Voraussetzung errechnet, daß Kernstöße eine viermal höhere Wirksamkeit zur Inaktivierung von DNS besitzen als Ionisationen. Aus dem Vergleich der experimentell ermittelten Inaktivierungsquerschnitte mit den nach Gleichung (2) berechneten Kurven geht eindeutig hervor, daß elastische Kernstöße zur Inaktivierung von DNS fähig sind; andernfalls müßte die Inaktivierungswahrscheinlichkeit den gleichen Verlauf wie Kurve I aufweisen und mit abnehmender Protonenenergie gegen Null gehen. Allerdings kann über die Energieausbeute der Kernstöße keine Aussage gemacht werden. Abb. 22 weist zwar darauf hin, daß Kernstöße zur Inaktivierung von DNS evtl. wirksamer sind als Ionisationen; doch ist dieser Schluß nicht zwingend, da der Verlauf der berechneten Kurven stark davon abhängt, welche Molekülform der Rechnung zugrundegelegt wird.

#### 4. Modifizierende Parameter

Nachdem mit den voranstehend beschriebenen Experimenten der Nachweis geführt worden war, daß elastische Kernstöße in der Lage sind, die biologische Funktionsfähigkeit von  $\phi$ X-DNS sowie die enzymatische Aktivität von Ribonuclease mit großer Wirksamkeit zu zerstören, erschien es uns interessant und aufschlußreich, mögliche Unterschiede in der Wirkungsweise von elastischen Kernstößen und von Ionisationen aufzuzeigen. Beispielsweise könnten sich Ionisationen und Kernstöße dadurch unterscheiden, daß die Wirkungen beider Primärprozesse doch verschiedene Parameter beeinflußt werden. Mit ionisierenden Strahlen wurde bisher eine ganze Reihe solcher Parameter ausführlich untersucht (vgl. Abb. 2), wobei Schutzeffekt, Temperatureffekt und Sauerstoffeffekt besonderes Interesse fanden.

Diese drei die Strahlenwirkung modifizierenden Parameter wurden in einer großen Zahl verschiedenartiger Systeme beobachtet, und zwar sowohl bei strahlenchemischen Experimenten als auch bei Bestrahlung von Makromolekülen, Viren und Zellen. Es war daher die Frage zu klären, ob diese Modifizierung von Strahlenschäden nur bei ionisierenden Strahlen möglich ist, oder ob sie auch dann auftritt, wenn die Strahlungsenergie über elastische Kernstöße übertragen wird.

Unsere Experimente hatten zum Ziel, den Einfluß von Schutzstoffen und tiefen Temperaturen auf die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease mit ionisierenden Strahlen und mit elastischen Kernstößen zu untersuchen (vgl. Jung 1966a, 1967). Es konnte nicht geprüft werden, ob bei Strahlenschädigung durch Kernstöße ein Sauerstoffeffekt auftritt; denn die kurze Reichweite der verwendeten niederenergetischen Protonen erforderte, die Bestrahlungen im Hochvakuum auszuführen. Als Schutzstoff wählten wir Cystamin, da verhältnismäßig geringe Mengen dieser Substanz bereits meßbare Schutzwirkungen hervorrufen. Dies ist beim Arbeiten mit langsamen Protonen, deren geringe Eindringtiefe von etwa  $100 \text{ \AA}$  die Versuche auf Bestrahlung sehr dünner Schichten und damit kleinster Materialmengen beschränkt, von ausschlaggebender Bedeutung. Da diese Versuche darauf hinausliefen, die Wirkungen von schnellen Protonen, die Ionisationen auslösen können, mit den Wirkungen langsamer Protonen zu vergleichen, die ihre Energie zum überwiegenden Teil in elastischen Kernstößen abgeben, wurden die Bestrahlungen bei Energien von 2 MeV bzw. 1,4 keV ausgeführt.

Für die Experimente zum Schutzeffekt wurden Cystamin und chromatographisch gereinigte Ribonuclease in Wasser gelöst und zusammen auf Goldplättchen gefrieretrocknet. Abb. 23 zeigt die Abhängigkeit des Schutzfaktors  $p$  von der Menge des zugesetzten Cystamins bei Einwirkung von 2 MeV-Protonen. Bis zu einem Gewichtsverhältnis Cystamin/RNase von etwa 0,05 ist keine Schutzwirkung zu beobachten.

Mit steigender Konzentration nimmt die Schutzwirkung zu, um bei einem Gewichtsverhältnis von 0,7 bis 0,8 maximalen Schutz zu erreichen. Bei weiterer Erhöhung der Cystaminzugabe kann kein über  $p = 1,8$  hinausgehender Schutz erzielt werden. Auf Abb. 24 sind Dosis-Wirkungskurven dargestellt, die mit  $0,7 \mu\text{g}$  RNase bzw. mit einer molekularen Mischung aus  $0,4 \mu\text{g}$  RNase und  $0,3 \mu\text{g}$  Cystamin erhalten wurden. Bestrahlung mit "ionisierenden" Protonen von 2 MeV Energie erbrachten 37 %-Dosen von  $2,1 \cdot 10^{13} \text{ p/cm}^2$  bzw.  $3,8 \cdot 10^{13} \text{ p/cm}^2$ , was einem Schutzfaktor von  $p = 1,8$  entspricht (Abb. 24). Bestrahlt man jedoch gleichwertige Proben unter identischen Bedingungen mit langsamen Protonen von 1,4 keV Energie, dann liegen die in beiden Versuchsreihen mit und ohne Cystamin erhaltenen Meßpunkte auf einer gemeinsamen Geraden, aus deren Neigung man eine  $D_{37}$  von  $(4,1 \pm 0,4) \cdot 10^{13} \text{ p/cm}^2$  entnimmt. Das zeigt, daß bei der Inaktivierung von Ribonuclease durch elastische Kernstöße die Größe des Strahlenschadens nicht durch Cystamin modifiziert werden kann.

Der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease geht aus der folgenden Abbildung 25 hervor. Sie zeigt Dosis-Effekt-Kurven für die Inaktivierung von RNase durch 2 MeV-Protonen. Bei Zimmertemperatur beträgt die  $D_{37} = 2,1 \cdot 10^{13} \text{ p/cm}^2$ , bei  $125^\circ\text{K}$  jedoch  $D_{37} = 6,4 \cdot 10^{13} \text{ p/cm}^2$ . Danach ist bei Zimmertemperatur die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease um einen Faktor von 3,0 höher als bei  $125^\circ\text{K}$ . Bei Verwendung von 1,4 keV-Protonen führt ein entsprechendes Experiment zu dem Resultat, daß die Inaktivierungsrate von RNase nicht von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur abhängt. Sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei  $130^\circ\text{K}$  ergibt sich eine 37 %-Dosis von  $(4,0 \pm 0,4) \cdot 10^{13} \text{ p/cm}^2$  (Abb. 25). Das zeigt, daß bei der Inaktivierung von Ribonuclease durch elastische Kernstöße die Größe des Strahlenschadens nicht durch tiefe Temperaturen modifiziert werden kann.

Abschließend und zusammenfassend sei folgendes festgestellt: Elastische Kernstöße und Ionisationen zeigen in einer Hinsicht ein ähnliches Verhalten, nämlich darin, daß beide Prozesse mit großer Wirksamkeit biologische Veränderungen hervorrufen. Andererseits bestehen auch ausgeprägte Unterschiede zwischen beiden Arten der Energieübertragung; denn während die Wirkungen ionisierender Strahlen in vielen Fällen durch Schutzstoffe oder tiefe Temperaturen modifiziert werden können, lassen sich die biologischen Wirkungen der elastischen Kernstöße weder durch Cystamin noch durch tiefe Temperaturen beeinflussen.

## V. Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit

### 1. Problemstellung

Obwohl schon seit 1939 bekannt ist, daß die Strahlenempfindlichkeit von Proteinen in wässriger bzw. gefrorener Lösung stark von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur abhängt (Svedberg und Brohult 1939), wurde ein entsprechender Nachweis für trockene Präparationen von Bakteriophagen und Enzymen erst 1952 erbracht (Adams und Pollard 1952; Pollard, Powell und Reaume 1952; Setlow 1952). In der Folgezeit gewann dieses Phänomen zunehmend an Interesse und wurde seither von zahlreichen Experimentatoren bearbeitet. Als gemeinsames Resultat aller Arbeiten ist der Befund zu nennen, daß die Strahlenempfindlichkeit trockener Biomoleküle mit abnehmender Temperatur geringer wird. Ein großer Teil der frühen Untersuchungen hatte den Nachteil, daß durch die damals angewandten Methoden bei der Reinigung der verwendeten Präparate, der Bestimmung der Funktionsfähigkeit von DNS in Transformationsexperimenten, beim Nachweis der enzymatischen Aktivität, usw. die erhaltenen Meßpunkte eine relativ große Streuung aufwiesen, was die Interpretation der Resultate sehr erschwerte. Dennoch wurden im Verlauf der vergangenen eineinhalb Jahrzehnten zahlreiche Hypothesen zur Erklärung der Abnahme der Strahlenempfindlichkeit bei

tiefen Temperaturen formuliert:

Kombinierte Wirkung: Die ersten Interpretationen der bei verschiedenen Temperaturen erhaltenen Befunde standen noch ganz unter dem Einfluß der Treffbereichstheorie und dem "one-ionization model" von Lea (vgl. Kap. VII.). Adams und Pollard (1952) führten die von ihnen oberhalb von Zimmertemperatur beobachtete Zunahme der Strahlenempfindlichkeit von T1-Bakteriophagen auf eine kombinierte Wirkung von thermischer Energie und Strahlungsenergie zurück: Die Lokalisierung der absorbierten Strahlenenergie in einem kleinen Volumen soll in vielen Fällen nur ausreichen, um einen Teil der wichtigen Bindungen aufzubrechen; die Inaktivierung ist erst dann vollständig, wenn genügend thermische Energie zur Verfügung steht, um die restlichen der für die Unversehrtheit des Moleküls verantwortlichen Bindungen zu unterbrechen.

Sukzessive Inaktivierung verschiedener Untereinheiten: Der Wirkungsquerschnitt für die Inaktivierung von Catalase durch 3,8 MeV-Deuteronen zeigt einen stufenförmigen Verlauf mit zunehmender Temperatur (Setlow 1952; Setlow und Doyle 1953). Dieses Verhalten wurde darauf zurückgeführt, daß bei tiefen Temperaturen durch das Auftreten einer Primärionisation nur ein Viertel des Moleküls inaktiviert wird. Im Temperaturintervall zwischen 200 und 320 °K soll die Hälfte des Moleküls pro Absorptionsereignis inaktiviert werden, während zwischen 340 und 370 °K das Auftreten einer Primärionisation irgendwo im Catalase-Molekül zu dessen Inaktivierung führt. Da oberhalb von 370 °K ein weiterer Anstieg des Inaktivierungsquerschnitts zu beobachten ist, sollen bei dieser Temperatur auch Enzymmoleküle inaktiviert werden, in deren Nähe ein geladenes Teilchen vorbeifliegt. Die Wirkung soll dabei entweder über Anregungen oder über strahlengeschädigte Nachbarmoleküle zustandekommen.

Diffusible Bestrahlungsprodukte: In ihrer Untersuchung über den Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von T1-Bakteriophagen stellten Bachofer und Mitarb. (1953) fest, daß der Wirkungsquerschnitt in einen konstanten Anteil und in eine temperaturabhängige Komponente zerlegt werden kann. Die temperaturunabhängige Komponente führten die Autoren auf eine direkte Wechselwirkung zwischen der Strahlung und wichtigen Untereinheiten des Virus zurück. Die zweite Komponente oder ein Teil davon könnte von irgendwelchen durch die Bestrahlung erzeugten reaktionsfähigen Produkten herrühren oder den Einfluß der Temperatur auf einen Diffusionsprozeß widerspiegeln.

Energiewanderung: Einige Autoren (Pollard, Guild, Hutchinson und Setlow 1955; Hutchinson 1960; Augenstein und Mason 1964) erklären die an verschiedenen Makromolekülen beobachteten Temperatureffekte damit, daß Energiewanderungsprozesse derart durch die Temperatur beeinflußt werden, daß bei tiefen Temperaturen die Ableitung eines Teils der absorbierten Strahlungsenergie auf solche Seitengruppen begünstigt wird, die größere Energiebeträge ohne Schädigung aufzunehmen vermögen (wie z.B. ein Benzolring).

Käfigeffekt: Ein anderer Deutungsvorschlag basiert auf der Voraussetzung, daß es bei tiefen Temperaturen zwar mit der gleichen Wahrscheinlichkeit zu einer Primärschädigung der bestrahlten Moleküle kommt wie bei Zimmertemperatur; im ersten Fall sollen die einzelnen Molekülgruppen durch die verringerte thermische Energie so stark in ihrer räumlichen Anordnung fixiert sein, daß etwa die Hälfte der aufgebrochenen Bindungen sich wiederherstellen können, ohne daß das Molekül dabei seine Funktionsfähigkeit einbüßt (Hutchinson 1960).

Eingefangene Radikale: Aus der Tatsache, daß die Strahlenempfindlichkeit von Sporen von *B. megaterium* zwischen 5 °K und 125 °K von der Temperatur unabhängig ist (Webb,

Ehret und Powers 1958), schließen Bacq und Alexander (1961) darauf, daß eingefangene Radikale (trapped radicals) bei der Strahleninaktivierung biologischer Objekte eine Rolle spielen. Die Temperaturabhängigkeit soll nach dieser Hypothese dadurch zustandekommen, daß bei tiefen Temperaturen reaktionsfähige Radikale in Potentialmulden festgehalten werden, die sie erst bei entsprechend höherer thermischer Energie verlassen können, um zur insgesamt beobachteten Inaktivierung beizutragen.

Ladungswanderung: Die Temperaturabhängigkeit der Inaktivierungsrate verschiedener Enzyme wird von einigen Autoren (Augenstein und Mason 1962, 1964; Augenstein, Brustad und Mason 1964) auf eine Wanderung elektrischer Ladungen vom Ort der primären Energieabsorption zu besonders schwachen oder empfindlichen Stellen des Moleküls zurückgeführt.

Beitrag der Anregungen: Von den gleichen Autoren wird ferner in Betracht gezogen, daß die von der Temperatur unabhängige Komponente von Ionisationen, der durch die Temperatur modifizierbare Teil des Inaktivierungsquerschnitts von Anregungen herrühren könnte (Augenstein und Mason 1962; Augenstein, Brustad und Mason 1964).

Hitzenaturierung: Das sog. "thermal spike"-Modell, das eine Wiederbelebung des von Dessauer (1922) geprägten Begriffs der "Punktwärme" darstellt, führt die Inaktivierung von Makromolekülen auf deren thermische Zersetzung durch die hohen Temperaturen zurück, die in der Spur dichtionisierender Teilchen oder in der Spur der von dünnionisierender Primärstrahlung ausgelösten  $\delta$ -Strahlen als Folge einer hohen lokalen Energieabsorption zustandekommen (Norman und Spiegler 1962; Ingalls, Spiegler und Norman 1964). Je höher die anfängliche Temperatur des bestrahlten Materials, um so eher soll die Zersetzungstemperatur erreicht werden.

Bei dieser Zusammenstellung der bisher zur Erklärung des Temperatureinflusses vorgeschlagenen Mechanismen wurde bewußt darauf verzichtet, die verschiedenen, recht spekulativen Hypothesen kritisch gegeneinander abzuwägen; denn dieses Unterfangen erscheint uns nicht möglich, ohne erneut ins Spekulieren zu verfallen. Die in vielen Arbeiten mitgeteilten Temperatureffekte weisen beträchtliche Unterschiede auf, je nachdem ultraviolettes Licht,  $\gamma$ -Strahlung, schnelle Elektronen oder dichter ionisierende Teilchen bei den betreffenden Experimenten zur Anwendung gelangten; außerdem wurden meist nur wenige Temperaturen zwischen Zimmertemperatur und der Temperatur des flüssigen Stickstoffs untersucht. Deshalb versuchten wir, die Unterschiede zwischen  $\gamma$ -Strahlung und dichter ionisierenden Teilchen in einer systematischen Studie aufzuklären. Ein wesentlicher Gesichtspunkt für die Aufnahme dieser Experimente war die Frage, ob die biologischen Wirkungen der verschiedenen Strahlenarten durch unterschiedliche Mechanismen modifiziert werden oder ob sie sich durch einen gemeinsamen Ansatz beschreiben lassen. Ferner sollten diese Versuche Information zur Charakterisierung der physiko-chemischen Prozesse liefern, die bei der Entwicklung eines Strahlenschadens beteiligt sind.

## 2. Ergebnisse

Experimente mit  $\gamma$ -Strahlung: Bei Bestrahlung von trockener Ribonuclease mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung ist die Inaktivierungskonstante außerordentlich stark temperaturabhängig (Abb. 26). Die 37 %-Dosen betragen bei Bestrahlung im Vakuum  $(42 \pm 3)$  Mrad für  $T = 310^\circ\text{K}$  und  $(105 \pm 6)$  Mrad für  $T = 195^\circ\text{K}$ . Bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs ( $T = 77^\circ\text{K}$ ) ist innerhalb der Fehlergrenzen überhaupt keine Inaktivierung mehr festzustellen. Es kann lediglich eine untere Grenze für die  $D_{37}$  von mindestens 800 Mrad abgeschätzt werden. Bei einem Teil der erwähnten Versuche wurden die unter Vakuum bestrahlten Ampullen in einer Stickstoff-Atmosphäre aufgebrochen und die enzy-

matische Aktivität der Proben unter völligem Ausschluß von Sauerstoff bestimmt; bei den übrigen Proben erfolgte die Enzymbestimmung in Luft. Wie aus Abb. 26 ersichtlich ist, hat dieses Verfahren jedoch keinen Einfluß auf die Strahlenempfindlichkeit der Ribonuclease. Auch chromatographisch gereinigte RNase A zeigt, ebenso wie käufliche fünfmal umkristallisierte Ribonuclease, bei 77 °K innerhalb des untersuchten Dosisbereiches keine Abnahme der Enzym-Aktivität. Wenn die Bestrahlung in Sauerstoff-Atmosphäre durchgeführt wird, ist die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease 2,1 mal größer als bei Bestrahlung im Vakuum. Die 37 %-Dosen betragen (20 ± 2) Mrad für T = 310 °K, (19 ± 3) Mrad für 293 °K, (30 ± 3) Mrad für 256 °K, (39 ± 3) Mrad für 213 °K und (50 ± 5) Mrad für T = 195 °K. Die Strahlenempfindlichkeit bei 77 °K konnte in Sauerstoff-Atmosphäre nicht gemessen werden, da bei dieser Temperatur der Sauerstoff kondensiert.

Die unter den verschiedenen Versuchsbedingungen ermittelten Resultate sind in Abb. 27 zusammengestellt. In dieser Darstellung sind die reziproken 37 %-Dosen - die Inaktivierungskonstanten - in halblogarithmischem Maßstab über der reziproken absoluten Temperatur aufgetragen ("Arrhenius-Darstellung"). Die durch die Meßpunkte gelegten Geraden lassen sich durch die Gleichung

$$S(T) = S_1 \cdot e^{-E_a/RT} \quad (3)$$

beschreiben. Bei Bestrahlung im Vakuum beträgt  $S_1 = 0.125 \text{ Mrad}^{-1}$ , für Bestrahlung in Sauerstoff-Atmosphäre gilt  $S_1 = 0.265 \text{ Mrad}^{-1}$ . Aus der Steigung der Kurven einer Arrhenius-Darstellung kann die "Aktivierungsenergie"  $E_a$  bestimmt werden. Dieser Wert beläuft sich in unserem Falle auf 1 kcal/Mol, und zwar unabhängig davon, ob die Bestrahlung im Vakuum oder in Sauerstoff durchgeführt wurde. Bei Extrapolation der durch die Meßpunkte gelegten Geraden auf Abb. 27 ergibt sich für 77 °K und anaerobe Bedingungen ein Wert von  $1000/D_{37} \approx 0.25 \text{ Mrad}^{-1}$ , was mit der für diese Temperatur experimentell ermittelten unteren Grenze von

$D_{37} > 800$  Mrad (vgl. Abb. 26) nicht im Widerspruch steht.

Experimente mit Protonen und Deuteronen: Abb. 28 zeigt zwei Dosis-Effekt-Kurven, die mit 2 MeV-Protonen bei  $T = 300$  °K und bei  $T = 125$  °K aufgenommen wurden; ihre  $D_{37}$ -Werte betragen  $2,1 \cdot 10^{13}$  p/cm<sup>2</sup>, bzw.  $6,4 \cdot 10^{13}$  p/cm<sup>2</sup>. Die Bestrahlungen erfolgten bei Dosisleistungen zwischen  $4 \cdot 10^{11}$  p/cm<sup>2</sup> sec und  $7 \cdot 10^{12}$  p/cm<sup>2</sup> sec. Innerhalb dieser Grenzen konnte kein Einfluß der Dosisleistung auf die Inaktivierungsrate beobachtet werden; außerdem zeigte käufliche Ribonuclease die gleiche Strahlenempfindlichkeit wie chromatographisch gereinigte RNase A. Bereits der Vergleich der aus Abb. 28 ermittelten 37 %-Dosen läßt erkennen, daß beim Bestrahlen mit 2 MeV-Protonen der Temperatureffekt wesentlich kleiner ist als bei den Experimenten mit  $\gamma$ -Strahlung: Während beim Übergang von 300 °K zu 100 °K im letzten Fall ein Schutzfaktor von  $p > 20$  ermittelt wurde, beläuft sich der entsprechende Wert für Protonen auf  $p = 3,0$ .

Mit 2 MeV-Protonen wurde der Inaktivierungsquerschnitt von Ribonuclease in Abhängigkeit von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur bestimmt, wobei die tiefste Temperatur 125 °K betrug. Da RNase thermisch sehr stabil ist, konnten die Messungen im Bereich höherer Temperaturen bis 443 °K (170 °C) ausgedehnt werden. Die hohe thermische Stabilität der Ribonuclease war einer der entscheidenden Gründe für ihre Anwendung bei diesen Experimenten. In Abb. 29 sind die ermittelten Inaktivierungsquerschnitte  $S (= 1/D_{37})$  in Form einer Arrhenius-Darstellung über der reziproken absoluten Temperatur aufgetragen. Mit zunehmenden Werten von  $1/T$  scheint die Kurve einem konstanten Wert zuzustreben, der experimentell nicht erfaßt wurde. Doch ist an der Existenz dieses konstanten Anteils nicht zu zweifeln. Denn bei allen Experimenten, die bisher zwischen der Temperatur des flüssigen Stickstoffs und der des flüssigen Heliums ausgeführt wurden, zeigte sich, daß die Inaktivierungsrate zwischen 4 °K und 77 °K nicht von der

Temperatur abhängt; dieser Befund gilt für Trypsin bei verschiedenen Strahlenarten (Brustad 1964), für T1-Bakteriophagen unter diversen experimentellen Bedingungen (Uenzelmann 1968) sowie für Sporen von *B. megaterium* (Webb, Ehret und Powers 1958). Durch Extrapolation des gemessenen Kurvenverlaufes ergibt sich ein von der Temperatur unabhängiger Inaktivierungsquerschnitt von  $S_0 = 1,28 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2$  (Abb. 29, unterbrochene horizontale Gerade mit  $E_0 = 0$ ). Wird dieser Wert von den Meßpunkten subtrahiert, so erhält man die Kreise, die unterhalb von Zimmertemperatur auf einer Geraden liegen, deren Steigung einer Aktivierungsenergie von  $(1,0 \pm 0,1) \text{ kcal/Mol}$  entspricht. Durch nochmalige Differenzbildung zwischen den Kreisen und der extrapolierten Geraden ergeben sich die Dreiecke, die über zwei Dekaden hinweg recht gut auf einer Geraden mit einer Aktivierungsenergie von  $(6,5 \pm 1,5) \text{ kcal/Mol}$  liegen. Die Abhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur kann somit durch den Ausdruck

$$S(T) = (1,28 + 16 \cdot e^{-1000/RT} + 14 \cdot 000 \cdot e^{-6500/RT}) \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2 \quad (4)$$

wiedergegeben werden. Die auf Abb. 29 durch die Meßpunkte gezeichnete Kurve entspricht dieser Gl. (4).

Die mit 2 MeV-Deuteronen für Ribonuclease gemessenen Inaktivierungsquerschnitte sind auf Abb. 30 als Funktion der reziproken Temperatur aufgetragen. Werden die Daten in der vorstehend beschriebenen Weise analysiert, dann lassen sie sich in zwei Komponenten zerlegen; die eine ist temperaturunabhängig (Abb. 30, unterbrochene horizontale Gerade mit  $E_0 = 0$ ), die Neigung der anderen entspricht einer Aktivierungsenergie von  $1,05 \text{ kcal/Mol}$ . Der Wirkungsquerschnitt für Deuteronen wird durch folgende Beziehung beschrieben:

$$S(T) = (2,45 + 31 \cdot e^{-1050/RT}) \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2 \quad (5)$$

Legt man für 2 MeV-Protonen eine lineare Energieabgabe von  $166,5 \text{ MeV} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  (Lea 1946) zugrunde und für 2 MeV-Deuteronen eine solche von  $276,9 \text{ MeV} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  (Lea 1946), dann kann der Teilchenfluß in die entsprechende Dosis umgerechnet werden. Gln. (4) und (5) erhalten damit die Form:

$$2 \text{ MeV-p:S(T)} = (0,0048 + 0,060 \cdot e^{-1000/RT} + 52 \cdot e^{-6500/RT}) \text{ Mrad}^{-1} \quad (6)$$

$$2 \text{ MeV-d:S(T)} = (0,0055 + 0,070 \cdot e^{-1050/RT}) \text{ Mrad}^{-1} \quad (7)$$

Dieser Vergleich zeigt, daß die Inaktivierungsrate für Protonen in gleicher Weise von der Temperatur abhängt wie für Deuteronen, d.h. nicht nur die ermittelten Aktivierungsenergien, sondern auch die Koeffizienten, die den absoluten Betrag der Strahlenempfindlichkeit beschreiben, sind innerhalb der Fehlergrenzen identisch. Die Bestrahlungen mit 2 MeV-Deuteronen wurden nur bei Temperaturen unterhalb von  $20^\circ \text{C}$  durchgeführt, so daß die zweite temperaturabhängige Komponente nicht erfaßt werden konnte.

Neben den hier beschriebenen Experimenten an Ribonuclease wurden im hiesigen Institut ganz entsprechende Versuche an infektiöser  $\phi\text{X 174-DNS}$  bzw. T1-Bakteriophagen unternommen, wozu ebenfalls 2 MeV-Protonen bzw.  $\gamma$ -Strahlung und Elektronen verwendet wurden (Hermann 1966; Hotz und Müller 1968). In beiden Fällen läßt sich die Abhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts von der Bestrahlungstemperatur durch einen von der Temperatur unabhängigen Anteil und eine temperaturabhängige Komponente mit einer Aktivierungsenergie von 1 bzw.  $6,3 \text{ kcal/Mol}$  beschreiben. Die numerischen Ausdrücke haben die Form:

$$\text{T1-Phagen: } S(T) = (3,3 + 13,9 \cdot e^{-1000/RT}) \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2 \quad (8)$$

$$\phi\text{X 174-DNS: } S(T) = (1,05 + 6500 \cdot e^{-6300/RT}) \text{ Mrad}^{-1} \quad (9)$$

### 3. Diskussion

Wie aus diesen Untersuchungen hervorgeht, läßt sich der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease, ØX-DNS und T1-Bakteriophagen allgemein durch einen von der Temperatur unabhängigen Anteil und zwei temperaturabhängige Komponenten in der Form

$$S(T) = S_0 \cdot e^{-E_0/RT} + S_1 \cdot e^{-E_1/RT} + S_2 \cdot e^{-E_2/RT} \quad (10)$$

beschreiben. Die konstante Komponente  $S_0 \cdot e^{-E_0/RT}$  mit  $E_0 = 0$  ist für die unterhalb von 100 °K auftretende Inaktivierung verantwortlich, im mittleren Temperaturbereich zwischen 100 °K und 300 °K tritt der zweite Term von Gl. (10) in Erscheinung, während die dritte Komponente erst bei Temperaturen oberhalb von Zimmertemperatur einen nennenswerten Beitrag zur insgesamt beobachteten Inaktivierung leistet. Bei den  $\gamma$ -Bestrahlungen von Ribonuclease tritt der konstante Anteil  $S_0 \cdot e^{-E_0/RT}$  nicht auf ( $S_0 = 0$  oder nahe Null), während bei den Versuchen mit ØX-DNS der Term  $S_1 \cdot e^{-E_1/RT}$  verschwindet. Demgegenüber sind bei den Experimenten mit Protonen und Deuteronen bei nicht zu niedrigen Temperaturen zwei bzw. drei Komponenten an den Strahlenwirkungen beteiligt.

Nach unseren Versuchen mit  $\gamma$ -Strahlung ist die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease bei 77 °K mehr als 20 mal geringer als bei Zimmertemperatur. Dieser große Temperatureffekt von  $p > 20$  rührt davon her, daß bei diesen Experimenten die temperaturunabhängige Komponente  $S_0$  nicht auftritt. Ähnlich große Temperatureffekte wurden bisher von Setlow und Doyle (1953) für UV-Bestrahlung von kristalliner Catalase ( $p = 8$ ) und von Shalek (1961) für  $\gamma$ -Bestrahlung von Lysozym ( $p = 10$ ) mitgeteilt. Nach  $\gamma$ -Bestrahlung im Vakuum bei 77 °K und anschließender Enzymbestimmung unter Argon konnten Ganassi u. Mitarb. (1964) nach einer Dosis von 10 Mrad keine Inaktivierung von Pepsin feststellen, was bei den angegebenen Fehlergrenzen von  $(100 \pm 4) \%$  einem

Temperatureffekt von  $p > 10$  entspricht. Wir halten es für wahrscheinlich, daß nur unter bestimmten Versuchsbedingungen die temperaturunabhängige Komponente  $S_0$  verschwindet: kleine Moleküle, dünn ionisierende Strahlung, geringe Dosisrate, dünne Proben, keine Verunreinigungen. Bei Bakteriophagen und Bakteriensporen wurden auch bei niedrigen Dosisraten (0,4 bzw. 0,15 Mrad/Std.) kleine Temperatureffekte von  $p = 2,8$  (Hotz und Zimmer 1963; Hotz 1966) und  $p = 1,25$  (Webb, Ehret und Powers 1958) gefunden und auch bei Verwendung von dicht ionisierenden Teilchen (Adams und Pollard 1952; Pollard, Powell und Reaume 1952; Brustad 1964; Hermann 1966; Henriksen 1966, 1967; Günther und Hermann 1967) und von schnellen Elektronen bei hoher Dosisleistung (Fluke 1966; Henriksen 1967) strebte die Inaktivierungsrate bzw. Radikalausbeute mit abnehmender Temperatur stets einem konstanten Wert zu. Daß die Dosisleistung bei dünn ionisierender Strahlung einen Einfluß auf die Größe des zu beobachtenden Temperatureffektes hat, konnten wir kürzlich für die Einwirkung von  $\gamma$ -Strahlung auf RNase nachweisen (Kürzinger und Jung 1968a), nachdem ein erster Hinweis auf eine mögliche Abhängigkeit 1965 von Thomson und Stratton veröffentlicht wurde. Beim Bestrahlen von dicken Enzym-Schichten (jeweils 7 mg RNase wurden aus wässriger Lösung eingetrocknet und nach 24 Stdn. bei  $10^{-5}$  Torr in Ampullen eingeschmolzen) mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung fanden wir bei  $77^\circ\text{K}$  eine  $D_{37} = (110 \pm 20)$  Mrad, was einem Temperatureffekt von  $p = 2,6$  entspricht. Werden jeweils 1  $\mu\text{g}$  RNase nur 2 Stdn. lang bei einem Druck von  $5 \cdot 10^{-2}$  Torr entgast und dann in Glasampullen eingeschmolzen, so zeigen sie bei Zimmertemperatur die gleiche Strahlenempfindlichkeit wie die im Hochvakuum bestrahlten Proben, bei  $77^\circ\text{K}$  ergibt sich jedoch eine  $D_{37} = (190 \pm 15)$  Mrad oder ein Schutzfaktor von  $p = 4,5$ . Diese Versuche zeigen, die in den Proben vorhandenen Verunreinigungen, wie Wasser und Sauerstoff, bei tiefen Temperaturen einen großen Einfluß auf die Inaktivierungsrate haben; darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß eine größere Schichtdicke das

Entweichen von reaktionsfähigen diffusiblen Radikalen (z.B. von atomarem Wasserstoff) verhindert.

Unsere Experimente erbrachten den bemerkenswerten Befund, daß die unter verschiedenen Versuchsbedingungen und mit unterschiedlichen Objekten erhaltenen Aktivierungsenergien innerhalb der experimentellen Genauigkeit übereinstimmen. Um nachzuprüfen, ob diesem Verhalten eine allgemeine Gesetzmäßigkeit zugrunde liegt, haben wir die bisher bekannt gewordenen Resultate gemäß Gl. (10) zerlegt und die Werte für  $E_0$ ,  $E_1$ ,  $E_2$  und  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  berechnet. Wie Tab. 2 zeigt enthalten bis auf unsere Experimente mit Co- $\gamma$ -Strahlung (vgl. Abb. 26 und 27) alle Wirkungsquerschnitte einen temperaturunabhängigen Anteil mit  $E_0 = 0$ . Allerdings konnten die Ergebnisse der bereits zitierten Arbeiten (Setlow und Doyle 1953; Shalek 1961; Ganassi, Eidus und Arifulina 1964), in denen ebenfalls ungewöhnlich große Temperatureffekte mitgeteilt wurden (was auf ein weitgehendes Verschwinden des konstanten Anteils schließen läßt) nicht nach Gl. (10) analysiert werden, da in ihnen wie auch in zahlreichen weiteren nicht in Tab. 2 berücksichtigten Publikationen nur einige Temperaturen untersucht worden sind. Besonders bemerkenswert ist, daß die nach Abzug der konstanten Komponente  $S_0$  aus den Arrhenius-Darstellungen ermittelten Aktivierungsenergien  $E_1$  und  $E_2$  für die Inaktivierung der verschiedenen untersuchten Objekte die gleichen Werte haben. Im Gegensatz dazu lassen die Koeffizienten  $S_0$ ,  $S_1$  und  $S_2$  keine Gesetzmäßigkeiten erkennen. Neben dieser auffallenden Übereinstimmung der ermittelten Aktivierungsenergien ist weiterhin interessant, daß der Wert von  $E_1 = 1$  kcal/Mol nicht von den Versuchsbedingungen abhängt. Bei Bestrahlung in Sauerstoff-Atmosphäre ist die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease zwar doppelt so groß wie im Vakuum, doch beträgt die aus der Arrhenius-Auftragung bestimmte Aktivierungsenergie in beiden Fällen  $E_1 = 1$  kcal/Mol (vgl. Abb. 27). Dieser Befund wird von den Beobachtungen von Hermann und Günther (Hermann 1966; Günther und Hermann

**Tabelle 2:** Zusammenstellung der Aktivierungsenergien  $E_0$ ,  $E_1$  und  $E_2$  für die Beschreibung des Wirkungsquerschnitts  $S(T)$  als Funktion der absoluten Temperatur  $T$  durch die Gleichung  $S(T) = S_0 \cdot e^{-E_0/RT} + S_1 \cdot e^{-E_1/RT} + S_2 \cdot e^{-E_2/RT}$  ( $R = \text{Gaskonstante}$ ).

<sup>a</sup> Komponente wurde untersucht; sie tritt aber nicht auf

<sup>b</sup> Angaben wegen fehlender Meßpunkte nicht möglich

<sup>c</sup> Zusätzlich tritt noch eine Komponente mit 0,35 kcal/Mol auf

Objekt	Strahlung	Aktivierungsenergien [kcal/Mol]			Autoren
		$E_0$	$E_1$	$E_2$	
Ribonuclease	Co- $\gamma$	fehlt <sup>a</sup>	1	- <sup>b</sup>	Günther u. Jung 1967
" (in $O_2$ )	Co- $\gamma$	fehlt	1	-	" "
"	2 MeV-d	0	1,05	-	" "
"	2 MeV-p	0	1	6,5	Kürzinger u. Jung 1968a
"	1,4 keV-p	0	fehlt	-	Jung 1966a
"	3 MeV-e	0	1,06	6,1	Fluke 1966
Lysozym	3 MeV-e	0	0,62	2,54	"
Trypsin	18 MeV-d	0	1,1	4,5	Brustad 1964
"	33 MeV- $\alpha$	0	1,2	5	"
"	90 MeV-B	0	0,9	2,9	"
"	100 MeV-C	0	1	3,1	"
"	116 MeV-Ne	0	1	3,7	"
"	330 MeV-Ar	0	1	3	"
Hyaluronidase	1 MeV-e	0	1,1	-	Vollmer u. Fluke 1967
Invertase	4 MeV-d	0	1	6	Pollard et al. 1952

Fortsetzung nächste Seite

- 69 -

Fortsetzung Tabelle 2

Invertase	8 MeV- $\alpha$	0	0,95	6	Pollard et al. 1952
$\phi$ X 174-DNS	10 MeV-e	0	fehlt	6,3	Hotz u. Müller 1968
$\phi$ X 174-Phagen	2 MeV-p	0	1	-	Günther u. Hermann 1967
" + Cystamin	2 MeV-p	0	1	-	" "
T1-Bakteriophagen	4 MeV-d	0	fehlt	5,4	Adams u. Pollard 1952
"	50 kVp-X	0	1,1	-	Bachofer et al. 1953
"	2 MeV-p	0	1	-	Hermann 1966
T1-Phagen+Cystamin	2 MeV-p	0	1	-	"
BU-T1-Phagen	2 MeV-p	0	1	-	"
" + Cystamin	2 MeV-p	0	1	-	"
T1-Phagen	Co- $\gamma$	0 <sup>c</sup>	1	-	Uenzelmann 1968
" + Cystamin	Co- $\gamma$	0 <sup>c</sup>	1	-	"
Bu-T1-Phagen	Co- $\gamma$	0 <sup>c</sup>	1	-	"
" + Cystamin	Co- $\gamma$	0 <sup>c</sup>	1	-	"
Sporen v. B.megatherium	50 kVp-X	0	1,06	-	Webb et al. 1958

1967) gestützt, die an T1- bzw. ØX 174-Phagen bei Zugabe von Cystamin zwar verschiedene Schutzfaktoren von  $p = 2,5$  bzw.  $p = 1,26$  fanden, jedoch an beiden Phagen mit und ohne Cystamin eine Aktivierungsenergie von  $E_1 = 1$  kcal/Mol ermittelten.

Der Wert von  $E_2$  läßt sich nicht mit der gleichen Genauigkeit angeben wie der von  $E_1$ , da er durch doppelte Differenzbildung bestimmt werden muß. Darüber hinaus können die Versuche zur Bestimmung von  $E_2$  wegen der thermischen Inaktivierung der Proben nicht zu beliebig hohen Temperaturen ausgedehnt werden, so daß nur in einem relativ kleinen Temperaturintervall der Beitrag des dritten Termes von Gl. (10) mit den beiden ersten vergleichbar ist. Nach unserer Zusammenstellung beläuft sich die Aktivierungsenergie der zweiten temperaturabhängigen Komponente auf  $E_2 = 4 - 6$  kcal/Mol. Wegen der zuvor aufgeführten Einschränkungen läßt sich nicht entscheiden, ob die Schwankungen der für  $E_2$  ermittelten Werte allein von Meßfehlern herrühren, oder ob verschiedene Prozesse oder Prozeßketten mit unterschiedlichen Aktivierungsenergien beteiligt sind.

Beide hier angegebenen Aktivierungsenergien  $E_1$  und  $E_2$  weisen eine bemerkenswerte Diskrepanz auf gegenüber den von Augenstein und Mitarb. (Augenstein, Ghiron, Grist und Mason 1961; Augenstein und Mason 1962, 1964; Augenstein, d. Brustad und Mason 1964; Brustad 1964) publizierten Werten von  $E_1 = 70 - 110$  cal/Mol und  $E_2 = 2,2 - 2,3$  kcal/Mol. Wir sind der Meinung, daß die von Augenstein und Mason (1962) durchgeführte Zerlegung der von anderen Autoren gemessenen Inaktivierungsquerschnitte in zwei Komponenten willkürlich ist und einer statistischen Analyse keinesfalls standhält. Ebensowenig ist die 1964 von Augenstein, Brustad und Mason vorgenommene Zerlegung der Brustad'schen Daten an Trypsin (Brustad 1964) in drei Komponenten zutreffend, was in einer späteren Mitteilung auch eingeräumt wurde (Brustad 1967). Dies und besonders die gute Übereinstimmung der in Tab. 2 aufgeführten Werte für die Aktivierungsenergien läßt uns

die Beschreibung der Temperaturabhängigkeit von  $S(T)$  nach Gl. (10) mit  $E_0 = 0$ ,  $E_1 = 1$  kcal/Mol und  $E_2 = 4 - 6$  kcal/Mol für zutreffend halten.

Daß es prinzipiell temperaturunabhängige Inaktivierungsmechanismen gibt, geht aus den in Kap. IV. 4 beschriebenen Experimenten zum Temperatureffekt bei langsamen Protonen hervor (vgl. Abb. 25). Damit soll jedoch keinesfalls impliziert werden, daß beim Bestrahlen mit schnellen ionisierenden Teilchen die Komponente  $S_0$  von denselben Prozessen herrührt, wie sie beim Bestrahlen mit langsamen Protonen auftreten, die ihre kinetische Energie in elastischen Kernstößen an die durchstrahlte Materie abgeben. Wahrscheinlicher ist, daß beide verschieden sind; denn die temperaturunabhängige Komponente der Wirkung ionisierender Strahlung verringert sich bei Zugabe von Cystamin (Hermann 1966; Günther und Hermann 1967), und zwar um den gleichen Faktor wie die temperaturabhängige, während die Wirkung von elastischen Kernstößen nicht durch Cystamin beeinflusst werden kann (vgl. Abb. 24). Dennoch zeigen diese Resultate, daß die Existenz eines von der Temperatur nicht abhängigen Inaktivierungsmechanismus nicht a priori auszuschließen ist. Die Versuche mit 1,4 keV-Protonen (Abb. 25) können als Sonderfall von Gl. (10) angesehen werden:  $S(T) = S_0$ ;  $S_1 = 0$ ;  $S_2$  wurde nicht bestimmt. Bis jetzt können wir noch keine Erklärung dafür geben, warum in einigen Experimenten der konstante Anteil (bei RNase und  $\gamma$ -Strahlung) bzw. die erste temperaturabhängige Komponente (Adams und Pollard 1952; Jung 1966a; Hotz und Müller 1968) nicht auftritt, während in der überwiegenden Zahl der bisher durchgeführten Versuche der Strahlenschaden sich aus drei Komponenten zusammensetzt. Wir halten es für wahrscheinlich, daß der relative Beitrag der einzelnen Komponenten empfindlich von den Versuchsbedingungen abhängt, was sich auch schon darin zu erkennen gibt, daß für die Koeffizienten  $S_0$ ,  $S_1$  und  $S_2$  in Gl. (10) keine Gesetzmäßigkeit aufgefunden werden konnte.

Gl. (10) und die Zusammenstellung auf Tab. 2 zeigen, daß die an trocken bestrahlten Aminosäuren, Enzymen, Nucleinsäuren, Bakteriophagen und Bakteriensporen beobachteten Wirkungen sich additiv aus drei Komponenten zusammensetzen, deren Anteil an der insgesamt zu messenden Veränderung von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur abhängt. Da die Aktivierungsenergien der verschiedenen Komponenten in allen untersuchten Systemen übereinstimmen, kann man schließen, daß bei der Einwirkung von Strahlung auf biologische Objekte drei Inaktivierungsmechanismen wirksam sind, von denen einer temperaturunabhängig ist, während die beiden übrigen in verschiedener Weise von der Bestrahlungstemperatur beeinflußt werden. In welchem Maße die drei Mechanismen zur Inaktivierung beitragen, hängt vom bestrahlten Objekt, der verwendeten Strahlenart, der Dosisrate und evtl. weiteren Parametern ab. Dieser Befund liefert eine Erklärung für die bisher unter verschiedenen experimentellen Bedingungen beobachteten unterschiedlich großen Temperatureffekte: Diese kommen nicht dadurch zustande, daß die Modifizierung der Strahlenschäden über qualitativ verschiedene Prozesse verläuft, sondern sie rühren von einer unterschiedlich großen Beteiligung der drei aufgeführten Inaktivierungsmechanismen am insgesamt beobachteten Effekt her. Allerdings läßt sich auf Grund unserer Untersuchungen noch keine Aussage über die Natur der drei auftretenden Inaktivierungsprozesse machen. Denn bis jetzt können diese nur auf Grund ihrer unterschiedlichen Temperaturabhängigkeit unterschieden werden, was für eine eindeutige Charakterisierung nicht ausreicht. Wir möchten deshalb die hier mitgeteilten Aktivierungsenergien als "formale Aktivierungsenergien" bezeichnen, da die Angabe einer Aktivierungsenergie keinen Sinn hat, wenn nicht die zugehörigen Prozesse bekannt sind. Unter "Aktivierungsenergie" soll lediglich ein Temperatur-Exponent verstanden werden, der die Abhängigkeit der experimentell ermittelten Inaktivierungsraten von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur beschreibt. In

diesem Zusammenhang ist anzuführen, daß die Anwendung des Temperaturbegriffs etwas problematisch ist, da durch die Absorption von Strahlung recht große Energiebeträge (im Vergleich zu thermischen Energien) in relativ kleinen Volumina konzentriert werden. Allerdings erscheint es uns nicht zwingend, aus der Existenz des temperaturunabhängigen Anteils  $S_0$  auf Reaktionstemperaturen von 1000 °K und mehr zu schließen (Pauly 1966). Denn die Wirkungen ionisierender Strahlen beruhen nicht nur auf temperaturgesteuerten Reaktionen; es gibt auch Prozesse, wie z.B. die Ionisierung eines Moleküls, die in erster Näherung nicht von der Temperatur abhängen. Daneben sind aber auch Inaktivierungsprozesse denkbar, deren Geschwindigkeitskonstante nicht durch die lokale Temperaturerhöhung am Ort der Strahlenabsorption beeinflusst wird, wodurch die "Bestrahlungstemperatur" die Bedeutung einer Reaktionstemperatur erlangt. Einer dieser Prozesse ist die Schädigung noch unveränderter Moleküle durch kleine diffusible Radikale, die durch Strahleneinwirkung auf andere Moleküle entstehen. Mit dieser Interpretation konsistent sind die außerordentlich kleinen Werte der hier mitgeteilten Aktivierungsenergien, die etwa eine Größenordnung unter den Werten liegen, die für "normale" chemische Reaktionen oder auch für Hitzedenaturierung von Biomolekülen üblicherweise gemessen werden. Beispielsweise betragen die Aktivierungsenergien für die thermische Inaktivierung von  $\phi X$  174-DNS 24,5 kcal/Mol (Hotz und Müller 1968), von T1-Bakteriophagen 28 kcal/Mol (Pollard und Reaume 1951) und von Ribonuclease 22,4 kcal/Mol (Mullaney und Preiss 1966). Die für die Reaktionen freier Radikale mit organischen Molekülen bekannten Aktivierungsenergien sind demgegenüber wesentlich kleiner; z.B. wurden für die Anlagerung von H-Atomen und  $CH_3$ -Radikalen an die Doppelbindung der Olefine schon Aktivierungsenergien von weniger als 1 kcal/Mol gemessen (vgl. Steacy 1954). Diese Überlegungen führen zu dem Schluß, daß die temperaturabhängigen Komponenten von einem Beitrag diffusibler reaktionsfähiger Radikale zu der insgesamt beobachteten Inaktivierung herrühren könnten. Da bisher jedoch

noch nicht experimentell nachgewiesen worden war, daß strahlenerzeugte Radikale die Fähigkeit zur Inaktivierung von trockener DNS, Bakteriophagen und Proteinen besitzen, haben wir entsprechende Versuche unternommen, die im folgenden Kap. VI beschrieben werden.

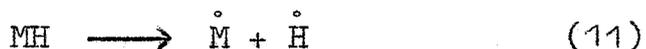
## VI. Wirkungen von atomarem Wasserstoff

### 1. Problemstellung

Seit den grundlegenden Arbeiten von Bonhoeffer in den zwanziger Jahren ist bekannt, daß Wasserstoffatome mit zahlreichen wasserstoffhaltigen anorganischen und organischen Molekülen reagieren, wobei in vielen Fällen Abstraktion von Wasserstoff stattfindet (Boehm und Bonhoeffer 1926; Bonhoeffer und Harteck 1928). Seither wurden die Wirkungen von atomarem Wasserstoff an einer großen Zahl chemischer Systeme untersucht. Die Monographie von Steacy (1954) gibt einen guten Überblick über die umfangreiche Literatur der ersten Jahrzehnte. In der letzten Zeit gewann die Frage zunehmend an Interesse, ob atomarer Wasserstoff auch bei der Strahleninaktivierung von biologisch wichtigen Makromolekülen von Bedeutung ist. Dieses Interesse wurde durch folgende Befunde geweckt: Aus den im vorangegangenen Kap. V beschriebenen Experimenten zum Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit war der Schluß gezogen worden, daß Radikalreaktionen u.U. bei der Strahleninaktivierung zahlreicher biologischer Objekte eine Rolle spielen könnten. Da überdies aus ESR-Daten bekannt ist, daß mehr als 70 % der Radikale bestrahlter organischer Moleküle durch das Aufbrechen einer C-H-Bindung zustandekommen (Rowlands und Whiffen 1962), lag die Annahme nahe, daß die bei der Entstehung eines Strahlenschadens beteiligten Radikale im wesentlichen Wasserstoffatome sind. (Diese Annahme wird durch die Resultate unserer Experimente sehr wahrscheinlich gemacht; vgl. Kap. VI. 3). Eine weitere Tatsache, die für einen Beitrag des atomaren Wasserstoffs angeführt werden kann, ist seine hohe Reaktionsfähigkeit

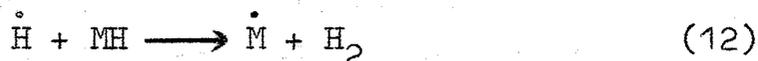
sowie sein gutes Diffusionsvermögen, das z.B. auch bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs noch erheblich ist. Weiterhin wurde gefunden, daß bei Bestrahlung von Kohlenwasserstoffen (vgl. Swallow 1960; Hart und Platzman 1961), Aminosäuren (Sommermeyer, Stegle und Schnepel 1967), Proteinen (ten Bosch und Braams 1963) und Nucleinsäurebausteinen (Jacobs 1962; Merwitz 1967; Heitkamp, Merwitz und Späth 1968) ein Gas gebildet wird, das zum überwiegenden Teil aus molekularem Wasserstoff besteht. Dertinger konnte 1967 zeigen, daß die nach  $\gamma$ -Bestrahlung in Kristallen der Nucleoside Adenosin, Cytosin und Guanosin entstehenden Radikale, ebenso wie die früher von Pruden, Snipes und Gordy (1965) für Thymidin nachgewiesenen, in erheblichem Maße durch Anlagerung von atomarem Wasserstoff hervorgerufen werden. 1964 fanden Patten und Gordy, daß bei 4,2 °K durch Bestrahlung gefrorener Nucleinsäure-Lösungen H-Atome gebildet und stabilisiert werden, die sich durch ESR-Messungen nachweisen lassen. In jüngster Zeit gelang Müller und Dertinger (1968) ein entsprechender Nachweis an hochgereinigten Präparaten der Phagen T1, T2, T4 Bo<sup>r</sup> und an Phagen-DNS. Die durch Bestrahlung bei 77 °K erzeugten und in dem Material stabilisierten Wasserstoffatome weisen eine relativ große Stabilität auf; denn Erwärmung auf 200 °K für 10 Minuten verringerte ihre Konzentration nur auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes.

Im Jahre 1963 schlug Braams einen Mechanismus vor, der in der Lage ist, zahlreiche experimentelle Befunde an trocken bestrahlten Proteinen und Nucleinsäuren zu beschreiben. Nach dieser Hypothese dissoziiert ein bestrahltes Makromolekül MH in ein Makroradikal  $\dot{M}$  und ein Wasserstoffradikal  $\dot{H}$  entsprechend der Gleichung



H-Atome sind ohnehin sehr reaktionsfähig; darüber hinaus sind die durch Bestrahlung erzeugten Wasserstoffatome in vielen Fällen noch elektronisch angeregt (Platzman 1962b), was sich z.B. dadurch zu erkennen gibt, daß bei Bestrah-

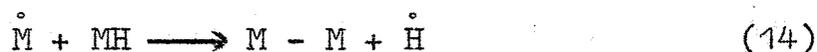
lung wasserstoffhaltiger Moleküle durch schnelle Elektronen die Emissionslinien des atomaren Wasserstoffs beobachtet werden (Horie, Otsuka und Nagura 1957). In jedem Fall besitzen sie genügend Energie, um durch Abstraktionsreaktionen weitere Moleküle zu schädigen



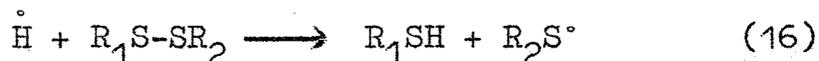
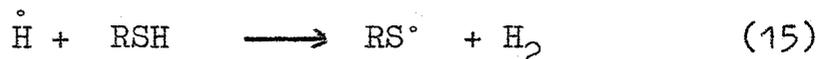
Dabei entsteht molekularer Wasserstoff, der sich in vielen bestrahlten Systemen nachweisen läßt (vgl. Swallow 1960; Hart und Platzman 1961; Jacobs 1962; ten Bosch und Braams 1963; Merwitz 1967; Sommermeyer, Stegle und Schnepel 1967; Heitkamp, Merwitz und Späth 1968). Die Makroradikale M haben verschiedene Möglichkeiten der Weiterreaktion; und zwar können nach dem Schema



Vernetzungen entstehen, oder es finden Reaktionen mit noch ungeschädigten Molekülen statt:



Bei dieser letzten Reaktion wird neben den Dimeren M - M wiederum atomarer Wasserstoff frei, der nach Gl. (12) weitere Moleküle schädigen kann. Die Schutzwirkung von SH-haltigen Substanzen (RSH) oder von Verbindungen mit einer Disulfidbrücke ( $\text{R}_1\text{S}-\text{SR}_2$ ) wird in diesem Reaktionsschema auf ein unspezifisches Wegfangen der H-Radikale zurückgeführt, wodurch die Zahl der nach Gl. (12) erzeugten Schäden verringert wird:



Um die in trockenen Systemen beobachteten Schutzwirkungen, die in den meisten Fällen etwa einen Faktor 2 betragen, durch die Gleichungen (15) und (16) erklären zu können, ist zu fordern, daß die Reaktion (12) nicht nur stattfindet, sondern auch zum Verlust der biologischen Funktionsfähigkeit

der bestrahlten Makromoleküle führt. Es ist zwar bekannt, daß in wässrigen Lösungen durch Einwirkung von H-Atomen die Aktivität verschiedener Enzyme (Mee, Navon und Stein 1964, 1965; Holmes, Navon und Stein 1967) und die biologische Funktionsfähigkeit von T7-Phagen (Dewey und Stein 1968) verlorengehen. Außerdem konnte für trockene Systeme mit Hilfe der Elektron-Spin-Resonanz-Methode gezeigt werden, daß atomarer Wasserstoff mit Proteinen (Snipes und Schmidt 1966) sowie mit DNS und deren Bausteinen (Heller und Cole 1965; Herak und Gordy 1965, 1966a, 1966b; Holmes, Myers und Ingalls 1966; Dertinger 1967; Holmes, Ingalls und Myers 1967a, 1967b) reagiert, doch war bisher noch nicht experimentell bewiesen worden, daß eine solche Reaktion auch die spezifische Funktionsfähigkeit der betreffenden Biomoleküle zerstört. Zudem war die Frage noch ungeklärt, ob diese Reaktion mit derselben Kinetik abläuft, wie die Inaktivierung durch ionisierende Strahlen. Wäre dies nicht der Fall, so könnte bereits aus der Form der Dosis-Effekt-Kurven geschlossen werden, daß H-Atome bei der Strahleninaktivierung von trockenen Makromolekülen keinen Beitrag gemäß Gl. (12) leisten. Nachdem wir in einer in der vorliegenden Arbeit nicht näher beschriebenen Serie von Experimenten (Jung und Schüßler 1968b) den Nachweis geführt haben, daß bei Bestrahlung von trockener Ribonuclease im Vakuum, unter Sauerstoff und bei 77 °K die inaktivierten Moleküle zum überwiegenden Teil als Dimere vorliegen, wodurch Gl. (13) und/oder Gl. (14) experimentell bestätigt wurden, haben wir die hier mitgeteilten Versuche in der Absicht unternommen, die Gültigkeit der Gleichungen (11) und (12) einer experimentellen Nachprüfung zu unterziehen.

## 2. Ergebnisse

Abb. 31 zeigt eine Dosis-Effekt-Kurve für die Inaktivierung von ØX 174-DNS durch atomaren Wasserstoff. Sie ist typisch für alle hier untersuchten Objekte und für beide Methoden der H-Erzeugung. Im dargestellten Beispiel ist die Plaque-

Bildungs-Fähigkeit der  $\phi$ X-DNS als Funktion der Einwirkungszeit von Wasserstoffatomen aufgetragen, die nach Methode II (Bestrahlung von Hostaphan durch 2 MeV-Protonen) erzeugt wurden. Die Überlebensrate strebt mit zunehmender Einwirkungszeit asymptotisch einem Grenzwert zu. Dieses Verhalten rührt davon her, daß die Dicke der exponierten Proben größer ist als die Diffusionslänge der H-Atome; d.h. ein Teil des gefriergetrockneten Materials wird gar nicht von den H-Radikalen erreicht, weil sie bereits an den äußeren Schichten abreagieren. Die Größe dieses konstanten Anteils hängt von der Präparation der Proben ab und lag in den verschiedenen Experimenten zwischen 12 und 35 %. Sie wurde durch mehrere Langzeitbestrahlungen mit besonders guter Statistik ermittelt. Zieht man diesen konstanten Anteil von den Meßpunkten ab, so liegen die daraus resultierenden Punkte (vgl. Abb. 31) bei halblogarithmischer Auftragung recht gut auf einer Geraden, aus deren Steigung als Maß für die relative Empfindlichkeit die  $D_{37}$  entnommen werden kann. Ganz entsprechende Dosis-Effekt-Kurven wurden bei den Versuchen mit kurzwelligem UV-Licht und mit langsamen Protonen von 0,8 und 1 keV Energie erhalten (vgl. Kap. III. 2 und IV. 3).

Die Inaktivierung von  $\phi$ X 174-DNS nach beiden Methoden der H-Erzeugung ist in Abb. 32 dargestellt. Die Meßpunkte stammen aus mehreren unabhängigen Versuchsserien. Bei der Auftragung wurde die Zahl der nach Gefriertrocknung erhaltenen Plaques verringert um den konstanten Anteil gleich 100 % gesetzt. Die Inaktivierung erfolgt in beiden Systemen nach exponentiellen Dosis-Effekt-Kurven. Die  $D_{37}$ -Werte betragen 17 bzw. 11,3 Sekunden. Daß diese nach beiden Expositionsmethoden erhaltenen Werte von vergleichbarer Größenordnung sind, ist zufällig und somit bedeutungslos.

Abb. 33 zeigt die Inaktivierung von T1-Bakteriophagen mit normaler und mit Bromuracil-substituierter DNS durch atomaren Wasserstoff. Unabhängig davon, ob die H-Atome durch

eine Hochfrequenzentladung oder durch Bestrahlung einer Kunststoff-Folie erzeugt wurden, verläuft die Inaktivierung stets nach exponentiellen Überlebenskurven. Bemerkenswert ist der Befund, daß die Meßpunkte für T1- und BU-T1-Phagen auf einer gemeinsamen Geraden liegen; d.h. durch Einbau von Bromuracil in die DNS wird die Empfindlichkeit von T1-Phagen gegen H-Atome nicht erhöht. Die Inaktivierungskurven verlaufen etwas flacher als bei ØX-DNS; die 37 %-Werte betragen 11,3 bzw. 7,8 Sekunden.

Die Inaktivierung von Ribonuclease durch Wasserstoffatome ist aus Abb. 34 ersichtlich. Auch für RNase erhält man in System I und II nach Abzug des konstanten Anteils exponentielle Kurven, deren Neigung im Vergleich zur Inaktivierung von ØX-DNS oder T1-Phagen wesentlich geringer ist. Die 37 %-Expositionszeiten betragen 12,9 Minuten für System I und 8,5 Minuten für System II.

Vergleichende Untersuchungen mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlen ergaben unter anaeroben Bedingungen folgende 37 %-Dosen: ØX 174-DNS 320 krad (Abb. 35), T1-Phagen 320 krad und BU-T1-Phagen 145 krad (Abb. 36), Ribonuclease 42 Mrad (Abb. 26). Bei Verwendung von ultraviolettem Licht von 2537 Å Wellenlänge ist ebenfalls eine ausgeprägte BU-Sensibilisierung zu beobachten; in der ersten Inaktivierungs-Dekade ist die Empfindlichkeit von BU-T1 um etwa einen Faktor von 3 größer als die von T1-Bakteriophagen (vgl. Abb. 36).

### 3. Diskussion

Die Zusammenstellung der Dosis-Effekt-Kurven auf Abb. 36 für die Inaktivierung von T1 und BU-T1 nach verschiedenen Methoden bringt einen wichtigen Befund unserer Experimente klar zum Ausdruck, und zwar das Fehlen einer BU-Sensibilisierung bei Einwirkung von H-Atomen. Bei Inaktivierung durch Co- $\gamma$ -Strahlung ist die Empfindlichkeit von BU-T1-Phagen um einen Faktor von 2,2 größer als die von normalen T1-Phagen und bei Bestrahlung mit UV-Licht unterscheiden sich die Neigungen der beiden Inaktivierungskurven in der

ersten Dekade um einen Faktor von etwa 3. Dieser mit gefriergetrockneten Phagen erhaltene Sensibilisierungsfaktor stimmt mit dem von Hotz und Zimmer (1963) mit Phagen in 0,8 proz. NaCl gefundenen Wert überein. Im Gegensatz zu den unterschiedlichen Empfindlichkeiten gegenüber  $\gamma$ -Strahlung und UV-Licht, werden T1- und BU-T1-Phagen durch atomaren Wasserstoff mit gleicher Geschwindigkeit inaktiviert, sowohl in System I als auch bei Anwendung von Methode II. Aus diesen Befunden kann rückwärts auf die Zuverlässigkeit unserer Versuchsanordnungen geschlossen werden: Wenn bei der Einwirkung von atomarem Wasserstoff aus der Hochfrequenz-Entladung ein nennenswerter Bruchteil der Inaktivierung durch die Einwirkung von UV-Licht zustande käme, dann würde sich das durch das Auftreten einer BU-Sensibilisierung zu erkennen geben; und wenn bei Methode II rückgestreute Protonen oder Sekundärelektronen in nennenswertem Maße zur beobachteten Inaktivierung betrogen, dann sollte auch in diesem System ein BU-Effekt auftreten. Durch die identische Inaktivierungsrate von T1 und BU-T1 ist sichergestellt, daß in beiden experimentellen Anordnungen die zu messenden Wirkungen auf Wasserstoffatome zurückzuführen sind und daß ein eventueller Beitrag von UV-Licht bzw. von geladenen Teilchen innerhalb unserer Versuchsgenauigkeit liegt.

Es gibt mehrere Hypothesen, die das Ausbleiben einer BU-Sensibilisierung bei der Einwirkung von H-Atomen auf T1-Phagen zu erklären vermögen:

(1) Es ist denkbar, daß die Reaktionsfähigkeit der H-Atome so groß ist, daß sie gar nicht die Proteinhülle der Phagen durchdringen können. Die Schädigung würde unter dieser Voraussetzung dadurch zustandekommen, daß an der Proteinhülle ein Schaden (z.B. eine Radikalstelle) entsteht, der auf die DNS hinüberwandert oder zu einer Bindung zwischen Protein und DNS Veranlassung gibt, wodurch die Injektion der DNS in das Wirtsbakterium gehemmt oder unterbrochen wird. Aber auch die Beschädigung des Anheftmechanismus

würde dazu führen, daß die Plaque-Bildungsfähigkeit von T1-Phagen verlorenght. Auch Dewey und Stein (1968) führen die von ihnen gefundene Inaktivierung von T7-Phagen durch H-Atome in wässriger Lösung auf einen Schaden am Protein zurück: Durch die Einwirkung des atomaren Wasserstoffs auf die Proteinhülle der T7-Phagen wird die DNS in die Lösung entlassen, wo sie durch Angriff weiterer H-Atome zu kleineren Stücken degradiert wird, die sich mit der analytischen Ultrazentrifuge nachweisen lassen. In allen Fällen sollte man eine gleiche Empfindlichkeit von T1- und BU-T1-Phagen erwarten, die sich nur in ihrer DNS, nicht aber hinsichtlich ihrer Proteinhülle unterscheiden. Dieses Problem ist unseres Erachtens noch nicht völlig geklärt; es sollte sich aber dadurch untersuchen lassen, daß man trockene BU-DNS von ØX 174-Phagen mit atomarem Wasserstoff behandelt und ihre Empfindlichkeit mit der von normaler DNS vergleicht. Ein entsprechendes Experiment befindet sich in Vorbereitung. Leider ist es noch nicht möglich, die Empfindlichkeit von ganzen ØX 174-Phagen mit der von infektiöser ØX-DNS zu vergleichen, oder T1-Phagen mit infektiöser T1-DNS; denn ØX-Phagen werden bei Abwesenheit von organischen Substanzen während der Gefriertrocknung fast vollständig inaktiviert und der Nachweis der Infektiösität von T1-DNS ist noch nicht mit genügender Ausbeute und Genauigkeit möglich.

(2) Eine zweite Hypothese, den fehlenden BU-Effekt bei H-Einwirkung zu erklären, basiert auf der Voraussetzung, daß die H-Atome die Proteinhülle durchdringen können und durch Schädigung der DNS die Phagen inaktivieren. Wie Heller und Cole (1965) gezeigt haben, entsteht bei der Behandlung von Thymin mit atomarem Wasserstoff ausschließlich das  $C(6)$ -Anlagerungsradikal, dessen ESR-Spektrum aus acht charakteristischen Linien besteht; bei Exposition von DNS wird im wesentlichen ein zentrales Signal beim g-Faktor des freien Elektrons gefunden, das große Ähnlichkeit mit den bei Adenin, Guanin und Cytosin erhaltenen ESR-Spektren aufweist. Aus diesem Befund könnte geschlossen werden, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der H-Atome

mit Thymin kleiner ist als mit den übrigen Basen, obwohl das für die in Wasser gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten nicht zutrifft (Anbar und Neta 1965). In diesem Fall hätte die Substitution des Thymins durch Bromuracil keinen nennenswerten Einfluß auf die Gesamtreaktionsrate der DNS, doch halten wir diese Interpretation nicht für sehr wahrscheinlich.

(3) Eine dritte Erklärungsmöglichkeit geht von der Annahme aus, daß bei Einwirkung von  $\gamma$ -Strahlung und UV-Licht Energiebeträge, die beim Thymin nur zur Anregung ausreichen, in BU-DNS zur Abspaltung von Brom führen können. Dadurch würden bereits durch die primäre Energieabsorption in BU-DNS mehr Basenveränderungen pro Dosisseinheit entstehen als in Thymin-DNS. Diese Anschauung wird durch ESR-Untersuchungen von Müller, Köhnlein und Zimmer (1963) gestützt, wonach die Spinausbeute pro Dosisseinheit in Bromuracil um beinahe eine Größenordnung höher ist als beim Thymin. Außerdem ist bekannt, daß bei Röntgen- und UV-Bestrahlung von BU-DNS die Debromierung mit besonders hoher Ausbeute verläuft (Wacker, Dellweg und Weinblum 1961; Lochmann 1963).

Es ist jedoch noch nicht möglich zu entscheiden, welche der aufgeführten Erklärungen für das Ausbleiben des BU-Effektes bei H-Einwirkung zutrifft. Dies ist nicht verwunderlich; denn auch für ionisierende Strahlen und UV-Licht, die bisher in zahlreichen vergleichenden Versuchen auf Phagen mit normaler und Bromuracil-substituierter DNS angewandt wurden, liegt noch keine allgemein anerkannte Vorstellung über den Mechanismus der BU-Sensibilisierung vor. Gerade deshalb sind aber die von uns nachgewiesenen Unterschiede bei Einwirkung von atomarem Wasserstoff von großem Interesse. Denn die Gültigkeit der bisher vorliegendenwie auch künftiger Hypothesen zur Erklärung der BU-Sensibilisierung wird auch danach zu beurteilen sein, ob sie erklären können, warum zwar die Wirkungen ionisierender Strahlen und von UV-Licht durch den Einbau

von Bromuracil in die DNS beeinflusst werden können, jedoch nicht die Schädigungen durch atomaren Wasserstoff.

Um die relativen Empfindlichkeiten der verschiedenen Objekte miteinander zu vergleichen, sind in Abb. 37 unsere gesamten Resultate zusammengestellt, der Übersichtlichkeit wegen ohne Meßpunkte. Die Kurven wurden so normiert, daß sich für T1-Bakteriophagen ein Wert von  $D_{37} = 1$  ergibt. In beiden Systemen der H-Erzeugung haben BU-T1-Phagen die gleiche Empfindlichkeit wie T1-Phagen ( $D_{37} = 1$ ), während für infektiöse  $\phi$ X-DNS die relative  $D_{37}$  in System I auf 1,5 und in System II auf 1,45 beläuft. Für Ribonuclease sind die entsprechenden Werte  $D_{37} = 68$  bei Anwendung von Methode I und  $D_{37} = 65$  bei Methode II. Die gute Übereinstimmung der mit beiden Versuchsanordnungen erhaltenen Empfindlichkeiten kann dahingehend interpretiert werden, daß in beiden Systemen identische Inaktivierungsmechanismen vorliegen (vgl. Jung und Kürzinger 1968). Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis darauf, daß bei Bestrahlung organischen Materials atomarer Wasserstoff freigesetzt wird. Der Schluß auf das Vorliegen identischer Wirkungsmechanismen in System I und II wird durch einen Vergleich der Wirkung von H-Atomen mit den Resultaten unserer  $\gamma$ -Experimente weiter gestützt. Denn im Gegensatz zur H-Einwirkung findet man mit Co- $\gamma$ -Strahlung für BU-T1 eine relative  $D_{37} = 0,45$ , was einem Sensibilisierungsfaktor von 2,2 entspricht. Die relative  $D_{37}$  für die Inaktivierung von infektiöser  $\phi$ X-DNS ist mit  $D_{37} = 1$  kleiner als der mit H-Atomen erhaltene Wert. Für RNase ergibt sich eine  $D_{37} = 130$ ; das zeigt, daß im Vergleich zu T1-Phagen die RNase gegenüber atomarem Wasserstoff empfindlicher ist als gegenüber  $\gamma$ -Strahlung.

Bei anaerober  $\gamma$ -Bestrahlung von Bakteriophagen, die aus Nährbouillon (NB) eingetrocknet wurden, fanden Hotz und Zimmer (1963) für T1 eine  $D_{37} = 410$  krad und für BU-T1 eine  $D_{37} = 180$  krad. Bei unserer Probenzubereitung wurden die Phagen praktisch ohne Zusatzsubstanzen gefrieretrocknet. Die damit ermittelten 37 %-Dosen betragen 320 krad

für T1 und 145 krad für BU-T1. Durch Anwesenheit eines Überschusses von getrockneter NB tritt demnach eine Schutzwirkung auf, die allerdings in beiden Fällen mit  $p = 1,28$  bzw.  $p = 1,24$  relativ gering ist. Die gute Übereinstimmung der beiden Schutzfaktoren zeigt, daß die Größe der BU-Sensibilisierung durch die Fremdsubstanzen nicht beeinflußt wird. Im Gegensatz dazu ist die von Hotzbund Müller (1968) für NB-getrocknete  $\phi$ X-DNS erhaltene  $D_{37} = 880$  krad um einen Faktor von  $p = 2,75$  größer als der von uns an "reiner" DNS ermittelte Wert von 320 krad (vgl. Abb. 35). Das zeigt, daß DNS durch beigemischte Fremdsubstanzen wesentlich stärker geschützt wird als ganze Phagen. Ob die Proteinhülle der Phagen die Abgabe von reaktionsfähigen Bestrahlungsprodukten (H-Atome) an die Beimischungen verhindert, ob die DNS im Phagen derart stabilisiert wird, daß latente Primärschäden sich ohne Inaktivierung zurückbilden können, oder ob dieser Befund mit der Einsträngigkeit der  $\phi$ X-DNS zusammenhängt, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht entschieden werden.

## VII. Zusammenfassende Diskussion und Schlußfolgerungen

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Experimente haben gezeigt, daß Anregungen, Ionisationen, elastische Kernstöße und atomarer Wasserstoff in der Lage sind, die biologische Funktionsfähigkeit von DNS zu zerstören. Weiterhin haben sie das Resultat erbracht, daß in allen Fällen die Inaktivierung nach exponentiellen Dosis-Effekt-Kurven verläuft. Durch diesen Befund wird wahrscheinlich, daß an einer durch energiereiche Strahlen hervorgerufenen Schädigung die verschiedenen hier untersuchten Primär- und Sekundärprozesse in mehr oder minder großem Maße beteiligt sind; zumindest kann keiner dieser Prozesse auf Grund seiner Kinetik von vornherein hinsichtlich eines möglichen Beitrags ausgeschlossen werden.

Die exponentielle Inaktivierungskinetik, die der einfachen Relation  $N/N_0 = e^{-SD}$  gehorcht (vgl. Gl. (1)), impliziert, daß ein einziger "Treffer" innerhalb des DNS-Moleküls dieses inaktiviert. Damit ist noch nichts über die Wirkungswahrscheinlichkeit ausgesagt, d.h. über die Zahl von Treffern, die im Mittel pro Molekül auftreten, ehe es zur Inaktivierung kommt. Die exponentielle Dosis-Wirkungs-Beziehung impliziert ferner, daß die Verteilung der einzelnen Treffer rein statistisch ist. Diese Bedingung ist bei Verwendung von dünn ionisierender  $\gamma$ -Strahlung weitgehend erfüllt, während bei dichter ionisierenden Partikeln zwar die Bahnen der Teilchen statistisch verteilt sind, die Primärakte der Energieabgabe aber entlang dieser Bahnen erfolgen. Deshalb muß bei Partikelstrahlung noch eine weitere Bedingung erfüllt sein, und zwar, daß der mittlere Abstand der Primärionisationen entlang der Bahn groß ist gegenüber den Dimensionen der bestrahlten Objekte. Unter diesen Voraussetzungen kann die Poisson-Statistik angewandt und die Größe (oder das Molekulargewicht) des Treffbereiches aus der 37 %-Dosis ( $SD = 1$ ;  $N/N_0 = e^{-1} = 0,37$ ) und aus dem Energieaufwand pro Primärionisation berechnet werden (vgl. Zimmer 1961). Der letztere Wert beträgt in kondensierter Materie durchschnittlich etwa 60 eV; er wurde durch direkte Messung des Energieverlustes von Elektronen in Substanzen mit ähnlicher atomarer Zusammensetzung wie biologisches Material bestimmt (Rauth und Hutchinson 1962; Rauth und Simpson 1964). Dieser Wert ist wesentlich kleiner als die früher mitgeteilten Daten (Pollard und Forro 1951; Pollard et al. 1955; Sommermeyer und Philip 1959); er kann aber unter Verwendung der von Ore und Larsen (1964) angegebenen Häufigkeitsverteilung der in einem Ionencluster enthaltenen Ionenpaare bestätigt werden (Jung und Zimmer 1966).  $SD = 1$  bedeutet, daß die Zahl der inaktivierenden Ereignisse und die Zahl der zu inaktivierenden Objekte gleich sind. Die  $D_{37}$  (in eV/Gramm), dividiert durch 60 eV, ergibt die Zahl der Objekte pro Gramm, woraus leicht ihr Molekulargewicht bestimmt werden kann.

Für die verschiedenen hier untersuchten Biomoleküle wurden im Vakuum mit Co- $\gamma$ -Strahlung folgende 37 %-Dosen ermittelt:  $\phi X$  174-DNS 320 krad (vgl. Abb. 35), Ribonuclease 42 Mrad (vgl. Abb. 26), T1-Bakteriophagen 320 krad (vgl. Abb. 36). Ein Vergleich der daraus zu ermittelnden Treffbereichs-Molekulargewichten ( $MG_T$ ) mit den aus physiko-chemischen Messungen bekannten Daten ( $MG$ ) ist in Tab. 3 durchgeführt. Dabei ergibt sich für  $\phi X$ -DNS und für RNase eine ausgezeichnete Übereinstimmung zwischen beiden Werten. Das impliziert, daß im Mittel das Auftreten einer Primärionisation irgendwo innerhalb des DNS- bzw. des RNase-Moleküls dieses mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 inaktiviert. Diese Übereinstimmung zeigt, daß die der Treffbereichstheorie zugrundeliegenden Überlegungen nicht prinzipiell falsch sind; andererseits zeigt die Temperaturabhängigkeit der Inaktivierungsrate (z.B. Abb. 27 und 29), daß für die Auszeichnung der Zimmertemperatur keine Veranlassung besteht. Zieht man einen bei höheren oder tieferen Temperaturen ermittelten Inaktivierungsquerschnitt zur Berechnung der betreffenden  $MG_T$ -Werte heran, dann verschwindet die in Tabelle 3 angezeigte Übereinstimmung der Ergebnisse. Es dürfte somit durch das Zusammentreffen von mindestens zwei im Gegensatz wirkenden Mechanismen dazu kommen, daß die für Zimmertemperatur ermittelten Treffbereichs-Molekulargewichte mehr oder weniger zufällig mit den wahren Molekulargewichten übereinstimmen.

Daß nicht jedes Absorptionsereignis zur Inaktivierung führt, konnten wir durch Untersuchung der Aminosäure-Zusammensetzung von bestrahlter Ribonuclease nachweisen. Durch Chromatographie über Sephadex kann die nach Bestrahlung noch enzymatisch aktive Ribonuclease von den inaktivierten Bestrahlungsprodukten abgetrennt werden (Jung und Schüßler 1966). Unterwirft man die einzelnen Komponenten einer trocken bestrahlten RNase-Probe einer Aminosäure-Analyse, dann findet man, daß mit zunehmender Dosis sechs Aminosäuren in steigendem Maße abgebaut werden, und zwar Cystin, Methionin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und

Tabelle 3

Vergleich der aus der Strahlenempfindlichkeit berechneten Treffbereichs-Molekulargewichte ( $MG_T$ ) mit den nach physikochemischen Methoden bestimmten Molekulargewichten (MG)

	MG	$D_{37}$	$MG_T$	$MG_T/MG$
ØX-DNS	$1,7 \cdot 10^6$ (1)	320 krad	$1,8 \cdot 10^6$	1,05
RNase	13 680 (2)	42 Mrad	13 750	1,0
T1-Phagen	$31 \cdot 10^6$ (3)	320 krad	$1,8 \cdot 10^6$	0,06

(1) Sinsheimer 1959b

(2) Hirs, Moore und Stein 1960

(3) Mol. Gew. der DNS:  $31-32 \cdot 10^6$  (Bresler et al. 1967)  
 $30 \cdot 10^6$  (Bohne, Coquerelle und Hagen 1968)

Histidin (Jung und Schüßler 1968b). Dieser Abbau erfolgt sowohl in den inaktivierten Komponenten als auch in der noch aktiven RNase, d.h. nicht alle Aminosäure-Veränderungen führen zu einer Inaktivierung des RNase-Moleküls. Eingehendere Analysen haben ergeben, daß nach Zerstörung einer der genannten sechs Aminosäuren das Ribonuclease-Molekül mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,45 inaktiviert wird, während in 55 % aller Fälle die enzymatische Aktivität erhalten bleibt (Jung und Schüßler 1968b). Dieser Befund steht im Widerspruch zu den Voraussetzungen, die dem Vergleich auf Tab. 3 zugrundeliegen. Er zeigt ferner an, daß pro Primärionisation (= 60 eV) mehr als ein Molekül verändert wird. Ob diese zusätzliche Wirkung durch abgespaltene H-Atome, freigesetzte Elektronen oder Energiewandlungsprozesse zustandekommt, kann noch nicht entschieden werden. Doch beweisen unsere in Kap. VI beschriebenen Versuche, daß Wasserstoffatome an der Strahlenschädigung von Biomolekülen beteiligt sind. Diese Interpretation dürfte auch auf unsere an bestrahlter RNase beobachteten Aminosäure-Veränderungen zutreffen. Bei Einwirkung von atomarem Wasserstoff auf Ribonuclease in wässriger Lösung fanden Holmes, Navon und Stein (1967), daß mit zunehmendem Inaktivierungsgrad Cystin, Methionin, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin abgebaut werden - das sind fünf der sechs Aminosäuren, die nach unseren Messungen bei trockener Bestrahlung von RNase selektiv zerstört werden.

Wie Tab. 3 weiter zeigt, besitzen T1-Bakteriophagen auch bei Zimmertemperatur eine im Verhältnis zu ihrem DNS-Gehalt ungewöhnlich geringe Strahlenempfindlichkeit. Nur in 6 % der Fälle wird durch das Auftreten einer Primärionisation in der Phagen-DNS die Plaque-Bildungs-Fähigkeit der T1-Phagen zerstört, der überwiegende Teil der Primärschäden bleibt ohne Wirkung auf die Überlebensrate. Die Ursache für die hohe Strahlenresistenz der T1-Phagen ist in der Doppelsträngigkeit seiner DNS zu suchen, und die Zusammenstellung auf Tab. 3 weist darauf hin, daß ein Primärereignis in einem der beiden Stränge nicht ausreicht, um die

Replikationsfähigkeit von T1 zu zerstören, während ein Treffer zur Inaktivierung der einsträngigen ØX-DNS genügt. Für dieses Verhalten können drei Erklärungen angeführt werden:

(1) Nur Doppelstrangbrüche oder Schäden an gegenüberliegenden Basenpaaren zerstören die Information doppelsträngiger DNS in einem Maße, daß sie nicht mehr zur Bildung ganzer Phagen ausreicht. Diese Interpretation wird durch experimentelle Befunde von Stent und Fuerst (1955) und Freifelder (1965) gestützt. Wird in die DNS verschiedener Phagenarten radioaktiver Phosphor eingebaut, dann werden diese Phagen durch den Zerfall eines  $P^{32}$  mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,1 inaktiviert (Stent und Fuerst 1955). Dieser Befund wurde dahingehend interpretiert, daß es bei jeder Kernumwandlung des  $P^{32}$  durch den dabei entstehenden Rückstoß zu einem Bruch des Stranges kommt, in den der radioaktive Phosphor eingebaut war; doch ist dieser Schaden für den Phagen nicht letal. Wenn aber der rückgestoßene  $S^{32}$ -Tochterkern den zweiten DNS-Strang an gegenüberliegender Stelle trifft und dabei unterbricht, was möglicherweise in 10 % aller Fälle vorkommt, wird durch den dadurch entstandenen Doppelbruch der Phage inaktiviert. Freifelder (1965), der T7-Phagen in  $10^{-3}$ -molarer Histidinlösung einer Röntgen-Bestrahlung unterwarf, fand eine Proportionalität zwischen dem Prozentsatz der Doppelstrangbrüche in der Phagen-DNS und dem Anteil inaktivierter Phagen.

(2) Der überwiegende Teil der Primärschäden wird durch die Wirtszelle repariert. Es ist bekannt, daß Reparaturvorgänge unmittelbar mit der Doppelsträngigkeit der DNS verknüpft sind. Das geht z.B. aus den Experimenten von Sinsheimer und Mitarb. (1962) hervor, wonach die UV-Empfindlichkeit doppelsträngiger ØX 174-DNS, der sog. replikativen Form (RF), um einen Faktor von 10 geringer ist als die der normalen Einstrang-DNS. Bei Verwendung von Röntgen-Strahlung liegt die  $D_{37}$  für die replikative Form um einen Faktor von 2 höher als für einzelsträngige DNS

(Ginoza und Miller 1965); das bedeutet bei dem doppelten Molekulargewicht der RF, daß letztere eine viermal größere Strahlenresistenz als der Einzelstrang besitzt. Bei Einwirkung von ultraviolettem Licht wurden in zahlreichen Fällen Repair-Raten von 90 % und darüber nachgewiesen, doch konnte bisher nicht endgültig klargestellt werden, ob ein entsprechend hoher Prozentsatz der durch ionisierende Strahlung hervorgerufenen Schäden ebenfalls repariert wird. Durch Blockierung der Wirtszellreaktivierung durch Coffein oder durch UV-Bestrahlung der Wirtsbakterien konnte Sauerbier (1964b) nachweisen, daß bis zu 22 % der durch  $\gamma$ -Bestrahlung in T1-Phagen erzeugten letalen Schäden von den Bakterien repariert werden; doch könnte dieser Anteil nach Guild (1963) wesentlich höher liegen.

(3) Innerhalb der DNS gibt es eine Unterstruktur, die getroffen werden muß, um zur Inaktivierung zu führen. Eine solche kritische Struktur könnte z.B. der Teil der DNS sein, der die genetische Information für die sog. "frühen" Enzyme enthält, die für das Ingangsetzen der Phagenreplikation ausschlaggebend sind. Diese Anschauung wird durch ein Experiment von Benzer (1952) gestützt, der bei der Bestrahlung von T2-Wirts-Komplexen zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion der Bakterien feststellte, daß die Inaktivierungskurven mit der Zeit flacher werden, was auf eine abnehmende Größe des Treffbereichs hinweist, und daß stets exponentielle Kurven auftreten, was die Existenz eines einzigen strahlenempfindlichen Targets impliziert.

Trotz der großen Zahl der bis heute mit DNS und Bakteriophagen unternommenen Experimenten kann noch nicht entschieden werden, welcher der aufgeführten Mechanismen in erster Linie für die relativ hohe Strahlenresistenz der doppelsträngigen T1-Bakteriophagen verantwortlich zu machen ist. Diese Situation ist bei strahlenbiologischen Experimenten relativ häufig anzutreffen, daß zur Interpretation eines Ergebnisses zwar mehrere Hypothesen zur Diskussion stehen, die durch das Experiment erbrachte

Information zu einer eindeutigen Entscheidung aber nicht ausreicht. Es ist vorläufig noch nicht abzusehen, wann sich diese Situation grundlegend ändern wird, insbesondere deshalb nicht, weil auf diesem Forschungsgebiet die Systematisierung, das Ausarbeiten allgemeiner Vorstellungen und die Schaffung überzeugender Interpretationen mit der Anhäufung von neuen Befunden nicht Schritt hält und sich diese Tendenz in den letzten Jahren in zunehmendem Maße verstärkt.

Als vor etwa zwei Jahrzehnten die beiden Bücher von Lea (1946) und von Timoféeff-Ressovsky und Zimmer (1947) erschienen waren, hatte die Strahlenbiologie einen Stand an innerer Geschlossenheit erlangt, den sie seitdem niemals wieder erreichen konnte. Besonders das Lea'sche Modell, das damals durch seine Konsistenz und Überschaubarkeit großen Anklang fand, mußte im Verlauf der vergangenen zwei Jahrzehnte zahlreiche Korrekturen hinnehmen. Unsere Resultate lassen sehr klar erkennen, welche Einschränkungen heute an diesem Modell anzubringen sind. Die zentrale Voraussetzung der Lea'schen Konzeption beruht auf der Annahme, daß das Auftreten einer Ionisation irgendwo in einem Makromolekül oder einem Virus die Inaktivierung nach sich zieht. Nicht-ionisierenden Anregungen wurde nur eine geringe Wirkung zugeschrieben, während die übrigen Primärprozesse der Energieübertragung überhaupt nicht berücksichtigt wurden. Diese Voraussetzung beruht vor allem auf der eingangs (Kap. I. 5) erwähnten Proportionalität zwischen der Strahlenempfindlichkeit eines Virus und seiner Größe (Lea 1946), sowie auf der an vielen Biomolekülen beobachteten Übereinstimmung zwischen Treffbereichs-Molekulargewicht und wahren Molekulargewicht (Pollard 1959; vgl. auch Werte für  $\text{ØX-DNS}$  und RNase auf Tab. 3). Da die Zahl der pro Dosiseneinheit erzeugten Ionisationen von der Temperatur weitgehend unabhängig ist, sollte nach dem Lea'schen Modell die während der Bestrahlung herrschende Temperatur ohne Einfluß auf die Strahlenempfindlichkeit sein. Ebenso wenig sollte die Zumischung von Fremdstan-

zen oder die Gasatmosphäre, in der die Bestrahlung stattfindet, einen Einfluß auf die Zahl der in den bestrahlten Objekten erzeugten Ionisationen und damit auf deren Inaktivierungsrate haben.

Da man annahm, daß im Trockenen nur diejenigen Moleküle oder biologischen Objekte inaktiviert werden, die unmittelbar mit der primären oder sekundären Strahlung in Wechselwirkung treten, wurde die Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf trockene Systeme als "direkte Strahlenwirkung" (direct effect) bezeichnet. Diese Anschauung wurde ergänzt durch die Theorie der diffusiblen Agentien, wonach in wässriger Lösung durch die Bestrahlung reaktionsfähige Produkte gebildet werden, die zu den gelösten Makromolekülen diffundieren und diese inaktivieren. Dies wird als "indirekte Strahlenwirkung" bezeichnet. Obwohl schon frühzeitig auf die Problematik dieser Unterscheidung zwischen direktem und indirektem Effekt hingewiesen wurde (Zimmer 1956b), hält man bis heute daran fest. Das Lea'sche Modell ist leicht überschaubar und in sich konsistent; und das erklärt wohl den Einfluß, den es jahrzehntelang auf das Denken einer großen Zahl von Strahlenbiologen ausübte. Da auch heute noch bei Treffbereichsanalysen oftmals die Begrenzungen dieser "Theorie" unberücksichtigt bleiben, soll hier nachdrücklich darauf hingewiesen werden, daß den Voraussetzungen dieser Hypothese nicht mehr volle Gültigkeit zukommt.

Folgende Befunde dieser Arbeit stehen im Widerspruch zu den Voraussetzungen des Lea'schen Modells:

- (1) Anregungen sind zur Inaktivierung von DNS fähig (vgl. Abb. 12)
- (2) Elastische Kernstöße sind zur Inaktivierung von DNS und RNase fähig (vgl. Abb. 15 und 20). Unsere Experimente stellen einen ersten Nachweis dar für die biologische Wirksamkeit dieses Primärprozesses.

- (3) Atomarer Wasserstoff ist zur Inaktivierung von DNS, T1-Phagen und RNase fähig (vgl. Abb. 37). Auch dieser Nachweis war für biologische Objekte bisher noch nicht geführt worden.
- (4) Die Strahlenempfindlichkeit hängt von der Konzentration von Beimischungen, wie Cystamin, ab (vgl. Abb. 23).
- (5) Die Strahlenempfindlichkeit hängt von der Gasatmosphäre ab, in der die Bestrahlung stattfindet (vgl. Abb. 27).
- (6) Die Strahlenempfindlichkeit hängt von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur ab (vgl. Abb. 28).
- (7) Nicht jeder Treffer ist wirksam: Es gibt Veränderungen, wie z.B. die Zerstörung einer Aminosäure im Ribonuclease-Molekül, die nicht in jedem Fall zur Inaktivierung führen (vgl. vorangehenden Abschnitt). Unsere Messungen an trocken bestrahlter RNase (Jung und Schüßler 1968b) stellen einen ersten Nachweis dieser Art dar.
- (8) Nicht jeder Treffer ist wirksam: Es gibt Veränderungen, z.B. in T1-Bakteriophagen, die eliminiert oder repariert werden, ohne daß es zur Inaktivierung kommt (vgl. Tab. 3).
- (9) Die Unterscheidung zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung bedarf einer neuen Definition: Wie unsere Experimente zeigten (vgl. Kap. VI), sind in trocken bestrahlten Systemen zwei Schädigungsmechanismen wirksam. Ein Teil des bestrahlten Materials wird unmittelbar durch Absorption von Strahlung verändert, und es wäre vielleicht angebracht, den Begriff der "direkten Wirkung" enger zu fassen und nur auf diese Veränderungen anzuwenden; ein weiterer Teil der bestrahlten Objekte wird durch sekundäre Radikalprozesse verändert, und diese sollten eindeutig als solche gekennzeichnet werden.

Unsere Messungen geben somit neben den angeführten Ergebnissen klare Ansatzpunkte zur weiteren Bearbeitung der Frage, welche Reaktionen zwischen der Strahlenabsorption und dem Verlust der Replikationsfähigkeit der DNS ablaufen und worin sich aktive und inaktivierte Moleküle unterscheiden. Zu letzterem Punkt wurden zwar während der vergangenen Jahre zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, die das Auftreten einer Reihe von Veränderungen in bestrahlter DNS beweisen, wie Brüche in der Hauptkette, Vernetzungen innerhalb ein und desselben Moleküls bzw. zwischen zwei verschiedenen DNS-Molekülen, Basenveränderungen, Veränderungen am Zucker, usw.. Es ist noch nicht möglich, die Resultate der hier beschriebenen Experimente mit den Befunden dieser Arbeiten zu vergleichen. Dazu müssen die von den hier verwendeten Strahlenarten hervorgerufenen physikochemischen und chemischen Veränderungen an DNS ausführlicher analysiert werden. Solche Untersuchungen sollten in Zukunft jedoch möglich sein, nachdem mit der vorliegenden Arbeit die notwendigen Voraussetzungen für Experimente dieser Art geschaffen worden sind. Diese bestehen in dem Nachweis, daß es möglich ist, die verschiedenen Primärprozesse der Energieabsorption von einander zu trennen und unabhängig von einander zu untersuchen. Weiterhin zeigten die hier beschriebenen Versuche, daß sich die Wirkungen der einzelnen Primärprozesse in einigen Wesensmerkmalen unterscheiden: Bei elastischen Kernstößen gibt es z.B. weder Schutz- noch Temperatureffekt, und der Einbau von Bromuracil in die Phagen-DNS führt bei Einwirkung von H-Atomen nicht zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit; im Gegensatz dazu treten bei Verwendung von ionisierenden Strahlen Schutzeffekt, Temperatureffekt und BU-Sensibilisierung auf.

Eine Schwierigkeit tritt bei den hier beschriebenen Experimenten auf, die sich aber leider nicht umgehen läßt, und zwar durch die Tatsache, daß in allen Systemen nur sehr dünne Schichten inaktiviert werden können. Das beschränkt die Untersuchungen auf Materialmengen von maxi-

mal 0,5 Mikrogramm. Wir sind aber der Ansicht, daß sich diese technischen Schwierigkeiten lösen lassen. Beispielsweise wurden in der letzten Zeit, aufbauend auf einer Methode von Studier (1965), Mikromethoden für die analytische Ultrazentrifuge entwickelt, mit deren Hilfe Molekulargewichtsveränderungen an solch kleinen Substanzmengen bestimmt werden können (Hagen und Jung 1968). Bei Verwendung von radioaktiv markierter DNS sollte eine ganze Reihe chromatographischer Verfahren zur Untersuchung dieser kleinen Substanzmengen anwendbar sein, ebenso genetische Testmethoden, wie sie z.B. von van der Endt, Blok und Linckens (1965) bei Röntgen-bestrahlter  $\phi$ X-DNS angewandt wurden. Damit sollten sich zahlreiche interessante Probleme untersuchen lassen: (1) Beruht bei Einwirkung von atomarem Wasserstoff die Inaktivierung zu einem ähnlich großen Prozentsatz auf Strangbrüchen wie bei Anwendung ionisierender Strahlen? (2) Entstehen Doppelstrangbrüche vorzugsweise dadurch, daß Ionisationen ein und desselben Ionen-clusters in beiden Strängen an gegenüberliegenden Stellen auftreten, oder reicht bereits die Energie einer einzigen Ionisation (kurzwelliges UV) dazu aus? Da langwelliges UV-Licht bekanntlich zur Erzeugung von Doppelbrüchen eine äußerst geringe Wirksamkeit besitzt, sollten Untersuchungen mit Vakuum-Ultraviolett auch zeigen, welcher Mindestenergiebetrag für einen Doppelbruch aufzuwenden ist. (3) Beruht der an T1-Phagen zu beobachtende BU-Effekt nur auf Anregungen, etwa in der Art, daß kleine Energiebeträge Thymin-DNS nur anregen, BU-DNS dagegen irreversibel verändern (vgl. Kap. VI. 3) ? Wenn diese Voraussetzung richtig ist, dann sollte bei sehr kurzwelligem UV-Licht keine BU-Sensibilisierung auftreten. (4) Beruhen die temperaturabhängigen Komponenten (vgl. Abb. 26, 28 und 29) darauf, daß bei erhöhten Temperaturen mehr Wasserstoffatome freigesetzt werden, oder darauf, daß bei erhöhter thermischer Energie diese Radikale entweder leichter aus Potentialmulden freikommen oder/und eine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen? Untersuchungen zum Einfluß

der Temperatur auf die Empfindlichkeit von DNS und Phagen gegenüber atomarem Wasserstoff, die zur Klärung dieses Problems beitragen sollten, befinden sich in Vorbereitung. (5) Ist das mit  $\gamma$ -Strahlung für Phagen-DNS ermittelte Verhältnis von Basenveränderungen und Strangbrüchen für diese Strahlenart typisch oder gilt der gleiche Wert auch bei Einwirkung von elastischen Kernstößen und atomarem Wasserstoff? (6) Wie hängt das Verhältnis von mutierten zu inaktivierten DNS-Molekülen von der Wellenlänge des eingestrahlten UV-Lichts ab? Ist bei H-Einwirkung die relative Zahl der Mutanten größer als bei  $\gamma$ -Bestrahlung? Diese Liste, die sich selbstverständlich noch fortsetzen ließe, zeigt, daß durch die hier vorgenommene Trennung der verschiedenen Primärprozesse die Voraussetzungen für zahlreiche aufschlußreiche Experimente geschaffen wurden. Bei Energieübertragung durch definierte Primärprozesse und durch Anwendung weiterer Untersuchungsmethoden, wie sie heute in der Molekularbiologie oft verwendet werden, sollte es möglich sein, der eingangs in Kap. I. 3 aufgezeigten Entwicklung der verschiedenen Epochen der Strahlenbiologie einen weiteren Schritt, eine "molekulare Strahlenbiologie", anfügen zu können.

VIII. Literaturverzeichnis

Adams, M.H. (1959)

Bacteriophages.

Interscience Publ., New York

Adams, W.R. und E.C. Pollard (1952)

Combined thermal and primary ionization effects on a bacterial virus.

Arch. Biochem. Biophys. 36, 311-322

Ahnström, G. und L. Ehrenberg (1961)

Dosimetry of mixed neutron-gamma radiation in the Stockholm reactor R-1.

In: Selected Topics in Radiation Dosimetry S. 603-607.

Internat. Atomic Energy Agency, Vienna.

Ahnström, G., L. Ehrenberg und K.G. Zimmer (1960)

Action of slow deuterons on plexiglas.

Report to statens råd för atomforskning, Stockholm.

Anbar, M. und P. Neta (1965)

Tables of bimolecular rate constants of hydrated electrons, hydrogen atoms, and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds.

Intern. J. Appl. Rad. and Isotopes 16, 227-242

von Ardenne, M. (1962)

Tabellen zur angewandten Physik, Bd. 1, S. 200 ff.

VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin

Augenstein, L.G., T. Brustad und R. Mason (1964)

In: Advances in Radiation Biology Vol. I

(eds. L.G. Augenstein, R. Mason und H. Quastler)

S. 227-266. Academic Press, New York

Augenstein, L.G., C.A. Ghiron, K.L. Grist und R. Mason (1961)

The inactivation of trypsin by ultraviolet light.

II. The involvement of intramolecular bond disruption.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 47, 1733-1741

Augenstein, L.G. und R. Mason (1962)

The possible nature of physical mechanisms in enzyme inactivation as deduced from temperature studies.

In: Biological Effects of Ionizing Radiation at the Molecular Level, S. 227-238.

Internat. Atomic Energy Agency, Vienna

Augenstein, L.G. und R. Mason (1964)

The contribution of charge and energy migration phenomena to radiation inactivation mechanisms in enzymes.

In: Electronic Aspects of Biochemistry (ed. B. Pullman)

S. 23-28. Academic Press, New York

Bachofer, C.S., C.F. Ehret, S. Mayer und E.L. Powers (1953)

The influence of temperature upon the inactivation of a bacterial virus by X-rays.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 39, 744-750

Bacq, Z.M. und P. Alexander (1961)

Fundamentals of Radiobiology.

Pergamon Press, New York

Bardeen, C.R. (1908)

Abnormal toad and frog larvae from eggs fertilized by spermatozoa exposed to Roentgen rays.

Science 27, 953

Benzer, S. (1952)

Resistance to ultraviolet light as an index to the reproduction of bacteriophage.

J. Bacteriol. 63, 59-72

Blau, M. und K. Altenburger (1922)

Über einige Wirkungen von Strahlen II.

Z. Physik 12, 315-329

Boag, J.W. (1963)

Primary processes of deposition of radiant energy and initial biochemical events.

Am. Journ. Roentgenology 90, 896-906

- Boag, J.W. (1967)  
The events following primary activations.  
In: Radiation Research (ed. G. Silini) S. 43-53.  
North-Holland Publ. Co., Amsterdam
- Bodansky, O. und M.K. Schwartz (1961)  
Zitiert bei Jung und Schübler (1966)
- Boehm, E. und K.F. Bonhoeffer (1926)  
Über die Gasreaktionen des aktiven Wasserstoffs.  
Z. physik. Chemie 119, 385-399
- Bohne, L., T. Coquerelle und U. Hagen (1968)  
Degradierung der Desoxyribonukleinsäure in bestrahlten  
T1-Phagen.  
studies biophysica 7, 117-124
- Bohr, N. (1940)  
Scattering and stopping of fission fragments.  
Phys. Rev. 58, 654-655
- Bohr, N. (1941)  
Velocity range relation for fission fragments.  
Phys. Rev. 59, 271-275
- Bohr, N. (1948)  
The penetration of atomic particles through matter.  
Mat. Fys. Medd. Dan. Vid. Selsk. 18, No. 8
- Bonhoeffer, K.F. und P. Harteck (1928)  
Über die Reaktionen von atomarem Wasserstoff mit Kohlen-  
wasserstoffen.  
Z. physik. Chemie 139, 64-74
- ten Bosch, J.J. und R. Braams (1963)  
Zitiert bei Braams (1963)
- Braams, R. (1963)  
A mechanism for the direct action of ionizing radiations.  
Nature 200, 752-754

Brehm, B. und H. Siegert (1965)

Eine intensive  $H_2$ -Entladungslampe für das ferne Vakuum-  
Ultraviolett.

Z. angew. Phys. 19, 244-246

Bresch, C. (1952)

Unterscheidung verschiedener Bakteriophagen durch Farb-  
indikatornährböden.

Zentralbl. f. Bakteriolog. 159, 47

Bresler, S.E., N.A. Kiselev, V.F. Manjakov, M.T. Mosevitsky  
und A.L. Timkovsky (1967)

Isolation and physicochemical investigation of T1 bacterio-  
phage DNA.

Virology 33, 1-9

Brostrøm, K.J., J.K. Bøggild und T. Lauritsen (1940)

Cloud-chamber studies of fission fragment tracks.

Phys. Rev. 58, 651-653

Brustad, T. (1961)

Molecular and cellular effects of fast charged particles.

Radiat. Res. 15, 139-158

Brustad, T. (1964)

Heat as a modifying factor in enzyme inactivation by  
ionizing radiation.

In: Biological Effects of Neutron and Proton Irradiations,  
Vol. II, S. 404-410

Internat. Atomic Energy Agency, Vienna

Brustad, T. (1967)

Inactivation at various temperatures of the esterase  
activity of dried trypsin by radiations of different LET.

Radiat. Res. Suppl. 7, 74-86

Bube, R.H. und R.E. Shrader (1954)

Importance of thermal equilibrium in measurements on  
powdered insulators in vacuo.

Rev. Sci. Instr. 25, 921-922

Corson, D.R. und R.L. Thornton (1939)

Disintegration of uranium.

Phys. Rev. 55, 509

Deering, R.A. (1960)

Adsorption of ribonuclease to glass.

Archiv Mat. Nat. (Oslo) 55, Nr. 6

Denhardt, D.T. und R.L. Sinsheimer (1965a)

The process of infection with bacteriophage  $\phi$ X 174.

III. Phage maturation and lysis after synchronized infection.

J. Mol. Biol. 12, 641-646

Denhardt, D.T. und R.L. Sinsheimer (1965b)

The process of infection with bacteriophage  $\phi$ X 174.

VI. Inactivation of infected complexes by ultraviolet irradiation.

J. Mol. Biol. 12, 674-694

Dertinger, H. (1967a)

Freie Radikale in bestrahlten Einkristallen von Purin-Nucleosiden: Adenosin, Desoxyadenosin und Desoxyguanosin.

Z. Naturforschg. 22b, 1261-1266

Dertinger, H. (1967b)

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

Z. Naturforschg. 22b, 1266-1269

Dessauer, F. (1922)

Über einige Wirkungen von Strahlen I.

Z. Physik 12, 38-47

Dessauer, F. (1931)

Untersuchungen über das Grundproblem der biologischen Strahlenwirkungen.

In: Zehn Jahre Forschung auf dem physikalisch-medizinischen Grenzgebiet. G. Thieme, Leipzig

Dewey, D.L. und G. Stein (1968)  
Action of atomic hydrogen on aqueous bacteriophage T7.  
Nature 217, 351-353

Dienes, G.J. und G.H. Vineyard (1957)  
Radiation Effects in Solids.  
Interscience Publ., New York

Ellis, E.L. und M. Delbrück (1939)  
The growth of bacteriophage.  
J. Gen. Physiol. 22, 365-384

van der Ent, G.M., J. Blok und E.M. Linckens (1965)  
The induction of mutations by ionizing radiation in  
bacteriophage  $\phi$ X 174 and its purified DNA.  
Mutation Research 2, 197-204

Epstein, H.T. (1953)  
Identification of radiosensitive volume with nucleic  
acid volume.  
Nature 171, 394-395

Fano, U. (1938)  
Unveröffentlichtes Manuskript.  
Zitiert bei Zimmer 1961

Fano, U. (1952)  
Secondary electrons: Average energy loss per ionisation.  
In: Symposium on Radiobiology (ed. J.J. Nickson)  
S. 13-18. John Wiley and Sons, New York

Fano, U. (1954)  
Principles of radiological physics.  
In: Radiation Biology Vol. I, 1 (ed. A. Hollaender)  
S. 1-144. McGraw-Hill, New York

Fano, U. (1963)  
Penetration of protons, alpha particles, and mesons.  
Ann. Rev. Nucl. Science 13, 1 - 66

Fiers, W. und R.L. Sinsheimer (1962)

Structure of the DNA of bacteriophage  $\phi$ X 174.

III. Ultracentrifugal Evidence for a ring Structure.

J. Mol. Biol. 5, 424-434

Fluke, D.J. (1966)

Temperature dependence of ionizing radiation effect on dry lysozyme and ribonuclease.

Radiat. Res. 28, 677 - 693

Fluke, D.J., T. Brustad und A.C. Birge (1960)

Inactivation of dry T1 bacteriophage by helium ions, carbon ions, and oxygen ions: Comparison of effect for tracks of various ion density.

Radiat. Res. 13, 788 - 808

Fluke, D.J. und F. Forro (1960)

Efficiency of inactivation of dry T1-bacteriophage by protons, deuterons, and helium ions from a 60-inch cyclotron.

Radiat. Res. 13, 305 - 317

Franck, J. und R.L. Platzman (1954)

Physical principles underlying photochemical, radiation-chemical, and radiobiological reactions.

In: Radiation Biology, Vol. I, 1 (ed. A. Hollaender)

S. 191-253. McGraw-Hill, New York

Fraser, D. und E.A. Jerrel (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. U.S. 54, 128 - 134

Freifelder, D., A.K. Kleinschmidt und R.L. Sinsheimer (1964)

Electron microscopy of single-stranded DNA:

Circularity of DNA of bacteriophage  $\phi$ X 174.

Science 146, 254 - 255

Fricke, H. und S. Morse (1927)

Die Verwendung der Oxydation einer verdünnten Ferro-  
sulfatlösung als Eichungsmaß der Röntgenstrahlen.  
Strahlentherapie 26, 757 - 760

Gager, C.S. (1908)

Effects of the rays of radium on plants.  
Mem. New York Bot. Garden 4, 1 - 278

Ganassi, E.E., L. Ch. Ejduš und R.A. Arifulina (1964)

Beteiligung von Sauerstoff an der Strahleninaktivierung  
trockener Fermente.  
Radiobiologija 4, 41 - 46

Ginoza, W. (1963)

Radiosensitive molecular weight of single-stranded  
virus nucleic acids.  
Nature 199, 453 - 456

Ginoza, W., C.J. Hoelle, K.B. Vessey und C. Carmack (1964)

Mechanisms of inactivation of single-stranded virus  
nucleic acid by heat.  
Nature 203, 606 - 609

Ginoza, W. und R.C. Miller (1965)

Kinetics of X-ray and heat inactivation of  $\phi$ X 174 RF-DNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 551 - 558

Gordy, W., W.B. Ard und H. Shields (1955)

Microwave spectroscopy of biological substances.  
I. Paramagnetic resonance in X-irradiated amino acids  
and proteins.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 41, 983 - 996

Greiner, H. und E. Schäffer (1958)

Theorie eines Konkavgitter-Spektrometers.  
Optik 15, 51 - 62

- Günther, H.H. und K.O. Hermann (1967)  
Temperatur- und Schutzstoffeffekte bei der Inaktivierung  
von ØX 174-Phagen mit Protonen.  
Z. Naturforschg. 22b, 53 - 57
- Günther, W. und H. Jung (1967)  
Der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlich-  
keit von Ribonuclease.  
Z. Naturforschg. 22b, 313-320
- Guild, W.R. (1963)  
The radiation sensitivity of deoxyribonucleic acid.  
Radiat. Res. Suppl. 3, 257 - 269
- Guilleminot, H. (1908)  
Effects des rayons X et des rayons du radium sur la  
cellule végétale.  
J. Physiol. et Pathol. gén. 10, 1
- Guthrie, G.D. und R.L. Sinsheimer (1960)  
Infection of protoplasts of Escherichia coli by subviral  
particles of bacteriophage ØX 174.  
J. Mol. Biol. 2, 297 - 305
- Guthrie, G.D. und R.L. Sinsheimer (1963)  
Observations on the infection of bacterial protoplasts  
with the deoxyribonucleic acid of bacteriophage ØX 174.  
Biochim. Biophys. Acta 72, 290 - 297
- Hagen, U. und H. Jung (1968)  
Action of hydrogen atoms on DNA.  
6<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Radiation  
Biology, Interlaken
- Hanawalt, P.C. und R.H. Haynes (1967)  
Reparatur schadhafter Desoxyribonucleinsäure.  
Umschau 67, 553 - 559

- Hart, E.J. und R.L. Platzman (1961)  
Radiation chemistry.  
In: Mechanisms in Radiobiology, Vol. I (eds. M. Errera  
und A. Forssberg) S. 93 - 257.  
Academic Press, New York
- Haynes, R.H. (1966)  
The interpretation of microbial inactivation and  
recovery phenomena.  
Radiat. Res. Suppl. 6, 1 - 29
- Haynes, R.H., S. Wolff und J. Till (eds.) (1966)  
Structural Defects in DNA and Their Repair in Micro-  
organisms (Radiat. Res. Suppl. 6).  
Academic Press, New York
- Heitkamp, D., O. Merwitz und H. Späth (1968)  
Zur Kinetik der strahleninduzierten Wasserstoffabspaltung  
aus Thymin.  
Z. Naturforschg. 23b, im Druck
- Heller, H.C. und T. Cole (1965)  
The reaction of hydrogen atoms with thymine and DNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 1486 - 1490
- Henriksen, T. (1966)  
Effect of the irradiation temperature on the production  
of free radicals in solid biological compounds exposed  
to various ionizing radiations.  
Radiat. Res. 27, 694 - 709
- Henriksen, T. (1967)  
Free radicals induced in enzymes by electrons and  
heavy ions.  
Radiat. Res. Suppl. 7, 87 - 101
- Herak, J.N. und W. Gordy (1965)  
Free radicals formed by hydrogen atom bombardement of  
the nucleic acid bases.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 1287 - 1292

Herak, J.N. und W. Gordy (1966a)

Hydrogen addition radicals on RNA and nucleic acid bases at 77 °K.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 1373 - 1378

Herak, J.N. und W. Gordy (1966b)

ESR study of nucleosides and nucleotides bombarded with hydrogen atoms.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 56, 7 - 11

Hermann, K.O. (1966)

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

Z. Naturforschg. 21b, 678 - 682

Herriott, R.M. und J.L. Barlow (1953)

Preparation, purification, and properties of E.coli virus T2.

J. Gen. Physiol. 36, 17 - 28

Hirs, C.H.W., S. Moore und W.H. Stein (1953)

A chromatographie investigation of pancreatic ribonuclease.

J. Biol. Chem. 200, 493 - 506

Hiers, C.H.W., S. Moore und W.H. Stein (1960)

The sequence of the amino acid residues in performic acid-oxidized ribonuclease.

J. Biol. Chem. 235, 633 - 647

Holmes, B.E., G. Navon und G. Stein (1967)

Action of atomic hydrogen on ribonuclease in aqueous solution.

Nature 213, 1087 - 1091

Holmes, D.E., R.B. Ingalls und L.S. Myers (1967a)

E.S.R. spectra of free radicals induced in nucleic acid purine and pyrimidine bases and selected analogues by exposure to hydrogen atoms.

Int. J. Rad. Biol. 13, 225 - 234

Holmes, D.E., R.B. Ingalls und L.S. Myers (1967b)  
An E.S.R. study of free radicals formed by reaction of  
nucleotides and their constituents with hydrogen atoms.  
Int. J. Rad. Biol. 12, 415 - 426

Holmes, D.E., L.S. Myers und R.B. Ingalls (1966)  
Electron spin resonance technique for investigating  
reactions of free radicals with compounds of biological  
interest: Nucleic acids constituents.  
Nature 209, 1017 - 1018

Horie, T., M. Otsuka und T. Nagura (1957)  
Radiative collisions between molecular and electron  
beams. III. Angular momentum distribution of OH radicals  
liberated from alcohol molecules.  
J. Phys. Soc. Japan 12, 1099 - 1104

Hotz, G. (1963)  
Suppression by cysteamine of radiosensitization in  
5-bromodeoxyuridine.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 11, 393 - 396

Hotz, G. (1965)  
Chemische und physikalische Beeinflussung der Strahlen-  
wirkung auf Coliphagen.  
Habilitationsschrift, Technische Hochschule Karlsruhe

Hotz, G. (1966)  
Untersuchungen über den Mechanismus des Strahlenschutzes  
von Thiol- und Disulfidverbindungen am Modell biologischer  
Elementareinheiten.  
Z. Naturforschg. 21b, 148 - 152

Hotz, G. und A. Müller (1961)  
Strahlenbiologische Untersuchungen am Bakteriophagen  
ØX 174.  
Z. Naturforschg. 16b, 282 - 283

Hotz, G. und A. Müller (1968)  
The action of heat and ionizing radiation on the infectivity of isolated  $\phi$ X 174-DNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., im Druck

Hotz, G. und K.G. Zimmer (1963)  
Experiments in radiation chemistry of T1-phage.  
Int. J. Rad. Biol. 2, 75 - 86

Hutchinson, F. (1960)  
Modifying factors in the inactivation of biological macromolecules.  
Radiat. Res. Suppl. 2, 49 - 64

Hutchinson, F. und E.C. Pollard (1961)  
Physical principles of radiation action.  
In: Mechanisms in Radiobiology, Vol. I  
(eds. M. Errera und A. Forssberg) S. 1-70.  
Academic Press, New York

Ingalls, R.B., P. Spiegler und A. Norman (1964)  
Thermal-spike model of low LET radiolysis:  
Temperature dependence of reactions induced by radiolysis in liquid toluene.  
J. Chem. Phys. 41, 837 - 840

Jacobs, S.S. (1962)  
The solid state gamma irradiation of crystalline amino acids and sugars.  
Dissertation, Universtiy of Colorado

Jagger, J. und E.C. Pollard (1956)  
Inactivation with charged fast particles of infectivity and hemagglutination in influenza A virus.  
Radiat. Res. 4, 1 - 19

Johnson, C.D. und T.B. Rymer (1967)  
Existence of collective-excitation energy losses from an electron beam passing through biological materials.  
Nature 213, 1045 - 1047

Joliot, F. (1939)

Observation par la méthode de Wilson des trajectoires de brouillard des produits de l' explosion des noyaux d'uranium.

Comptes rendus 208, 647 - 649

Jordan, P. (1948)

Das Bild der modernen Physik.

Stromverlag, Hamburg

Jung, H. (1964)

Untersuchungen zur chemischen und biologischen Wirksamkeit langsamer Protonen.

Dissertation, Universität Heidelberg

Jung, H. (1965)

Zur biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße.

I. Inaktivierung von Ribonuclease durch langsame Protonen.

Z. Naturforschg. 20b, 764 - 772

Jung, H. (1966a)

Zur biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße.

II. Unbeeinflussbarkeit ihrer Wirkung auf Ribonuclease durch Cystamin und tiefe Temperaturen.

Z. Naturforschg. 21b, 1165 - 1170

Jung, H. (1966b)

Zur chemischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße

Bestrahlung von Polyäthylenterephthalat mit langsamen Protonen.

Makromol. Chemie 93, 243 - 254

Jung, H. (1967)

Effects of elastic nuclear collisions on biomolecules.

In: Radiation Research (Hrsg. G. Silini), S. 410-419.

North-Holland Publ. Co., Amsterdam

Jung, H. und K. Kürzinger (1968)

Inactivation of bacteriophage, DNA, and ribonuclease by thermal hydrogen atoms.

Radiat. Res., im Druck

- Jung, H. und H. Schüßler (1966)  
Zur Strahleninaktivierung von Ribonuclease.  
I. Auftrennung der Bestrahlungsprodukte.  
Z. Naturforschg. 21b, 224 - 231
- Jung, H. und H. Schüßler (1968a)  
Inaktivierung von Ribonuclease in wässriger Lösung.  
studia biophysica 7, 23 - 30
- Jung, H. und H. Schüßler (1968b)  
Zur Strahleninaktivierung von Ribonuclease.  
III. Aminosäure-Veränderungen nach Bestrahlung im  
Trockenen.  
Z. Naturforschg. 23b, im Druck
- Jung, H. und K.G. Zimmer (1966)  
Some chemical and biological effects of elastic nuclear  
collisions.  
In: Current Topics in Radiation Research, Vol. II.  
(eds. M. Ebert u. A. Howard), S. 69 - 127.  
North-Holland Publ. Co., Amsterdam
- Kalnitsky, G., J.P. Hummel, H. Resnick, J.R. Carter,  
L.B. Barnett und C. Dierks (1959)  
The relation of structure to enzymatic activity in  
ribonuclease.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 81, 542 - 569
- Kaplan, H.S. und L.E. Moses (1964)  
Biological complexity and radiosensitivity.  
Science 145, 21 - 25
- Keller, R. (1949)  
Etude d' une source d'ions du type Penning.  
Helv. Phys. Acta 22, 78 - 88
- Kinchin, G.H. und R.S. Pease (1955)  
The displacement of atoms in solids by radiation.  
Rept. Progr. in Phys. 18, 1

Kistemaker, J., F.J. de Heer, J. Sanders und C. Snoek (1967)  
Energy deposition in matter by slow heavy particles.  
In: Radiation Research (ed. G. Silini) S. 68 - 95  
North-Holland Publ. Co., Amsterdam

Klein, S. und J.W. Preiss (1958)  
Depth controlled deuteron irradiation of *lactuca sativa*  
seeds. I. Effects on germination and growth.  
Plant Physiol. 33, 321 - 325

Korogodin, V.I. (1966)  
Probleme der Wiederherstellung nach Bestrahlung.  
Atomverlag, Moskau

Kühn, H. (1960a)  
Zur Inaktivierung von Milchsäure-Dehydrogenase mit  
langsamen Protonen.  
Z. Naturforschg. 15b, 277 - 284

Kühn, H. (1960b)  
Nachtrag zu der Arbeit "Zur Inaktivierung von Milch-  
säure-Dehydrogenase mit langsamen Protonen".  
Z. Naturforschg. 15b, 626

Kürzinger, K. und H. Jung (1968a)  
Strahleninaktivierung von Ribonuclease bei erhöhten  
Temperaturen und unterschiedlichen Dosisraten.  
Z. Naturforschg. 23b, im Druck

Kürzinger, K. und H. Jung (1968b)  
Zur biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße.  
III. Inaktivierung von  $\text{O}^17\text{X}$  174-DNS durch langsame Protonen.  
Manuskript in Vorbereitung

Lea, D.E. (1946)  
Actions of Radiations on Living Cells.  
University Press, Cambridge

Lindhard, J., V. Nielsen, M. Scharff und P.V. Thomsen (1963)  
Integral equations governing radiation effects.  
Mat. Fys. Medd. Dan. Vid. Selsk. 33, No. 10

Lindhard, J. und M. Scharff (1961)  
Energy dissipation by ions in the keV region.  
Phys. Rev. 124, 128 - 130

Lindhard, J., M. Scharff und H.E. Schiøtt (1963)  
Range concepts and heavy ions ranges.  
Mat. Fys. Medd. Dan. Vid. Selsk. 33, No. 14

Lochmann, E.R. (1963)  
Die Umwandlung von 5-Bromuracil-2-<sup>14</sup>C durch Röntgenstrahlen in vitro und in vivo.  
Naturwiss. 50, 520 - 521

Marmur, J. und P. Doty (1962)  
Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature.  
J. Mol. Biol. 5, 109 - 118

McCrea, J.F., J.W. Preiss und J. O'Loughlin (1960)  
Physical studies on pox viruses. I. Inactivation of vaccina virus infectivity with low-energy electrons.  
Biophys. J. 1, 43 - 53

McLaren, A.D. (1949)  
Photochemistry of enzymes, proteins, and viruses.  
Adv. in Enzymology 9, 76 - 170

Mee, L.K., G. Navon und G. Stein (1964)  
Inactivation of chymotrypsin in aqueous solution by atomic hydrogen.  
Nature 204, 1056 - 1057

Mee, L.K., G. Navon und G. Stein (1965)  
The action of atomic hydrogen on trypsin in aqueous solution.  
Biochim. Biophys. Acta 104, 151 - 159

Merwitz, O. (1967)

Die Wasserstoffabspaltung aus  $\gamma$ -bestrahltem  $^3\text{H}$ -Thymin  
und  $^3\text{H}$ -Uracil.

Dissertation, Universität Karlsruhe

Molière, G. (1948)

Theorie der Streuung schneller geladener Teilchen.

II. Mehrfach- und Vielfachstreuung.

Z. Naturforschg. 3a, 78 - 97

Müller, A. und H. Dertinger (1968)

Die Erzeugung atomaren Wasserstoffs in  $\gamma$ -bestrahlten  
Bakteriophagen und deren DNS.

Z. Naturforschg. 23b, 83-89

Müller, A., W. Köhnlein und K.G. Zimmer (1963)

X-ray induced unpaired spins in nucleic acid bases and  
in 5-bromouracil.

J. Mol. Biol. 7, 92 - 94

Mullaney, P.F. und J.W. Preiss (1966)

The effects of damaged protein on the light-scattering  
properties of RNA solutions: A comparison of thermal  
and radiation effects.

Radiat. Res. 27, 582 - 596

Neufeld, J. und W.S. Snyder (1961)

Estimates of energy dissipation by heavy charged particles  
in tissue.

In: Selected Topics in Radiation Dosimetry,

S. 35 - 44. Internat. Atomic Energy Agency, Vienna

Nielsen, K.O. (1956)

The range of atomic particles with energies of about  
50 keV.

In: Electromagnetically Enriched Isotopes and Mass  
Spectrometry (ed. M.L. Smith) S. 68 - 81

Butterworth Scientific Publ., London

Norman, A. und P. Spiegler (1962)

Thermal spikes in protein.

J. Appl. Phys. 32, 2658

Ore, A. (1967)

The role of multiple ionization in radiation action.

In: Radiation Research (ed. G. Silini) S. 54 - 67.

North-Holland Publ. Co., Amsterdam

Ore, A. und A. Larsen (1964)

Relative frequencies of ion clusters containing various numbers of ion pairs.

Radiat. Res. 21, 331 - 338

Patten, R.A. und W. Gordy (1964)

Electron spin resonance investigations of radiation-induced free radicals in DNA and RNA at low temperatures.

Nature 201, 361 - 363

Pauly, H. (1966)

Temperaturabhängigkeit und Aktivierungsenergie bei der direkten Strahlenwirkung.

Biophysik 3, 40 - 43

Person, S. (1956)

Inactivation Studies of Enzymes and *B. subtilis* Spores Using Low Energy Protons.

Dissertation, Yale University

Person, S., F. Hutchinson und D. Marvin (1963)

Range of low-energy protons in protein.

Radiat. Res. 18, 397 - 406

Platzman, R.L. (1952)

On the primary processes in radiation chemistry and biology. In: Symposium on Radiobiology (ed. J.J. Nickson)

S. 97 - 116. John Wiley and Sons, New York

Platzman, R.L. (1958)

The physical and chemical basis of mechanisms in radiation biology. In: Radiation Biology and Medicine (ed. W.D.Claus) S. 15 - 72. Addison-Wesley Press, Reading, Mass.

Platzman, R.L. (1962a)

Superexcited states of molecules and the primary action of ionizing radiation.

The Vortex 23, 372 - 385

Platzman, R.L. (1962b)

Superexcited states of molecules.

Radiat. Res. 17, 419 - 425

Platzman, R.L. (1967)

Energy spectrum of primary activations in the action of ionizing radiation.

In: Radiation Research (ed. G. Silini) S. 20 - 42

North-Holland Publ. Co., Amsterdam

Pollard, E.C. (1959)

Radiation inactivation of enzymes, nucleic acids, and phage particles.

Rev. Mod. Phys. 31, 273 - 281

Pollard, E.C. und F. Forro (1951)

The inactivation of bacteriophage by ionizing radiation.

Arch. Biochem. Biophys. 32, 256 - 273

Pollard, E.C., W.R. Guild, F. Hutchinson und R.B. Setlow (1955)

The direct action of ionizing radiation on enzymes and antigens.

Progr. in Biophys. and Biophys. Chem. 5, 72 - 108

Pollard, E.C., W.F. Powell und S.H. Reaume (1952)

The physical inactivation of invertase.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 38, 173 - 180

Pollard, E.C. und M. Reaume (1951)

Thermal inactivation of bacterial viruses.

Arch. Biochem. Biophys. 32, 278 - 287

Powers, E.L. (1962)

Consideration on survival curves and target theory.

Phys. Med. Biol. 7, 3 - 28

Preiss, J.W. und E.G. Pollard (1961)

Localization of  $\beta$ -galactosidase in cells of Escherichia coli by low voltage electron bombardment.

Biophys. J. 1, 429 - 435

Preiss, J.W. und R.B. Setlow (1956)

Spectra of some amino acids, peptides, nucleic acids, and protein in the vacuum ultraviolet.

J. Chem. Phys. 25, 138 - 141

Pruden, B., W. Snipes und W. Gordy (1965)

Electron spin resonance of an irradiated single crystal of thymidine.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 53, 917 - 924

Rauth, A.M. und F. Hutchinson (1962)

Distribution in energy of the primary energy loss events of electrons in condensed media.

In: Biological Effects of Ionizing Radiation at the Molecular Level, S. 25 - 36.

Internat. Atomic Energy Agency, Vienna

Rauth, A.M. und J.A. Simpson (1964)

The energy loss of electrons in solids.

Radiat. Res. 22, 643 - 661

Regaud, C. und G. Dubreuil (1908)

Perturbations dans le développement des oeufs fécondés par des spermatozides roentgenisés chez le lapin.

Compt. Rend. Soc. Biol. 64, 1014

Riehl, N. (1956)

Einige Wirkungen des radioaktiven Rückstoßes.

Atomkernenergie 1, 297 - 300

Rowlands, J.R. und D.H. Whiffen (1963)

Zitiert bei Braams (1963)

Rupley, J.A. und H.A. Scheraga (1963)

Structural studies of ribonuclease.

VII. Chymotryptic hydrolysis of ribonuclease A at elevated temperatures.

Biochemistry 2, 421 - 431

Sauerbier, W. (1964a)

Host cell reactivation of ØX 174 at intracellular UV irradiation.

Z. Vererbungsl. 95, 145 - 149

Sauerbier, W. (1964b)

Host cell reactivation of gamma-rayed T1.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 17, 46 - 50

Schambra, P.E. und F. Hutchinson (1964)

The action of fast heavy ions on biological material.

II. Effects on T1 and ØX 174 bacteriophage and double-strand and single-strand DNA.

Radiat. Res. 23, 514 - 526

Schüßler, H. und H. Jung (1967)

Zur Strahleninaktivierung von Ribonuclease.

II. Aminosäure-Zusammensetzung der Bestrahlungsprodukte.

Z. Naturforschg. 22b, 614 - 621

Schüßler, H. und H. Jung (1968)

Strahleninduzierte Aggregation und die Rolle der Disulfidbrücken bei der Inaktivierung von Ribonuclease in wässriger Lösung.

In: Molekulare Struktur und Strahlenwirkung (Hrsg.

S. Glubrecht). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, im Druck

Seitz, F. (1949)

On the disordering of solids by action of fast massive particles.

Disc. Faraday Soc. 5, 271 - 282

Semjonow, N.N. (1961)

Einige Probleme der chemischen Kinetik und Reaktionsfähigkeit. Akademie-Verlag, Berlin

- Setlow, R.B. (1952)  
The radiation sensitivity of catalase as a function of temperature.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 38, 166 - 172
- Setlow, R.B. (1960)  
Ultraviolet wave-length-dependent effects on proteins and nucleic acids.  
Radiat. Res. Suppl. 2, 276 - 289
- Setlow, R.B. und R. Boyce (1960)  
The ultraviolet light inactivation of  $\phi$ X 174 bacteriophage at different wavelengths and pH's.  
Biophys. J. 1, 29 - 41
- Setlow, R.B. und B. Doyle (1953)  
The effect of light of wavelength 2537 Å on proteins and nucleic acid at low temperatures.  
Bicchim. Biophys. Acta 12, 508 - 514
- Setlow, R.B., L. Silverman und G. Watts (1958)  
Zitiert bei Setlow (1960)
- Setlow, R.B., G. Watts und C. Douglas (1959)  
Inactivation of proteins by vacuum ultraviolet radiation.  
In: Proceedings of the First National Biophysics Conference, S. 174 - 183.  
Yale University Press, New Haven, Connecticut
- Seya, M. (1952)  
A new mounting of concave grating suitable for a spectrometer.  
Science of Light (Tokio) 2, 8 - 17
- Shalek, R. (1961)  
Zitiert bei Augenstein und Mason (1962)
- Shapira, R. (1959)  
Adsorption of ribonuclease on glass.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1, 236 - 237

Sinsheimer, R.L. (1959a)

Purification and properties of bacteriophage  $\phi$ X 174.

J. Mol. Biol. 1, 37 - 42

Sinsheimer, R.L. (1959b)

A single-stranded deoxyribonucleic acid from bacteriophage  $\phi$ X 174.

J. Mol. Biol. 1, 43 - 53

Sinsheimer, R.L., B. Starman, C. Nagler und S. Guthrie (1962)

The process of infection with bacteriophage  $\phi$ X 174.

I. Evidence for a "replicative form".

J. Mol. Biol. 4, 142 - 180

Smith, K.C. (1964)

Photochemistry of the nucleic acids.

In: Photophysiology (A.C. Giese, ed.), Vol. 2, 329-388.

Academic Press, New York

Smith, K.C. (1966)

Physical and chemical changes induced in nucleic acids by ultraviolet light.

Radiat. Res. Suppl. 6, 54 - 79

Snipes, W. and J. Schmidt (1966)

Free radical formation in amino acids exposed to thermal hydrogen atoms.

Radiat. Res. 29, 194 - 202

Snyder, W.S. und J. Neufeld (1957)

On the passage of heavy particles through tissue.

Radiat. Res. 6, 67 - 78

Sommermeier, K. und K. Philipp (1959)

Die Bedeutung und Berechnung der primären Ionisationen in der Treffertheorie.

Z. Naturforschg. 14b, 33 - 37

Sommermeyer, K., J. Stegle und G.H. Schnepel (1967)  
Zur Deutung der Abhängigkeit der Spinkonzentration von  
der Strahlendosis in kristallisierten Aminosäuren.  
Atompraxis 13, 20 - 24

Sparrow, A.H., A.G. Underbrink und R.C. Sparrow (1967)  
Chromosomes and cellular radiosensitivity.  
I. The relationship of  $D_0$  to chromosome volume and  
complexity in seventy-nine different organisms.  
Radiat. Res. 32, 915 - 945

Stahl, F.W., J.M. Craseman, L. Okun, E. Fox und  
C. Laird (1961)  
Radiation sensitivity of bacteriophage containing  
5-bromodeoxyuridine.  
Virology 13, 98 - 104

Steacy, E.W.R. (1954)  
Atomic and Free Radical Reactions, Vol. II, 2<sup>nd</sup> edition.  
Reinhold Publ. Co., New York

Stent, G.S. und C.R. Fuerst (1955)  
Inactivation of bacteriophages by decay of incorporated  
radioactive phosphorus.  
J. Gen. Physiol. 38, 441 - 458

Studier, F.W. (1965)  
Sedimentation studies of the size and shape of DNA.  
J. Mol. Biol. 11, 373 - 390

Svedberg, T. und S. Brohult (1939)  
Splitting of protein molecules by ultra-violet light  
and  $\alpha$ -rays.  
Nature 143, 938 - 939

Swallow, A.J. (1960)  
Radiation Chemistry of Organic Compounds.  
Pergamon Press, Oxford

Terzi, M. (1961)

Comparative analysis of inactivating efficiency of radiation on different organisms.

Nature 191, 461 - 462

Terzi, M. (1965)

Radiosensitivity and genetic complexity.

J. Theoret. Biol. 8, 233 - 243

Thomson, D.H. und K. Stratton (1965)

Radiation induced inactivation of ribonuclease.

Radiat. Res. 25, 247

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

Biophysik I: Das Trefferprinzip in der Biologie.

S. Hirzel-Verlag, Leipzig

Uenzelmann, J. (1968)

Einfluß physikalischer und chemischer Parameter auf die Strahlenempfindlichkeit von T1-Phagen.

Dissertation, Universität Heidelberg

Vollmer, R.T. und D.J. Fluke (1967)

Temperature dependence of ionizing radiation effect on dry hyaluronidase.

Radiat. Res. 31, 867 - 875

Wacker, A. (1963)

Molecular mechanisms of radiation effects.

Progr. Nucleic Acid Res. 1, 369 - 399

Wacker, A., H. Dellweg, L. Träger, A. Kornhauser,

E. Lodemann, G. Türck, R. Selzer, P. Chandra und

M. Ishimoto (1964)

Organic photochemistry of nucleic acids.

Photochem. and Photobiol. 3, 369 - 394

Wacker, A., H. Dellweg und D. Weinblum (1961)

Über die strahlensensibilisierende Wirkung des 5-Bromuracils.

J. Mol. Biol. 3, 787 - 789

Watanabe, K. und E.C.Y. Inn (1953)

Intensity measurements in the vacuum ultraviolet.

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

Webb, R.B., C.F. Ehret und E.L. Powers (1958)

A study on the temperature dependence of radiation sensitivity of dry spores of *Bacillus Megaterium* between 5 °K and 309 °K.

Experientia [Basel] 14, 324 - 326

Wilson, D. und E.C. Pollard (1958)

Radiation studies on the infective property of Newcastle disease virus.

Radiat. Res. 8, 131 - 141

Winkler, U., H.E. Johns und E. Kellenberger (1962)

Comparative study of some properties of bacteriophage T4D irradiated with monochromatic ultraviolet light.

Virology 18, 343 - 358

Yarus, M. und R.L. Sinsheimer (1964)

The u.v. resistance of double-stranded  $\phi$ X 174 DNA.

J. Mol. Biol. 8, 614 - 615

Zimmer, K.G. (1943a)

Ergebnisse und Grenzen der treffertheoretischen Deutung von strahlenbiologischen Dosis-Effekt-Kurven.

Biol. Zbl. 63, 42 - 107

Zimmer, K.G. (1943b)

Statistische Ultramikrometrie mit Röntgen-, Alpha- und Neutronenstrahlung.

Physikal. Z. 44, 233 - 243

Zimmer, K.G. (1956a)

Probleme der Neutronendosimetrie.

Strahlentherapie 101, 143 - 151

Zimmer, K.G. (1956b)

Diskussionsbemerkung.

In: Advances in Radiobiology (eds. G.C. de Hevesy, A.G. Forssberg und J.D. Abbatt) S. 13.

Oliver and Boyd, Edinburgh / London

Zimmer, K.G. (1958)

Entwicklung und Stand der Hypothesenbildung in der quantitativen Strahlenbiologie.

Naturwiss. 45, 325 - 327

Zimmer, K.G. (1960)

The development and prospects of quantitative radiobiology.

In: Immediate and Low Level Effects of Ionizing Radiations (ed. A.A. Buzzati-Traverso) S. 1 - 9. Taylor and Francis, London.

Zimmer, K.G. (1961)

Studies on Quantitative Radiation Biology.

Oliver and Boyd, Edinburgh / London

Zimmer, K.G. (1967)

Entwicklung und einige aktuelle Probleme der molekularen Strahlenbiologie.

Strahlentherapie 137, 161 - 174

Zimmer, K.G., L. Ehrenberg und A. Ehrenberg (1957)

Nachweis langlebiger magnetischer Zentren in bestrahlten biologischen Medien und deren Bedeutung für die Strahlenbiologie.

Strahlentherapie 103, 3 - 15

Zimmer, K.G. und A. Müller (1965)

New light on radiation biology from electron spin resonance studies.

In: Current Topics in Radiation Research Vol. I (eds. M. Ebert and A. Howard) S. 1 - 47.

North-Holland Publ. Co., Amsterdam

IX. Abbildungen

Abb. 1: Die zeitlichen Phasen der Strahlenwirkung

# Die zeitlichen Phasen der Strahlenwirkung

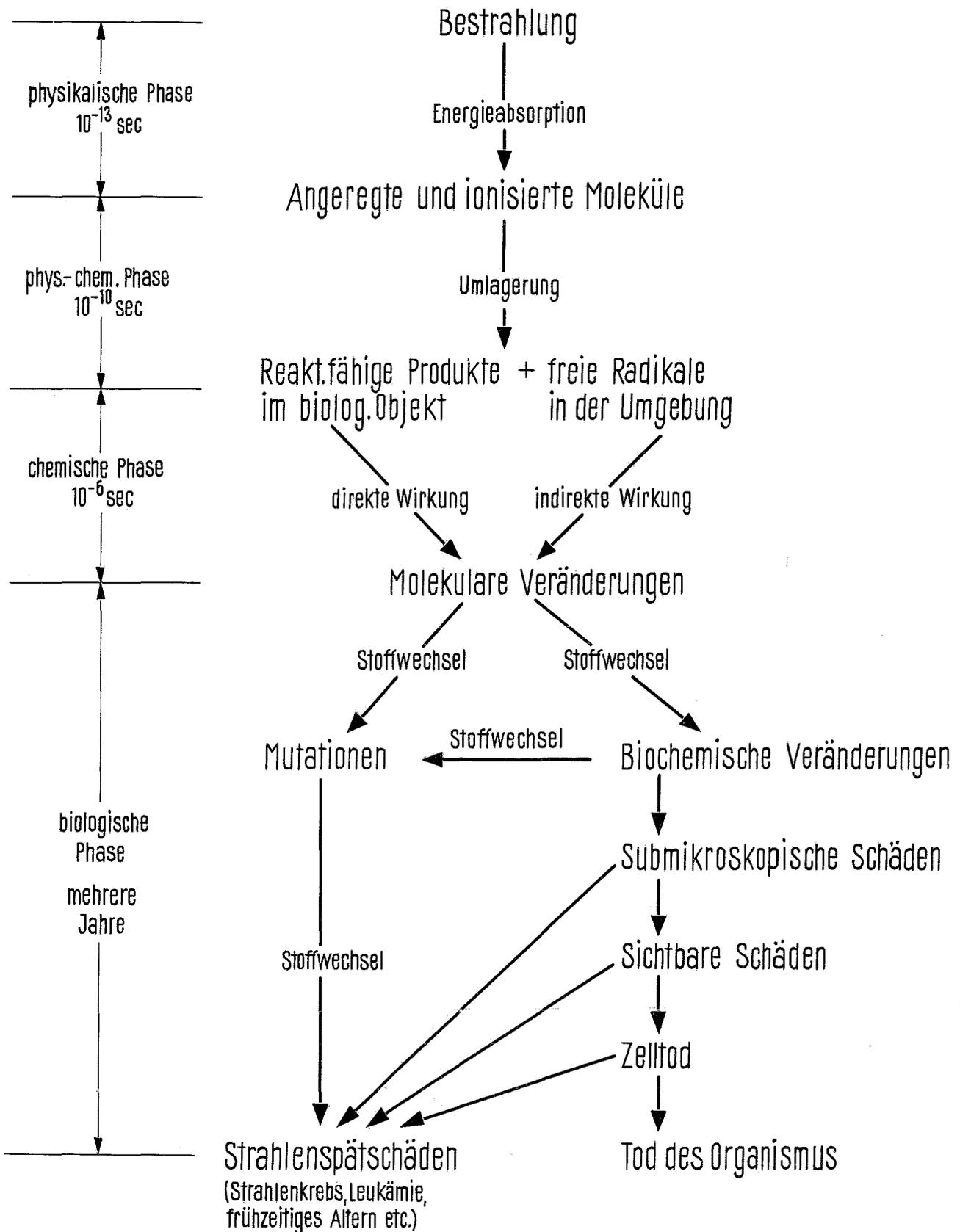


Abb. 2: Einfluß der verschiedenen modifizierenden Faktoren auf die Entwicklung eines Strahlenschadens

*Schema der Entwicklung des Strahlenschadens von Zellen vom Moment der Verwirklichung von Treffereignissen bis zur Manifestation einer "Einheit der Reaktion"*

*Aus V.I.Korogodin: "Problemy Postradiatsionnogo Vosstanovleniya" Atomizdat, Moskva 1966*

<i>Entwicklungsphasen des Strahlenschadens</i>	<i>Reaktionstyp</i>	<i>Modifizierende Faktoren</i>
<p><i>Treffereignisse</i> (Energieabsorption im "empfindlichen Volumen")</p> <p>↓</p> <p><i>Primärschädigung der "reagierenden Einheiten"</i></p> <p>↓</p> <p><i>Potentielle Schäden</i></p> <p>↓</p> <p><i>Realisierung potentieller Schäden</i></p> <p>↓</p> <p><i>Registrierbare "Einheit der Reaktion"</i> (Manifestation potentieller Schäden)</p>	<p><i>Verschiedene Formen der Energiewanderung: physikalische, physikochemische, Diffusion von Radikalen und andere</i></p> <p><i>Physikochemische oder chemische Prozesse der "Schadensentwicklung" oder "Reversion" teilweise geschädigter elementarer Strukturen</i></p> <p><i>Abänderung spezifischer biochemischer Prozesse, im Zusammenhang mit geschädigten elementaren Strukturen. (Biosynthese von Eiweißen? Nucleinsäuren? Übermolekularen Strukturen?)</i></p> <p><i>Abänderung, unspezifischer biochemischer Prozesse, die zu Störungen im mikro- und makroskopischen Niveau führen</i></p>	<p><i>LET, Zeitfaktor, Anwesenheit von Sauerstoff und chemischen Strahlenschutzmitteln, Temperatur, Phasenzustand</i></p> <p><i>Temperatur, Sauerstoff, Wasser, verschiedene chemische Agentien</i></p> <p><i>Intensivierung oder Dämpfung des Energiestoffwechsels, Hemmung oder Beschleunigung der Zellteilung und anderer Faktoren, die auf die Wiederherstellung einwirken</i></p> <p><i>Vorliegen- im Substrat- von Faktoren, die Störungen kompensieren: Vitamine, Aminosäuren; "Kompensations-Therapie"</i></p>

Abb. 3: Aufbau des Vakuum-UV-Monochromators  
(halbschematisch)

$B_1, B_2 =$  Blenden

$P_1, P_2, P_3 =$  Diffusionspumpen

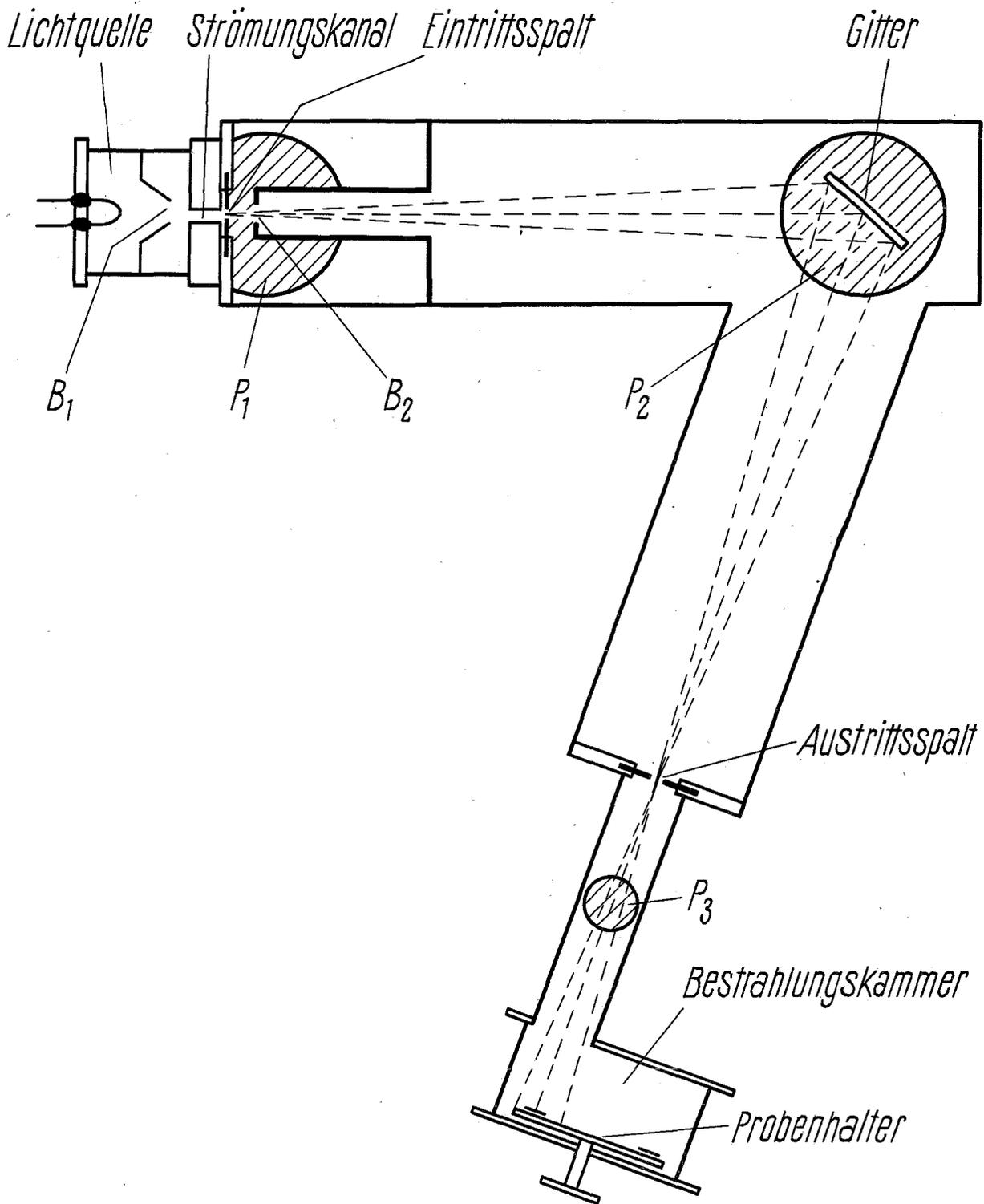


Abb. 4: Aufbau des Protonenbeschleunigers (halbschematisch).  $\bar{U}$  = Beschleunigungsspannung, T = Trenntransformator, C = Coronaschutz, I<sub>q</sub> = Ionenquelle, R = Reihenwiderstand, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = Beschleunigungsröhren, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> = Blenden, F = Federbalg, M = Trennmagnet, Str = Protonenstrahl, S = Schieberventil, K = Bestrahlungskammer, FB = Faraday-Becher, A = Nanoampèremeter, P 15 = Pumpstand

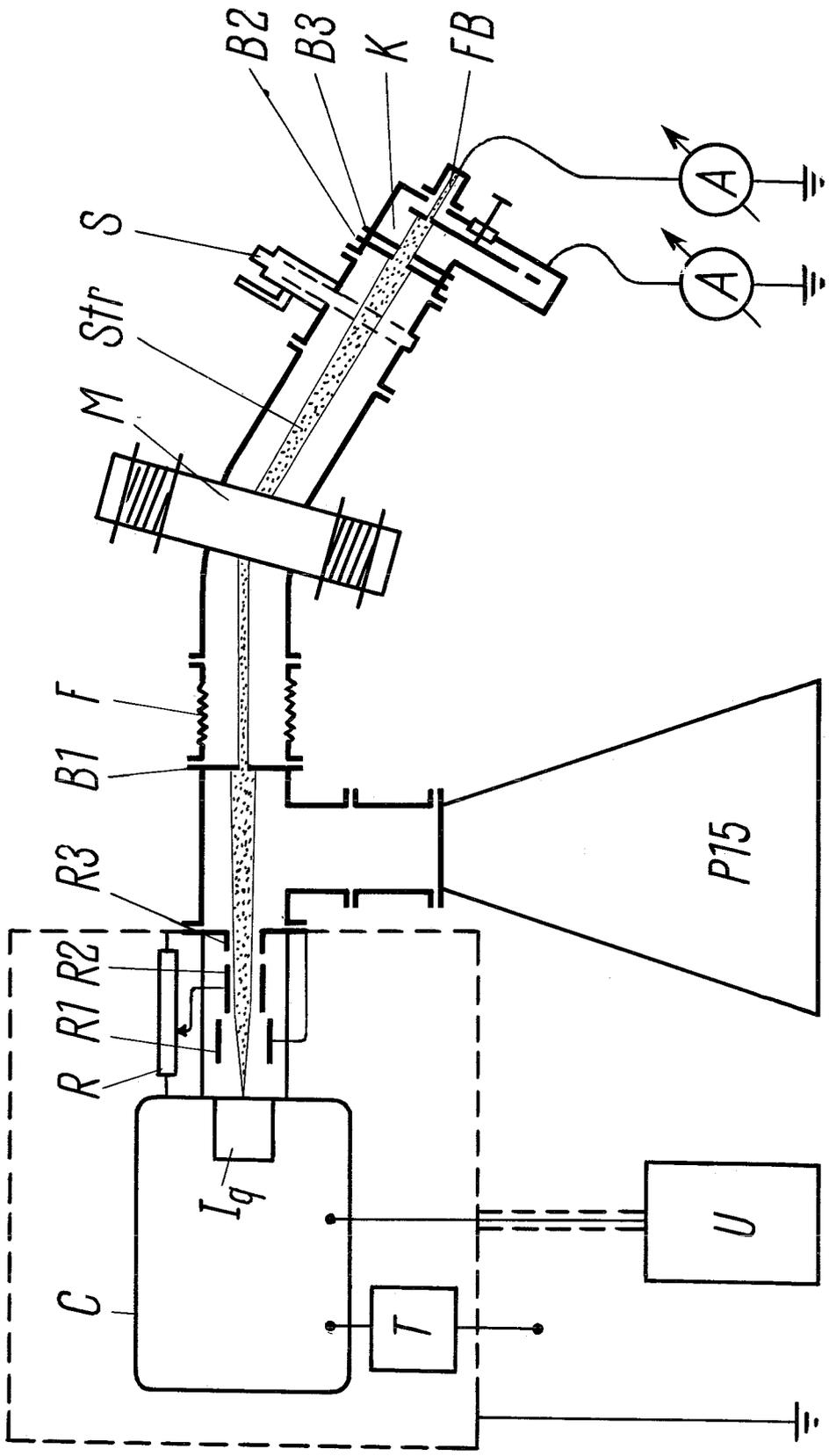


Abb. 5: Bestrahlungskammer (halbschematisch).  $B_2$ ,  $B_3$  =  
Blenden, FB = Faraday-Becher, M = Magnetfeld,  
D = Drehdurchführung, P = Positionsanzeige,  
Dr = Drehknopf, BP = Bestrahlungsplatte, HP =  
Halterung für die zu bestrahlenden Proben,  
HK = Halterung für die Kontrollproben, Str =  
Protonenstrahl

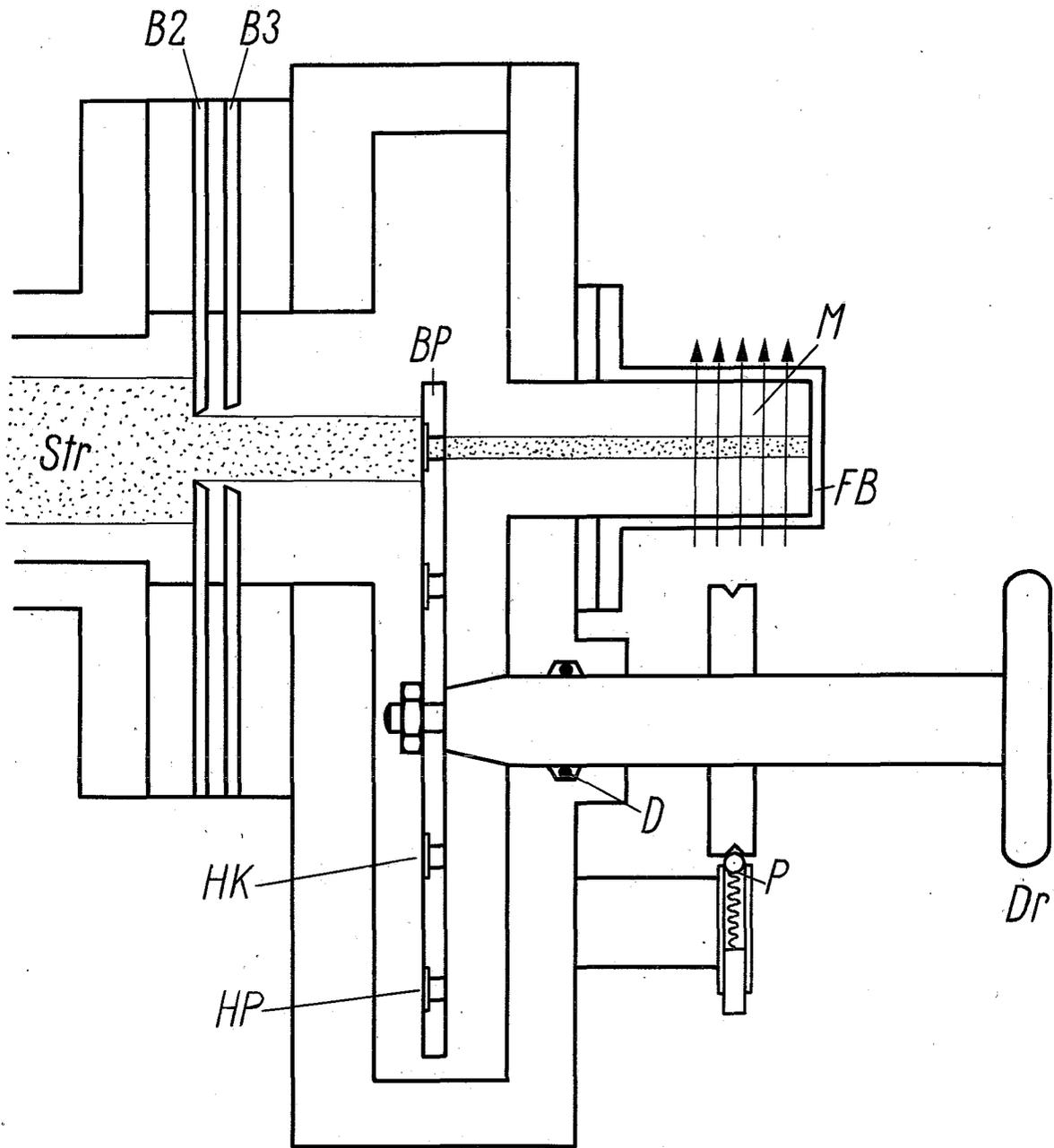


Abb. 6: Bestrahlungskammer für Tieftemperaturversuche.  
B = Eintrittsblenden, D = Probenhalter, E =  
Kühlmitteleinlaß, F = Absaugstutzen, K = Kühl-  
falle, P = Proben, R = Abdeckplatte, S = Strahl-  
achse, T = Thermoelement

-  V2A
-  Messing
-  Aluminium
-  Teflon
-  PVC

10cm

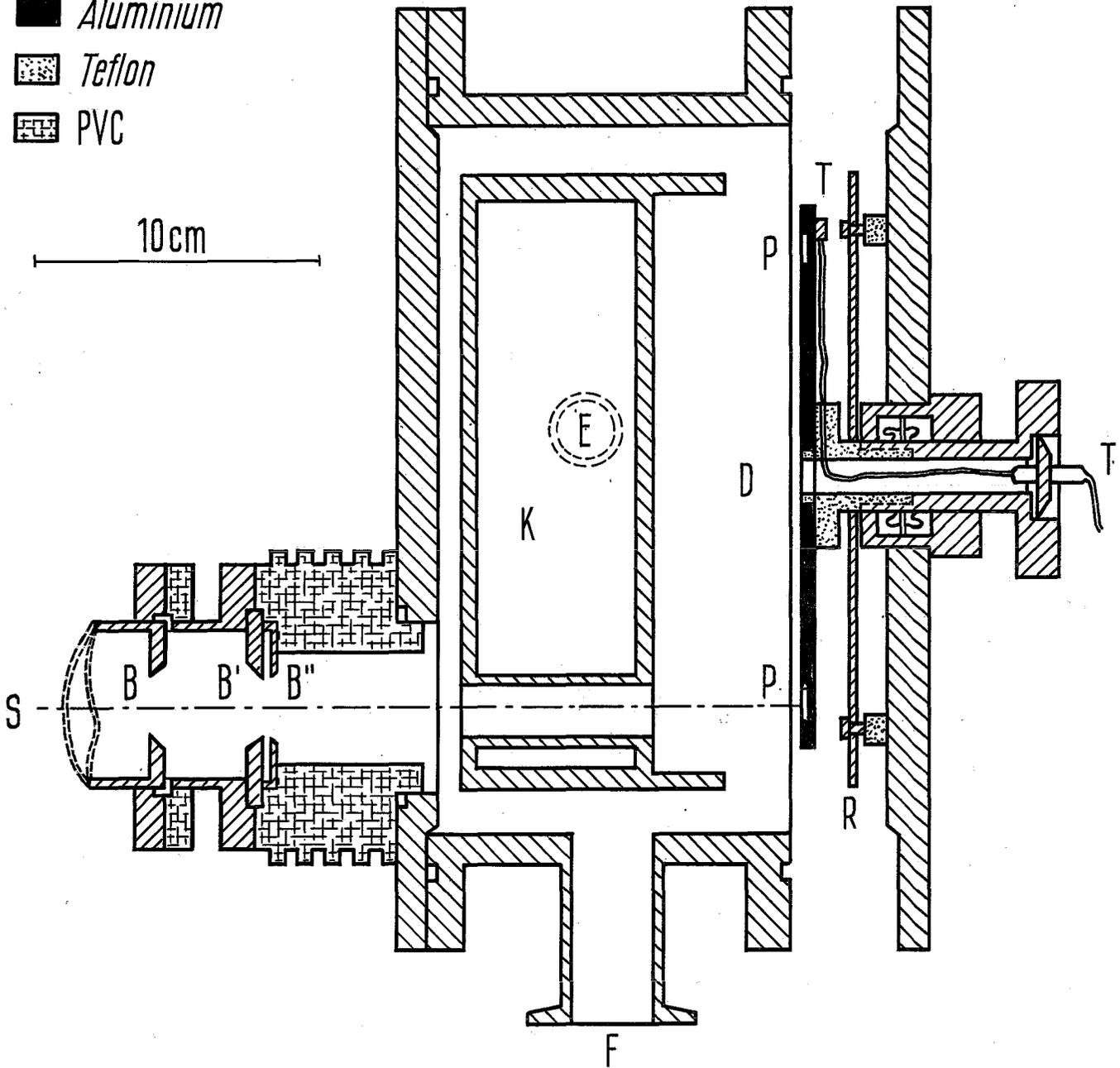
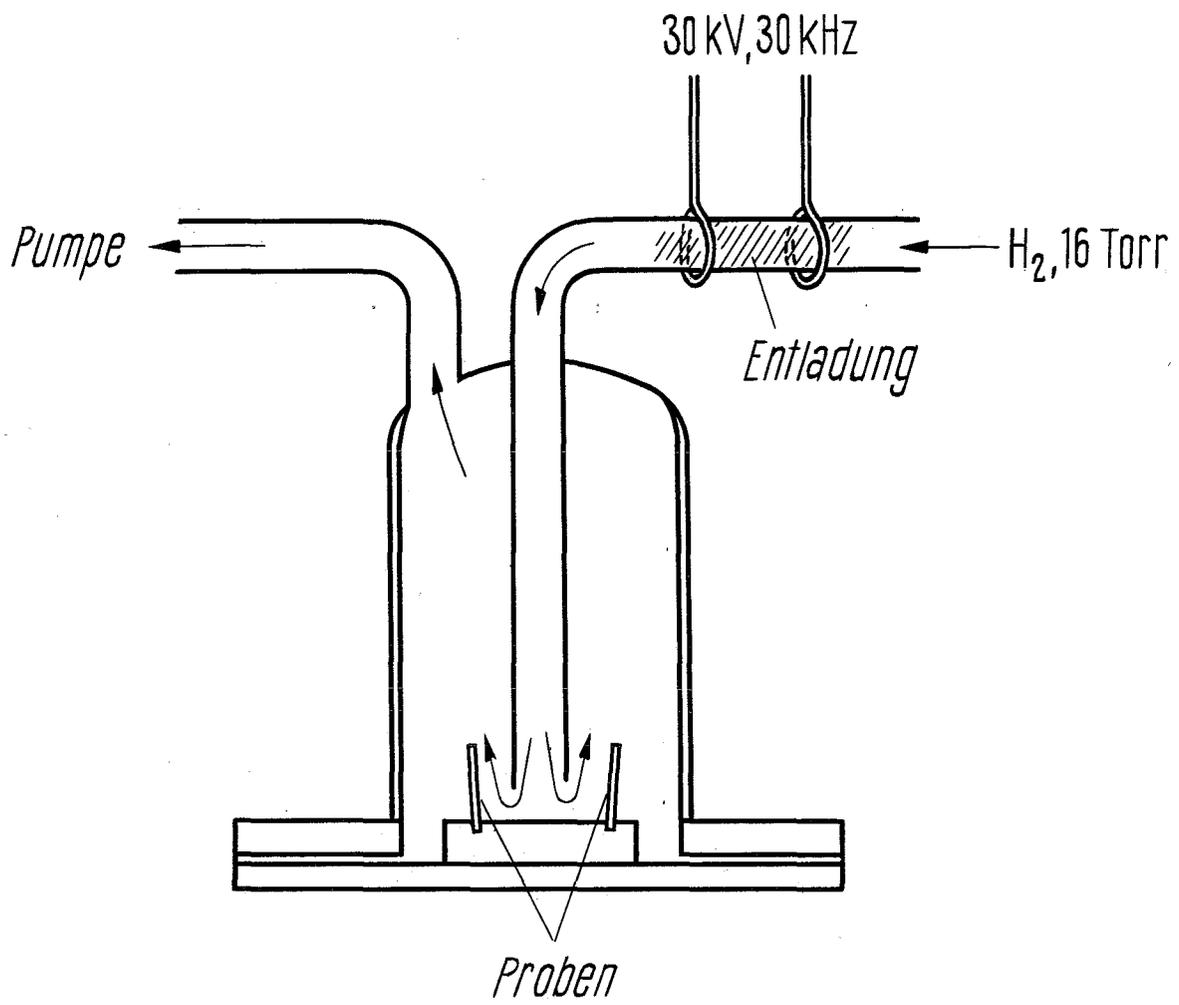


Abb. 7: Erzeugung von atomarem Wasserstoff in einer  
Hochfrequenz-Gasentladung (System I)



0 1 2 3 cm

Abb. 8: Erzeugung von atomarem Wasserstoff durch Bestrahlung einer Folie aus Polyäthylenterephthalat (Hostaphan) mit 2 MeV-Protonen (System II)

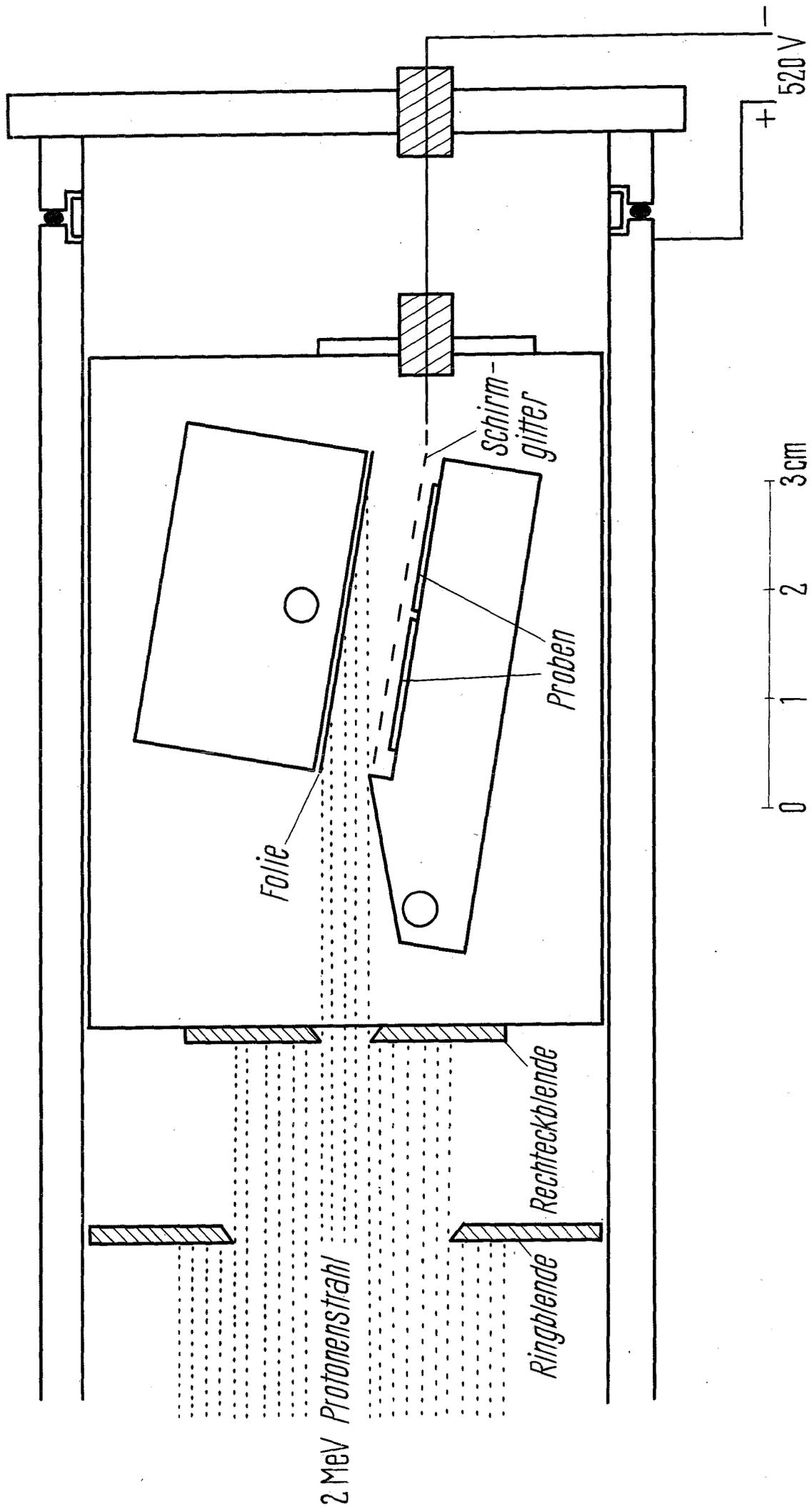


Abb. 9: Kalibrierungskurve für den Nachweis infektiöser ØX 174-DNS. Die Zahl der infektiösen Zentren pro Milliliter zu Ende der Infektionsperiode (= Plaque-Titer) ist aufgetragen als Funktion der relativen DNS-Konzentration

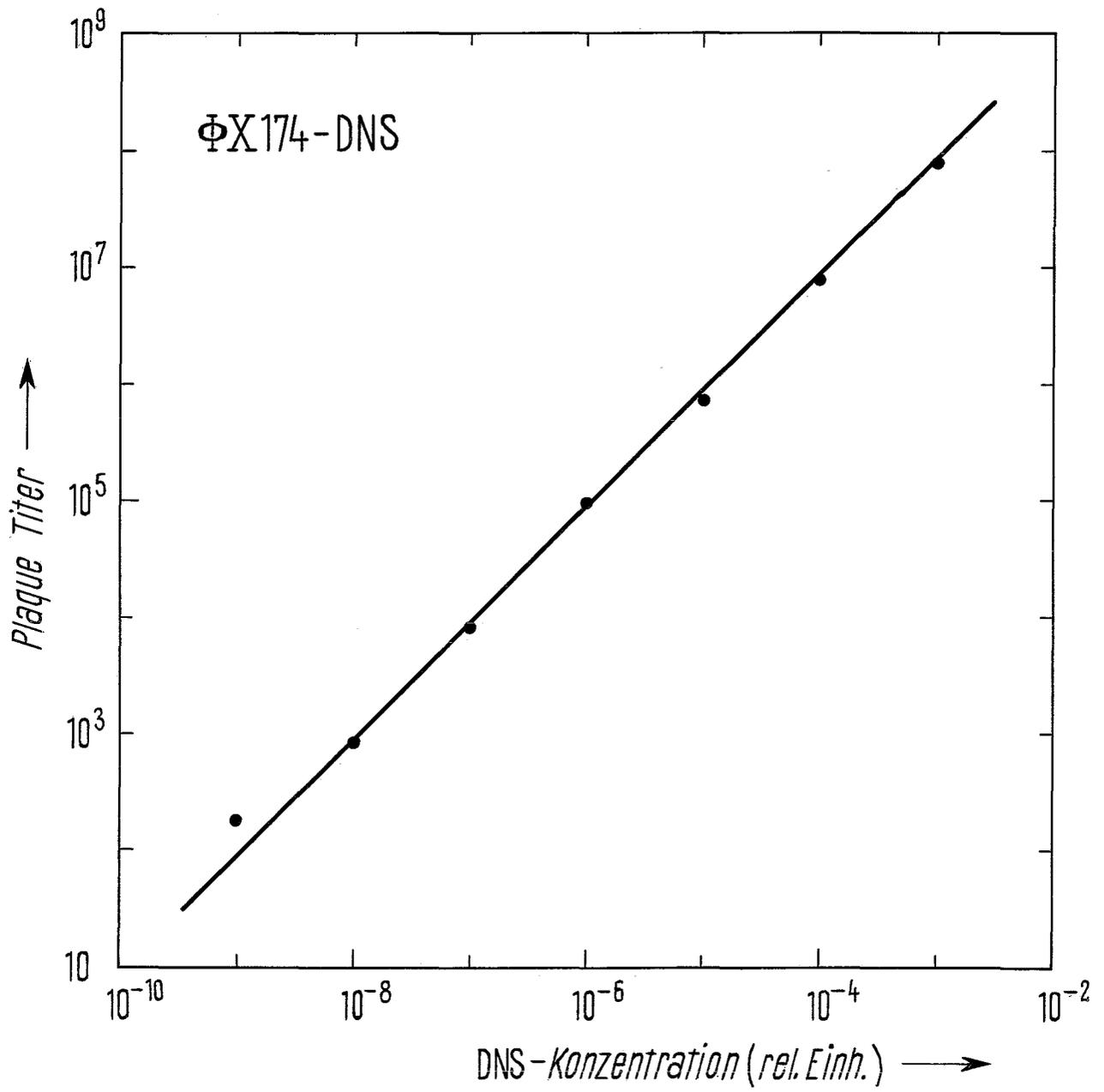


Abb. 10: Kalibrierungskurve für den RNase-Nachweis.  
Links: Extinktion bei 260 m $\mu$  in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zwischen 1  $\mu$ g Ribonuclease und 1 ml RNS-Substratlösung. Rechts: Extinktion bei 260 m $\mu$  in Abhängigkeit von der verwendeten Ribonuclease-Menge bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten

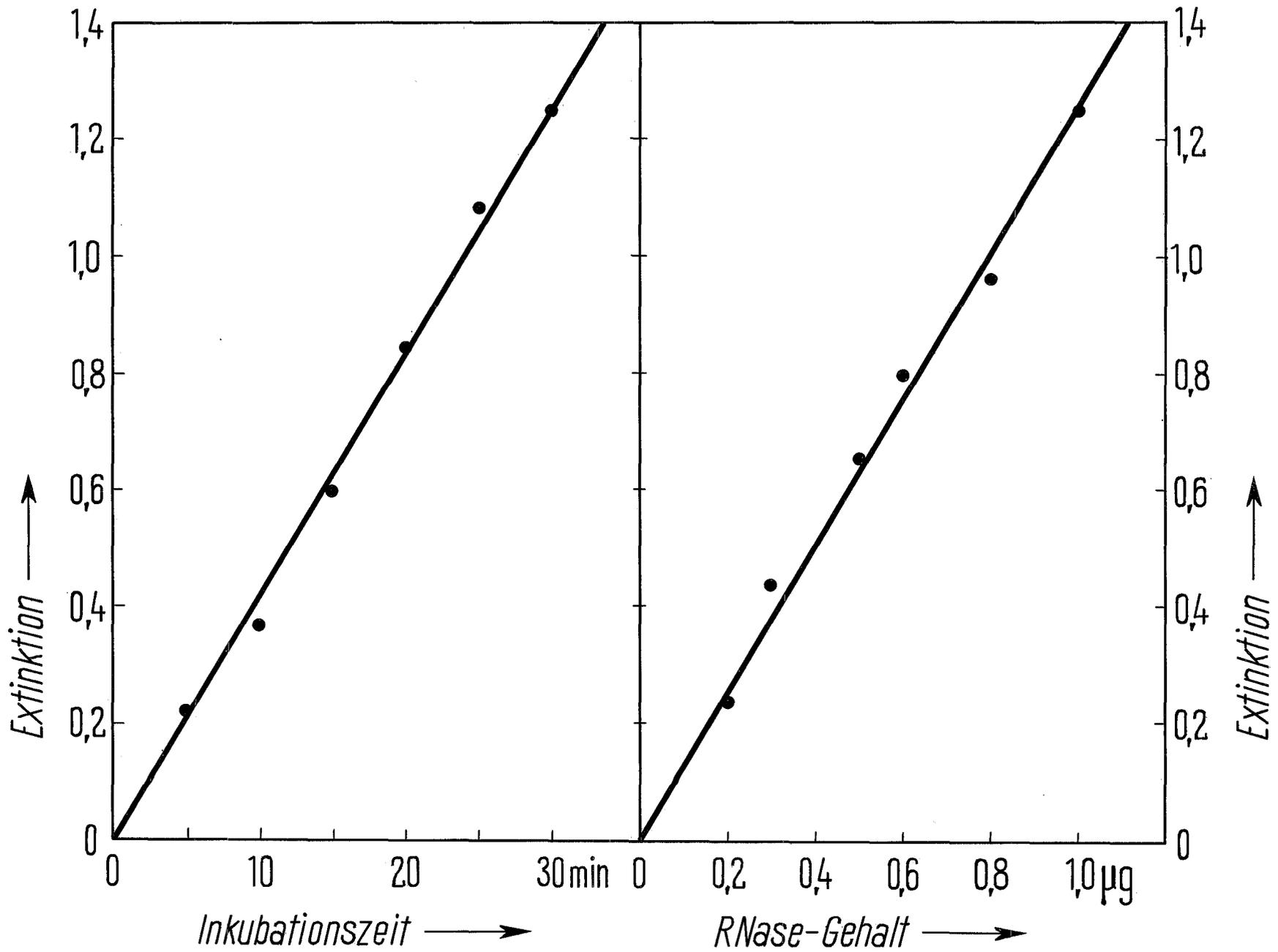


Abb. 11: Inaktivierung von infektiöser ØX 174-DNS  
durch Vakuum-UV-Licht bei verschiedenen  
Wellenlängen

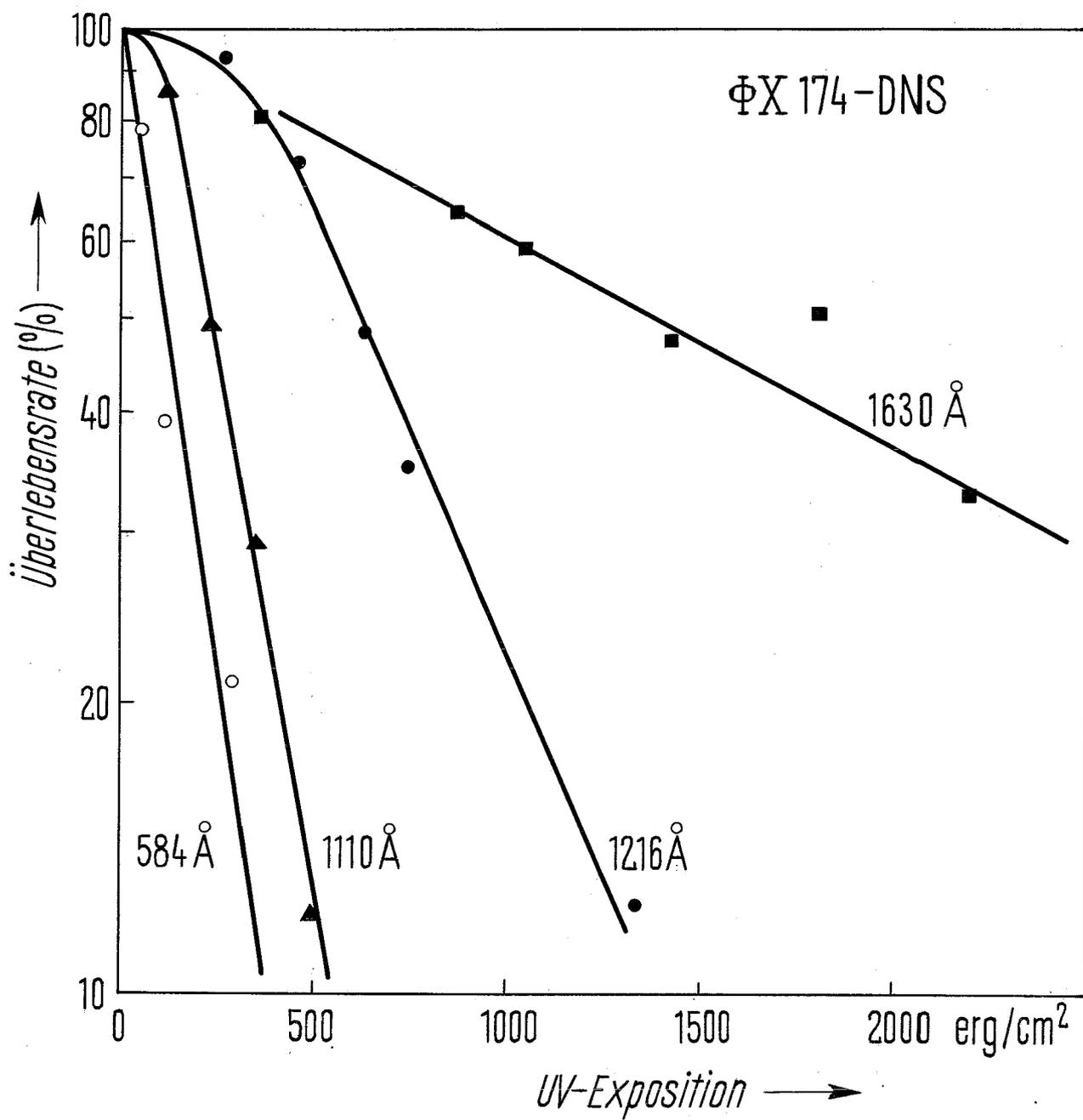


Abb. 12: Wirkungsquerschnitt für die Inaktivierung von  $\text{ØX 174-DNS}$  (●) und relative Elektronenemission (x) als Funktion der Quantenenergie des einstrahlten Vakuum-Ultraviolett

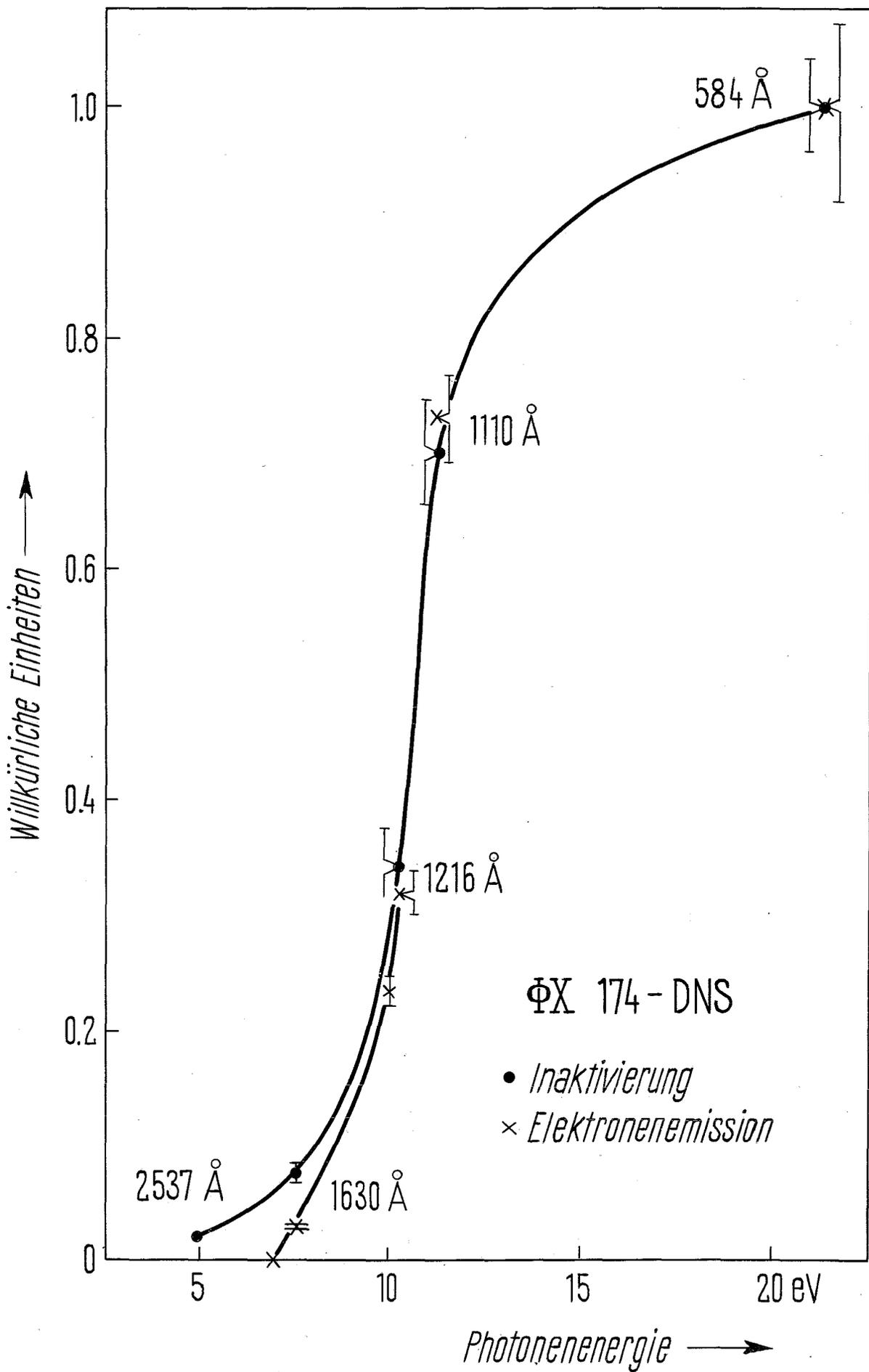


Abb. 13: Wirkungsquerschnitte für Elektronenwechselwirkung ( $\sigma_e$ ) bzw. für elastische Kernstöße ( $\sigma_n$ ) von Protonen in Gewebe (Neufeld und Snyder 1961)

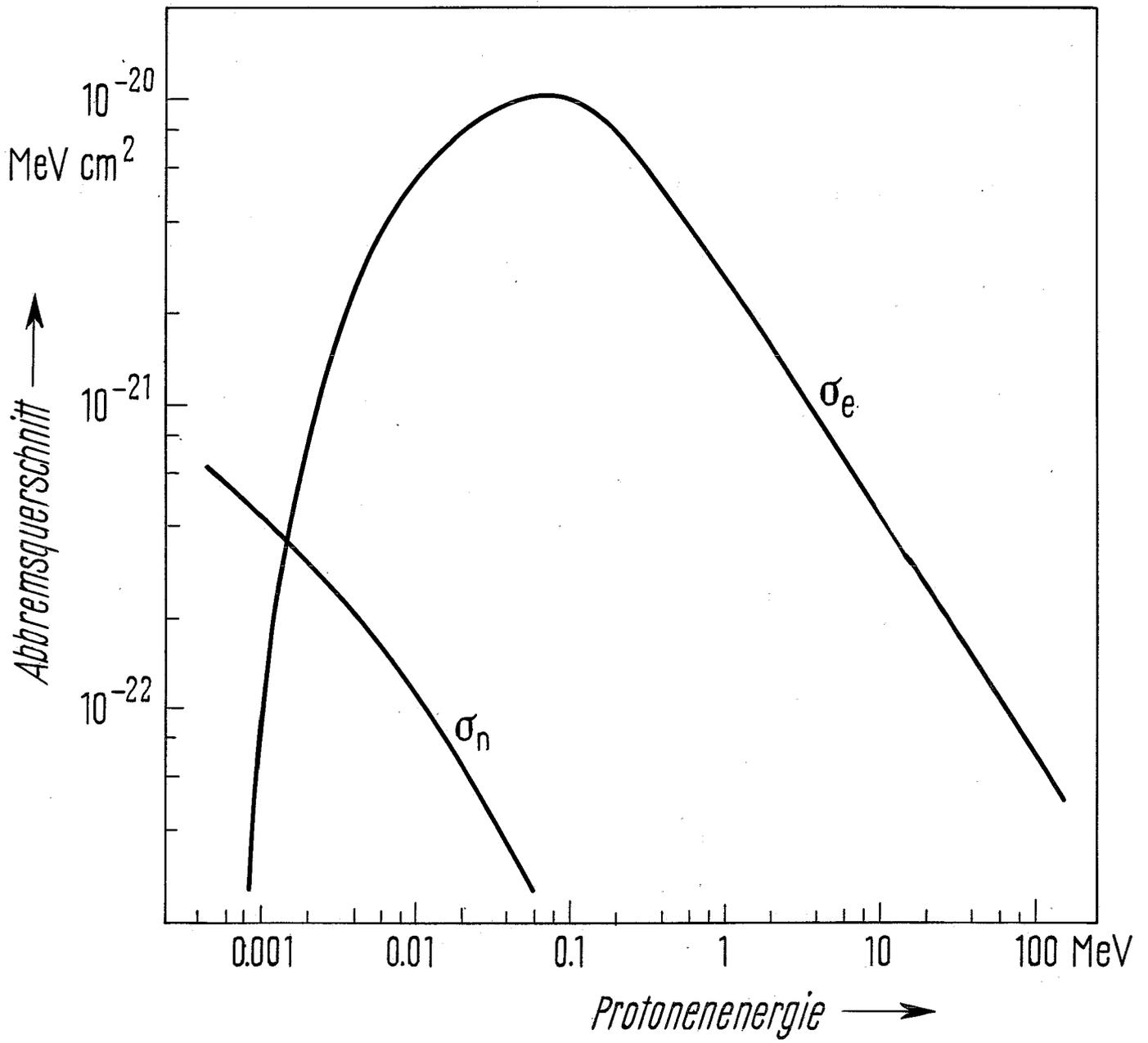


Abb. 14: Inaktivierung von  $\text{OX 174-DNS}$  durch Protonen  
von 0,8, 1,2 und 35 keV Energie

ΦX 174-DNS

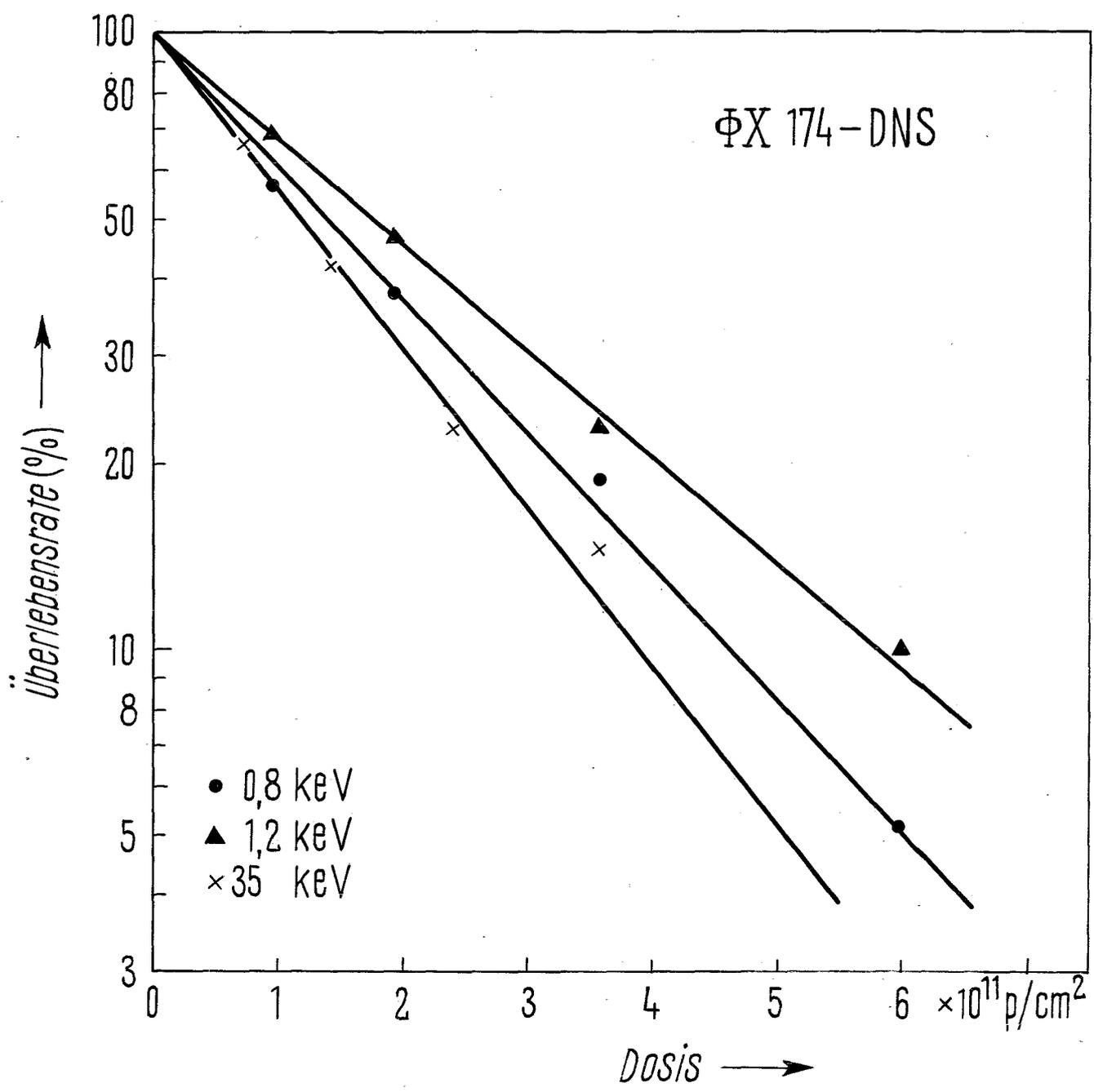


Abb. 15: Verlauf des Wirkungsquerschnitts für die Inaktivierung von  $\text{O}^17\text{X}$ -DNS in Abhängigkeit von der Energie der eingestrahnten Protonen

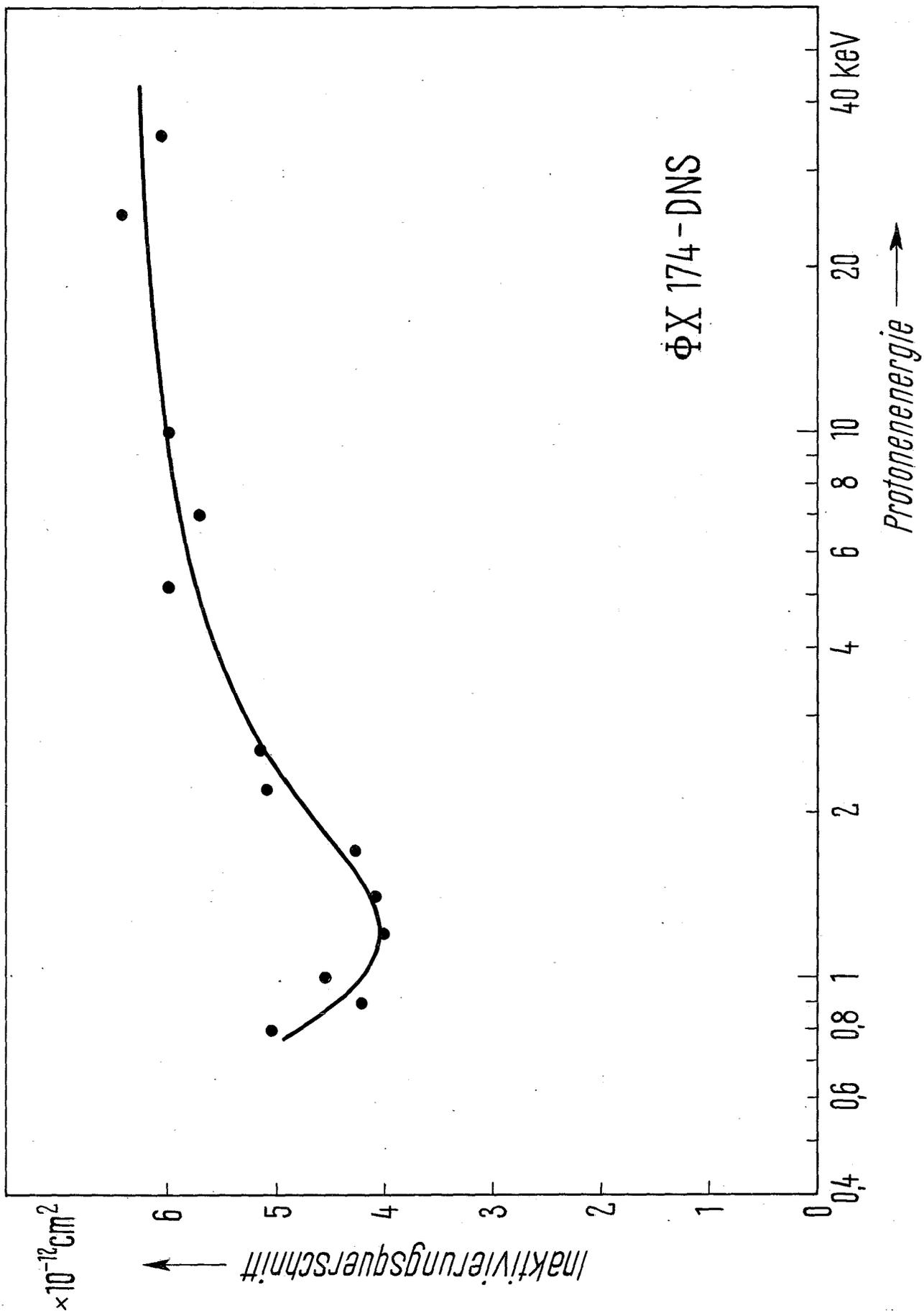


Abb. 16: Untere Kurve: Inaktivierung von 0,5  $\mu\text{g}$  Ribonuclease durch 0,8 keV-Protonen. Obere Kurve: Verlauf der Inaktivierungskurve nach Abzug des konstanten "unzerstörbaren" Anteils (---)

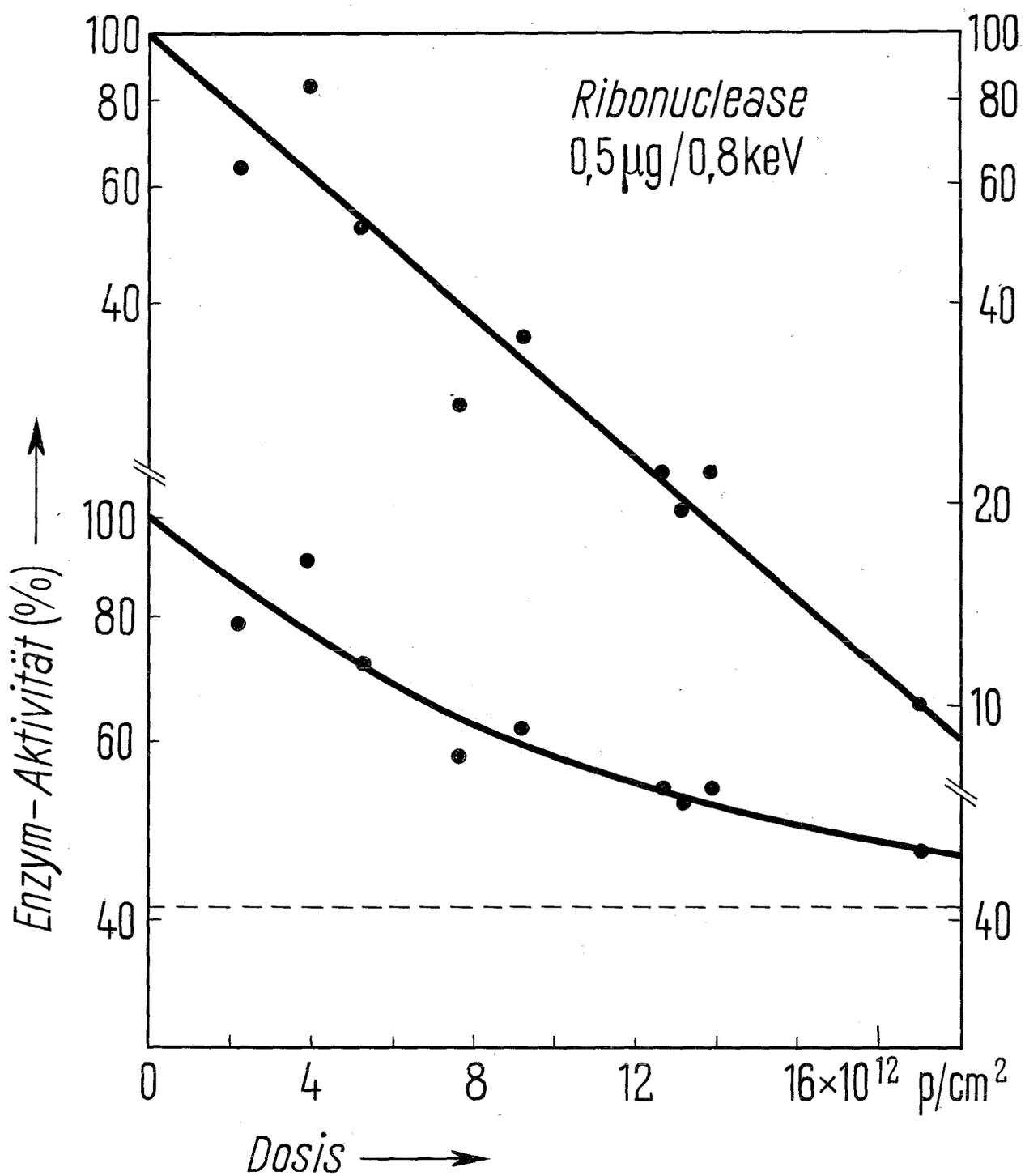


Abb. 17: Inaktivierung von Ribonuclease mit 1,2 keV-  
Protonen bei Verwendung von 0,5  $\mu\text{g}$  bzw. 1,0  $\mu\text{g}$   
RNase (Schichtdicke 0,65 bzw. 1,3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

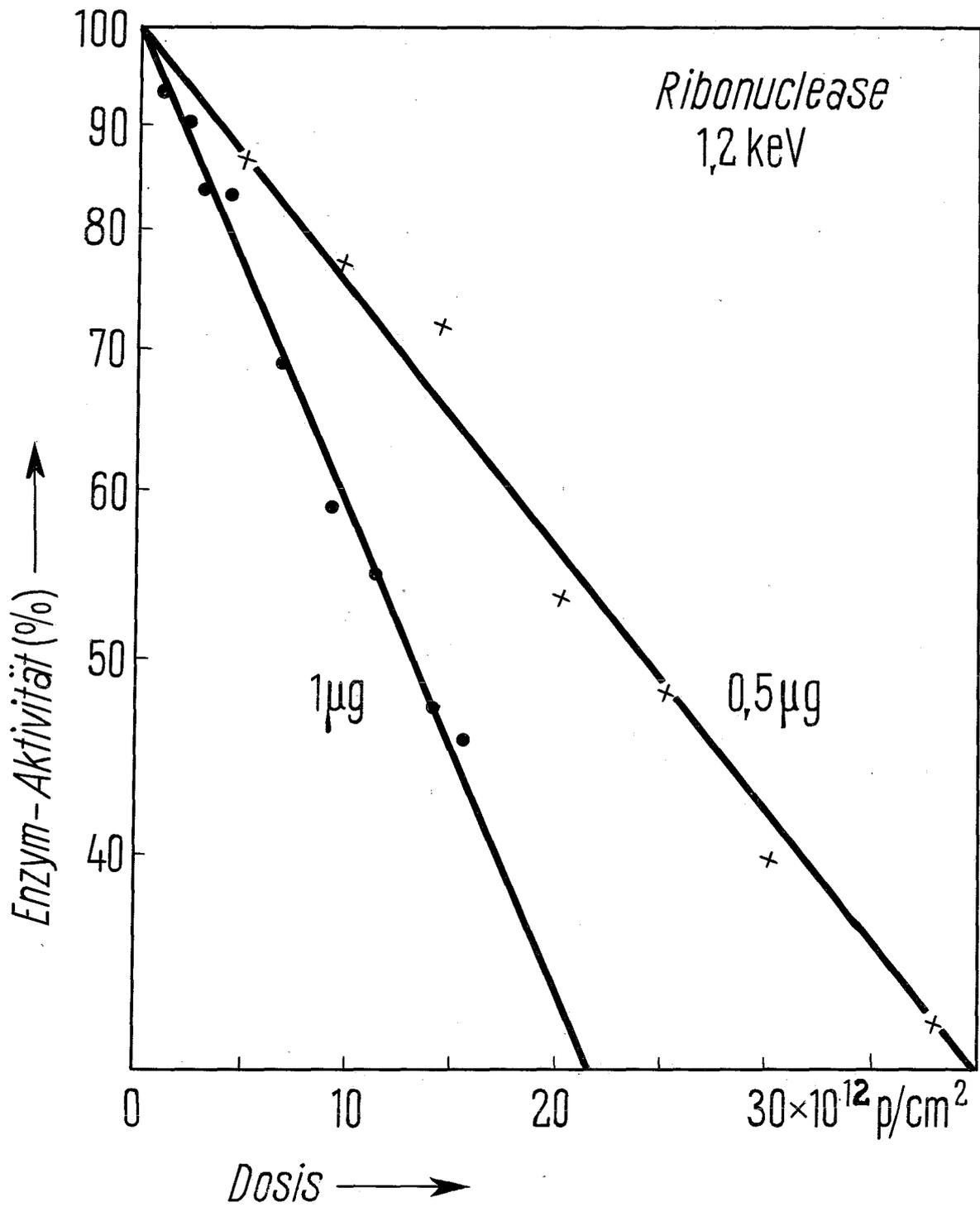


Abb. 18: Inaktivierung von jeweils 0,5  $\mu$ g Ribonuclease  
durch Protonen von 1,4 keV bzw. 50 keV Energie

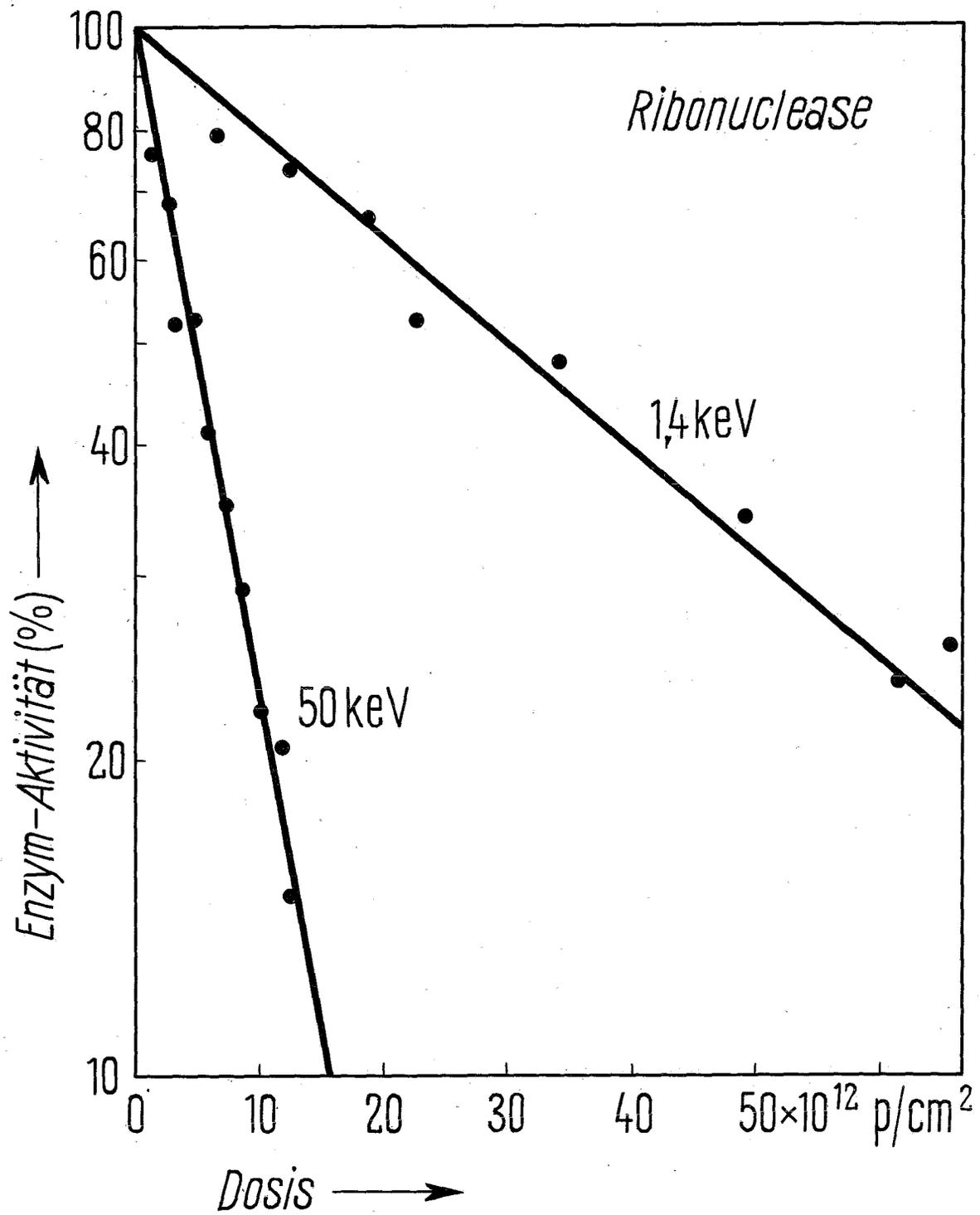


Abb. 19: Verlauf der 37 %-Dosis ( $D_{37}$ ) für die Inaktivierung von käuflicher Ribonuclease (●) bzw. chromatographisch gereinigter Ribonuclease A (○) in Abhängigkeit von der mittleren Protonenenergie

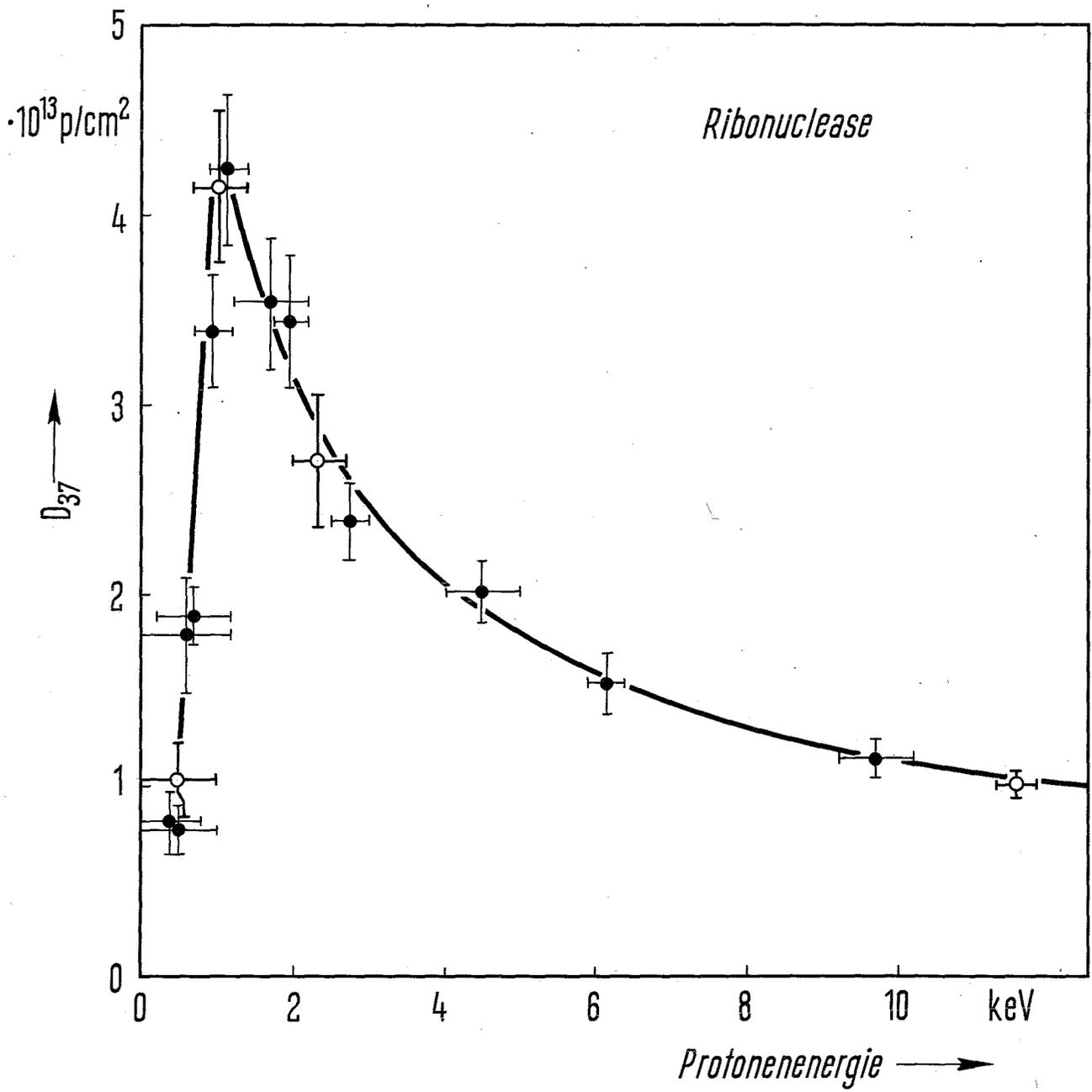


Abb. 20: Verlauf des Wirkungsquerschnitts für die Inaktivierung von käuflicher Ribonuclease (●) bzw. chromatographisch gereinigter Ribonuclease A (o) in Abhängigkeit von der mittleren Protonenenergie

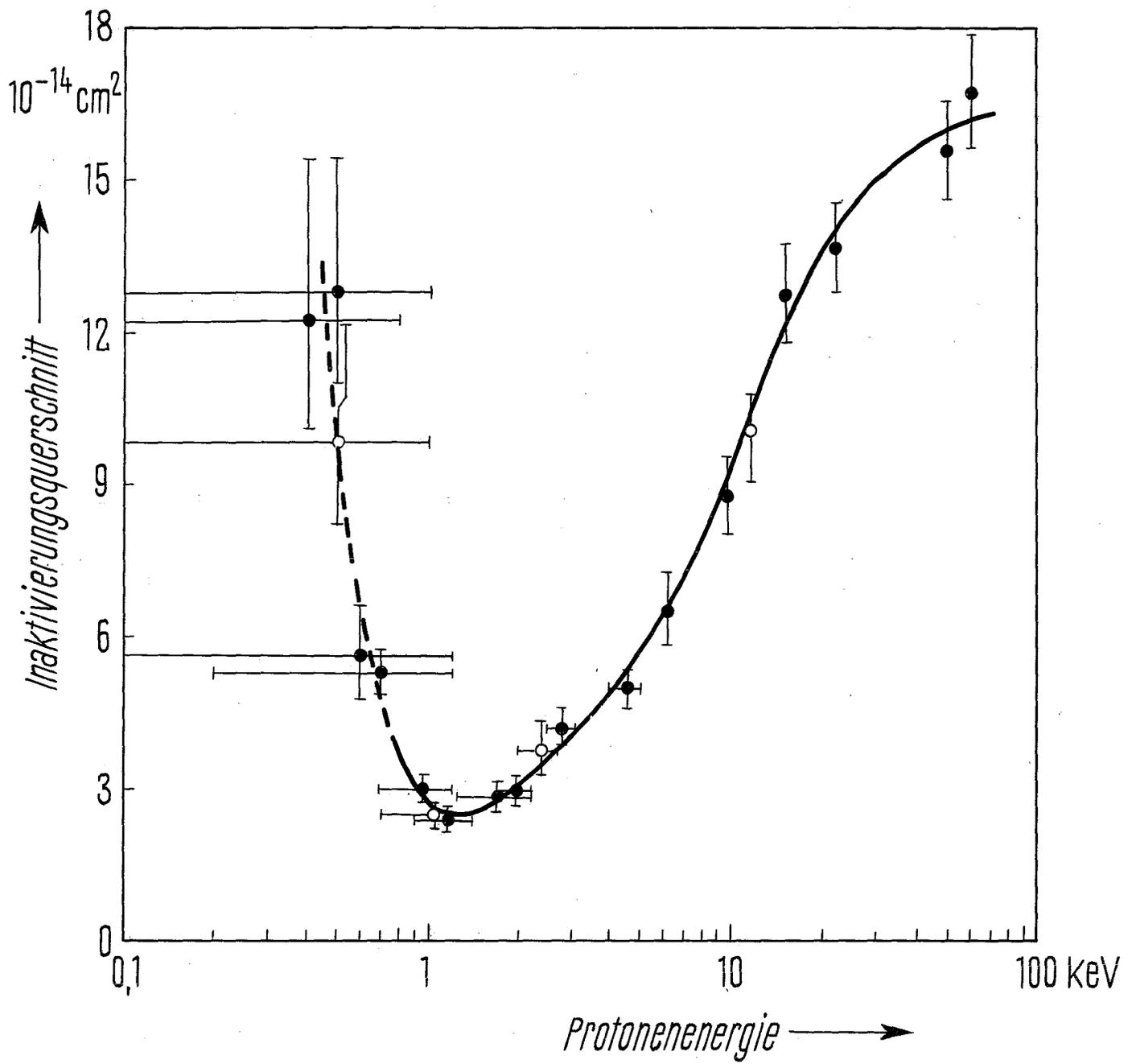


Abb. 21: Vergleich der experimentell bestimmten Inaktivierungsquerschnitte von Ribonuclease (x) mit dem Verlauf der von Neufeld und Snyder (1961) berechneten Wirkungsquerschnitte für den Energieverlust von Protonen durch Elektronen-Wechselwirkung ( $\sigma_e$ ) bzw. durch Kernstöße ( $\sigma_n$ ). Die Differenz zwischen den Meßpunkten (x) und der Kurve  $S_e$  wird durch die Punkte (●) wiedergegeben. Die durch diese Punkte gelegte Kurve  $S_n$  gibt den Verlauf des Wirkungsquerschnitts für die Inaktivierung von Ribonuclease durch Kernstöße in Abhängigkeit von der Protonenenergie an.

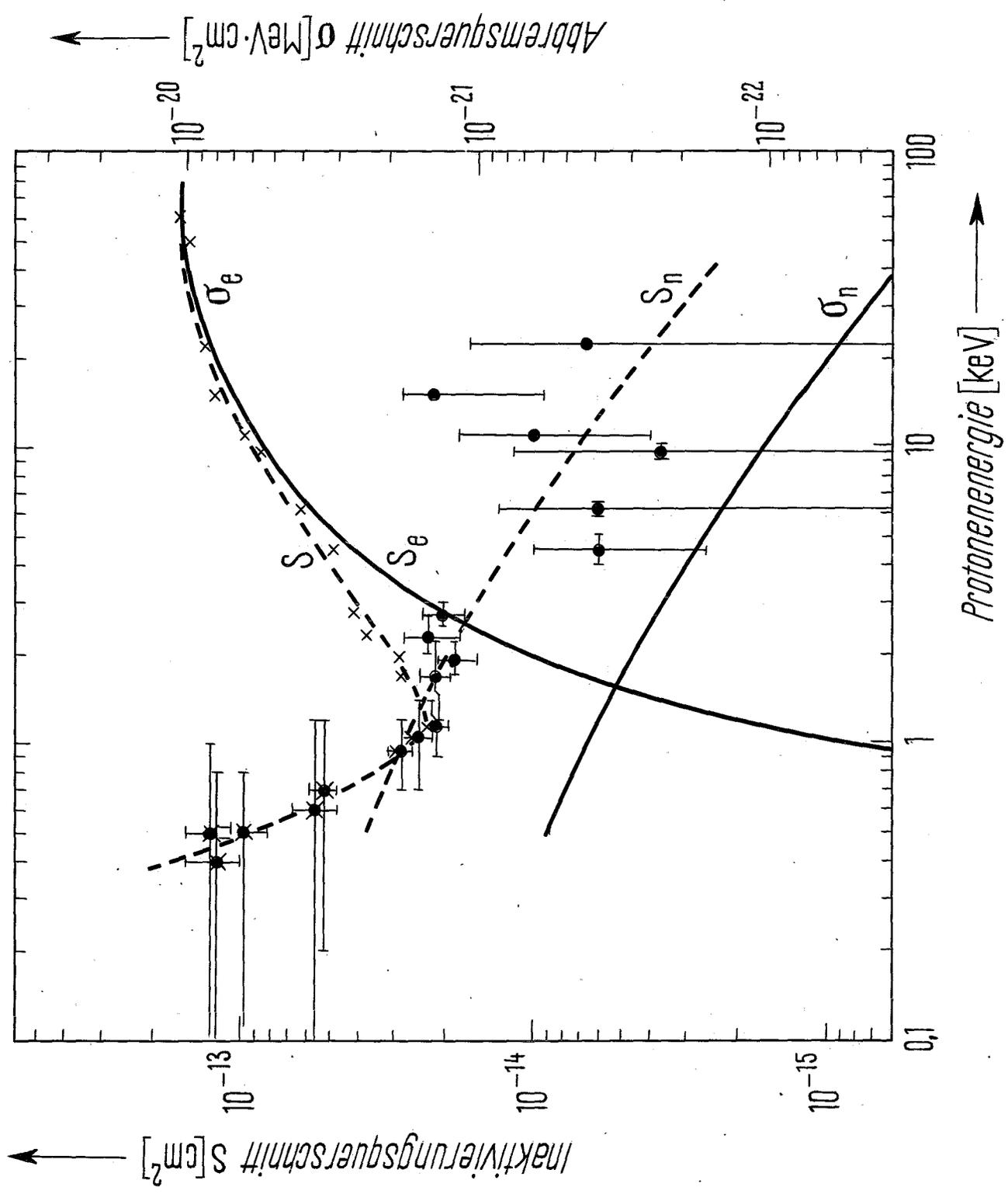


Abb. 22: Vergleich der experimentell bestimmten Wirkungsquerschnitte für die Inaktivierung von ØX 174-DNS (●) mit dem nach der Treffbereichstheorie unter verschiedenen Voraussetzungen zu erwartenden Kurvenverlauf (weitere Erläuterungen im Text)

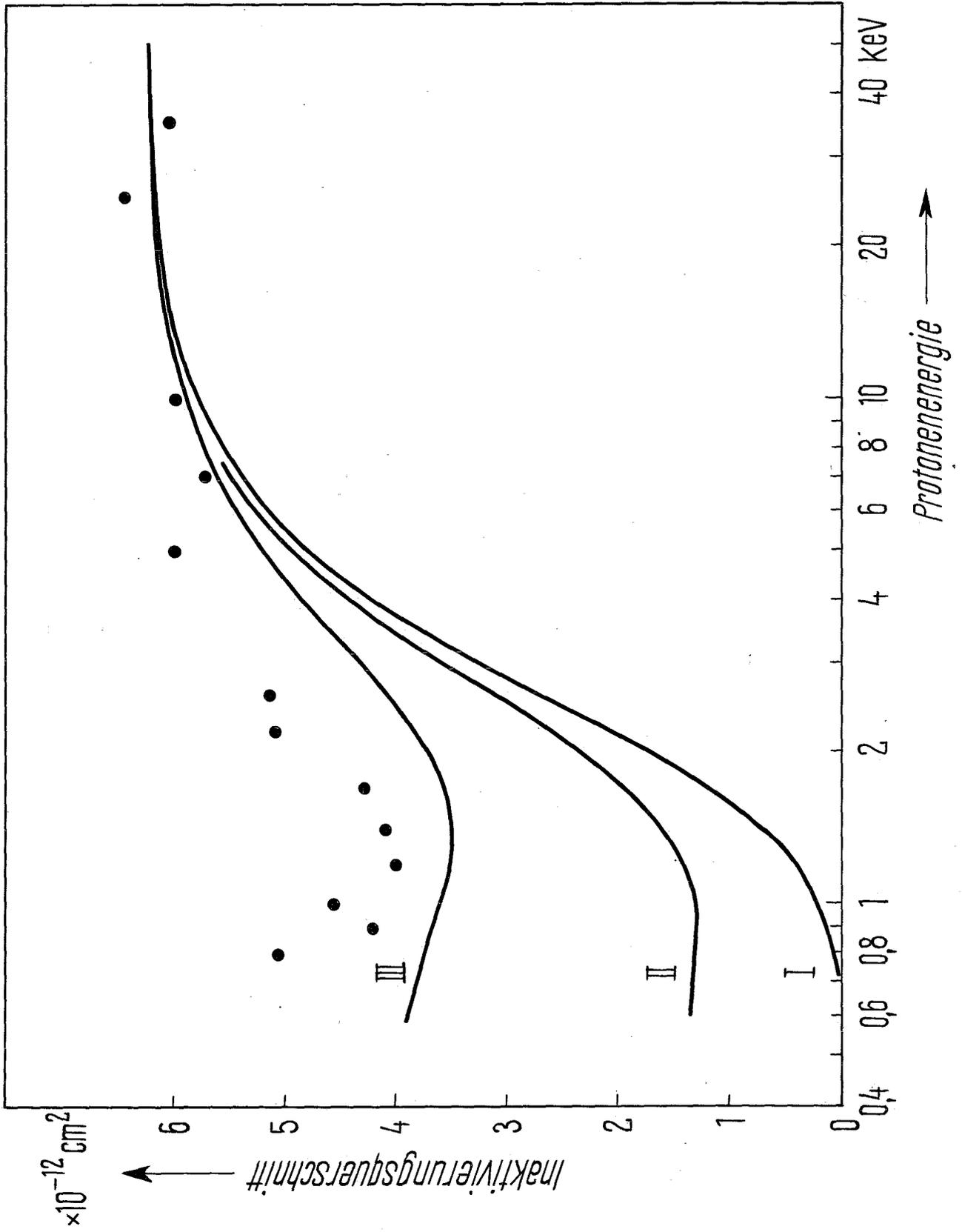


Abb. 23: Abhängigkeit des Schutzfaktors von der Cystamin-Konzentration bei der Inaktivierung von Ribonuclease durch 2 MeV-Protonen

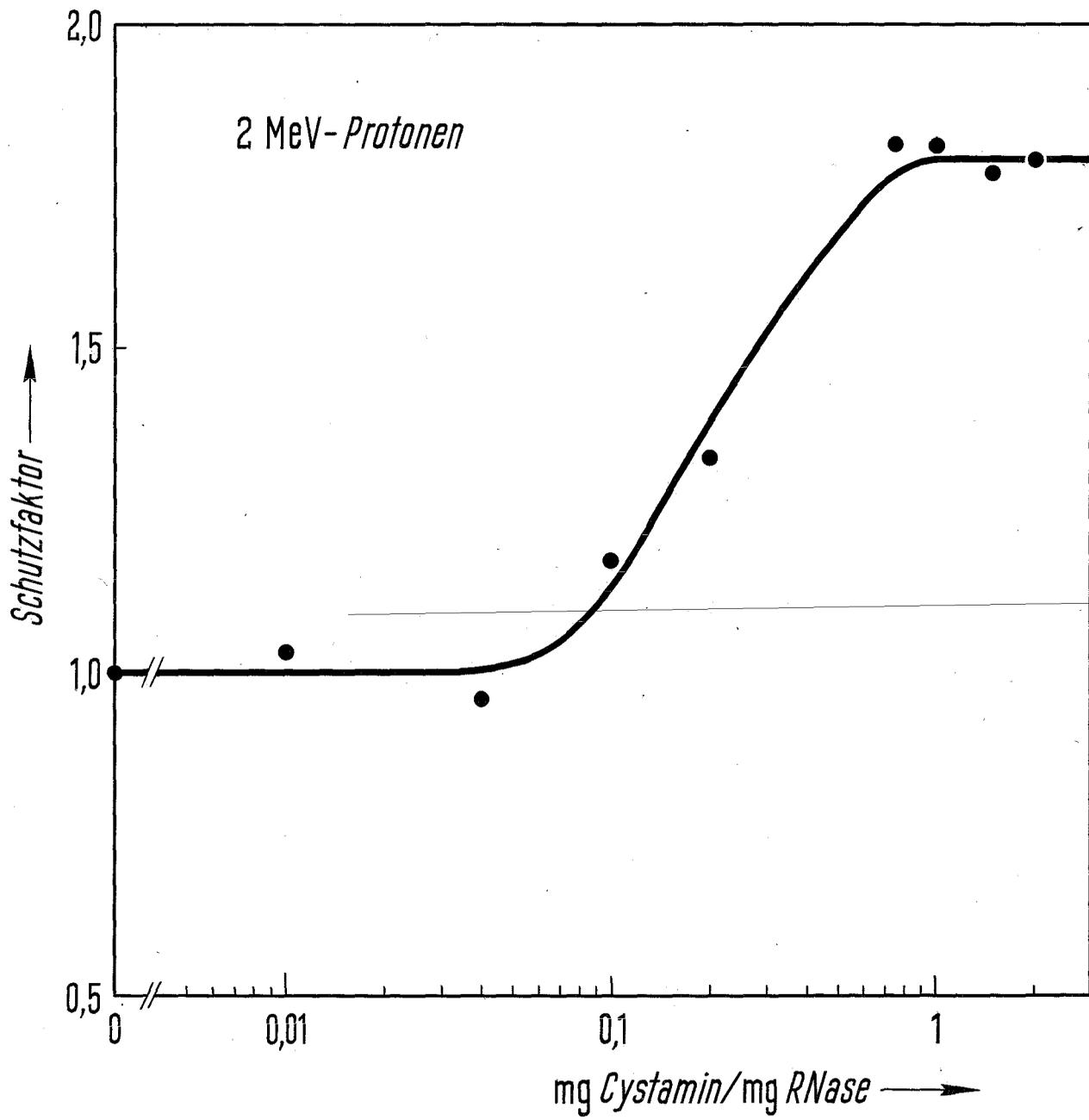


Abb. 24: Inaktivierung von 0,7  $\mu\text{g}$  Ribonuclease (●) bzw. einer molekularen Mischung aus 0,4  $\mu\text{g}$  Ribonuclease und 0,3  $\mu\text{g}$  Cystamin (▲) durch 2 MeV-Protonen bzw. 1,4 keV-Protonen

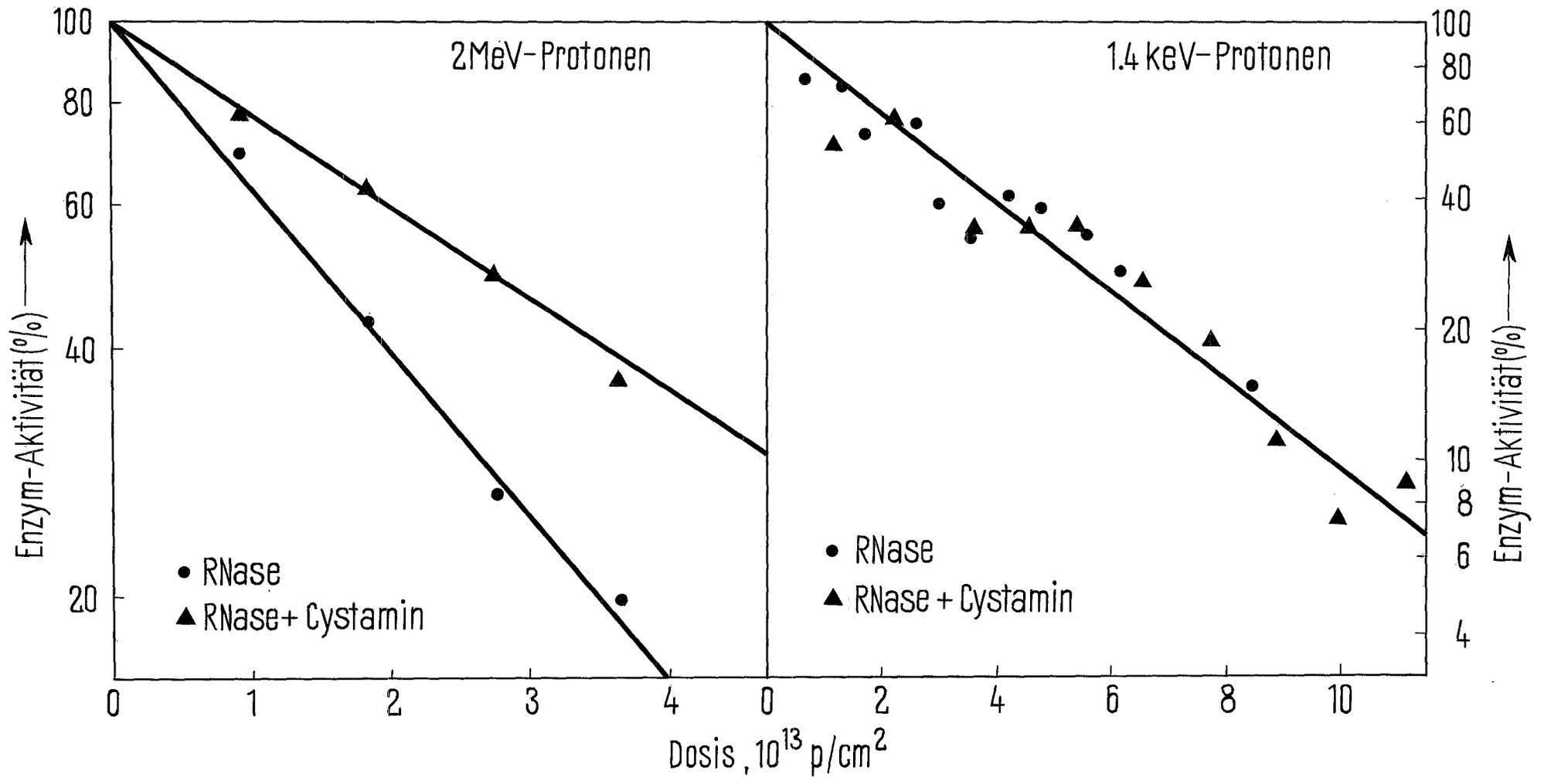


Abb. 25: Inaktivierung von 0,5  $\mu$ g Ribonuclease bei verschiedenen Temperaturen durch 2 MeV-Protonen bzw. 1,4 keV-Protonen

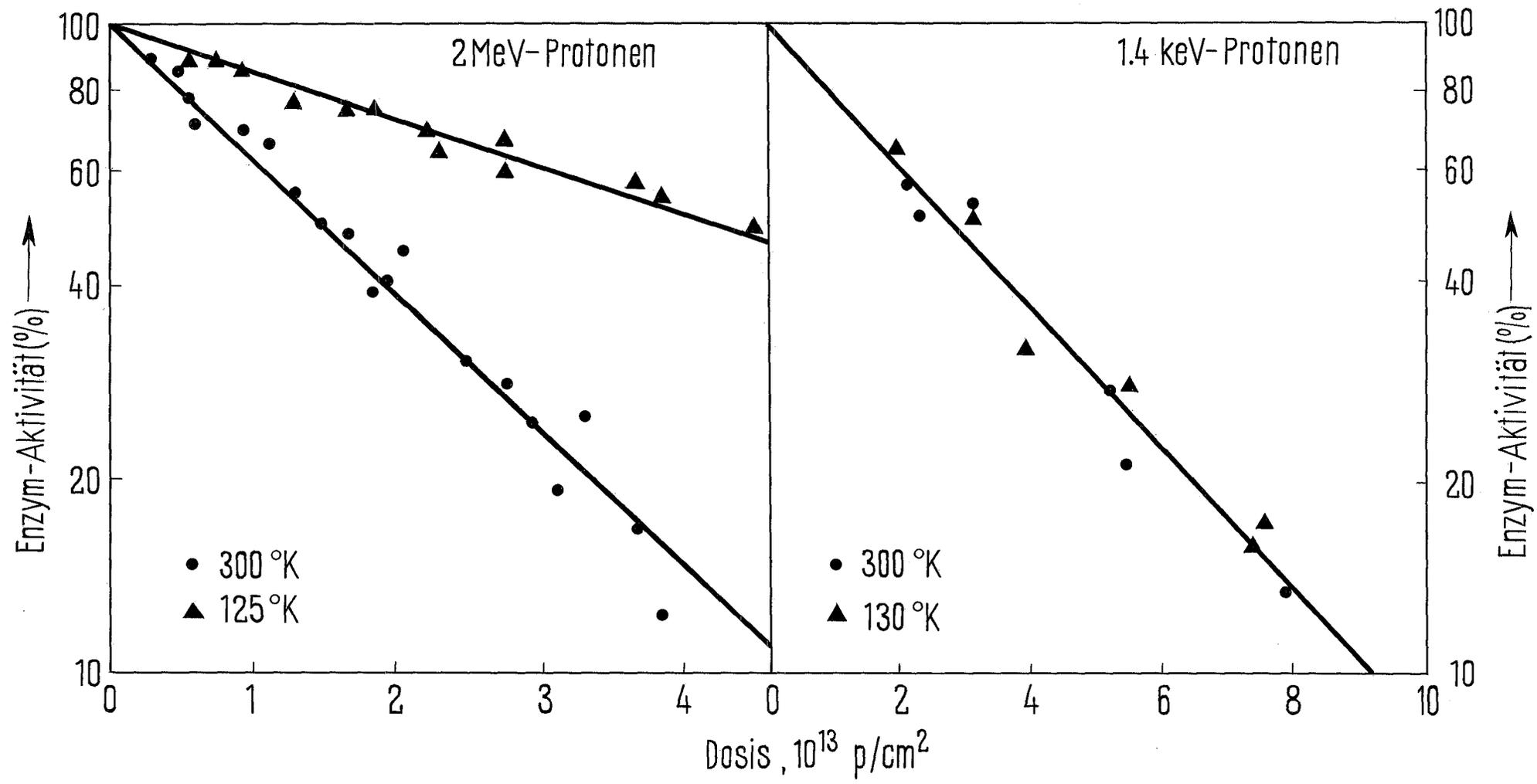


Abb. 26: Inaktivierung von trockener Ribonuclease durch  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung im Vakuum bei verschiedenen Temperaturen und anschließender Enzymbestimmung in Luft (●) bzw. unter Stickstoff (○)

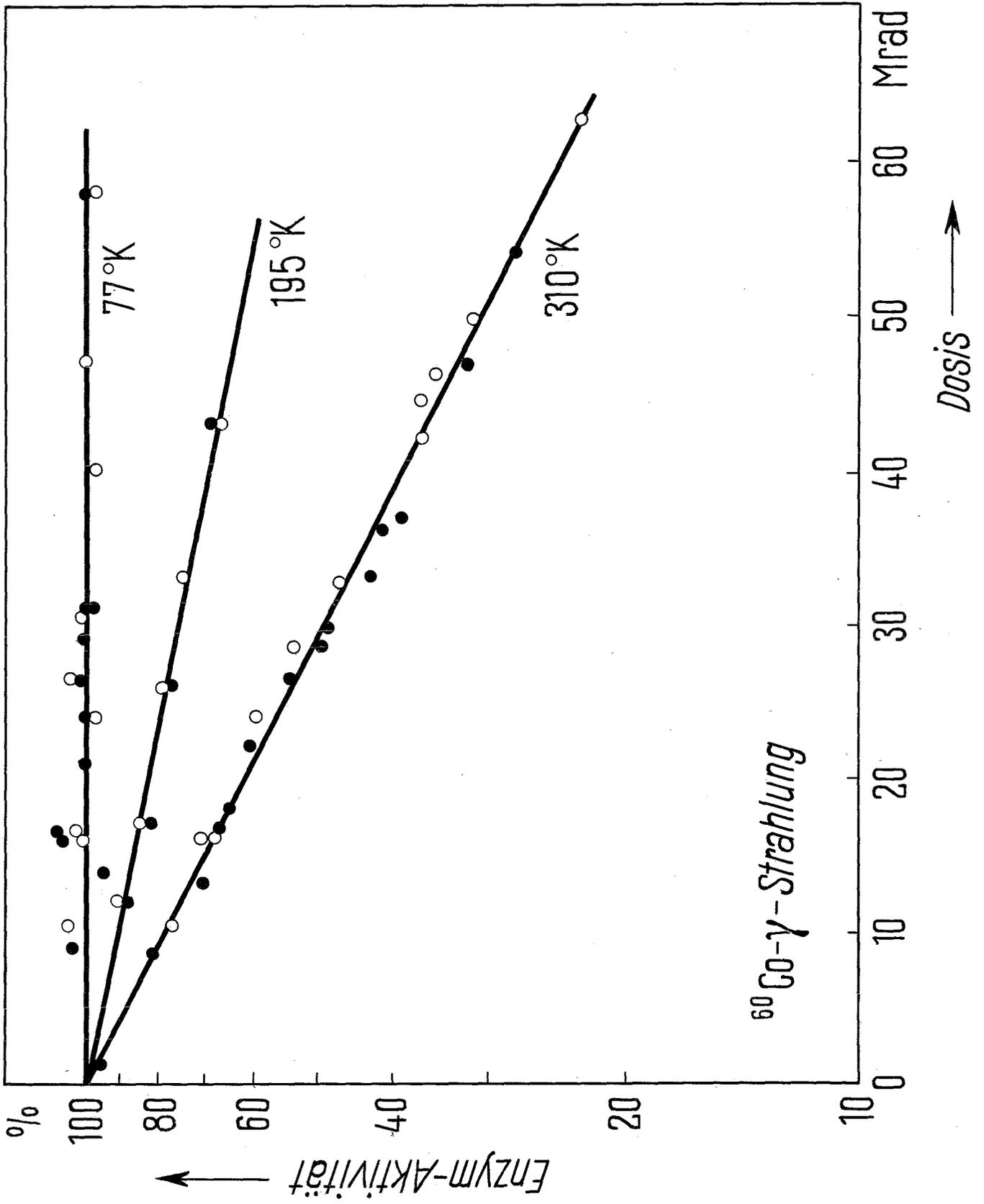


Abb. 27: Abhängigkeit der 37 %-Dosen ( $D_{37}$ ) von der reziproken absoluten Temperatur bei Bestrahlung von trockener Ribonuclease mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlen im Vakuum (●) bzw. in Sauerstoff-Atmosphäre (▲)

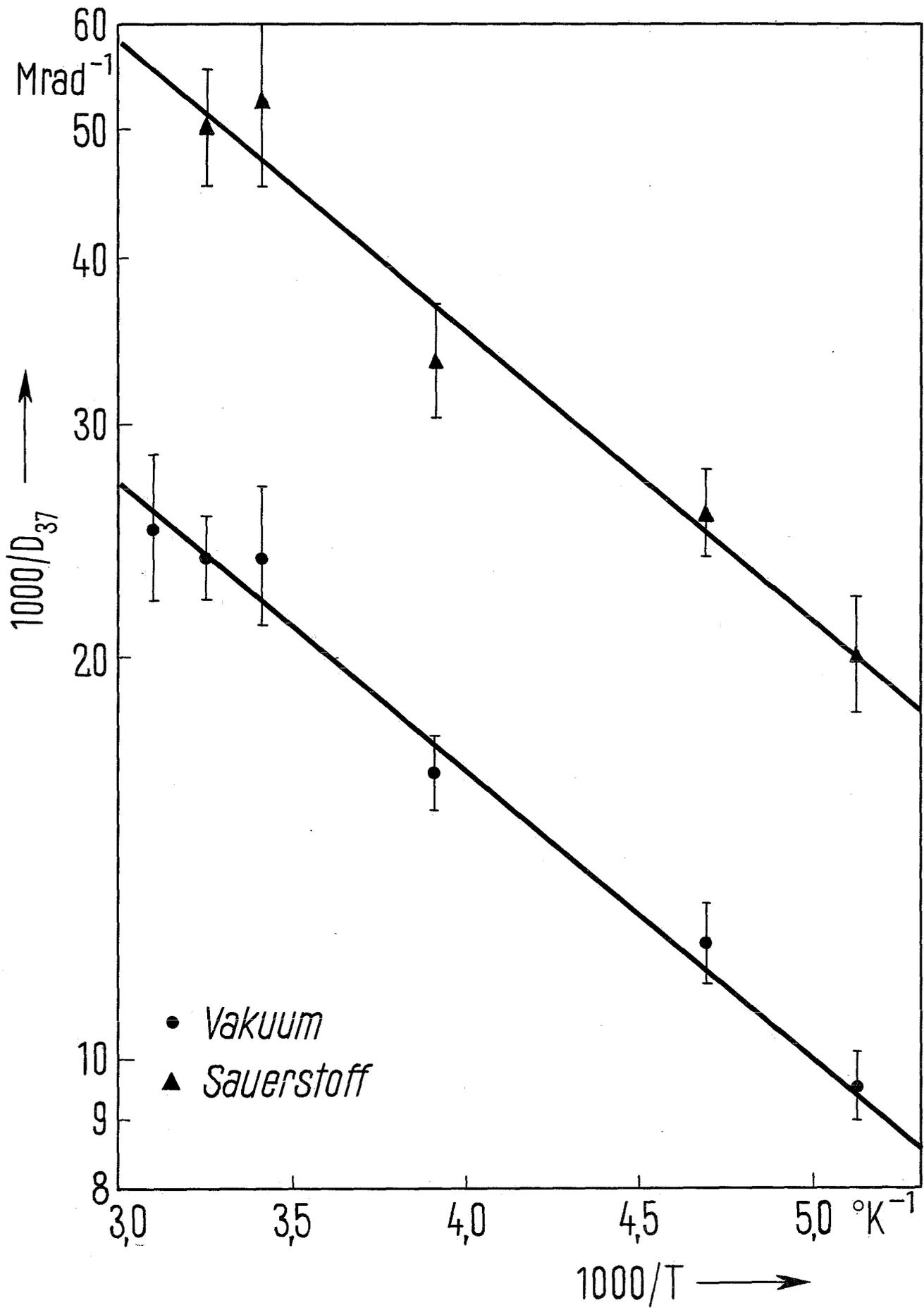


Abb. 28: Inaktivierung von trockener Ribonuclease durch  
2 MeV-Protonen bei 125 °K und 300 °K

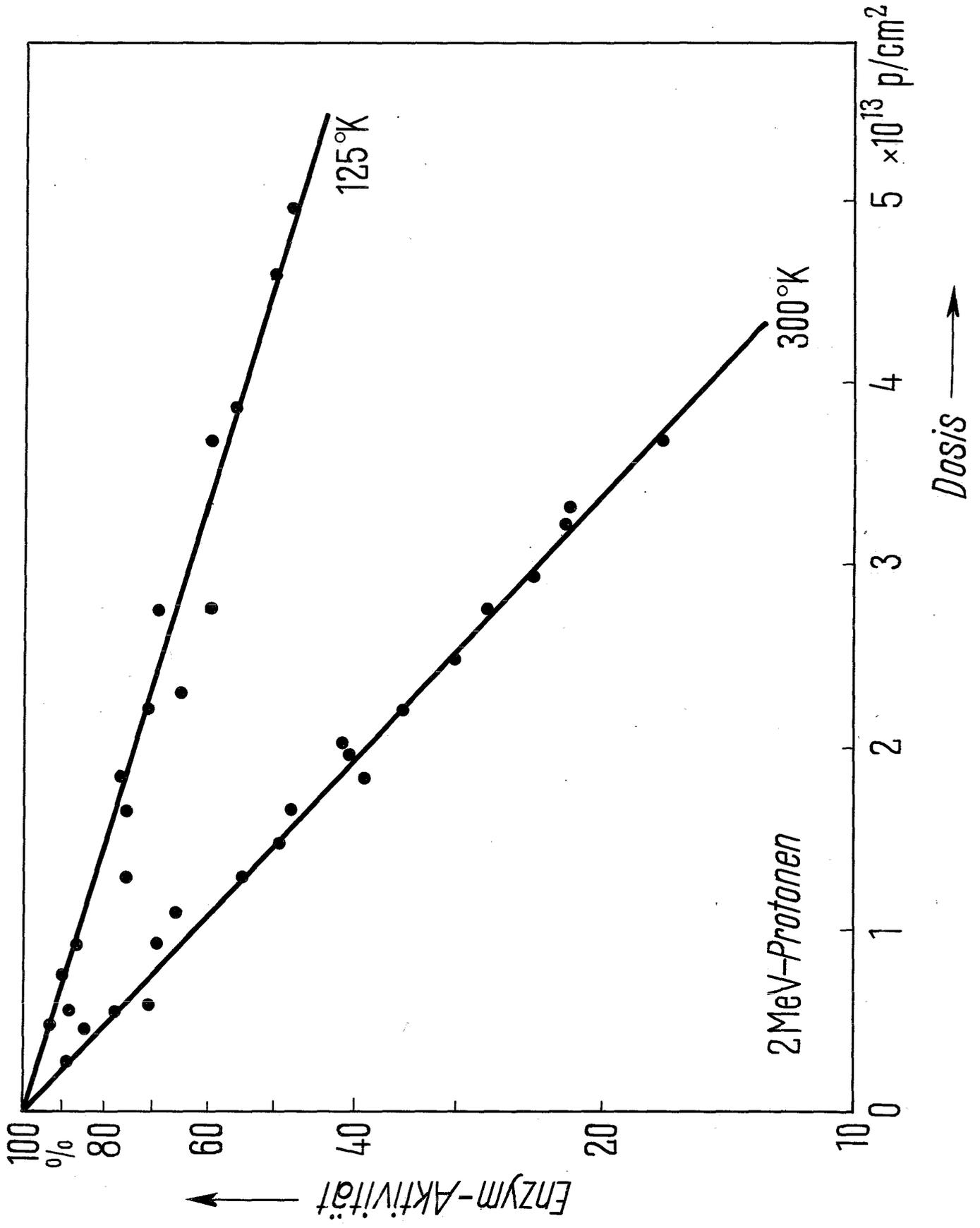


Abb. 29: Wirkungsquerschnitte für die Inaktivierung von Ribonuclease durch 2 MeV-Protonen (●) in Abhängigkeit von der reziproken absoluten Temperatur und Zerlegung in drei Komponenten

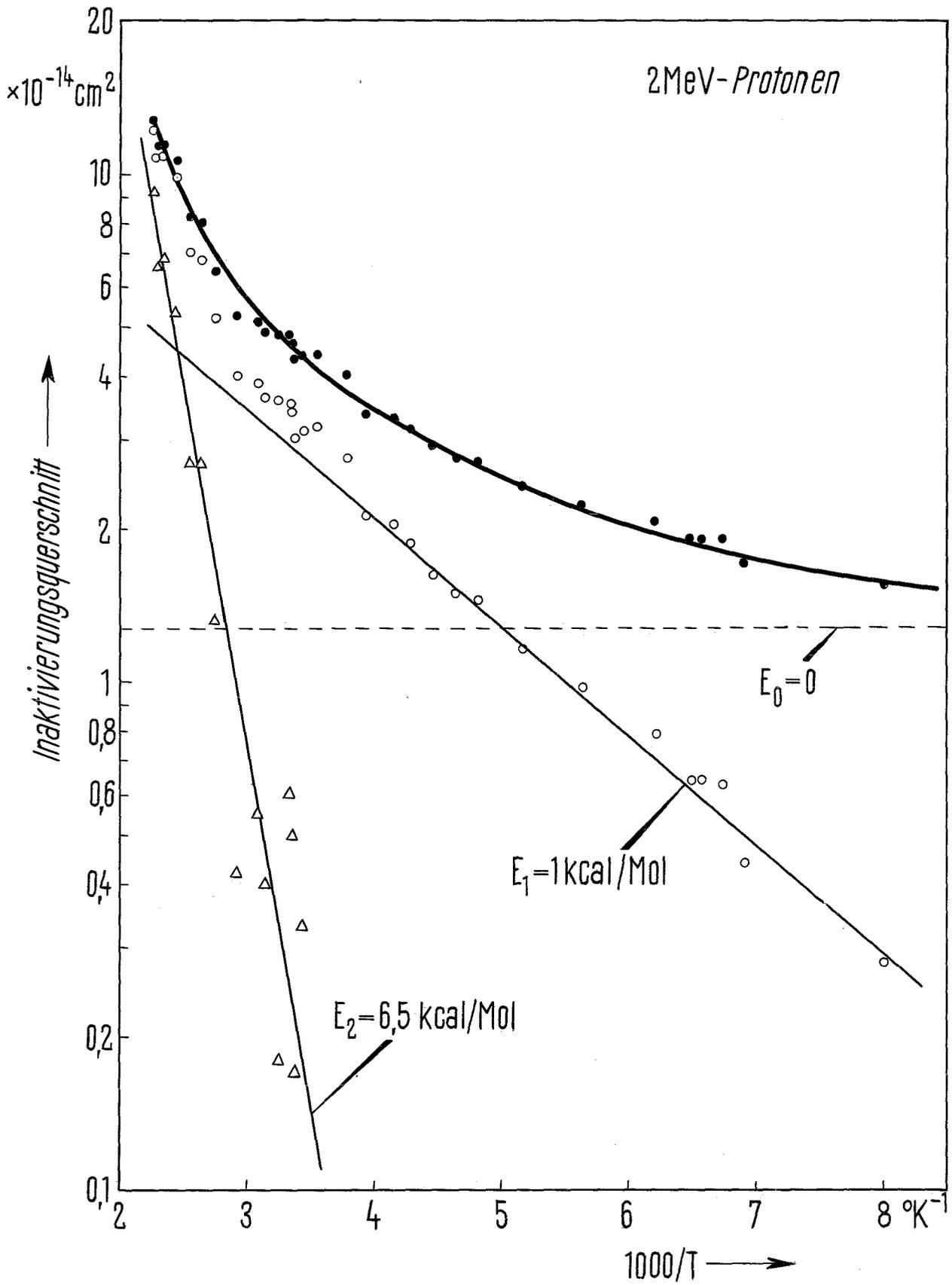


Abb. 30: Wirkungsquerschnitte für die Inaktivierung von Ribonuclease durch 2 MeV-Deuteronen (●) in Abhängigkeit von der reziproken absoluten Temperatur und Zerlegung in zwei Komponenten

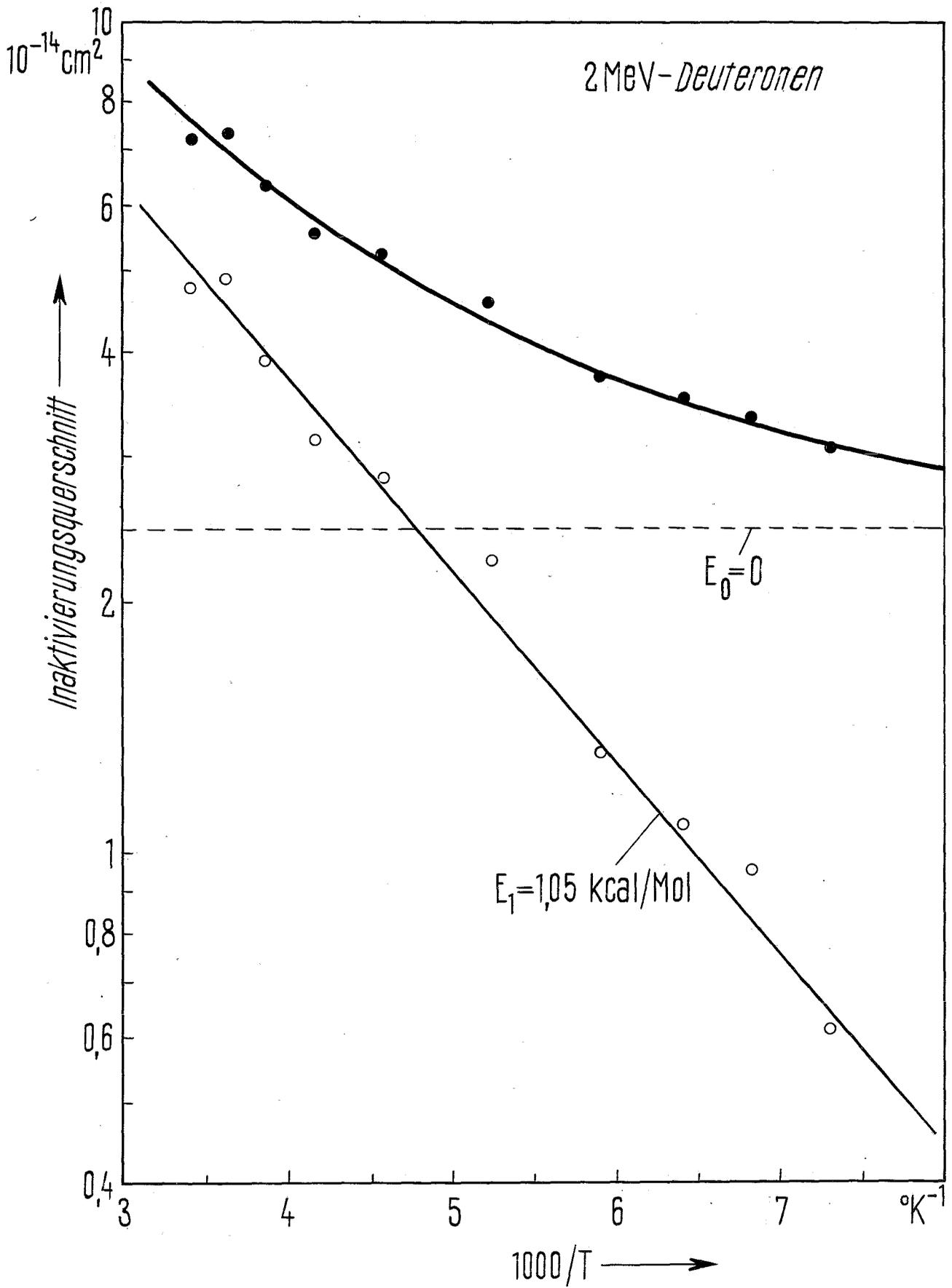


Abb. 31: Typische Inaktivierungskurve für die Einwirkung von thermischen Wasserstoffatomen auf infektiöse ØX 174-DNS (System II)

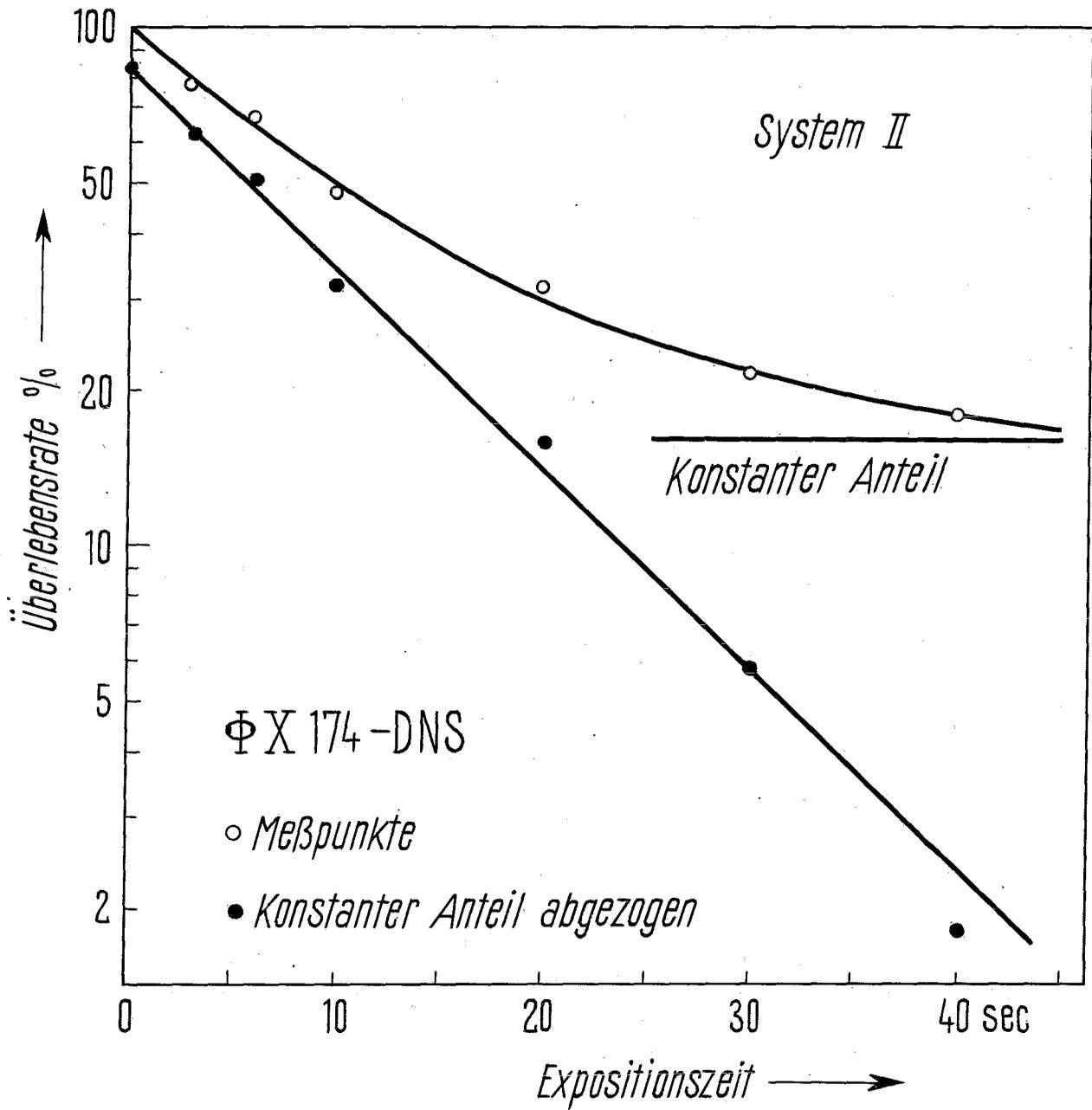


Abb. 32: Inaktivierung von trockener infektiöser ØX 174-  
DNS durch atomaren Wasserstoff (System I und II)

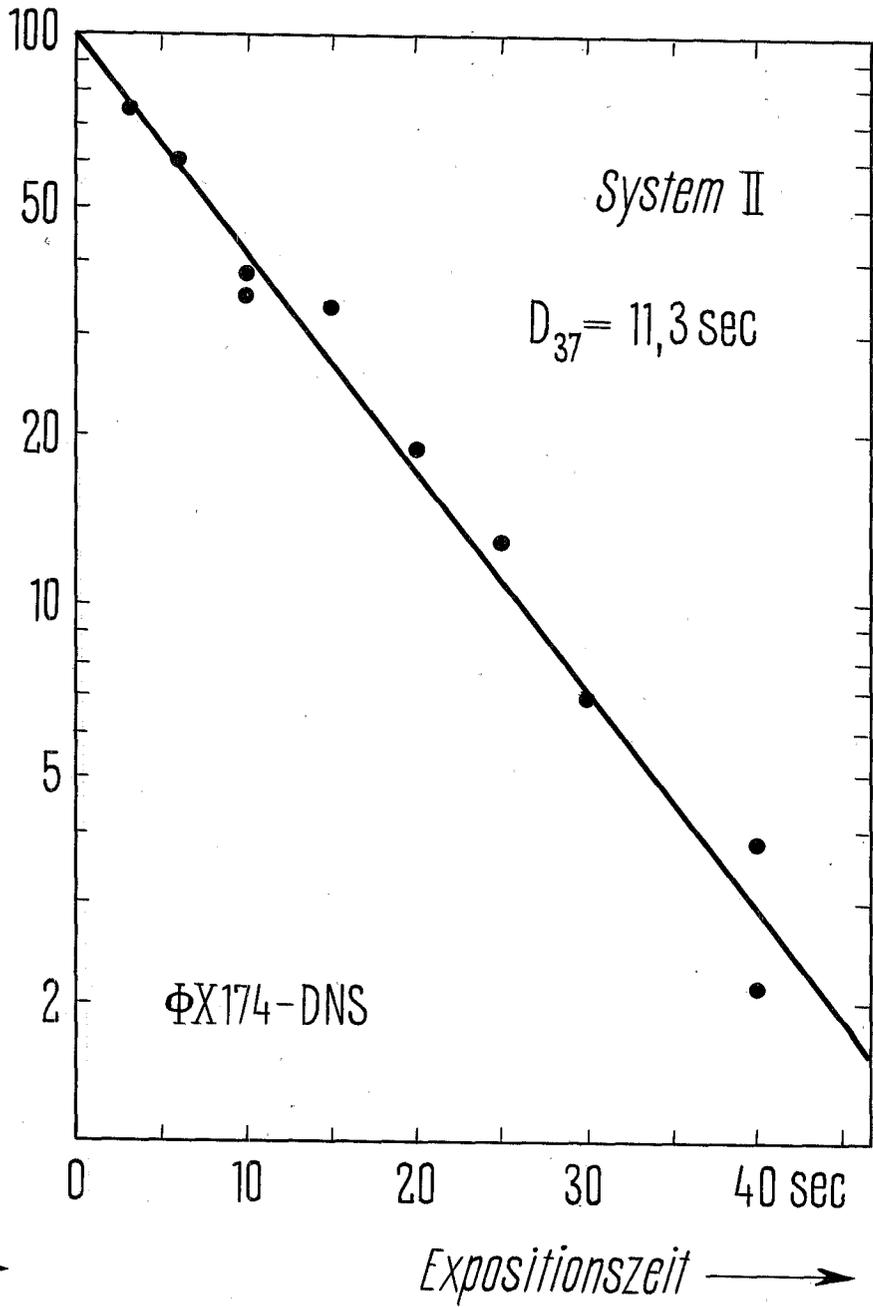
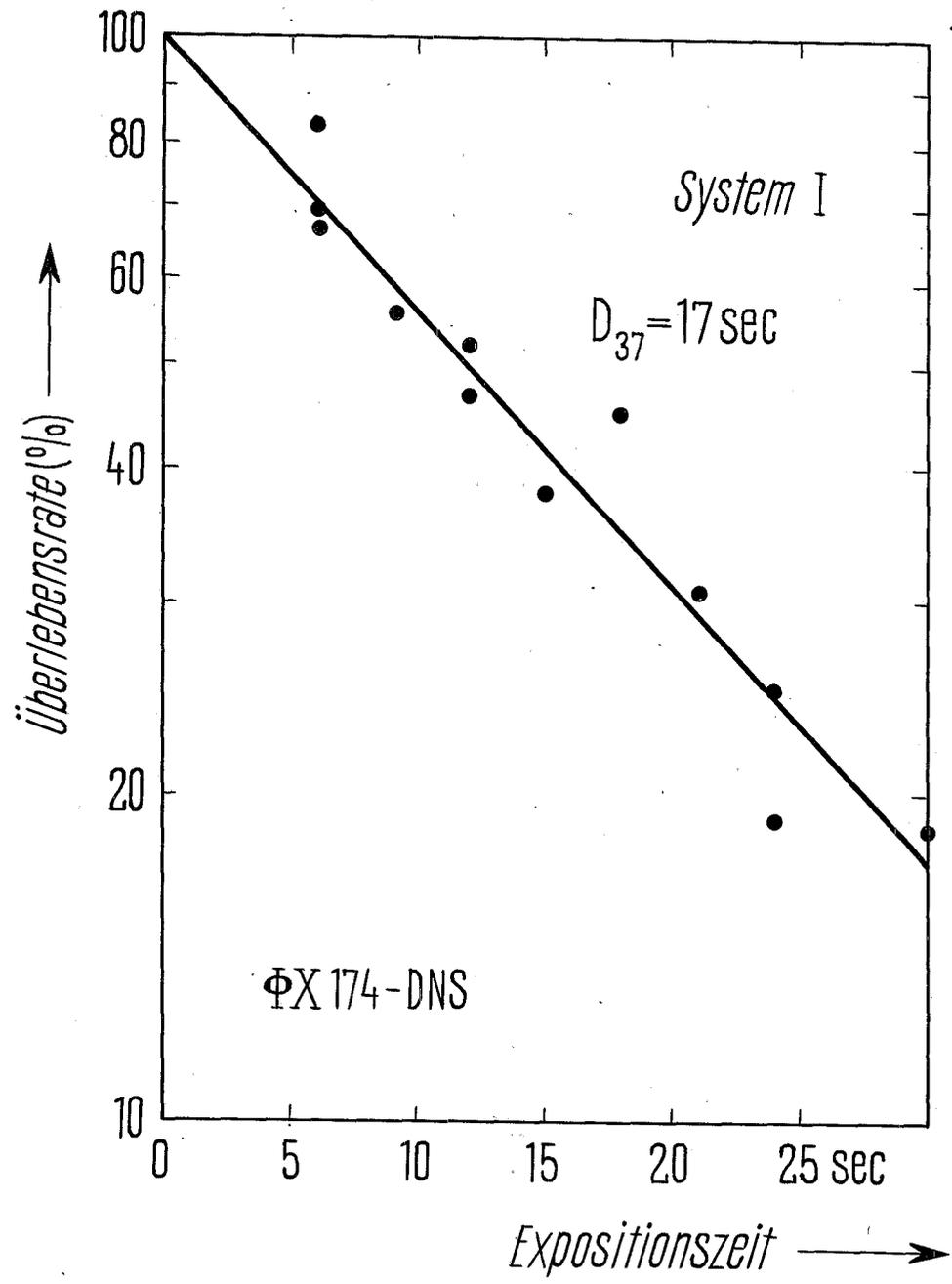


Abb. 33: Inaktivierung von trockenen T1-Bakteriophagen (●)  
und BU-T1-Phagen (▲) durch atomaren Wasserstoff  
(System I und II)

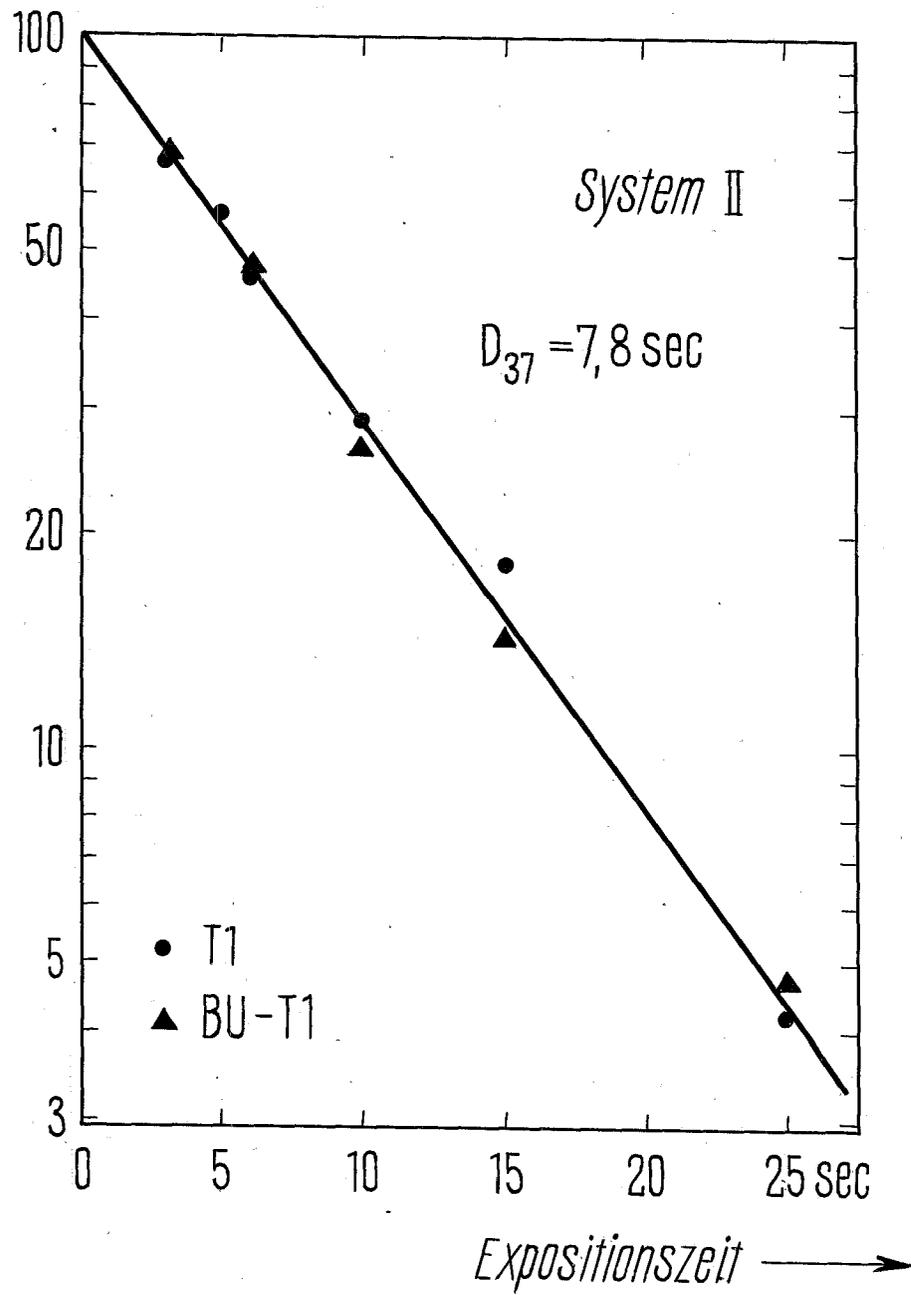
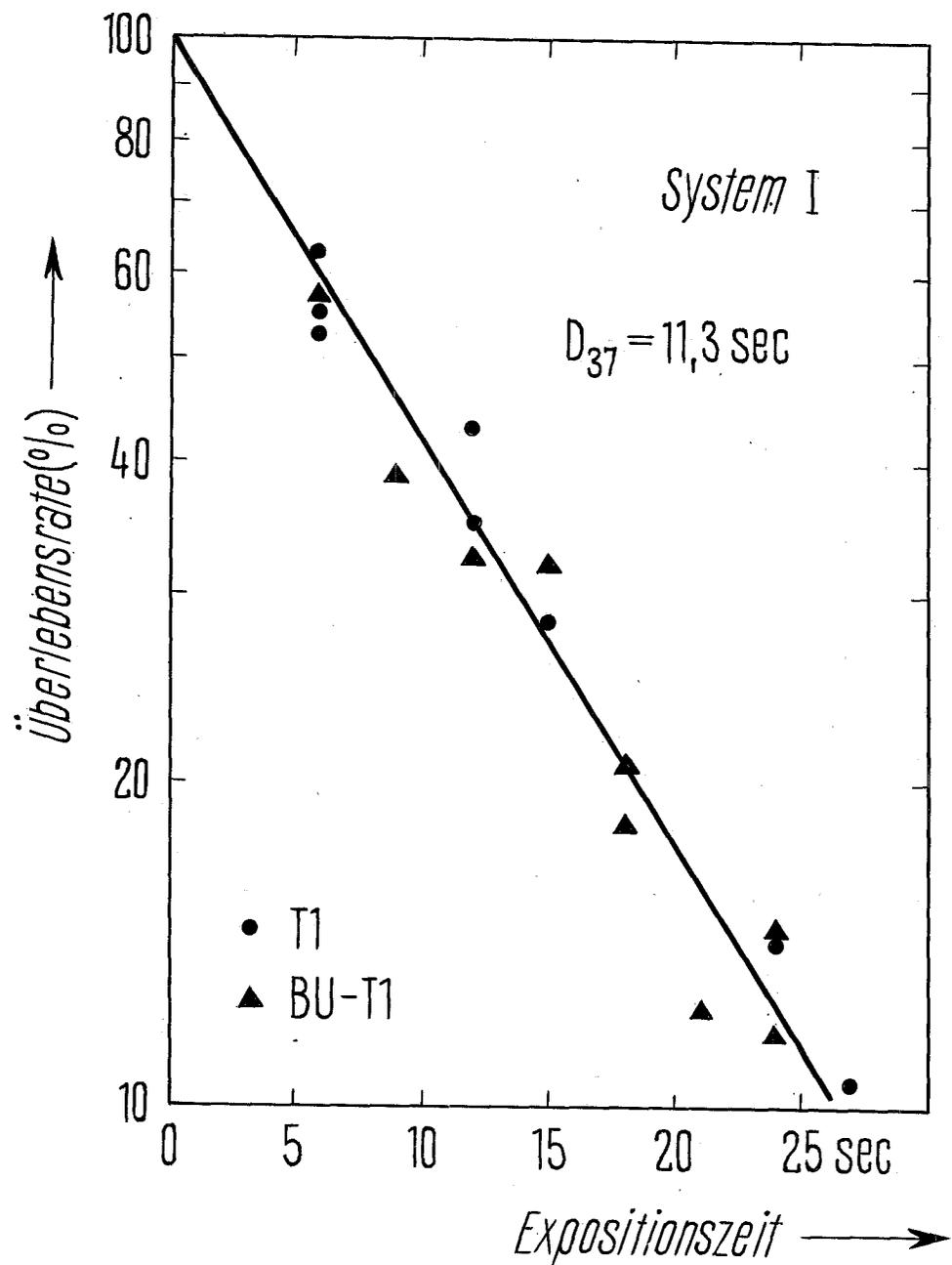


Abb. 34: Inaktivierung von trockener Ribonuclease durch  
atomaren Wasserstoff (System I und II)

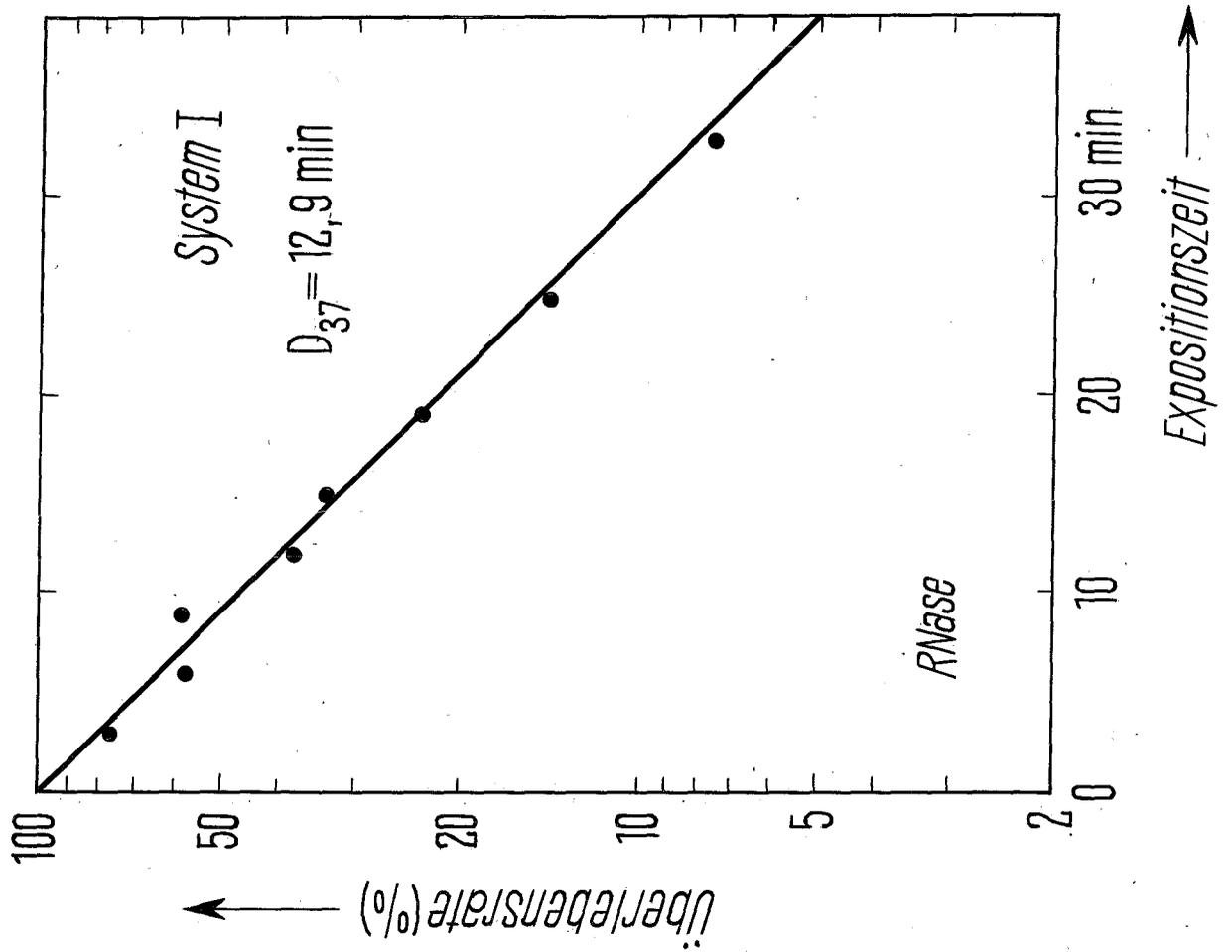
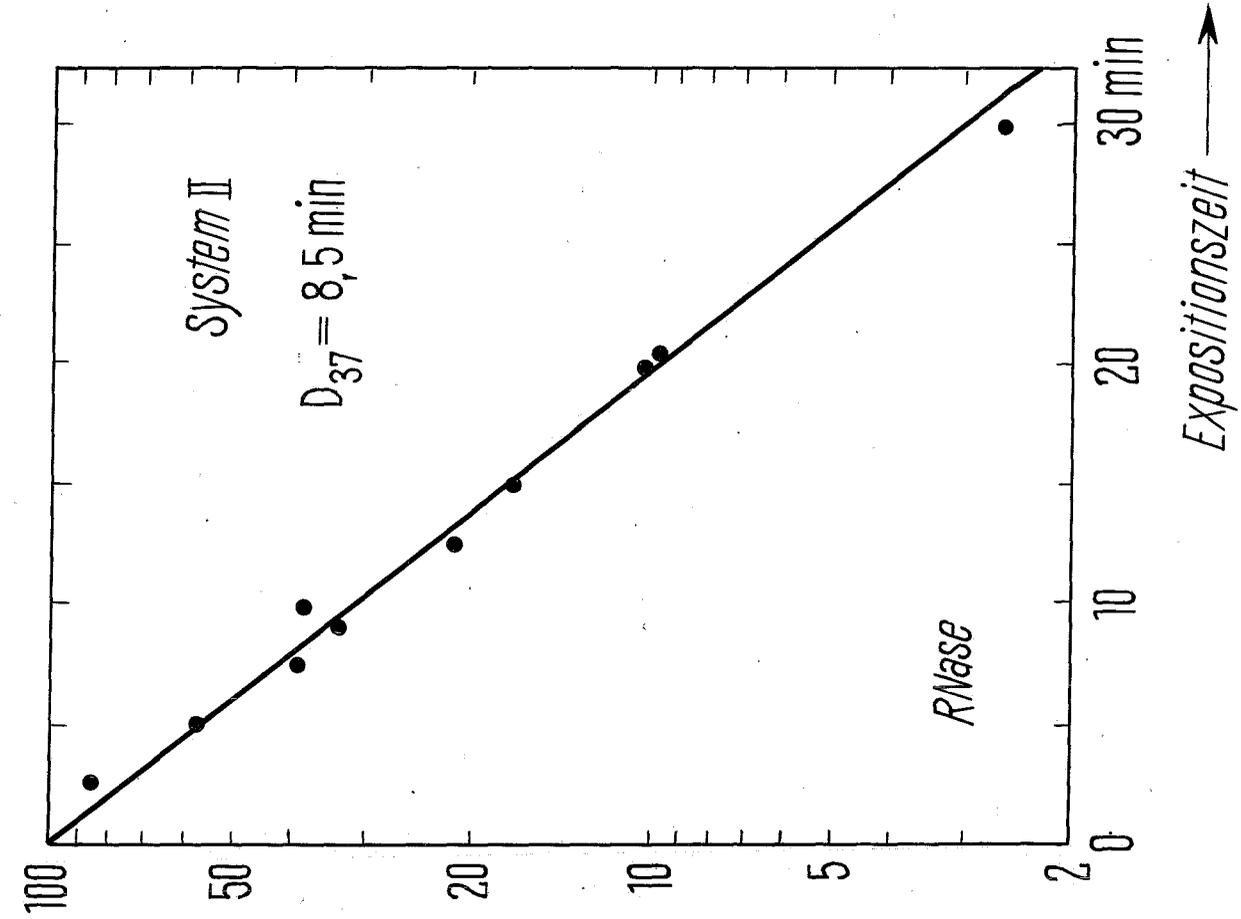


Abb. 35: Inaktivierung von trockener infektiöser ØX 174-  
DNS im Vakuum durch  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung

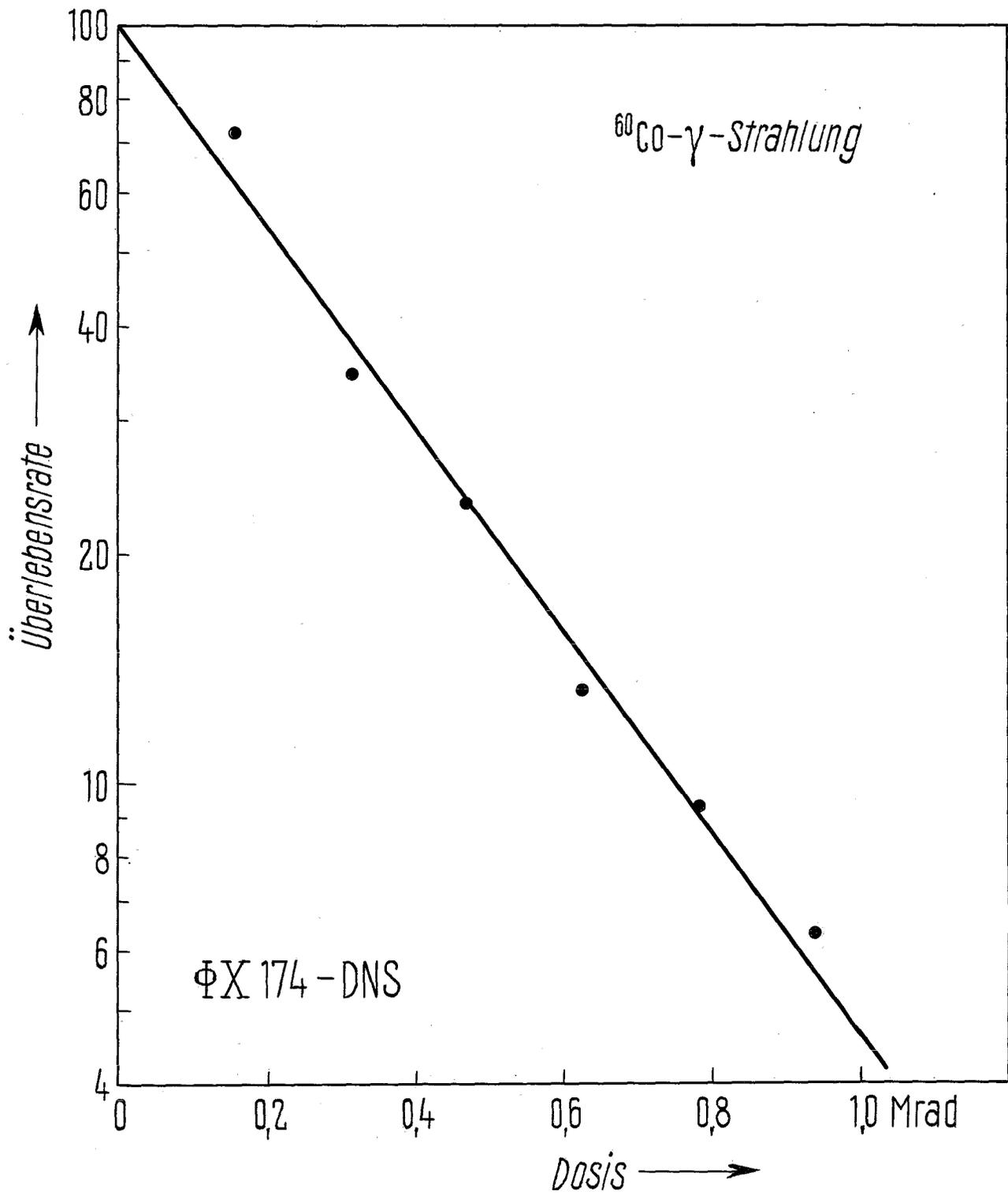


Abb. 36: Inaktivierung von T1-Phagen (●) und BU-T1-Phagen (▲) durch atomaren Wasserstoff (System I und II) und durch Bestrahlung mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlen und UV-Licht von 2537 Å Wellenlänge

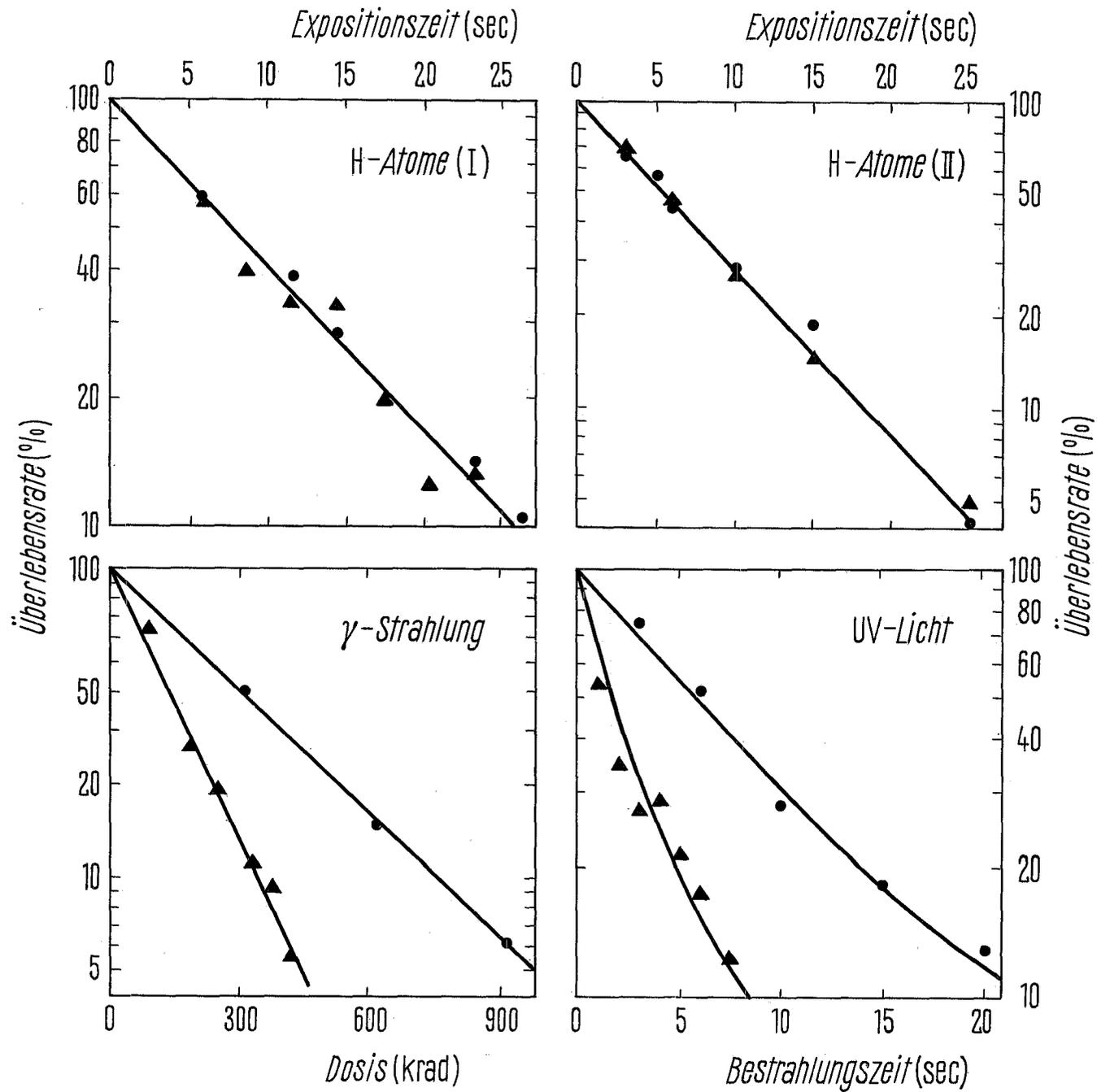


Abb. 37: Dosis-Effekt-Kurven für die Inaktivierung von T1, BU-T1, infektiöse ØX 174-DNS und Ribonuclease durch atomaren Wasserstoff (System I und II) und durch Co- $\gamma$ -Strahlung. Die  $D_{37}$  für T1-Phagen wurde auf 1 normiert

