

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

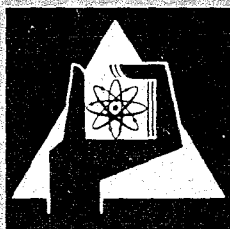
März 1969

KFK 938

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen über physiko-chemische Sekundärprozesse
bei ionisierender Bestrahlung makromolekularer
biologischer Objekte im Trockenen

K. Kürzinger



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE



Kernforschungszentrum Karlsruhe

März 1969

KFK 938

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen über physiko-chemische Sekundärprozesse
bei ionisierender Bestrahlung makromolekularer biologischer
Objekte im Trockenen

Klaus Kürzinger

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-------|
| I. Einführung in die Problemstellung | 1 |
| II. Grundkonzeption der Arbeit | 13 |
| III. Experimentelle Durchführung | 18 |
| 1 Testobjekte und biochemische bzw. mikro- biologische Nachweismethoden | 18 |
| 2 Probenbereitung | 24 |
| 3 Kernstoßversuche an ØX174-DNS | 25 |
| 4 Inaktivierung von RNase durch 2 MeV-Protonen bei erhöhten Temperaturen | 28 |
| 5 Inaktivierungsversuche mit thermischen H-Atomen | 30 |
| 1 Radikalerzeugung durch Hochfrequenz-Entladung | 30 |
| 2 'Kondensator'-Experiment | 31 |
| 6 Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung von T1-Phagen mit thermischen H-Atomen | 33 |
| IV. Ergebnisse und Diskussion | 38 |
| 1 Kernstoßversuche an infektiöser ØX174-DNS | 38 |
| 2 RNase-Inaktivierung durch 2 MeV-Protonen bei erhöhten Temperaturen | 42 |
| 3 Inaktivierung von RNase, Bakteriophagen und infektiöser ØX174-DNS durch thermische H-Atome | 44 |
| 4 Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung von T1-Phagen mit thermischen H-Atomen | 48 |
| V. Schlußfolgerungen und Ausblick | 57 |
| VI. Zusammenfassung | 60 |
| VII. Anhang: Biochemische und mikrobiologische Verfahren und Nachweismethoden | 61 |
| VIII. Literaturhinweise | 63 |
| IX. Tabelle und Abbildungen | 73 |

I. Einführung in die Problemstellung

Die Aufgabe, die sich dem Naturwissenschaftler stellt - und damit der Reiz, der sich ihm bietet - besteht darin, möglichst unvoreingenommen aufgrund neuer Erkenntnisse seine Vorstellungen zu ergänzen, abzuändern oder manchmal völlig zu verwerfen. Die Notwendigkeit hierzu ist in praktisch allen Forschungszweigen gegeben, denn mit wachsender Erfahrung wird ein Fragenkomplex zunächst meist nicht einfacher und überschaubarer, sondern es zeigt sich nur zu oft, daß die Vielfalt der Einzelbeobachtungen immer weniger in das anfangs erarbeitete Bild paßt. Dies gilt auch für die molekulare Strahlenbiologie, für den Zweig der Biophysik also, der sich auf molekularer Ebene mit der Einwirkung von Strahlung (im folgenden sei darunter einschränkend jeweils ionisierende Strahlung verstanden) auf Materie befaßt. Zunächst glaubte man, daß zumindest bei Bestrahlung trockener Substanzen (z.B. Enzyme oder Viren) eine recht einfache Zuordnung von energie-absorbierendem Ereignis und biochemisch nachweisbarer Schädigung vorliege. Die Vorstellung ging dahin, daß die Bestrahlung über Coulomb-Wechselwirkung, Compton- und Auger-Effekt - je nach Art der Energie der Strahlung sowie Kernladungszahl der Targetatome - in den Elektronenhüllen Anregungen und Ionisationen bewirke; diese fänden mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit ihre Ausprägung in einem bleibenden Schaden, z.B. dem biochemischen Funktionsverlust von Makromolekülen. Jedenfalls ging man davon aus, daß die 'geschädigte Stelle' identisch sei mit dem Ort der primären Energieabsorption, daß also jeweils ein einziges Molekül betroffen sei. Für diesen vermuteten Sachverhalt wurde der Begriff des 'direkten Effekts' geprägt, der einen klaren Unterschied zu den Verhältnissen bei Bestrahlung in verdünnten Lösungen aufzeigen sollte, wo die gelösten Substanzen in einem 'indirekten Effekt' durch chemischen Angriff der Radiolyseprodukte des Lösungsmittels geschädigt werden.

Beachtliche Erfolge, die die Treffbereichstheorie (Lea, 1946; Timoféeff-Ressovsky und Zimmer, 1947) erzielen konnte, schienen die plausible Vorstellung vom 'direkten Effekt' auch zu bestätigen. Als Beispiele seien die mit der Theorie gut übereinstimmende Winkelabhängigkeit des Wirkungsquerschnitts ausgerichteter Tabak-Mosaik-Viren bei variierender Bestrahlungsrichtung (Pollard und Whitmore, 1955) genannt, oder auch die Abschätzung der Treffbereichsmolekulargewichte von Biomolekülen, die in manchen Fällen den tatsächlichen Werten sehr nahe kam (z.B. Pollard, 1959). Mit dem 'one-ionization-model' von Lea in seiner ursprünglichen Konzeption, d.h. der Annahme, daß eine einzige Ionisation innerhalb eines Makromoleküls zu dessen biochemischer Inaktivierung führe, sowie mit dem damit in engem Zusammenhang stehenden Bild des 'direkten Effekts' waren jedoch Befunde über den Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit nicht zu vereinbaren. Wie schon vorher für Lösungen, konnte auch bei Bestrahlung im Trockenen gezeigt werden, daß mit abnehmender Temperatur die Inaktivierungsrate von Biomolekülen kleiner wird (Setlow, 1952; Adams und Pollard, 1952). Ionisationen und auch Anregungen, die zu chemischen Veränderungen führen, erfolgen jedoch in erster Näherung temperaturunabhängig, da die hierfür erforderlichen Energiebeträge um 2 bis 3 Größenordnungen über den thermischen Energien des in Frage kommenden Temperaturbereichs liegen. Als man fand, daß unter bestimmten Versuchsbedingungen (erhöhten Temperaturen) der Inaktivierungsquerschnitt eines Moleküls dessen geometrische Abmessungen übertreffen kann (Setlow, 1952), wurden durch treffbereichstheoretische Überlegungen, die in anderen Fällen so positive Argumente erbringen konnten, erste Zweifel an der Stichhaltigkeit der Hypothese vom 'direkten Effekt' geweckt.

Die in den Jahren seither durchgeführten Untersuchungen über den Einfluß modifizierender Faktoren (z.B. Temperatur, Schutzstoffgehalt, An- oder Abwesenheit von Sauerstoff) auf die Strahlenempfindlichkeit zeigen klar, daß auch bei Bestrahlung im Trockenem eine heterogene Reaktionsfolge zur endgültigen Schädigung führt, daß also der dafür geprägte Begriff des 'direkten Effekts' den tatsächlichen Verhältnissen nicht gerecht wird. Doch auch die Fülle eindeutiger Widersprüche konnte nicht verhindern, daß dieser Begriff nicht nur im Sprachschatz, sondern auch in der Vorstellung vieler mit diesem Fragenkreis befaßter Wissenschaftler ein zähes Leben führt. Hierfür mag nicht zuletzt die Tatsache verantwortlich sein, daß trotz mancher Versuche bis heute noch kein anderes, in sich geschlossenes Modell aufgezeigt werden konnte, das in überzeugender Weise alle bei der Strahleninaktivierung von Biomolekülen im Trockenem festgestellten Phänomene zu erklären vermocht hätte.

Um den experimentellen Befunden - vor allem den Untersuchungen zum Temperatureffekt - Rechnung zu tragen, wurden Hypothesen über den Beitrag von Anregungen (Augenstein und Mason, 1962) sowie über die indirekte Beeinflussung durch benachbarte Moleküle aufgestellt. In einigen Arbeiten (Hutchinson, 1960; Augenstein und Mason, 1962) wurden temperaturabhängige Prozesse in Form von intramolekularer Energie- und Ladungswanderung postuliert. Hutchinson (1960) schlug sterische Behinderung als weitere Erklärungsmöglichkeit für die Temperaturabhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit vor: Durch primäre Energieabsorption abgetrennte Molekülstücke würden bei tiefen Temperaturen wegen der weitgehenden Einfrierung der Wärmebewegung in ihrer ursprünglichen Position zum Molekülrest festgehalten, wodurch eine Rekombination der Bindungswalenzen ermöglicht würde ('cage-effect'). Norman und Spiegler (1962) stellten das 'thermal-spikes'-Modell zur Diskussion.

Danach sollen die Moleküle innerhalb eines Hitzeschlauches um die Bahn eines Teilchens mit ausreichendem linearem Energie-Transfer (LET), in dem die Temperatur einen kritischen Wert übersteigt, thermisch inaktiviert werden; die Ausbildung bzw. Ausdehnung der 'thermal spikes' hänge wesentlich von der Bestrahlungstemperatur ab. Einige weitere Hypothesen brauchen hier nicht aufgeführt zu werden, da sie keine allzu große Überzeugungskraft besaßen und nur geringe Resonanz fanden.

Es wurden aber auch Reaktionsmechanismen angedeutet, die neben einigen der schon erwähnten Vorstellungen bis heute in der Diskussion blieben, und die zum Teil durch die vorliegenden Untersuchungen bestätigt, präzisiert oder ergänzt werden konnten. Diese Vorschläge enthielten erstmals - orientiert an den Verhältnissen bei Bestrahlung im Flüssigen - die Annahme diffusibler und reaktionsfähiger Bestrahlungsprodukte, wodurch sie die vagen Vorstellungen von intermolekularer Wechselwirkung konkretisierten. Bachofer und Mitarbeiter (1953) fanden bei Bestrahlung von Bakteriophagen, daß sich der Inaktivierungsquerschnitt aus einem konstanten und einem überlagerten temperaturabhängigen Anteil zusammensetzt. Während sie den konstanten Term der Wirkung primärer Ionisationen zuordneten, brachten sie die Temperaturabhängigkeit mit der Schädigung durch strahleninduzierte diffusible Agentien in Zusammenhang. In enger Beziehung dazu steht eine weitergeführte Deutung, die den variablen Anteil des Wirkungsquerschnitts auf temperaturgesteuerte Diffusionsprozesse zurückführt (Bacq und Alexander, 1961). Nach dieser Deutung können radikalische Produkte, durch 'Treffereignisse' von den Makromolekülen abgetrennt, in Potentialmulden ('traps') festgehalten werden; gegebenenfalls werden sie aber durch Aufwendung thermischer Energie wieder aus diesen 'traps' befreit, wodurch die Weiterreaktion ermöglicht und die festgestellte Gesamtschädigung erhöht wird. Daß freie Radikale bei Strahlen-

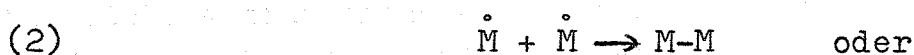
einwirkung auf Biomoleküle erzeugt werden, ist durch eine Vielzahl von Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Untersuchungen während etwa des vergangenen Jahrzehnts erwiesen (z.B. Müller, 1964).

Auf der Suche nach einer Erklärungsmöglichkeit für den sensibilisierenden Einfluß von Sauerstoff sowie für die Schutzwirkung von Verbindungen, die Sulfhydryl- oder Disulfid-Gruppen enthalten, wurden einige Autoren (Alexander und Charlesby, 1955; Howard-Flanders, 1960; Howard-Flanders et al., 1963; Braams, 1963) zu der Vermutung geleitet, daß es sich bei den strahleninduzierten kleinen Radikalen in erster Linie um atomaren Wasserstoff handle. Die in diesem Zusammenhang interessierenden Schritte des vorgeschlagenen Reaktionsschemas sehen folgendermaßen aus:

Durch primäre Energieabsorption wird von einem Makromolekül MH entsprechend der Gleichung



ein Wasserstoffatom abgetrennt. In diesem Prozeß entstehen Makroradikale $\dot{\text{M}}$, die nun weitere Reaktionen eingehen können, z.B. durch Ausbildung von Vernetzungen in der Form



die zu einer irreversiblen Schädigung führen. Wegen der starren gegenseitigen Fixierung der großen Molekülreste in trockenen Präparationen werden derartige Reaktionen sehr wahrscheinlich erst nach dem (für den biochemischen Nachweis erforderlichen) Wiederauflösen der Proben ablaufen. Das abdissoziierte Wasserstoffradikal (nach Gl. (1) oder (3)) kann nun, sofern es nicht mit dem Molekülrest oder einem anderen H-Atom rekombiniert, ein noch ungeschädigtes Molekül angreifen. Dies ist entweder gemäß



in Form einer H-Abstraktions-Reaktion möglich, wobei molekularer Wasserstoff freigesetzt wird, oder es führt zur Bildung eines Anlagerungsradikals:



Auch die durch H-Atom-Einwirkung gemäß den beiden zuletzt genannten Gleichungen entstandenen Molekülradikale sind jeweils als Vorstufen einer 'letalen Veränderung' (Inaktivierung oder allgemein biochemischer Funktionsverlust) anzusehen, für deren endgültige Ausprägung noch eine weitere Reaktion - etwa der durch die Gleichungen (2) und (3) beschriebenen Art - folgen muß.

Daß bei Bestrahlung organischer Substanzen ein Gas gebildet wird, das größtenteils aus Wasserstoff besteht, ist seit längerem bekannt. Diese Wasserstoff-Abspaltung ist für einige strahlenbiologisch besonders interessante Objekte wie Aminosäuren (Jacobs, 1962; Sommermeyer et al., 1967) und Nukleinsäure-Bausteine (Jacobs, 1962; Merwitz, 1967) genauer untersucht. Das entweichende H₂-Gas kann entweder durch Rekombination zweier Wasserstoffatome oder gemäß Gleichung (4) durch Abstraktion entstehen. Durch ESR-Untersuchungen gelang es Patten und Gordy (1964) und vor kurzem Müller und Dertinger (1968), strahleninduzierte freie Radikale als atomaren Wasserstoff zu identifizieren, der bei tiefen Temperaturen in 'traps' stabilisiert wird. Copeland, Sanner und Pihl (1968) nehmen H-Radikale als wahrscheinliche Zwischenglieder in der bei Lagerung oder Erwärmung trocken bestrahlter Substanzen beobachteten Radikalumwandlung an. Ein Beweis für das Auftreten intermolekularer Vernetzungen ('cross-links') ist der Befund von Jung und Schüßler (1966), daß Ribonuklease nach Bestrahlung im Trockenen und anschließendem Auflösen überwiegend in dimerisierter Form vorliegt, wodurch eine experimentelle Bestätigung für Gl. (2) und/oder Gl. (3) erbracht ist. Für trockene Systeme konnte wiederum durch ESR-Messungen ge-

zeigt werden, daß unter Einwirkung von atomarem Wasserstoff Molekülradikale gebildet werden. Solche Reaktionen sind bisher nachgewiesen für Aminosäuren (Snipes und Schmidt, 1966), wie auch für Nukleinsäuren (Heller und Cole, 1965; Herak und Gordy, 1966a) und deren Bausteine (Heller und Cole, 1965; Herak und Gordy, 1965, 1966a, 1966b; D. Holmes et al., 1966, 1967). Bei den bis jetzt eindeutig identifizierten, durch H-Atom-Einwirkung entstandenen Produkten handelt es sich stets um Additionsradikale (Gl. (5)). Ein Beispiel dafür, daß bei H-Radikalen die Addition gegenüber Abstraktions-Reaktionen überwiegt, fanden Vacek und Schulte-Frohlinde (1968) durch Bestrahlung von gelösten bzw. in eine feste Matrix aus Schwefelsäure-Glas eingebauten Alkoholen.

So aufschlußreich diese ESR-Ergebnisse auch sind, sie vermochten doch keine endgültige Antwort auf die letztlich interessierende Frage zu geben, ob die strahleninduzierten diffusiblen Radikale auch zur Inaktivierung biologischer Elementareinheiten beitragen. Erste Untersuchungen an verdünnten Lösungen von Enzymen (Mee et al., 1965; B. Holmes et al., 1967), Bakteriophagen (Dewey und Stein, 1968) und isolierter Phagen-DNS (Hagen und Jung, 1968) zeigten, daß im Flüssigen die Funktionsfähigkeit von Biomolekülen durch die Einwirkung von atomarem Wasserstoff zerstört werden kann. Ein entsprechender Nachweis für trockene Systeme wurde erstmals mit dieser Arbeit versucht.

Gelegentlich wird die Kette von Prozessen, die während und nach einer Bestrahlung ablaufen, in eine Folge einzelner Wechselwirkungs- und Reaktionsphasen gegliedert. Wenn man die Gefahr der Vereinfachung nicht übersieht, die eine solche Schematisierung immer mit sich bringt, kann eine derartige Einteilung durchaus nützlich sein, die komplexe Struktur des Reaktionsmechanismus anzudeuten, über den der schließlich feststellbare Strahlenschaden zustande kommt. Danach spricht man von der physikalischen Phase (Dauer

ca. 10^{-13} sec) der primären Energieabsorption; in der physiko-chemischen (ca. 10^{-10} sec) und chemischen Phase (10^{-6} sec) spielen sich Sekundärprozesse ab, bei denen es sich um Energieumlagerung, Dissoziation, Diffusion und Radikalreaktionen handelt; die sog. biologische Phase, in der es zur Ausprägung der biologisch relevanten Veränderungen kommt, kann von genetischen und metabolischen Vorgängen beeinflusst sein und sich über mehrere Jahre erstrecken. Alle Reaktionsschritte, die durch Veränderungen der Versuchsbedingungen zu beeinflussen sind, im besonderen Prozesse, an denen strahleninduzierte, diffusible Spezies mitwirken, und die im wesentlichen den Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen bilden, sind somit der zweiten und dritten Phase zuzuordnen.

In der physikalischen Phase sind unter üblichen Bestrahlungsverhältnissen Anregungen und Ionisationen die ausschlaggebenden Wechselwirkungsmechanismen, wobei im Falle von Quantenstrahlung Energieübertragung an Elektronen durch Compton- und Photoeffekt oder Paarbildung vorausgeht. Daneben gibt es noch einige weitere, in ihrem Beitrag meist vernachlässigbare Möglichkeiten primärer Energieabgabe, unter denen den elastischen Kernstößen aber doch auch vom strahlenbiologischen Standpunkt aus Interesse zukommt. Als elastischer Kernstoß sei hier ein Wechselwirkungsereignis definiert, in dem ein einfallendes Teilchen Energie an ein ganzes Atom überträgt, wobei die Summe der kinetischen Energien der Stoßpartner erhalten bleibt, der Energieverlust für Anregung oder Ionisation also vernachlässigbar ist. Wenn das stoßende Teilchen geladen ist (z.B. Proton, α -Teilchen), kommt die Energieübertragung durch Coulombwechselwirkung zustande, die mathematisch gut erfaßbar ist, wenn für das abgeschirmte Potential des gestoßenen Kerns das Thomas-Fermi-Modell oder ein ähnliches Zentralpotential zugrunde gelegt wird. Ist das einfallende Partikel ungeladen (z.B. Neutron), erfolgt die Wechselwirkung über Kernkräfte extrem kurzer Reichweite. Prinzipiell liegen die Verhältnisse dabei

gleichartig, nur sind die Werte für die Stoßquerschnitte und Austauschintegrale stark verändert.

Durch einen solchen elastischen Kernstoß kann ein Atom genügend Energie übertragen bekommen, um aus seiner Position in einem Molekül oder Atomgitter herausgelöst zu werden. Auf diese Weise erzeugte Versetzungen in Festkörpern sind gut untersucht (Seitz, 1949). Dies stellt zwar, z.B. in einem Biomolekül, einen drastischen Eingriff dar, ist aber normalerweise wegen der ausgeprägten Empfindlichkeit eines solchen Systems gegenüber den viel häufigeren Anregungen und Ionisationen ohne große Bedeutung. Unterhalb eines bestimmten - von der Art des Teilchens und des durchstrahlten Materials abhängigen - Energiewerts verliert ein geladenes Partikel jedoch mehr Energie in Kernstößen als in inelastischen Stoßprozessen. Neufeld und Snyder (1961) berechneten für Protonen und biologisches Material die Energieabhängigkeit des Bremsquerschnitts für Ionisationen und für Kernstöße. Aus der in Abb. 1 graphisch wiedergegebenen Abschätzung geht hervor, daß in diesem Fall unterhalb von etwa 1,5 keV der Energieverlust durch elastische Kernstöße dominierend wird. Hieraus wird deutlich, daß z.B. für die Dosimetrie epithermischer Neutronen, die in Gewebe ja überwiegend niederenergetische Protonen und thermische H-Atome auslösen, den Kernstoßprozessen ausschlaggebende Bedeutung zukommt (Zimmer, 1956).

Die Frage nach der biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße, die bereits wiederholt aufgegriffen wurde (Platzman, 1952; Fano, 1954; Zimmer, 1956; Riehl, 1956), ist bei Jung (1964, 1965, 1966) ausführlich diskutiert. In den letztgenannten Arbeiten sind auch die hauptsächlichen Schwierigkeiten erörtert, die sich bei einer experimentellen Untersuchung dieser Frage ergeben. Außerdem sind die Gründe dargelegt, die Bestrahlungen mit langsamen Protonen als die geeignetste Methode erscheinen lassen, die Wirkung von Kernstößen auf makromolekulare und elementarbiologische Objekte zu untersuchen.

Will man zuverlässige und möglichst allgemeingültige Informationen über den Ablauf und die Auswirkungen strahleninduzierter Primär- und Sekundärprozesse in biologischen Objekten gewinnen, ist man zwangsläufig gehalten, sich auf einigermaßen überschaubare elementare Systeme zu beschränken. Es ist leicht einzusehen, daß auf molekularer Ebene (selbst hier ist die Überschaubarkeit bezüglich Aufbau und Funktion der Moleküle in den meisten Fällen bei weitem noch nicht erreicht) am ehesten solche Informationen zu erwarten sind. Hier werden die Ergebnisse noch nicht durch Stoffwechselprozesse verzerrt, und die biologische Variabilität, die mit dem Organisationsgrad eines Systems zunimmt, ist von sehr untergeordneter Bedeutung. Bestrahlungsversuche an mikrobiologischen Objekten (z.B. Zellen) oder gar höheren Organismen sind für spezielle Fragestellungen sicher aufschlußreich - zu grundlegenden Erkenntnissen über den Mechanismus der Strahlenwirkung haben sie in keinem Fall geführt. Neben diesen, von der angestrebten allgemeinverbindlichen Aussagekraft diktierten Argumenten können auch physikalisch-technische Gründe die Verwendung makromolekularer Einheiten notwendig machen. In den hier referierten Untersuchungen setzen die extrem kurze Eindringtiefe langsamer Protonen wie auch die geringe Diffusionslänge thermischer H-Atome voraus, daß die Proben in dünnsten, praktisch monomolekularen Schichten vorliegen. Als elementare biologische Untersuchungsobjekte wurden das Enzym Ribonuklease (RNase), der Bakteriophage T1 sowie die einsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNS) des Phagen ØX174 gewählt. Die Frage, ob Phagen bzw. Viren ganz allgemein der belebten oder unbelebten Materie zuzuordnen sind, dürfte eher auf eine philosophische als auf eine naturwissenschaftliche Diskussion hinauslaufen. Jedenfalls haben sie keinerlei Stoffwechsel und bestehen rund zur Hälfte ihres Gewichts aus einem einzigen, wenn auch sehr kompliziert strukturierten Nukleinsäuremolekül. Man kann sie also mit einiger Berechtigung den 'Biomolekülen' zurechnen. Die zentrale Bedeutung der Nukleinsäuren in der Biologie und somit das Interesse,

das ihnen auch in der Biophysik zukommt - als Träger der genetischen Information sind sie die Steuerelemente aller Lebensvorgänge - brauchen wohl nicht mehr genauer dargelegt zu werden in einer Zeit, in der sich nicht nur die Fachliteratur in immer breiterem Umfang dieses Themas annimmt.

Bisher war sehr allgemein von der Ausprägung eines endgültigen 'Strahlenschadens' die Rede. Da jedoch in einer bestrahlten Probe eine Vielzahl von Veränderungen auftreten kann, ist es notwendig, im Einzelfall den 'Schaden' zu definieren, also einen Testeffekt festzulegen. Bei Phagen kann man sich z.B. auf die Adsorption an ein Wirtsbakterium, auf die Injektion der DNS, auf die Produktion neuer Phagen oder ähnliches beziehen. Unter der üblicherweise gemessenen 'Inaktivierung' ist der Ausfall einer markanten (und meist der strahlenempfindlichsten) Funktion zu verstehen. Damit ist für die hier verwendeten Versuchsobjekte bei RNase die Zerstörung der enzymatischen Aktivität gemeint und bei Phagen und infektiöser DNS der Verlust der Fähigkeit, in einem Wirtsbakterium die Produktion kompletter neuer Phagen zu veranlassen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß es Bestrahlungsfolgen in den Biomolekülen gibt, z.B. die Veränderung einer Aminosäure in der RNase (Jung und Schüßler, 1968), die in Funktionsfähigkeit nicht beeinträchtigen, die also beim üblichen Testverfahren nicht als 'Treffereignis' erfaßt werden.

Der Inaktivierungsgrad einer Probe hängt meist exponentiell von der Bestrahlungsdosis ab (auf Abweichungen, die in bestimmten Fällen und vor allem bei kleinen Dosen auftreten, soll hier nicht näher eingegangen werden). Diese Dosis-Effekt-Beziehung ist durch die Gleichung

$$(6) \quad N/N_0 = e^{-SD}$$

wiedergegeben. Hier steht N/N_0 für den Bruchteil der molekularbiologischen Einheiten, der eine Bestrahlung mit der

Dosis D ohne Funktionsverlust überstanden hat. Durch eine elementar-statistische Deutung läßt sich diese Abhängigkeit so interpretieren, daß jeweils ein einziges schaden-auslösendes Ereignis ('Treffer') genügt, um ein Biomolekül zu inaktivieren (Zimmer, 1960). S wird meist als Inaktivierungsquerschnitt bezeichnet und ist eine Konstante, die die Empfindlichkeit eines Systems gegenüber einer bestimmten Strahlenart unter den jeweiligen Versuchsbedingungen charakterisiert. Es ist üblich geworden, die Größe $1/S = D_{37}$ (bei dieser Dosis ist $N/N_0 = 0.37$) als Maß für die Strahlenresistenz zu benützen.

In einer Änderung dieser D_{37} -Werte drückt sich somit auch eine eventuelle Temperaturabhängigkeit der Überlebensrate aus. Faßt man die Inaktivierung als chemische Reaktion auf, die mit einer bestimmten (temperaturabhängigen) Geschwindigkeitskonstante abläuft, so kann man nach Arrhenius für die Strahlensensibilität, die der Geschwindigkeitskonstanten proportional ist, rein formal eine exponentielle Temperaturabhängigkeit zugrunde legen:

$$(7) \quad S = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

(R = allg. Gaskonstante, T = absolute Temperatur). Bei genauer Betrachtung zeigt sich, daß auch die 'Konstanten' A und E_a mit der Temperatur variieren (Marshall und Purnell, 1968). Der Temperaturexponent E_a , der den jeweils betrachteten physiko-chemischen Prozeß charakterisiert, kann in Analogie zur üblichen Betrachtungsweise der Chemie als Aktivierungsenergie bezeichnet werden. Ergibt sich beispielsweise bei einer Auftragung von $\ln S$ über der reziproken Temperatur ('Arrhenius-Darstellung') eine Gerade, so läßt das darauf schließen, daß ein einziger Reaktionsschritt zum beobachteten Effekt führt. Aus der Steigung der Geraden ist die der betreffenden Reaktion zugeordnete Aktivierungsenergie zu entnehmen.

II. Grundkonzeption der Arbeit

Nach der eben geschilderten Arrhenius-Methode analysierten Günther und Jung (1967) eine Reihe der aus der Literatur verfügbaren Daten über die Temperaturabhängigkeit der Strahlenwirkung. Sie fanden, daß sich die Inaktivierungsquerschnitte $S(T)$ (mit einer einzigen Ausnahme) jeweils aus einem temperaturunabhängigen Term und einem überlagerten, temperaturabhängigen Anteil zusammensetzen. Für Experimente, die auch nach erhöhten Temperaturen hin ausgedehnt worden waren, ließ sich dieser überlagerte Anteil wiederum in zwei rein exponentielle Terme (in der Arrhenius-Darstellung also in zwei Geraden) zerlegen (vergl. Abb. 18). Die Autoren konnten aufgrund dieser Analyse eine allgemeine Beziehung formulieren, die für verschiedene makromolekulare und elementare biologische Objekte sowie für eine Vielfalt von Strahlenarten die Temperaturabhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts recht befriedigend beschreibt durch die Gleichung

$$(8) \quad S(T) = S_0 \cdot e^{-E_0/RT} + S_1 \cdot e^{-E_1/RT} + S_2 \cdot e^{-E_2/RT}$$

(E_0 in praktisch allen Fällen = Null). Die Temperaturexponenten E_0 , E_1 und E_2 wurden als 'formale Aktivierungsenergien' bezeichnet, da es nicht möglich war, sie irgendwelchen bekannten chemischen Reaktionen zuzuordnen. In der Tabelle sind die für diese Exponenten ermittelten Werte aufgeführt, ergänzt durch einige Ergebnisse neuerer Untersuchungen. Ein Teil der Daten stammt aus ESR-Messungen, in denen die Ausbeute an freien Radikalstellen in Abhängigkeit von der Bestrahlungstemperatur bestimmt wurde. Ein kurzer Blick auf die Tabelle macht deutlich, daß in nahezu allen Fällen neben einem temperaturunabhängigen Anteil ($E_0 = 0$) eine zweite Komponente auftritt, deren formale Aktivierungsenergie E_1 meist nur wenig um 1 kcal/Mol schwankt. Soweit überhaupt untersucht, kommt bei hohen Temperaturen noch eine weitere Komponente zum Tragen. Ihr Temperaturexponent E_2 liegt etwa zwischen 3 und 6.5 kcal/Mol. Es läßt sich noch

nicht eindeutig abschätzen, ob diese starke Schwankung auf reale Unterschiede zwischen den einzelnen Werten von E_2 hinweist oder ob diesen Daten ein einheitlicher Wert zugrunde liegt (wie offensichtlich bei E_1), der durch die beträchtlichen Auswerte-Ungenauigkeiten verzerrt wird! Für die Ermittlung von E_2 ist zweimalige Differenzbildung erforderlich; außerdem steht dafür nur ein relativ enger Temperaturbereich zur Verfügung, da durch thermische Inaktivierung von Biomolekülen bzw. durch 'Ausheizen' von Radikalstellen bei erhöhten Temperaturen recht bald experimentelle Grenzen gesetzt sind.

Während der erste Term in Gl. (8) noch als unmittelbarer Beitrag von Ionisationen und elektronischen Anregungen (die ja näherungsweise temperaturunabhängig sind) gedeutet werden kann, ist für die beiden anderen Glieder wegen der niedrigen Werte ihrer Aktivierungsenergien eine konkrete Interpretation schwierig. Übliche Bindungsenergien sowie die Wärmetönungen der meisten physiko-chemischen Prozesse liegen um ein bis zwei Größenordnungen höher. Lediglich Wasserstoffbrücken-Bindungen und einige Radikalreaktionen fallen etwa in diesen Energiebereich. Es fand sich aber kein Ansatzpunkt, der es erlaubt hätte, auf dieser Tatsache eine plausible Deutung der Temperatur-exponenten E_1 und E_2 aufzubauen.

Da bisher bei Untersuchungen über den Temperatureinfluß auf die Strahleninaktivierung im Trockenen der Bereich erhöhter Temperaturen meist vernachlässigt worden war, E_2 also nur in wenigen Fällen erfaßt werden konnte (vergl. Tabelle), sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst versucht werden, einen Beitrag zum Schließen dieser Lücke in den rein phänomenologischen Befunden zu liefern. Dazu bot sich an, eine Meßreihe von Günther und Jung (1967), in der der Wirkungsquerschnitt für die Inaktivierung von RNase mit 2 MeV-Protonen zwischen 90 °K und 300 °K bestimmt worden war, nach erhöhten Temperaturen fortzusetzen. Hierbei

sollte sich zeigen, ob auch in diesem System ein zweiter temperaturabhängiger Term auftritt, nachdem bisher für RNase erst ein einziger derartiger Befund - $E_2 = 6.1$ kcal/Mol bei dünn-ionisierender 3 MeV-Elektronen-Strahlung - bekannt war (Fluke, 1966). Die Ergebnisse der bis 170°C ausgedehnten Messungen sind in Abschnitt IV.2 wiedergegeben.

Während dieses Experiment ein ziemlich spezielles Problem anschnitt, zielte das Hauptprogramm der vorliegenden Arbeit auf eine in derselben Richtung liegende, aber weit grundsätzlichere Fragestellung hin. Es sollte untersucht werden, ob durch Strahleneinwirkung freigesetzter Wasserstoff tatsächlich in der Lage ist, trockene makromolekulare Objekte anzugreifen, und ob gegebenenfalls eine derartige Radikalinaktivierung mit dem bei ionisierender Bestrahlung allgemein beobachteten Temperatureffekt in Zusammenhang gebracht werden kann. Entsprechende Möglichkeiten waren in einigen Hypothesen bereits angedeutet worden (vergl. vorausgehenden Abschnitt). Das Problem der Inaktivierung durch atomaren Wasserstoff ließ sich auf zwei getrennten, in ihrer Aussagekraft sich gegenseitig stützenden und ergänzenden Wegen angehen. Die eine Möglichkeit bestand darin, in Wasserstoffatmosphäre eine Hochfrequenzentladung zu zünden und die dabei durch Dissoziation - gewissermaßen 'synthetisch' - gebildeten H-Atome mit dem Probenmaterial reagieren zu lassen (vergl. Abschn. III.5.1). In dem zweiten System (Abschn. III.5.2) sollte die postulierte strahleninduzierte Freisetzung diffusibler H-Radikale in das Experiment mit einbezogen werden. Zu diesem Zweck wurde eine Folie aus organischem Material mit 2 MeV-Protonen bestrahlt; Wenn dadurch frei bewegliche und reaktionsfähige Radikale erzeugt werden, so müssen sie auch aus der dünnen Schicht herausdiffundieren und mit unmittelbar gegenüberliegendem Probenmaterial reagieren können. Die erwartete Inaktivierung der Proben sollte in einem einzigen, räumlich unterteilten System einen Nachweis für zwei

Reaktionsschritte, für Gl. (1) und Gl. (4) bzw. Gl. (5) des hypothetischen Schemas, erbringen. Als Untersuchungsobjekte für beide Methoden dienten RNase, infektiöse ØX174-DNS und T1-Phagen. Daneben wurde auch noch der homologe Phagenstamm verwendet, in dessen DNS die Base Thymin etwa zu 2/3 (Hotz, 1965) durch das basenanaloge Bromuracil ersetzt ist (BUT1-Phagen). Eine solche Substitution bewirkt sowohl gegenüber ionisierender wie nicht-ionisierender Strahlung eine Steigerung der Sensibilität um einen Faktor 2 bis 3 (Hotz und Zimmer, 1963).

Nachdem in den beiden Versuchsreihen und für sämtliche Testsysteme eine Inaktivierung der Proben nicht nur nachgewiesen, sondern auch als exponentiell von der Expositionszeit abhängig gefunden war (eine andere Kinetik hätte einen Beitrag solcher Radikalreaktionen zur Strahlenschädigung von vornherein ausgeschlossen, da Dosis-Effekt-Kurven normalerweise keine nicht-exponentiellen Anteile aufweisen), erschien das zweite Hauptvorhaben - die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit dieser Radikalinaktivierung - möglich und sinnvoll. Für die Durchführung dieses Vorhabens bot sich gerade die zweite der beiden skizzierten Methoden an. Hiermit ließ sich eine der wesentlichen experimentellen Voraussetzungen erfüllen, nämlich in einem weiten Bereich gut definierte Probentemperaturen zu erreichen und über ausreichende Zeitspannen während der Exposition aufrechtzuerhalten. Eine speziell für diese Erfordernisse konstruierte Expositionskammer (Abschn. III.6) ermöglichte Inaktivierungsversuche nach zwei verschiedenen Verfahren. Einmal konnte die bestrahlte Folie auf konstanter (Zimmer-) Temperatur gehalten werden, während sich die Temperatur der Proben nach unten (bis ca. 100 °K) und oben variieren ließ. Auf diese Weise war gleichbleibende Radikalausbeute gewährleistet; eine eventuelle Änderung der Inaktivierungsrate konnte somit nur in einem Temperatureinfluß auf Diffusions- und Reaktionsprozesse im Proben-

material begründet sein. Im zweiten System wurden Proben und Folie gemeinsam abgekühlt oder erwärmt und befanden sich also jeweils auf gleicher Temperatur. Hier war demnach die Radikalauslöserate mit in das Experiment einbezogen, sie konnte nicht von vornherein als konstant betrachtet werden. Falls diese Auslöserate und damit das Radikalangebot tatsächlich von der Temperatur beeinflusst wird, so mußte sich das in einer gegenüber der ersten Versuchsreihe veränderten Temperaturabhängigkeit der Inaktivierungsrate bemerkbar machen.

Parallel zu dem soeben skizzierten Programm und in engem thematischem Zusammenhang damit (siehe Abschn. I) wurde eine Untersuchung über die Wirkung von Kernstößen auf infektiöse Einstrang-DNS des Phagen ØX174 durchgeführt. Die bisher einzigen quantitativen Aussagen über die biologische Wirksamkeit elastischer Kernstöße waren durch Bestrahlung von RNase mit langsamen Protonen gewonnen worden (Jung, 1964, 1965, 1966). Hierbei hatte sich ergeben, daß für die Inaktivierung eines solchen Proteinmoleküls durch einen Kernstoß nur 25 % der für eine (mit der Wahrscheinlichkeit 1 inaktivierende) Primärisonisation erforderlichen Energie aufzuwenden sind. Mit anderen Worten: Kernstöße sind bei der Inaktivierung von RNase etwa viermal wirksamer als Ionisationen. Es lag nahe, die Experimente nun mit DNS weiterzuführen, im wesentlichen wegen der großen Bedeutung der Nukleinsäuren in der Biologie und der vom biochemischen und molekularbiologischen Interesse diktierten Frage nach der 'Anfälligkeit' dieser Schlüssel-moleküle gegenüber Kernstößen. Die Größe des Moleküls (das Molekulargewicht der DNS liegt ca. 2 Größenordnungen über dem von RNase) wirft jedoch das Problem des 'Auflösungsvermögens' dieses Systems auf, die Frage nämlich, ob bei Biomolekülen dieser Größe die experimentelle Erfassung einzelner Kernstoßprozesse noch möglich ist. Auf dieses Problem wird in der Diskussion (Abschn. IV.1) noch näher eingegangen.

Die direkte Verbindung zu den Inaktivierungsversuchen mit atomarem Wasserstoff wird ganz besonders durch folgende Überlegung beleuchtet: Ein eingestrahktes langsames Proton wird in Kernstößen aufgrund des Energie- und Impulssatzes und der Zusammensetzung organischen Materials im wesentlichen H-Atome aus den Molekülen herausschlagen. Diese H-Atome bekommen nur eine so geringe kinetische Energie mit (im Mittel werden bei einem inaktivierenden Stoß in RNase nur etwa 15 eV übertragen), daß sie nach kurzer Diffusionsstrecke als thermische Teilchen betrachtet werden können. Schließlich kann auch das einfallende Proton, in einer Reihe von Stößen nahezu vollständig abgebremst, durch einen Umladungsprozeß ein Elektron erhalten (denn die Ionisierungsenergien der in organischen Molekülen enthaltenen Atome sind annähernd von gleicher Größe) und damit als Wasserstoff-Radikal für eine chemische Reaktion zur Verfügung stehen. Wenn die Kernstöße für sich auch eindeutig primäre Wechselwirkungsereignisse sind, so wird durch das eben Gesagte doch deutlich gemacht, daß die gesamte dadurch ausgelöste Reaktionsfolge ein ebenso komplexes Ineinandergreifen von Primär- und Sekundärprozessen darstellen muß wie bei ionisierender Bestrahlung, und daß es auch hier nicht möglich ist, nur von einem 'direkten Effekt' zu sprechen.

III. Experimentelle Durchführung

III.1 Testobjekte und biochemische bzw. mikrobiologische Nachweismethoden

RNase ist mit 124 Aminosäurebausteinen ein relativ kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 13683. Nicht nur seine Primärstruktur, also die Aminosäuresequenz, sondern auch die Kettenkonformation ist aufgeklärt. Diese Sekundärstruktur wird durch 4 intramolekulare Disulfid-Bindungen zwischen Cystein-Molekülen sowie über Wasserstoffbrücken, hydrophobe Bindungen und elektrostatische Kräfte stabili-

siert und ist für die enzymatische Aktivität von ausschlaggebender Bedeutung. Das Molekül kann näherungsweise als Kugel mit einem Radius von ca. 35 Å angenommen werden. Seine geringe Adsorptionstendenz (im Gegensatz etwa zu Trypsin) an Glas erleichtert das Experimentieren erheblich. Da kein anderes Enzym sowohl biochemisch wie auch physiko-chemisch auch nur annähernd so gut untersucht ist, lassen an RNase gewonnene Befunde noch am ehesten Vergleichs- und Interpretationsmöglichkeiten erwarten. Die für diese Untersuchungen verwendete, aus Rinderpankreas isolierte und fünfmal umkristallisierte RNase (Sigma Chemical Company, St. Louis) war zusätzlich chromatographisch gereinigt worden. Für unsere Experimente war von besonderer Bedeutung, daß für RNase in der von Jung (1964) modifizierten Methode von Kalnitzky et al. (1959) eine Möglichkeit gegeben war, die Aktivität sehr kleiner Enzymmengen ($<10^{-6}$ g) zu bestimmen. Dieser Nachweis beruht auf dem in zwei Reaktionsschritten erfolgenden enzymatischen Abbau von Ribonukleinsäure (RNS). Hierbei werden durch Hydrolyse säurelösliche Oligonukleotide freigesetzt, deren Absorption bei 2600 Å eine optische Bestimmung der enzymatischen Aktivität ermöglicht. Die nach der im folgenden Abschnitt beschriebenen Methode bereiteten Proben werden nach Bestrahlung bzw. Exposition in Azetatpuffer gelöst. Nach Vermischung mit der RNS-Lösung kann die Enzymreaktion ablaufen, die nach einer definierten Inkubationszeit unterbunden wird. Die überschüssige RNS wird abzentrifugiert, worauf die optische Dichte des Überstandes im Vergleich zu einer Kontrollösung (ohne Enzym) bestimmt werden kann. Genauere Angaben über diesen Enzymnachweis sind im Anhang (Abschn. VII.) zu finden. Aus den Untersuchungen von Jung (1964) geht hervor, daß innerhalb gewisser Grenzen die Extinktion des Überstandes sowohl der Inkubationszeit wie auch der RNase-Konzentration direkt proportional ist. Für den Nachweis sehr kleiner Enzymmengen ist es erforderlich, die in käuflicher RNS bereits vorhandenen Oligonukleotide vorher durch Dialyse (1 %ige RNS-Lösung in 0.1 molarem

Azetatpuffer gegen 0.01 molaren Azetatpuffer) zu entfernen. Dadurch läßt sich ein RNS-Substrat gewinnen, mit dem der enzymbedingte Anstieg des Gehalts an Oligonukleotiden mit ausreichender Genauigkeit ermittelt werden kann.

Die T-Bakteriophagen, speziell die T1-Phagen, stellen bei den Viren ein ebenso ausgiebig untersuchtes Objekt dar wie die RNase bei den Enzymen (z.B. Hotz und Zimmer, 1963). Der verwendete Phage T1 besteht zu rund 45 Gewichtsprozent aus DNS, und zwar aus einem einzigen doppelsträngigen Molekül ($MG\ 5.8 \cdot 10^7$ Daltons), das in einer sekundären und tertiären Helix in den Kopf des Phagen gepackt ist. Die hervorstechendste biochemische Eigenschaft der Phagen liegt darin, daß sie bestimmte Bakterienstämme, sog. Wirtszellen, infizieren und dazu zwingen können, neue Phagen zu produzieren, wobei das Bakterium meist zugrunde geht. Innerhalb einer Generationszeit von etwa 15 Minuten bis zu einigen Stunden (für T1 und sein Wirtsbakterium E.coli B sind es 20 Minuten) können so nach der Vorlage eines einzigen Individuums einige hundert komplette Viruspartikel zusammengebaut werden. Die Phagen besitzen zu diesem Zweck in ihrer Proteinhülle Kontaktstellen - bei T-Phagen zu einer regelrechten Anheftplatte ausgebildet - mit denen sie sich an geeignete Rezeptorpartikel der Zellwand anlagern können, worauf der DNS-Strang durch die vermutlich enzymatisch angebaute Zellwand ins Zytoplasma des Bakteriums injiziert wird. Hier besorgen nun zelleigene Ribonukleinsäuren (m-RNS, t-RNS, r-RNS) nach der im DNS-Code niedergelegten Vorschrift nicht nur die vielfache Kopierung des injizierten Stranges, sondern auch die Produktion von Phagenprotein, bis nach dem erfolgten Zusammenbau das Bakterium platzt (Lysis). Wenn dies inmitten einer Bakterienkultur passiert, die auf einem Indikator Nährboden wächst, so werden von den freigesetzten Viren die umgebenden Zellen befallen, bis schließlich nach mehrstündiger Bebrütung in dem Bakterienrasen ein Loch ('plaque') zu erkennen ist.

Diese Plauebildungsfähigkeit (PFA) wird meist als Kriterium für das 'Überleben' eines Partikels, z.B. nach Bestrahlung, gewählt.

Die PFA stellt eine besonders strahlenempfindliche Funktion dar und kann denkbar einfach getestet werden. Trockene Phagenproben (vergl. folgenden Abschnitt) werden hierzu in Trypton-Nährbouillon (1 %) gelöst und im selben Medium bis auf eine Konzentration von einigen 10^3 intakten Phagen verdünnt. Auf einem Nährboden verteilt man 0.1 ml dieser Lösung mit einigen Tropfen der entsprechenden Bakterien-suspension, worauf man nach Bebrütung die Zahl der Plaques und damit die hierzu proportionale Zahl der funktionsfähigen Phagen bestimmen kann. Sowohl T1 wie auch BUT1-Phagen, die in ihren biochemischen Funktionen völlig identisch sind, wurden in 0.1 M Natriumtetraborat-Puffer bei einem Titer von ca. 10^{11} Partikeln/ml aufbewahrt. Da eine geringere Salzkonzentration im Laufe der Zeit die Aktivität der Phagen beeinträchtigt, wurden die jeweils benötigten Verdünnungen in bidest. Wasser erst kurz vor der Probenbereitung hergestellt.

Gegenüber den kompletten Viren stellt die infektiöse DNS des Phagen ØX174 wieder ein molekularbiologisches Objekt im engsten Sinn des Wortes dar. Es handelt sich dabei um einen in sich geschlossenen Einzelstrang mit einem Molekulargewicht von $1.7 \cdot 10^6$ Daltons (Sinsheimer, 1959b). Damit gehört die ØX174-DNS zu den kleinsten Phagennukleinsäuren. Mit der Methode der 'heißen Phenolextraktion', die besonders für geringe Phagenkonzentrationen von Vorteil ist, läßt sich durch Denaturierung des Hüllenproteins die DNS unbeschädigt aus den ganzen Phagen isolieren (Guthrie und Sinsheimer, 1963). Die Reinigung und Konzentration der Phagen wurde nach dem von Sinsheimer (1959b) angegebenen Schema durchgeführt. Für die DNS-Extraktion wird eine Phagenlösung bei 70°C mehrfach mit Phenol versetzt, worauf durch Zentrifugation jeweils die Phasen

voneinander getrennt werden. Im Phenol sammelt sich das abgebaute Protein, während die wässrige Phase die DNS enthält. Das Verfahren ist im Anhang genauer beschrieben. Die auf diese Weise gewonnene DNS-Lösung wird schließlich mehrere Tage gegen NCE-Puffer dialysiert.

Ein Teil der Moleküle eines solchen DNS-Konzentrates besitzt noch alle seine biochemischen Funktionen. Man nennt diese isolierten Moleküle infektiös, weil sie - genau wie die von einem Phagen bei der normalen Infektion eingeschleusten DNS-Fäden - in einem Wirtsbakterium die Produktion kompletter Phagen veranlassen können, wenn sie nur erst ins Innere der Zelle gelangt sind, was allerdings unter normalen Umständen praktisch ausgeschlossen ist. Um dieses Eindringen zu ermöglichen, bedient man sich eines Kunstgriffes. Durch enzymatische Einwirkung läßt sich die formgebende Proteinwand der Zellen ganz oder teilweise entfernen, wodurch aus den Bakterien sog. Protoplasten bzw. Sphäroplasten werden. Die verbleibende dünne Zellmembran kann von den DNS-Molekülen in einem rein passiven Diffusionsvorgang durchdrungen werden. Ein weiterer Kunstgriff besteht darin, daß man hierfür Bakterienmutanten verwendet (im Falle der ØX174-DNS den Stamm E.coli K12 anstelle des eigentlichen Phagenwirts E.coli C), die zwar nach Vorlage eines eingedrungenen DNS-Moleküls komplette Phagen produzieren können, deren Zellwand aber keine Rezeptorpartikel für diese Phagen besitzt. Dadurch wird vermieden, daß unverbrauchte Sphäroplasten, bei denen ja noch ein Teil der Proteinhülle vorhanden ist, durch neugebildete Phagen infiziert werden.

Für die hier beschriebenen Experimente wurden die Sphäroplasten nach einem von Guthrie und Sinsheimer (1963) erarbeiteten, jedoch entscheidend verkürzten Verfahren bereitet, für dessen ausschlaggebende Enzymreaktion man Lysozym während einer genau definierten Zeitspanne auf das Protein der Zellwand einwirken läßt (siehe Anhang).

Durch geringfügige Modifikation des Verfahrens und Weglassen der aufwendigen und zeitraubenden Reinigung und Konzentration der Sphäroplasten in einer Schichten-Zentrifugation wurde erreicht, daß die Sphäroplastenpräparationen bei gleicher Güte (d.h. 'Ansprechwahrscheinlichkeit' für DNS) nicht nur einige Stunden, wie bei der Originalmethode, sondern mehrere Wochen lang verwendbar blieben. So war es möglich, in einem relativ kurzen Arbeitsgang Zellsuspensionen für eine ganze Reihe von Versuchen auf Vorrat zu bereiten. Auf diese Weise konnte der für einen Infektionstest erforderliche Zeitaufwand um nahezu eine Größenordnung verringert werden, wodurch Untersuchungen in dem für die vorliegende Fragestellung notwendigen Umfang überhaupt erst vertretbar schienen.

Für die Bestimmung der Infektiosität der verschiedenen DNS-Präparationen (s. unten) wurden die Proben in Tris-Puffer von den Trägerplättchen abgelöst und mit der Sphäroplastenlösung versetzt (s. Anhang). Während der Inkubationszeit erfolgt die Infektion der vorbehandelten Zellen, und die infizierten Sphäroplasten gelangen zur Lysis und stoßen dabei die synthetisierten Phagen aus. Die Konzentration dieser Phagen, die ein direktes Maß für die Zahl der in der Infektionslösung anfangs vorhandenen intakten DNS-Moleküle (oder auch, im Vergleich zu Kontrollproben, für die Überlebensrate nach einer bestimmten experimentellen Prozedur) darstellt, wird in ganz analoger Weise zur Titration von T1-Phagen durch Plattieren in geeigneter Verdünnung ermittelt (mit E.coli C als Indikatorstamm). Aus der in Abb. 2 gezeigten Kalibrierungskurve ist zu ersehen, daß bei Verwendung der nach der beschriebenen Methode erhaltenen Sphäroplasten die Plaque-Zahl über etwa 6 Größenordnungen hinweg der DNS-Konzentration direkt proportional ist.

III.2 Probenbereitung

Sowohl die geringe Eindringtiefe der energiearmen Protonen bei den Kernstoßversuchen wie auch die sehr begrenzte Diffusionslänge von H-Radikalen bei den Inaktivierungsexperimenten mit atomarem Wasserstoff machen es erforderlich, daß das Probenmaterial in extrem dünnen und möglichst homogenen Schichten vorliegt. Die Reichweite von 1 keV-Protonen in biologischem Gewebe von durchschnittlicher Zusammensetzung beträgt z.B. rund 200 Å (Drosd, 1968). Wenn die Schätzungen über die Diffusionslängen von thermischen Wasserstoffatomen auch sehr weit auseinandergehen, so liegen sie doch zumindest größenordnungsmäßig ebenfalls in diesem Bereich. Daraus wird deutlich, daß die Testpräparationen weitgehend frei von Fremdstoffen (wie z.B. Pufferlösungen) sein sollten. Diese Forderung ließ sich allerdings nur für RNase erfüllen. Zahlreiche Versuche, DNS und Phagen durch Dialyse oder auch durch Chromatographie von jeglicher Salzbeimengung zu befreien, führten immer wieder zu dem Ergebnis, daß dadurch die biochemische Funktionsfähigkeit entweder schon in Lösung (bei DNS) oder bei der anschließenden Trocknung nahezu quantitativ verloren geht. Die Anwesenheit von Spurenmetallionen scheint somit für eine funktionserhaltende Stabilisierung dieser Elementareinheiten unerlässlich zu sein.

Für die Trocknung wurden verschiedene Verfahren erprobt. Lediglich mit der Methode der Gefriertrocknung ließ sich die durch den Wasserentzug bedingte Inaktivierung in vertretbaren Grenzen halten (nur für RNase stellt die Trocknung einen unkritischen Schritt dar), während bei der bloßen Evaporation die Moleküle vermutlich durch Scherkräfte, die von der Oberflächenspannung des Wassers herühren, praktisch vollständig inaktiviert werden. DNS und Phagen wurden für jede Versuchsreihe aus ihren Pufferlösungen $1:10^3$ bzw. $1:10^5$ in bidest. Wasser verdünnt, dessen

pH-Wert mit Ammoniak auf 7.5 angehoben war. RNase blieb auch in wässriger Lösung (ca. 0.1 mg/ml) über längere Zeit funktionsfähig. Aus diesen Lösungen konnten mit einer Pipettier-Vorrichtung Tröpfchen von 0.01 ml mit einer Genauigkeit von 5 % auf dünne Glasplättchen (12 mm \varnothing) aufgebracht und gleichmäßig verteilt werden. Die Plättchen wurden anschließend auf Trockeneis-Temperatur abgekühlt. Die Gefriertrocknung erfolgte bei etwa 10^{-2} Torr unter sehr langsamem Erwärmen der Probenplättchen. Mit dieser Methode konnten für die Phagen- und DNS-Präparationen Überlebensraten von etwa 30 bzw. 50 % bei der Trocknung erreicht werden. Die Experimente mit direkter Bestrahlung der Proben (mit 2 MeV-Protonen beim RNase-Temperaturversuch und langsamen Protonen bei den Kernstoßexperimenten mit DNS) erforderten statt der Glasplättchen metallische Trägerplättchen, um eine elektrostatische Aufladung der Probenträger zu vermeiden. In diesen Fällen wurden die Lösungen in gleicher Weise auf Feingoldronden (12 mm \varnothing , Dicke 0,5 mm) aufpipettiert, die zur Wiederverwendung jeweils in einer Äthanol-NaOH-Waschlösung (Jung, 1964) gereinigt werden mußten.

III.3 Kernstoßversuche an ϕ X174-DNS

Zur Ermittlung der strahlenbiologischen Wirksamkeit von Kernstößen bei DNS stand ein Beschleuniger zur Verfügung, der Protonen mit Energien von 0.7 bis 60 keV liefert. In Abb. 3 ist eine schematische Darstellung der Beschleunigeranordnung wiedergegeben, eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Jung (1964). Die Wirkungsweise der Anlage sei kurz skizziert: Durch ein Palladiumleck tritt Wasserstoffgas in eine Penning-Ionenquelle, in der bei einer Spannung von 800 V und einem Magnetfeld von etwa 600 Gauss eine Entladung betrieben wird. Diese Ionenquelle liegt mit ihren Versorgungseinheiten (H_2 -Druckbehälter, Spannungs-Netzgerät) auf dem jeweiligen Beschleunigungspotential. Durch eine Bohrung in der als Kathode dienenden Wand

der Entladungskammer gelangen die positiven Ionen mit einer mittleren Anfangsenergie von etwa 200 eV in die Beschleunigungsstrecke, die aus drei coaxial hintereinanderliegenden elektrostatischen Linsen besteht, von denen die erste und letzte geerdet sind, während das Potential der mittleren so gewählt wird, daß man am Strahlrohrende optimale Ausleuchtung und Strahlhomogenität erhält. Bei sehr niedrigen Beschleunigungsspannungen wird an die erste Linse ein negatives Zugpotential gelegt, um dadurch die Ionenextraktion aus der Entladungskammer und damit die Strahlintensität zu erhöhen. Nach dem Durchlaufen des Linsensystems erfährt der Protonenstrahl eine magnetische Ablenkung um 30° in horizontaler Ebene, wodurch die Abtrennung anderer geladener Teilchen (H_2^+ und H_3^+) ermöglicht wird. Über ein Schieberventil und hochisolierende Trennscheiben ist die Bestrahlungskammer angeflanscht, die unabhängig von der übrigen Apparatur belüftet werden kann. Der Aufbau dieser Kammer (Jung, 1964) ist aus Abb. 4 zu erkennen. Ein auf gestuftem negativen Potential liegendes Blendensystem am Kammereintritt dient einmal zur Strahlbegrenzung, zum anderen soll es Sekundärelektronen in der Kammer zurückhalten, um so eine exakte Bestimmung des Protonenstromes zu gestatten. In Verlängerung der Strahlachse ist an der rückwärtigen Kammerwand ein isolierter Faradaybecher angebracht. Ein senkrecht zur Strahlrichtung wirkendes Feld von Permanentmagneten soll auch hier das Entweichen ausgelöster Sekundärelektronen verhindern. Mit diesem, an ein Nanoampèremeter angeschlossenen Faradaybecher und einer drehbaren Blendenplatte, die Bohrungen von 3 bis 18 mm Weite - teilweise gegen die Achse des Primärstrahls versetzt - aufweist und somit jeweils verschiedene Bereiche des Strahls ausblendet, kann die Homogenität des Protonenstrahls ausgemessen werden. Bei allen Beschleunigungsspannungen läßt sich durch geeignete Wahl des Potentials der mittleren elektrostatischen Linse eine ausreichende Strahlhomogenität erzielen.

Im Betrieb wird in der gesamten Anlage ein Druck von etwa 10^{-5} Torr aufrechterhalten. Für die Inaktivierungsversuche wurden je elf Probenplättchen in eingefrästen Vertiefungen einer Bestrahlungsplatte befestigt. Diese drehbare Platte ist in Winkelabständen von 30° arretierbar, so daß die Plättchen der Reihe nach in das Zentrum der vom Strahl ausgeleuchteten Fläche gebracht werden können. Anstelle einer zwölften Probenhalterung weist die Platte eine Bohrung von 10 mm \varnothing auf. Indem man diese Bohrung in den Strahlengang dreht, kann auch bei eingebauter Bestrahlungsplatte der auf die Fläche eines Probenplättchens fallende Protonenstrom mit dem Faradaybecher gemessen werden. Während der einzelnen Bestrahlungen wird der hierzu proportionale, insgesamt in die Kammer eintretende Strom registriert. Als Nullkontrollen wurden auf der Platte jeweils 4 weitere Proben befestigt, die denselben Evakuierungs- und Belüftungsverhältnissen ausgesetzt waren und unbestrahlt blieben. Bei sämtlichen Inaktivierungsexperimenten betrug die Protonenstromdichte $3.8 \cdot 10^{-9}$ A/cm², was einem Partikelfluß von $2.4 \cdot 10^{10}$ p cm⁻² sec⁻¹ entspricht. Die 'Dosis'-Effekt-Kurven für die verschiedenen Protonenenergien wurden in der Regel aus den Überlebensraten von 32 bestrahlten Proben (jeweils 8 Plättchen für einen Meßpunkt), 12 Kontrollen und 12 extrem lange bestrahlte Proben ermittelt. Diese Langzeitbestrahlungen dienten dazu, den 'konstanten Anteil' der jeweiligen Probenpräparation zu erfassen, also den Prozentsatz an Biomolekülen, der auch bei noch so langer Bestrahlung nicht inaktiviert werden kann (vergl. Abschn. IV.1).

III.4 Inaktivierung von RNase durch 2 MeV-Protonen bei erhöhten Temperaturen

Dieses Temperatureffekt-Experiment wurde an einem Van de Graaff-Beschleuniger (High Voltage Eng. Corp.) mit Protonen von 2 MeV durchgeführt. Die prinzipielle Konstruktion der Beschleunigeranlage (Abb. 5) entspricht dem im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Aufbau. Auch hier werden die aus der Wasserstoff-Entladungskammer extrahierten positiven Ionen in einem Analysiermagneten in die einzelnen Komponenten aufgetrennt. Der Protonenstrahl durchläuft nach einer horizontalen Ablenkung um 25° ein Blenden-system, wobei er durch Vielfachstreuung an zwei 0.5μ starken Nickelfolien und geeignete Einstellung der Fokussierungspotentiale im Beschleuniger so weit aufgefächert werden konnte, daß am Strahlrohrende über eine Fläche von 2 - 3 cm Durchmesser gleichmäßige Bestrahlungsdichte vorlag. Auch die an diesem Ende angeflanschte Bestrahlungskammer (Abb. 6; Hermann, 1966) stimmt ihrer Konstruktion nach im wesentlichen mit der für die Kernstoßversuche verwendeten Kammer überein. Sie weist lediglich noch einen trommelförmigen Einbau auf, der mit Flüssigkeit oder Gas beschickt werden kann und die Möglichkeit bietet, die Proben auf die gewünschte Versuchstemperatur zu bringen. Die gut wärmeisoliert aufgehängte Bestrahlungsplatte kann 19 zu bestrahlende Proben sowie 6 Kontrollplättchen aufnehmen. Nach dem Evakuieren der Kammer erfolgt der Temperaturangleich der Proben an die (in unseren Versuchen jeweils erwärmte) Trommel ausschließlich durch Wärmestrahlung, wodurch die Ausbildung eines Temperaturgradienten innerhalb des Probenmaterials weitgehend vermieden wird. Die Trommel wurde durch die Umwälzanlage eines Thermostaten im Durchflußsystem entweder mit Wasser oder Öl (Mobiltherm 600, von 100°C bis zu 170°C) beschickt. Mit einem anstelle eines Probenplättchens auf der Trägerplatte befestigten Thermoelement war die Bestimmung der

Probentemperatur mit einer Genauigkeit von 2 Grad möglich. Die Erwärmung des Testmaterials durch die Bestrahlung bleibt im untersuchten Temperatur- und Dosisbereich innerhalb der Meßgrenzen. Da die Kontrollproben zusammen mit den bestrahlten Plättchen erwärmt und abgekühlt wurden (die Belüftung der Kammer durfte jeweils erst nach ausreichender Abkühlung erfolgen, da bei Anwesenheit von Sauerstoff die Hitzedenaturierung besonders stark ist), konnte auf diese Weise der Beitrag der rein thermischen Inaktivierung berücksichtigt werden. Oberhalb 170 °C war dieser Beitrag jedoch auch bei kürzestmöglicher Versuchsdauer bereits so hoch, daß eine Erfassung der Strahleninaktivierung nicht mehr mit ausreichender Genauigkeit möglich war. Zur Messung des Protonenflusses konnte wahlweise die gesamte Kammer oder ein an der rückwärtigen Kammerwand montierter Faradaybecher an einen Stromintegrator angeschlossen werden. Mit dem Faradaybecher ließ sich (wie bei der zuerst beschriebenen Bestrahlungskammer) ein durch eine Bohrung im Probenträger ausgeblendeter Teilstrahl erfassen. Die einzelnen Bestrahlungsphasen wurden automatisch beendet, indem der Integrator nach dem Erreichen der jeweils vorgegebenen 'Protonen-Dosis' eine elektromagnetisch betätigte Blende schloß. Die Stromdichte am Ort der Proben lag normalerweise bei $1.8 \cdot 10^{-8} \text{ A/cm}^2$, entsprechend einem Teilchenfluß von $11.3 \cdot 10^{10} \text{ p cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ oder einer Dosisleistung von knapp $300 \text{ krad sec}^{-1}$ (berechnet für eine Probenmaterial-Dichte von 1.45). Da die Reichweite von 2 MeV-Protonen (rund 50μ in Protein) die mittlere Materialdichte der Enzympräparationen ($< 1\mu$) erheblich übertraf, brauchte in diesem Experiment, im Gegensatz zu allen anderen Versuchsreihen, kein konstanter Anteil berücksichtigt zu werden.

III.5 Inaktivierungsversuche mit thermischen H-Atomen

Die Experimente wurden, wie bereits oben erwähnt, in zwei parallel laufenden Versuchsreihen mit grundsätzlich unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Als Testobjekte dienten RNase, die Phagen T1 und BUT1 sowie infektiöse ØX174-DNS.

III.5.1 Radikalerzeugung durch Hochfrequenz-Entladung

Das erste, im folgenden mit System I bezeichnete Verfahren zur Erzeugung von Wasserstoff-Radikalen bestand in einer Hochfrequenzentladung in H₂-Atmosphäre (Abb. 7). Durch geeignete Drosselung von Pumpleistung und Gaszuführung kann Wasserstoffgas bei einem gleichmäßigen Druck von 16 Torr (optimale Versuchsbedingungen) durch eine Reaktionsglocke gesaugt werden. Um das Einströmrohr sind Elektroden geschlungen, die von einem Hochfrequenzgenerator (30 kHz, 30 kV) gespeist werden. Auf diese Weise wird in dem Gasstrom eine Entladung betrieben, in der neben geladenen Produkten auch atomarer Wasserstoff entsteht. Die geladenen Partikel und ein Teil der H-Atome rekombinieren, ehe sie die Mündung des Rohres und damit den eigentlichen Reaktionsraum erreichen. Jeweils 4 Probenplättchen werden senkrecht dicht neben der Austrittsöffnung fixiert, so daß die Biomolekül-Präparationen dem vorbeistreichenden Gasstrom mit den noch verbliebenen H-Radikalen ausgesetzt sind. Der relativ hohe Betriebsdruck von 16 Torr, der die Entladung auf den Bereich zwischen den beiden Elektroden begrenzt, sollte in Verbindung mit der Abwinkelung des Rohres vermeiden, daß UV-Quanten aus der Entladungszone in den Reaktionsraum gelangen. Um außerdem noch einen eventuellen Inaktivierungsbeitrag von UV-Licht auszuschalten, das von Rekombinationsprozessen im senkrechten Rohrstutzen herrührt, mußte die erwähnte seitliche Anordnung der Proben gewählt werden. Es ist bisher nicht möglich, eine 'Radikal-Dosisleistung' für die Apparatur anzugeben. Da jedoch sämtliche Betriebsparameter genau

reproduzierbar waren und sehr konstant gehalten werden konnten, ist eine direkte Proportionalität zwischen Expositionsdauer und 'Radikal-Dosis', also der Ausbeute an atomarem Wasserstoff, mit Sicherheit anzunehmen.

III.5.2 'Kondensator'-Experiment

In dem zweiten System sollte gewissermaßen noch der Anfangsschritt (Gl. 1) des in der Einführung wiedergegebenen Reaktionsschemas, die strahleninduzierte Freisetzung diffusibler H-Atome aus wasserstoffhaltigem Material, mit in das Experiment einbezogen werden. Zu diesem Zweck wurde für das Strahlrohrende des beschriebenen Van de Graaff-Beschleunigers ein Einschub gebaut, der in seinen wesentlichen Konstruktionsmerkmalen eine gewisse Ähnlichkeit mit einem Plattenkondensator aufweist (Abb. 8). Auf einen metallischen Trägerblock ist eine 6 μ dicke Folie aus Polyäthylenterephthalat (Handelsname: Hostaphan) aufgespannt und unter einem Neigungswinkel von 9° gegen den 2 MeV-Protonenstrahl fixiert. In einem Abstand von 6 mm sind parallel dazu und abgeschirmt gegen den primären Protonenstrahl die Proben angeordnet. Die durch die Bestrahlung (bei einem Druck < 10⁻⁵ Torr) freigesetzten H-Radikale können aus der Folie herausdiffundieren und mit dem gegenüberliegenden Probenmaterial reagieren. Durch den flachen Einfallswinkel der Protonen läßt sich einerseits erreichen, daß die Wasserstoffatome über eine längere Strecke der Bahnspur hinweg relativ nahe der Folienoberfläche abgelöst werden und so eine größere Chance haben, aus der Folie herauszudiffundieren. Zum anderen können dadurch die Proben sehr nahe gegenüber angebracht werden, wodurch eine gute Raumwinkelausnutzung ermöglicht wird, wenn man davon ausgeht, daß der statistische Prozeß der Diffusion etwa isotrop über den Winkelraum 4 π erfolgt. Durch den gegenläufigen Effekt der mit dem Einfallswinkel abnehmenden Bestrahlungsdichte ergibt sich bei ca. 9° eine optimale Neigung, die sich in einer maximalen Inaktivierungsrate

der Proben zeigt. Daß im Mittel die (in Strahlrichtung gesehen) vorne und hinten gelegenen Proben jeweils gleiche Inaktivierung zeigen, weist darauf hin, daß der Radikalausstritt tatsächlich etwa isotrop verteilt erfolgt. Um einen Beitrag der durch die Bestrahlung ebenfalls ausgelösten Sekundärelektronen zur biochemischen Schädigung des Testmaterials auszuschließen, wurde zwischen Folie und Probenplättchen ein 'Schirmgitter' in Form eines Drahtrahmens auf negatives Potential gelegt. In einem Testexperiment wurde in Abhängigkeit von der Gitterspannung der Sekundärelektronenstrom gemessen, der auf ein Cu-Blech von 1 cm^2 Fläche am Ort eines Probenplättchen auffällt. Aus Abb. 9 ist zu ersehen, daß bei dem für die Serienversuche gewählten Potential von - 520 Volt der Elektronenstrom weitgehend unterbunden wird und in einem Bereich liegt, der für eine merkliche Inaktivierung nicht relevant ist. Der Schirmgitterrahmen ist außerhalb aller auf die Probenpräparationen treffenden Radikal-Flugbahnen angeordnet, so daß kein Teil des Testmaterials im geometrischen Schatten des Gitters liegt. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Proton des Primärstrahls nach Streuung wieder aus der Folie austritt und auf das Probenmaterial trifft, ist kleiner als 10^{-7} , wie man nach der Vielfachstreuungstheorie (Molière, 1948) abschätzen kann. Auch für diese Methode der Radikalerzeugung läßt sich keine 'Dosimetrie' angeben. Doch konnten die Intensität der Primärstrahlung und die übrigen Versuchspartner so konstant gehalten werden, daß die Expositionszeit mit hinreichender Genauigkeit als proportionales Maß für die Zahl der ausgelösten und damit der auf die Probe treffenden H-Radikale gelten kann.

III.6 Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung von T1-Phagen mit thermischen H-Atomen

Nachdem es gelungen war, mit den beiden voranstehend beschriebenen Systemen zu zeigen, daß bei ionisierender Bestrahlung organischen Materials tatsächlich diffusible und reaktionsfähige Produkte freigesetzt werden, die die Inaktivierung von Biomolekülen hervorrufen können (vergl. Abschn. IV.3), war die Frage zu prüfen, ob mit diesen Methoden auch eine eventuelle Temperaturabhängigkeit der Radikalinaktivierung erfaßt werden kann. Für das Verfahren der Hochfrequenz-Entladung ist zumindest eine quantitative Bestimmung einer solchen Abhängigkeit ausgeschlossen, da wegen des durchgeleiteten Gasstromes im Reaktionsraum und insbesondere im Probenmaterial keine einheitlichen Temperaturwerte zu erreichen sind. Dagegen bietet das im 'Kondensator'-Experiment benutzte System die Möglichkeit, strahleninduzierte Radikalreaktionen bei gut definierten Temperaturen zu studieren, sofern bei der Versuchskonzeption berücksichtigt wird, daß im Vakuum eine Temperaturänderung des Probenmaterials praktisch ausschließlich aufgrund von Photonenstrahlung erzielt werden kann.

Expositionskammer: Um möglichst rationelles Arbeiten zu ermöglichen und um den Informationsgehalt der erwarteten Ergebnisse zu erhöhen, wurde ein Apparat gebaut, der die Exposition von jeweils 50 Proben in einem einzigen Versuchsgang zuläßt, wobei zwischen zwei verschiedenen Versuchsbedingungen gewählt werden kann. Das Prinzip dieser beiden Methoden ist in Abb. 10 schematisch gezeigt. Bei Methode A können die Proben durch Kühlung oder Aufheizung auf die gewünschte Temperatur gebracht werden, wogegen die Folie, aus der die Radikale ausgelöst werden, während aller Messungen auf Zimmertemperatur gehalten wird, so daß bei allen Versuchsserien konstante Ausbeute an diffusiblen Radikalen vorliegt. Auf diese Weise läßt sich die Reaktionsrate der H-Atome mit Probenmaterial von verschiedener

Temperatur untersuchen. Bei Methode B werden Folie und Testpräparationen zusammen abgekühlt oder erwärmt, wodurch Verhältnisse wie bei direkter Bestrahlung makromolekularer Objekte gegeben sind, bei der sich ja auch das Molekül, von dem das bewegliche Radikal abgetrennt wird, und die schließlich von diesem Radikal geschädigte biologische Elementareinheit auf gleicher Temperatur befinden.

Die geometrischen Verhältnisse sind für beide Methoden identisch und weichen nur geringfügig von der in Abschnitt III.5.2 skizzierten Anordnung ab. Der Einfallswinkel des Primärstrahls (9°) und die Schirmgitterspannung (-520 Volt) wurden beibehalten. Eine halbschematische Darstellung der gesamten Expositionskammer ist in Abb. 11 gegeben. Anstelle der gebräuchlichen Anordnung einer drehbaren Bestrahlungsplatte wurde eine lineare, magazinartige Bauweise gewählt, um mit einer einzigen Apparatur die experimentellen Voraussetzungen für die beiden beschriebenen Expositionsmethoden erfüllen zu können.

In einer Vakuumkammer, die aus einem zentralen Kasten (6.5 · 13 · 18 cm) mit zwei zylindrischen Auslegern (Länge 35 cm, \varnothing 9 cm) besteht, ist das eigentliche Thermostatgefäß frei aufgehängt (justiert durch Stützringe aus hochisolierendem Teflon). Achsenparallel sind in dieses trommelartige Gefäß, das beispielsweise mit Kühlflüssigkeit gefüllt werden kann, zwei Führungsrohre von rechteckigem Querschnitt (12 x 28 mm Innenmaß) eingelassen. In der Mitte dieser Trommel ist ein Schlitz von 15 mm Weite so tief eingeschnitten, daß beide Rechteckrohre unterteilt werden. In diesem Schlitz findet die Bestrahlung der Folie bzw. die Exposition jeweils eines Probenpaares statt. Eine massive zwölfeckige Messingscheibe, die bei Methode A die Folie trägt, kann genau passend aber ohne direkte Berührung von oben so in diese Aussparung eingesenkt werden, daß eine der 12 Stirnflächen (14 x 30 mm) den richtigen Abstand zu den Proben und die gewünschte Neigung zur Einstrahlrichtung

aufweist. Diese Scheibe läßt sich mittels einer Kurbel drehen und in Winkelabständen von jeweils 30° fixieren. Zwei 'Magazine', eines für die Proben und eines für die Folie (bei Methode B), die als U-förmige Messingprofile gearbeitet sind, können in die beiden Führungsrohre eingeführt werden. Auf dem Probenmagazin finden 50 Glasplättchen ($12\text{ mm } \varnothing$) in 0.5 mm tiefen, paarweise angeordneten Einfräsungen Platz. Für Experimente nach Methode B (Folie und Proben auf einheitlicher Temperatur) wird die Zwölfeckscheibe ausgebaut und die Folie stattdessen auf die Unterseite des zweiten Magazins gespannt, wodurch sie sich in dieselbe Lage bringen läßt wie bei Methode A. Durch eine rechteckige Blende ist gewährleistet, daß in beiden Methoden identische Folienbereiche bestrahlt werden. Die Magazine sind in ihrer Länge so bemessen, daß sie in jeder der beiden Trommelhälften vollständig aufgenommen werden können. Durch diese weitgehende Umhüllung im Thermostatgefäß läßt sich besonders gute, auf Wärmestrahlung beruhende Temperaturanpassung der Proben erreichen. Bei der Konstruktion des Folienrades wurde darauf geachtet, daß es über die massiven Messingholme, in denen es gelagert ist, guten thermischen Kontakt zur Abdeckplatte hat, von der es getragen wird. Die Magazine können an Gewindestäben entlang über den Bestrahlungsschlitz hinweg von einer Hälfte der Thermostattrommel in die andere geschoben werden. Diese Gewindestäbe sind in vakuumdichten Drehdurchführungen gelagert und werden über eine Zahnradübersetzung einzeln oder gemeinsam gedreht. Über den Fühler eines Mikroschalters läßt sich feststellen, wann sich ein Probenpaar genau in Expositions-lage befindet; außerdem wird die jeweilige Probennummer angezeigt.

Temperatureinstellung und -messung: Das Thermostat-Gefäß kann über das Innere von zwei Koaxialrohren mit Kühlflüssigkeit oder Gas beschickt werden. Der Rückfluß führt durch das äußere Rohr. Ein- und Ausmündung liegen je an

einer Stirnfläche der Trommel, so daß im Durchflußbetrieb die Ausbildung eines nennenswerten Temperaturgradienten in den Gefäßwänden vermieden wird. In den meisten Fällen wurde kaltes Stickstoffgas eingeblasen. Durch Steuerung der Durchflußmenge konnte die gewünschte Proben-temperatur stabilisiert werden. Die tiefsten Temperaturen (ca. 100 °K) ließen sich dadurch erreichen, daß das Kühlgefäß mit flüssigem Stickstoff gefüllt wurde. Für die Versuche bei erhöhten Temperaturwerten wurde ganz entsprechend heiße Luft durch die Thermostattrommel geleitet. Zur Temperaturmessung ist in einem der beiden Einschubrohre ein Thermoelement in der Weise installiert, daß es weder die Rohrwand noch das eingeschobene Magazin berührt. Durch Vergleichsmessungen mit einem anstelle eines Probenplättchens auf dem Magazin befestigten Thermopaar wurde festgestellt, daß in keinem Temperaturbereich die angezeigten Werte um mehr als zwei Grad differierten. In gleicher Weise konnte gezeigt werden, daß abgekühlte Proben ihre Temperatur zunächst beibehalten, wenn sie aus der Kühltrommel in den Bestrahlungsschlitz geschoben werden, selbst wenn sie dort eine Folie auf Zimmertemperatur (Methode A) gegenüber haben. Erst nach mehr als 30 Sekunden beginnt durch Wärmeeinstrahlung die Temperatur langsam zu steigen. Bringt man dagegen den Temperaturfühler an dem in den Schlitz der gekühlten Trommel geschobenen Folienrand an, so erweist sich umgekehrt, daß sich die massive Metallscheibe und damit die aufgespannte Folie nur bis auf wenige Grad unter Zimmertemperatur abkühlt, wenn die Abdeckplatte von außen warm angeblasen wird.

Folien: An geeignetem, im Handel erhältlichen Fertigmateriale stand lediglich Polyäthylenterephthalat (Hostaphan) zur Verfügung, das (wie schon beim 'Kondensator'-Experiment) als Folie von 6 μ Dicke in Methode A verwendet wurde. In Methode B sollte die Folie die jeweilige Versuchstemperatur haben und also durch den auffallenden Protonenstrahl nicht nennenswert erwärmt werden. Dazu war eine extrem

dünne und fest auf dem Metallträger haftende Schicht erforderlich, damit Folie und Unterlage eine Einheit bilden und so die absorbierte Energie sich sofort auf die gesamte Masse des Folienmagazins verteilen kann. Zu diesem Zweck wurde Polyvinylformal (Handelsname: Formvar) in Chloroform in einer Konzentration von 1 - 5 mg/ml gelöst. Durch wiederholtes Eintauchen des Folienträgers und Verdunstenlassen des Lösungsmittels kann man Folien von beliebiger Dicke erhalten, die optimal auf der Unterlage haften. Die Inhomogenitäten in der Beschichtung betragen etwa $\pm 20\%$ (Kürzinger, 1965). Für die Serienversuche nach Methode B wurden Folien mit einer Schichtdicke von ca. 1700 Å verwendet.

Für die Wahl des T1-Phagen als Versuchsobjekt für diese Temperatureffektmessungen sprach einmal die Tatsache, daß dieser Phage strahlenbiologisch sehr ausgiebig untersucht ist (z.B. Hotz und Zimmer, 1963), und somit die Deutung von Ergebnissen auf einem recht breiten Spektrum bereits bekannter Fakten aufbauen kann. Zum anderen war die Überlegung ausschlaggebend, daß es wohl wenig sinnvoll ist, ein erstes Testexperiment, das gewissermaßen eine Ja-Nein-Frage beantworten soll - in unserem Fall die Frage, ob strahleninduzierte Radikalreaktionen eine Temperaturabhängigkeit zeigen - gleich an einem besonders aufwendigen Versuchssystem durchzuführen. Wenn RNase und ØX-DNS auch den Vorteil größerer thermischer Resistenz bei erhöhten Temperaturen geboten hätten, so wäre der experimentelle Aufwand bei diesen Objekten doch erheblich höher gewesen. Denn für RNase liegen die Expositionszeiten um beinahe zwei Größenordnungen über denen von T1-Phagen (vergl. Abschn. IV.3), und für ØX-DNS ist eine weitaus kompliziertere mikrobiologische Nachweismethode erforderlich.

IV. Ergebnisse und Diskussion

IV.1 Kernstoßversuche an infektiöser ØX174-DNS

In Abb. 12 ist eine typische Inaktivierungskurve für die Bestrahlung von isolierter ØX174-DNS mit niederenergetischen Protonen gezeigt. Die Überlebensrate fällt mit wachsender Dosis monoton ab und nähert sich bei hohen Dosen asymptotisch einem konstanten Wert. Entsprechende Kurven hatten sich bereits bei den Untersuchungen an RNase (Jung, 1966) für die kleinsten Protonenenergien ergeben und darauf hingewiesen, daß die Dicke der Probenpräparationen größer als die Reichweite der auftreffenden Partikel war. In den jetzigen Versuchen lag der konstante Anteil je nach Probenpräparation zwischen 20 und 40 Prozent, war aber unabhängig von der Protonenenergie. Demnach sind offensichtlich 20 - 40 Prozent des Testmaterials in winzige Salzkristalle eingeschlossen, wo sie wegen der geringen Reichweite der Protonen nicht getroffen werden können. Dagegen müssen 60 - 80 Prozent der Probensubstanz in nahezu monomolekularer Schicht vorliegen, da dieser Teil auch bei einer Protonenenergie von knapp 1 keV in gleicher Weise vollständig inaktiviert wird. Zieht man nun den konstanten Anteil, der einen ins eigentliche Experiment gar nicht einbezogenen Teil der Testsubstanz repräsentiert, gemäß Abb. 12 von den Meßpunkten ab, so ergibt sich ein exponentieller Zusammenhang zwischen der Überlebensrate und der 'Protonen-Dosis', in halblogarithmischer Darstellung also ein linearer Kurvenverlauf. Im folgenden ist jeweils nur diese nach Abzug des konstanten Anteils resultierende Inaktivierungskurve gezeichnet, aus deren Neigung die D_{37} als relatives Maß der Strahlenresistenz entnommen werden kann, wobei die Kurve für die Dosis Null auf 100 % normiert ist.

Da sich die D_{37} -Werte im erfaßten Energiebereich nur recht wenig voneinander unterscheiden, sind aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abb. 13 nur 3 Kurven wiedergegeben, und zwar für die Energien 0.8, 1.2 und 35 keV. Daraus ist

schon ersichtlich, daß in diesem Bereich die Protonenenergie nur von geringem Einfluß auf die Inaktivierungsrate der DNS ist. Die Ergebnisse der gesamten Versuchsreihe sind in Abb. 14 zusammengefaßt. Hier ist über der jeweiligen Protonenenergie der aus der zugehörigen Überlebenskurve ermittelte Inaktivierungsquerschnitt ($S = 1/D_{37}$) aufgetragen. Zwischen etwa 5 und 50 keV ist innerhalb der Fehlergrenzen keine Änderung des Wirkungsquerschnitts zu erkennen, unterhalb von 5 keV nimmt er jedoch ab, erreicht zwischen 1 und 1.5 keV ein Minimum und steigt bei noch kleineren Energien wieder etwas an. Wie schwach bei \emptyset X-DNS die Energieabhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts im Vergleich zu den Verhältnissen bei RNase (Jung, 1966) ausgeprägt ist, geht ebenfalls aus Abb. 14 hervor, in der neben den Ergebnissen dieses Experiments gestrichelt die entsprechende Kurve für RNase gezeichnet ist, wobei durch eine willkürliche Normierung die Wirkungsquerschnitte für 50 keV zur Deckung gebracht wurden.

Ruft man sich nochmals die Abbremsverluste von Protonen durch Ionisationen und Kernstöße in Abhängigkeit von ihrer kinetischen Energie ins Gedächtnis (Abb. 1), so läßt die gefundene geringe Variation des DNS-Inaktivierungsquerschnitts mit der Energie der eingestrahlten Partikel folgende Deutung zu: Bei hohen Energien ist die Ionisierungsdichte der Protonen so groß, daß jedes durchquerte DNS-Molekül inaktiviert wird. Um bei den Abmessungen des Makromoleküls die Ionisierungsdichte der Protonen so weit zu senken, daß die Wahrscheinlichkeit für ein inaktivierendes Ereignis innerhalb eines Moleküls merklich kleiner als 1 wird, muß die Protonenenergie so niedrig gewählt werden, daß in diesem Bereich bereits der Abbremsquerschnitt für Kernstöße von vergleichbarer Größe ist, also annähernd jedes getroffene Molekül einen Schaden durch elastischen Kernstoß erleidet. Das bedeutet, daß durch das hohe Molekulargewicht des gewählten Objektes das 'Auflösungsvermögen' des Systems sehr begrenzt ist.

Eine aus der Treffbereichstheorie stammende Formulierung der Abhängigkeit des Inaktivierungsquerschnittes S von der Ionisierungsdichte der eingestrahlten Teilchen läßt sich für eine Kalkulation des Effektes heranziehen. Durch die Gleichung

$$(9) \quad S = S_0(1 - e^{-id})$$

(S_0 und d stehen für den geometrischen Querschnitt bzw. die mittlere Dicke des bestrahlten Moleküls, i ist die Zahl der Primärionisationen pro cm) wird ausgedrückt, daß bei wachsendem Wert von i , worunter hier die Zahl der inaktivierenden Ereignisse pro Längeneinheit - also Ionisationen und Kernstöße zusammen - verstanden sei, der Inaktivierungsquerschnitt sich dem geometrischen Querschnitt des Moleküls nähert. Danach kann der einer Berechnung nach Gl. 9 zugrundezulegende geometrische Molekülquerschnitt, der sich für trockene Präparationen nicht aus anderen Daten erschließen läßt, nach dem bei hohen Protonenenergien asymptotisch erreichten Wert des Inaktivierungsquerschnitts mit $6.2 \times 10^{-12} \text{ cm}^2$ angenommen werden (vergl. Abb. 14). Wenn man von einem Molekulargewicht von 1.7×10^6 Daltons und der Dichte 1.7 g/cm^3 ausgeht und kompakte Packung des Stranges annimmt, entspricht das DNS-Molekül einem Scheibchen von etwa 300 \AA Durchmesser und knapp 30 \AA mittlerer Dicke. Es ist nicht bekannt, in welcher Form das Molekül in gefriergetrockneten Präparationen tatsächlich vorliegt.

Aus den Abbremsquerschnitten σ_e und σ_n , die in $\text{MeV} \cdot \text{cm}^2 / \text{Atom}$ in Abb. 1 graphisch wiedergegeben sind, läßt sich durch Multiplikation mit der Zahl der Atome pro cm^3 (wenn man die von Sinsheimer 1959 veröffentlichten Daten zugrunde legt, errechnet sich für OX-DNS ein Wert von $1.05 \times 10^{23} \text{ Atome/cm}^3$) der Energieverlust pro Längeneinheit ermitteln. Nimmt man nun einen bestimmten Energieaufwand für ein inaktivierendes Ereignis an, z.B. den recht gut gesicherten Wert von etwa 60 eV für eine Primärionisation, so erhält man damit i in Abhängigkeit von der Protonen-

energie. Unter der Voraussetzung, daß lediglich Ionisationen zur Schädigung der Moleküle beitragen und für i somit nur die Zahl der Primärionisationen einzusetzen ist, ergibt sich nach Gl. 9 der in Abb. 15 als Kurve A eingetragene Verlauf des Inaktivierungsquerschnitts. Kurve B ist unter der Annahme berechnet, daß Kernstöße und Ionisationen mit gleicher energiespezifischer Effektivität zum Funktionsverlust eines Moleküls führen, daß also pro inaktivierendem Kernstoßereignis ebenfalls im Mittel 60 eV aufzuwenden sind. Legt man der Berechnung eine vierfache Wirksamkeit der Kernstöße im Vergleich zu Ionisationen zugrunde (dabei wäre eine Energieabgabe von 15 eV für einen inaktivierenden elastischen Stoß ausreichend), wie sie aus den entsprechenden Experimenten an RNase (Jung, 1966) zu folgern war, dann erhält man die theoretische Kurve C.

Aus Abb. 15 ist als eindeutiges Ergebnis dieser Versuchsreihe zu entnehmen, daß auch bei O^16X -DNS elastische Kernstöße einen wesentlichen Beitrag zur Inaktivierung bei niedrigen Protonenenergien leisten. Der Verlauf der experimentellen Kurve weist auch darauf hin, daß Kernstöße eine größere Effektivität als Ionisationen besitzen, daß der Energieaufwand für einen funktionszerstörenden Kernstoß also unter 60 eV liegen muß. Über das genaue Verhältnis dieser Effektivitäten ist jedoch keine Aussage möglich, da der Verlauf der theoretischen Kurven nicht mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden kann, um eine exakte Abschätzung zu erlauben. In die Berechnung der Kurven geht nämlich nach Gl. 9 die mittlere Dicke der bestrahlten Einheiten und damit die Molekülform ein, für die jedoch keine verbindliche Annahme möglich ist. Wenn es wegen der zentralen Bedeutung der DNS auch von besonderem Interesse war, die biologische Wirksamkeit von Kernstößen an diesem Objekt nachzuweisen, so ist man doch gezwungen, sich für quantitative Untersuchungen von Kernstoßprozessen auf kleinere molekularbiologische Einheiten zu beschränken.

IV.2 RNase-Inaktivierung durch 2 MeV-Protonen bei erhöhten Temperaturen

In diesem Experiment übertrifft die Reichweite der Protonen die Dicke der Probenschicht um ein Vielfaches, weshalb die Inaktivierungskurven im Gegensatz zu allen übrigen hier dargelegten Versuchsreihen keinen konstanten Anteil aufweisen. Die für die verschiedenen Temperaturwerte erhaltenen Dosiseffektkurven (in Abb. 16 ohne Einzelmeßpunkte wiedergegeben), deren D_{37} -Werte bis um einen Faktor 3.5 voneinander abweichen, zeigen alle exponentiellen Verlauf. Der Anteil der thermischen Inaktivierung, der ab etwa $100 - 120$ °C Bedeutung gewinnt und Versuche oberhalb von 170 °C unmöglich macht, ist durch die Kontrollproben berücksichtigt, wie bereits in Abschn. III.4 beschrieben. Aus Abb. 17, in der die D_{37} -Werte logarithmisch über der absoluten Temperatur aufgetragen sind, kann man ersehen, daß sich die jetzt ermittelten Ergebnisse innerhalb der Fehlertoleranzen gut an die von Günther und Jung (1967) zwischen 120 und 300 °K durchgeführten Messungen anschließen. Eine Arrhenius-Darstellung der Temperaturabhängigkeit der gemessenen Inaktivierungsquerschnitte ist in Abb. 18 zusammen mit den Ergebnissen von Günther und Jung wiedergegeben. Wie aus entsprechenden Bestrahlungsversuchen z.B. an Trypsin (Brustad, 1964) oder an T1-Phagen (Uenzelmann, 1968) hervorgeht, ändert sich die Strahlenempfindlichkeit unterhalb von 100 °K praktisch nicht mehr, sondern strebt mit weiter abnehmender Temperatur einem konstanten Wert zu. Dieser temperaturunabhängige Anteil S_0 des Inaktivierungsquerschnitts (vergl. Gl. 8) konnte in den in Abb. 18 gezeigten Messungen nicht erfaßt werden, läßt sich aber durch Extrapolation des Kurvenverlaufes erschließen. Danach ergibt sich S_0 zu 1.28×10^{-14} cm². Zieht man diesen konstanten Term (gestrichelte Gerade in Abb. 18 mit dem Temperaturexponenten $E_0 = 0$) von den Meßpunkten ab, so ist durch die daraus resultierenden Werte (Kreise in Abb. 18)

unterhalb von Zimmertemperatur recht gut eine Gerade definiert, deren Neigung durch den Temperaturexponenten $E_1 = 1$ kcal/Mol charakterisiert ist. Die mit abnehmenden Werten von $1/T$ immer ausgeprägtere Abweichung der Kreise von dieser Geraden weist darauf hin, daß in der experimentellen Kurve noch ein weiterer Anteil überlagert sein muß. Durch Subtraktion der jeweiligen Ordinaten der letztgenannten Geraden von den mit Kreisen markierten Werten erhält man die Dreiecke. Wenn diese Dreiecke wegen der zweimaligen Differenzbildung auch mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet sind, so läßt sich durch sie doch über etwa 2 Dekaden hinweg eine Gerade bestimmen, der eine Aktivierungsenergie $E_2 = 6.5 \pm 1.5$ kcal/Mol entspricht. Der gemessene Verlauf des Inaktivierungsquerschnittes $S(T)$ in Abhängigkeit von der Bestrahlungstemperatur wird durch die mit dem Ausdruck

$$(10) \quad S(T) = (1.28 + 16 e^{-1000/RT} + 14000 e^{-6500/RT}) \times 10^{-14} [\text{cm}^2]$$

beschriebene Überlagerung der drei Geraden (stark ausgezogene Kurve in Abb. 18) recht exakt beschrieben. Temperaturexponenten, die mit dem hier ermittelten Wert von 6.5 kcal/Mol vergleichbar sind, wurden bereits für mehrere Objekte und verschiedene Strahlenarten gefunden (vergl. Tab.). Rechnet man den in Gl. 10 eingesetzten Teilchenfluß in die jeweils absorbierte Dosis um, indem man nach Lea (1946) von einer linearen Energieübertragung von $166.5 \text{ MeV cm}^2 \text{ g}^{-1}$ ausgeht, so erhält man für die Temperaturabhängigkeit der Inaktivierungsrate die Form

$$(11) \quad S(T) = 0.0048 + 0.060 e^{-1000/RT} + 52 e^{-6500/RT} [\text{Mrad}^{-1}].$$

In gleicher Weise gewonnene Beziehungen für die Inaktivierung von RNase mit 2 MeV-Deuteronen (Günther und Jung, 1967) und mit 3 MeV-Elektronen (Fluke, 1966) zeigen eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit Gl. 11 nicht nur in

den Temperaturexponenten, sondern auch in den Koeffizienten der einzelnen Terme. Wenn dies auch als Hinweis dafür gewertet werden kann, daß in den genannten Fällen der biochemische Schaden in einer einheitlichen Prozeßfolge zustandekommt, so ist es doch nicht möglich, aus den Gleichungen für $S(T)$ Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Reaktionen zu ziehen. Deshalb scheint es auch zweckmäßig zu sein, die verschiedenen Temperaturexponenten E_i als 'formale Aktivierungsenergien' zu bezeichnen, solange eine eindeutige Zuordnung bestimmter funktionszerstörender Reaktionen noch nicht gelungen ist. Lediglich die sehr kleinen Werte der 'Aktivierungsenergien' deuten an, daß es sich dabei eventuell um Radikalprozesse handelt. Eine mögliche Interpretation zumindest für den Exponenten $E_1 = 1 \text{ kcal/Mol}$ ergibt sich aus den in den beiden folgenden Abschnitten beschriebenen Messungen.

IV.3 Inaktivierung von RNase, Bakteriophagen und infektiöser ϕ X-DNS durch thermische H-Atome

Wie bei den Kernstoßversuchen mit langsamen Protonen ergaben sich bei sämtlichen Inaktivierungsexperimenten mit atomarem Wasserstoff nach System I und II (hochfrequente Gasentladung bzw. 'Kondensator'-Experiment) sowie in der analog zu System II gebauten Expositionskammer (vergl. nächsten Abschnitt) jeweils Überlebenskurven, die einen konstanten Anteil aufweisen, d.h. bei hohen Dosiswerten - hier also bei langen Expositionszeiten - sich asymptotisch einem endlichen Wert nähern. In Abb. 19 ist als Beispiel eine mit der Expositionskammer erhaltene Inaktivierungskurve gezeigt. Auch hier erhält man nach Abzug des konstanten Anteils, der für jedes Experiment durch Langzeit-Exposition von mindestens 12 Proben ermittelt wurde, eine rein exponentielle Abhängigkeit von der Zeit. Lediglich diese exponentiellen Kurven - durch Parallelverschiebung auf 100 % bei $t = 0$ normiert - sind in den folgenden

Abbildungen wiedergegeben. Aus der Neigung der Geraden läßt sich als Maß für die Resistenz gegen den Angriff der H-Radikale die Expositionszeit ermitteln, die für eine Inaktivierung auf 37 % erforderlich ist (t_{37}). Der konstante Anteil, dessen Höhe von der jeweiligen Präparation abhing, lag in den verschiedenen Experimenten zwischen 12 und 35 %. In Abb. 20 sind die nach H-Atom-Einwirkung in System I und II erhaltenen Überlebenskurven von T1 und BUT1-Phagen nebeneinander gezeigt. Die Meßpunkte, die die Daten von jeweils 8 Proben repräsentieren, stammen aus mindestens zwei unabhängigen Versuchsserien. Bemerkenswert ist, daß die Punkte für T1-Phagen und für die BU-substituierte Form auf eine gemeinsame Gerade fallen, der BU-Einbau hier im Gegensatz zu Bestrahlungsversuchen also keine Sensibilisierung bewirkt. Die aus den Zeichnungen zu entnehmenden t_{37} -Werte liegen bei 11.3 bzw. 7.8 sec. Daß diese Werte für die beiden Systeme von vergleichbarer Größe sind, ist bedeutungslos und durchaus zufällig. In den Abbn. 21 und 22 sind die entsprechenden Kurven für ØX-DNS und RNase gezeigt. Während sich für die infektiöse Einstrang-DNS Kurvenneigungen ergeben, die gegenüber der vorhergehenden Darstellung nur um etwa einen Faktor 1.5 flacher sind, weist die enzymatische Aktivität von RNase eine erheblich größere Resistenz gegen die Einwirkung von atomarem Wasserstoff auf. Die t_{37} -Werte für RNase liegen bei 12.9 bzw. 8.5 Minuten und sind damit in beiden Systemen annähernd 70 mal größer als für die T1- und BUT1-Phagen.

In Abb. 23 sind die Inaktivierungskurven von T1- und BUT1-Phagen bei H-Atom-Einwirkung nach System I und II denen bei γ - und UV-Bestrahlung unter anoxischen Bedingungen gegenübergestellt. Für T1-Phagen ergab sich mit ^{60}Co - γ -Strahlung eine 37 %-Dosis von 320 krad, für BUT1-Phagen von 145 krad. Bei UV-Inaktivierung ist die Anfangsneigung der gekrümmten Überlebenskurven für BUT1-Phagen um etwa

einen Faktor 3 steiler als für die nicht-substituierte Form. Dagegen zeigt sich in den beiden Systemen der H-Atom-Exposition, daß die Schädigung der beiden Phagentypen mit gleicher Geschwindigkeit erfolgt. Die Proben für diese Experimente stammen alle aus einheitlichen Chargen. Die sehr deutliche BU-Sensibilisierung bei γ - und UV-Bestrahlung zeigt also, daß tatsächlich Thymin im erreichbaren Ausmaß (ca. 65 %) in der Phagen-DNS durch Bromuracil substituiert war. Das Ausbleiben des BU-Effektes bei der Radikal-Inaktivierung kann als Bestätigung für den Erfolg der experimentellen Vorsichtsmaßnahmen in den beiden Expositionssystemen gewertet werden. Wenn UV-Licht bei der Hochfrequenz-Entladung und Sekundärelektronen oder gestreute Protonen im Falle des 'Kondensator'-Experimentes in nennenswertem Umfang zur Schädigung der Proben beigetragen hätten, müßte sich dies zumindest in einer geringfügig erhöhten Empfindlichkeit der BUT1-Phagen zeigen. Da eine solche Sensibilisierung innerhalb der Meßgenauigkeit jedoch nicht zu entdecken ist, kann ein die Radikalwirkung verzerrender Beitrag von UV-Quanten oder geladenen Partikeln zur Inaktivierung ausgeschlossen werden.

Eine schlüssige Erklärung für das Ausbleiben des BU-Effektes bei H-Atom-Einwirkung kann noch nicht gegeben werden. Wenn man von der Annahme ausgeht, daß die diffusiblen Spezies die Proteinhülle der Phagen durchdringen und an den verpackten DNS-Strang herankommen, dann kann in diesem Zusammenhang ein ESR-Befund von Heller und Cole (1965) für die Interpretation von Bedeutung sein. Sie ließen - entsprechend dem hier beschriebenen System I - atomaren Wasserstoff aus einer Hochfrequenz-Entladung auf trockene Proben von Thymin und von Thymus-DNS einwirken. Mit Thymin ergab sich das von ionisierender Bestrahlung her bekannte Oktett-Spektrum, das durch Anlagerung eines H-Atoms an C_6 im Ring hervorgerufen wird. Für die DNS fanden sie jedoch ein komplexes Spektrum, aus dem sich kaum ein Anteil des 8-Linien-

Signals des Thymin-Radikals herausanalysieren läßt. Die Autoren vermuten, daß im DNS-Strang die H-Atome nur in geringem Umfang mit Thymin und bevorzugt mit den restlichen drei Basen reagieren. Damit wäre es belanglos, ob Thymin oder Bromuracil in die DNS eingebaut ist, und es wäre verständlich gemacht, daß bei H-Atomen kein BU-Effekt auftritt.

Größere Wahrscheinlichkeit kommt jedoch einer viel einfacheren Erklärungsmöglichkeit zu. Es ist denkbar, daß die H-Radikale so reaktionsfähig sind, daß sie gar nicht bis zur DNS im Phagenkern gelangen, sondern bereits im Hüllprotein abreagieren. Als Stütze für die Vermutung, daß im wesentlichen Proteinschäden für die Inaktivierung der Phagen durch atomaren Wasserstoff verantwortlich sind, kann ein Experiment von Dewey und Stein (1968) angesehen werden. Sie setzten T7-Phagen in wässriger Lösung dem Angriff von H-Radikalen aus und fanden, daß dabei die DNS aus den Phagen austritt und in Lösung dann durch Radikaleinwirkung degradiert wird. Als Primäreffekt sind in diesem Falle also radikalinduzierte Läsionen am Protein anzunehmen. Gerade der komplizierte Anheft- und Injektionsapparat der T-Phagen ist vermutlich gegen solche Proteinschäden sehr empfindlich. Da sich T1- und BUT1-Phagen ja nur in ihrer DNS unterscheiden, würde sich daraus zwanglos die identische Inaktivierungsrate durch atomaren Wasserstoff erklären. Um jedoch zwischen diesen und möglichen anderen Deutungen des interessanten Befundes unterscheiden zu können, müssen noch gezielte Untersuchungen vorgenommen werden (vergl. Abschn. V.).

Sämtliche Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind zu Vergleichszwecken in Abb. 24 - der Übersichtlichkeit wegen ohne Meßpunkte - zusammengestellt. Die 'Dosis' ist in relativen Einheiten angegeben, wobei die D_{37} - bzw. t_{37} -Werte für T1-Phagen jeweils willkürlich gleich 1 gesetzt wurden. Es sei vor allem auf die bemerkenswerte Überein-

stimmung der mit den beiden Systemen der Radikal-Exposition gewonnenen Resultate hingewiesen. T1- und BUT1-Phagen haben beide Male gleiche Empfindlichkeit, während die Resistenz von isolierter ØX-DNS um einen Faktor von einmal 1.5 und einmal 1.45 größer ist. Die t_{37} -Werte von RNase liegen in System I 68 mal und in System II 65 mal höher als bei den Phagen. Diese Übereinstimmung liefert eine starke Stütze für die Annahme, daß in beiden Systemen jeweils gleiche Inaktivierungsmechanismen ablaufen, und somit die gleichen schadenerzeugenden Agentien wirksam sind, daß es sich also bei den strahleninduzierten diffusiblen Produkten in System II tatsächlich um atomaren Wasserstoff handelt. Im Gegensatz dazu weisen die deutlich abweichenden Verhältnisse bei ^{60}Co - γ -Strahlung, wo T1-Phagen und ØX-DNS gleiche Empfindlichkeit besitzen, BU-Einbau eine Sensibilisierung um einen Faktor 2.2 gegenüber der nichtsubstituierten Form bewirkt, und die Resistenz von RNase im Vergleich zu den T1-Phagen 130 mal größer ist, offensichtlich auf wesentliche Unterschiede im Reaktionsablauf hin.

IV.4 Temperaturabhängigkeit der Inaktivierung von T1-Phagen mit thermischen H-Atomen

Aufbauend auf den eben beschriebenen Ergebnissen der Inaktivierung durch H-Atome, die durch Bestrahlung im 'Kondensator'-System erzeugt waren, wurden in der Expositionskammer Versuche mit T1-Phagen zwischen 100 °K und 340 °K nach den Methoden A und B (vergl. Abschn. III.5) durchgeführt. Ein Beispiel für die dabei erhaltenen Überlebenskurven wurde bereits in Abb. 19 gegeben. Die Kurve zeigt die Inaktivierung bei Zimmertemperatur nach Methode B, die sich ja bei dieser Temperatur naturgemäß nicht von Methode A unterscheidet. Der konstante Anteil schwankte in diesen Serien zwischen 5 und 30 %. Da die Phagenpräparationen genau wie die in den Kernstoßversuchen verwendeten ØX-DNS-Proben gewonnen wurden, kann man annehmen,

daß auch hier der unzerstörbare Rest des Testmaterials in kleinen Salzkristallen eingeschlossen war und der Hauptteil in dünnster Schicht auf dem Probenträger haftete. Die Ermittlung der eigentlichen Inaktivierungskurven aus den Meßpunkten ist bereits in Abschn. IV.3 beschrieben. Wiederum dient die für eine Inaktivierung auf 37 % erforderliche Expositionszeit (t_{37}) als Maß der Resistenz gegen H-Radikale. Umgekehrt liefert der reziproke Wert ($1/t_{37}$) ein relatives Maß für den Reaktionsquerschnitt bzw. für die Empfindlichkeit gegen die diffusiblen Bestrahlungsprodukte unter den jeweiligen Expositionsbedingungen.

Die Inaktivierungsrate der Proben hängt natürlich von der Zahl der aus der gegenüberliegenden bestrahlten Folie pro Zeit- und Flächeneinheit ausgelösten Radikale und damit von der Intensität des primären Protonenstrahls ab. In Abb. 25 ist diese Abhängigkeit gezeigt, wie sie sich in einer Versuchsserie nach Methode B bei Zimmertemperatur und mit einer Formvarfolie von 1700 Å Dicke ergab. In doppelt logarithmischem Raster ist die reziproke 37 %-Expositionszeit über der Stromdichte des Protonenstrahls aufgetragen. Hier wie in den folgenden Darstellungen der $1/t_{37}$ -Werte repräsentiert jeder experimentelle Punkt eine vollständige Inaktivierungskurve von dem in Abb. 19 gezeigten Typ. Die Durch diese Punkte in Abb. 25 recht gut definierte Gerade kann durch die Gleichung

$$(12) \quad 1/t_{37} = c \cdot i^{0.82} \text{ [sec}^{-1}\text{]}$$

beschrieben werden, wo $c = 20000 \text{ A}^{-1} \text{ sec}^{-1} \text{ cm}^2$ ist, wenn i in A/cm^2 eingesetzt wird; c ist eine apparative Konstante und hängt zusätzlich von Art und Energie der auslösenden Strahlung ab. Aus Gleichung 12 ist die Existenz eines Dosisraten-Effektes zu ersehen (Exponent $\neq 1$): Die Schädigungsrate der Proben durch H-Atome wächst langsamer als die Intensität des auf die gegenüberliegende Folie fallenden Protonenstrahls. Da die 'Radikal-Empfindlichkeit'

der Proben sich nicht geändert haben kann, gibt es hierfür eine mögliche und vernünftige Erklärung: Die Rekombinationsrate der freigesetzten Radikale ist konzentrationsabhängig. Bei hoher Protonenstromstärke werden wegen der hohen Radikaldichte prozentual mehr H-Atome zu molekularem Wasserstoff rekombinieren und damit relativ weniger für die Bildung makromolekularer Additions- und/oder Abstraktionsradikale zur Verfügung stehen. Alle im weiteren zitierten Experimente wurden bei einer einheitlichen Protonenstromstärke von $2.5 \cdot 10^{-7} \text{ A/cm}^2$ durchgeführt.

Um die mit einer 6μ dicken Hostaphanfolie durchgeführten Versuche nach Methode A und die Experimente nach Methode B, für die eine 1700 \AA dicke Formvarschicht aufgetragen wurde, miteinander vergleichen zu können, war es notwendig, einen möglichen Einfluß von Materialart und Dicke der Folie auf die Radikalausbeute und damit auf die Inaktivierungsrate der gegenüberliegenden Proben zu untersuchen. Hierzu wurde das in Methode B verwendete Foliemagazin jeweils mit unterschiedlich dicken Lagen beider Materialien beschichtet. Aus Abb. 26 geht hervor, daß weder bei Zimmertemperatur noch bei $130 \text{ }^\circ\text{K}$ (Methode A) die Materialart (für die beiden untersuchten Fälle) oder die Dicke der Folien von Einfluß auf die Radikalausbeute sind. Die Abnahme des $1/t_{37}$ -Wertes für die dünnste verwendete Schicht ist mit einer gewissen Unsicherheit behaftet und deshalb gestrichelt gezeichnet. Die Inhomogenität der Foliendicke liegt hier vermutlich erheblich über den sonst gültigen 20 Prozent. Ein korrelierbares Ergebnis bei Schichtdicke Null, d.h. ohne Folie, konnte nicht ermittelt werden, da es sehr schwierig ist, eine Metallfläche auch von den letzten Spuren adsorbierter wasserstoffhaltiger Substanzen zu befreien. Überdies liegen dann veränderte Verhältnisse in der Sekundärelektronenemission vor. Prinzipiell wäre aus dem Absinken der oberen Kurve in Abb. 26 zu kleineren Schichtdicken hin abzuleiten, daß im Mittel diejenigen Radikale, die in einer Oberflächen-

schicht von etwa 200 \AA erzeugt werden, eine Chance haben, aus dem Material herauszudiffundieren. Sinkt die Schichtdicke unter diese Grenzlänge, so nimmt die Radikalausbeute ab. Das würde bedeuten, daß H-Radikalen in organischer Substanz eine mittlere Diffusionslänge von ca. 200 \AA zukommt. Diese Aussage ist jedoch als spekulativ zu betrachten, bis genauere Ergebnisse ermittelt sind.

In den Abb. 27 und 28 sind einige der Inaktivierungskurven gezeigt, die für verschiedene Temperaturen mit Methode A bzw. Methode B gefunden wurden. Jeder eingetragene Meßpunkt ist aus 10 - 12 Proben gemittelt. Bei beiden Methoden tritt ein sehr ausgeprägter Temperatureffekt auf. Im untersuchten Temperaturbereich ändern sich die Schädigungsraten durch H-Atome um mehr als eine Größenordnung. Der höchste erreichte Temperaturwert lag bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ($= 343 \text{ }^\circ\text{K}$). Hier betrug die thermische Inaktivierung - berücksichtigt durch die Kontrollproben - bereits 85 %, wodurch die statistischen Schwankungen der einzelnen Plaquezahlen stark erhöht wurden. Bei noch höheren Temperaturen waren die Proben nahezu vollständig inaktiviert, so daß die Versuche nicht mehr ausgewertet werden konnten.

Sämtliche Ergebnisse der mit beiden Methoden durchgeführten Experimente sind in Abb. 29 zusammengefaßt. Es handelt sich dabei um die übliche Arrhenius-Darstellung. Hier ist die Empfindlichkeit oder der Reaktionsquerschnitt (repräsentiert durch $1/t_{37}$) über der reziproken Temperatur aufgetragen. Wie aus Gl. 7 ersichtlich, kann bei diesem Verfahren die Neigung einer Kurve als direktes Maß für die Aktivierungsenergie genommen werden, die dem untersuchten Prozeß zugrunde liegt. Durch jede der beiden Punktscharen, die den zwei unterschiedlichen Expositionsmethoden zugeordnet sind, läßt sich recht gut eine Gerade legen. Diese Geraden werden durch die Gleichungen

$$(13) \quad 1/t_{37} = c_A e^{-E_a^A/RT} \quad [\text{sec}^{-1}]$$

für Methode A und

$$(14) \quad 1/t_{37} = c_B e^{-E_a^B/RT} \quad [\text{sec}^{-1}]$$

für Methode B beschrieben (mit $c_A = 0.146 \text{ sec}^{-1}$ und $c_B = 0.258 \text{ sec}^{-1}$). Die für die beiden Methoden aus den Kurvenneigungen abzulesenden Aktivierungsenergien sind $E_a^A = 0.65 \pm 0.1 \text{ kcal/Mol}$ bzw. $E_a^B = 0.95 \pm 0.1 \text{ kcal/Mol}$. Die Existenz eines temperaturunabhängigen konstanten Terms ist innerhalb des untersuchten Bereiches in keinem Fall zu erkennen.

Aus den in der Tabelle zusammengestellten Temperaturexponenten ist folgendes zu entnehmen: In fast allen Fällen weisen die Inaktivierungsraten einen temperaturunabhängigen Anteil mit $E_0 = 0$ auf. Bis auf ganz wenige Ausnahmen wird für die verschiedensten Strahlenarten und Testobjekte darüber hinaus ein Temperaturexponent mit $E_1 = 1 \text{ kcal/Mol}$ und - soweit überhaupt untersucht - ein weiterer mit $E_2 = 3 - 6.5 \text{ kcal/Mol}$ gefunden (vergl. Abschn. II.). Es fällt sofort auf, daß die aus Gl. 14 abgeleitete Aktivierungsenergie für Methode B, wo die Verhältnisse analog zur direkten Strahleninaktivierung sind (Folie und Probe auf gleicher Temperatur), mit $E_a^B = 0.95 \pm 0.1 \text{ kcal/Mol}$ innerhalb der Fehlergrenzen mit dem Temperaturexponenten $E_1 = 1 \text{ kcal/Mol}$ aus Gl. 8 übereinstimmt. Dieser Befund kann als Stütze für die Annahme gelten, daß die Temperaturabhängigkeit der Strahleninaktivierung von dem Anteil herrührt, den strahleninduzierte diffusible H-Radikale zur Gesamtschädigung beitragen.

Um Endgültiges über die Stichhaltigkeit dieser Hypothese aussagen zu können, ist eine Abschätzung erforderlich, ob der im vorliegenden Experiment erfaßte Radikalprozeß, dem eine Aktivierungsenergie von rund 1 kcal/Mol zukommt, mit ausreichender Effektivität abläuft, um die bei Tieftemperatur-Bestrahlungen gefundenen Dosisreduktionsfaktoren zu erklären.

Wenn der Prozeß im Rahmen der zum Gesamtschaden führenden Reaktionskette von nur untergeordneter Bedeutung ist, könnte die Übereinstimmung in den Aktivierungsenergien rein zufällig sein. Der von Hermann (1966) bei direkter Bestrahlung von T1-Phagen mit 2 MeV-Protonen zwischen 100 °K und 293 °K ermittelte Dosisreduktionsfaktor von 1.7 läßt sich gemäß der angeführten Hypothese so interpretieren, daß bei Zimmertemperatur etwa 60 % der Läsionen durch unmittelbare Wechselwirkungsereignisse zustande kamen, während die restlichen 40 % (dieser Anteil ist bei tiefer Temperatur weitgehend ausgeschaltet) durch den Angriff der strahleninduzierten H-Radikale verursacht wurden. Da eine 'Dosimetrie' für die Inaktivierungsversuche mit atomarem Wasserstoff im Trockenen, im speziellen Fall also eine Messung der Radikalausbeute bei indirekter Bestrahlung der Folie, bisher nicht durchgeführt werden konnte, bleibt man für die Beurteilung der Bedeutung der gemessenen Radikalreaktion auf eine etwas grobe Abschätzung angewiesen: Nimmt man an, daß auf dem Folienträger statt der Kunststoffschicht eine Präparation aus T1-Phagen aufgebracht ist, so wäre bei Zimmertemperatur für eine 37 %-Inaktivierung dieser Präparation nach Hermann (1966) eine 'Protonendosis' von 1.85×10^{11} p/cm² erforderlich (senkrecht zum Strahl gemessen; die tatsächliche Bestrahlungsdichte ist wegen der Flächenneigung von 9° etwa um einen Faktor 6 kleiner). Um unter entsprechenden Bedingungen die Phagenproben in der Expositionskammer auf 37 % zu inaktivieren, mußte die gegenüberliegende Folie mit einer Teilchendosis von 2.7×10^{13} p/cm² bestrahlt werden (wiederum senkrecht zum Strahl gemessen). Nun ist zu berücksichtigen, daß unter den gegebenen geometrischen Verhältnissen nur die Radikale erfaßt werden, die (gemittelt) in einen Raumwinkel von etwa $4\pi/7$ austreten. Setzt man eine isotrope Verteilung der Diffusionsrichtungen voraus und nimmt man außerdem an, daß die H-Auslöserate bei Phagenpräparation und Kunststoffolie übereinstimmt, so bedeutet das, daß

die gegen den Primärstrahl abgeschirmten Proben durch Radikal-Angriff mit einer Effektivität inaktiviert werden, die etwa 5 % der Strahlengesamtwirkung auf die direkt getroffene Präparation entspricht. Demnach würde die Schädigungsrate durch freigesetzte Wasserstoffatome in einer vom bestrahlten System vollständig getrennten Probe noch 12.5 % der Inaktivierungsrate ausmachen, die im unmittelbar bestrahlten Material auf die Wirkung dieser Radikale zurückzuführen ist (40 %). Es ist anzunehmen, daß die freigesetzten H-Atome mit besonders großer Wahrscheinlichkeit in allernächster Umgebung ihrer Ablösestelle reagieren, und nur ein geringer Bruchteil aus dem Molekülverband austreten kann. Der ermittelte Wert von 12.5 % liegt somit hoch genug, um die Annahme zu rechtfertigen, daß der in unserem Versuch erfaßte Reaktionsschritt mit dem bei ionisierender Bestrahlung gefundenen Temperatureffekt in unmittelbarem Zusammenhang steht. Ob und wie weit auch die Komponente E_2 mit 3 - 6.5 kcal/Mol (vergl. Gl. 8) auf Radikalprozesse zurückgeht, müssen zu höheren Temperaturen ausgedehnte Untersuchungen an thermisch resistenteren Objekten (z.B. RNase, ØX-DNS) zeigen. Es sei jedoch erwähnt, daß Vacek und Schulte-Frohlinde (1968) für das Verschwinden (durch Rekombination oder Weiterreaktion) von H-Atomen in glasiger Schwefelsäure eine Aktivierungsenergie von 6.0 kcal/Mol gemessen haben.

Wenn nun dem kombinierten Effekt in Methode B (Radikal-Quelle und Probenmaterial auf einheitlicher Temperatur) eine Aktivierungsenergie von 0.95 kcal/Mol zugeordnet ist, welche Schlüsse lassen sich dann aus dem Unterschied zu dem Temperaturexponenten $E_a^A = 0.65$ kcal/Mol bei Methode A ziehen? Die einzige Abweichung besteht hier darin, daß das System, aus dem die H-Atome ausgelöst werden, in allen Experimenten auf konstanter Temperatur lag, daß somit konstante Radikalausbeute vorgelegen haben muß. Die Temperaturabhängigkeit der Radikalauslösung ist demnach für die Dif-

ferenz der beiden Exponentenwerte verantwortlich, d.h. die Radikalfreisetzung hat für sich alleine eine Aktivierungsenergie von 0.3 kcal/Mol. Die primäre Abspaltung eines H-Atoms, die in den meisten Fällen eine Folge einer durch Ionisation entstandenen Ladungsverschiebung ist, hängt in erster Näherung sicher nicht von der Temperatur ab. Ein abgetrenntes H-Atom kann aber durch sterische Behinderung - z.B. durch Molekülseitenketten, von denen es eingeschlossen ist - praktisch an seinem ursprünglichen Platz festgehalten werden, wodurch die Rekombinationsrate mit dem Molekülrest erhöht wird. Auf die Möglichkeit eines solchen 'Käfig-Effektes' haben schon Franck und Rabinowitsch (1934) hingewiesen. Der Differenzbetrag $E_a^B - E_a^A = 0.3$ kcal/Mol kann möglicherweise als die Aktivierungsenergie betrachtet werden, die erforderlich ist, die Käfig-Wirkung zu überwinden und das H-Atom vollends freizusetzen. Deshalb sei dieser Energiewert mit E_a^L bezeichnet (L steht für 'Loslösung' oder auch 'liberation'). Eine Nachprüfung dieser Interpretation ist dadurch möglich, daß man in Umkehrung der Methode A die Temperatur der Proben konstant hält, während die der bestrahlten Folie variiert wird. Dabei müßte sich dann für die Inaktivierungsrate ein Temperatur-exponent von etwa 0.3 kcal/Mol ergeben. Ein solches Experiment ist nach entsprechendem Umbau der Expositions-kammer geplant.

Auf der anderen Seite entspricht der mit Methode A gefundene Exponent von 0.65 kcal/Mol der Temperaturabhängigkeit der Schädigungsrate. Darunter ist vermutlich ein komplexer Einfluß sowohl auf den direkten Radikal-Angriff nach Gl. 4, also auf die Reaktionsrate, wie auch auf die Beweglichkeit der H-Atome zu verstehen (deshalb $E_a^D - D$ steht für 'damage' oder für 'Diffusion'). Die Radikale können in Haftstellen ('traps') festgehalten werden, in flachen Potentialmulden, wie sie in den komplizierten Strukturen organischer Substanzen reichlich existieren. Daß es solche Stabilisierungszentren für H-Radikale tatsächlich geben muß, folgt aus den

ESR-Untersuchungen von Müller und Dertinger (1968), die in γ -bestrahlten trockenen Phagenpräparationen selbst nach einer Erwärmung auf 200 °K noch atomaren Wasserstoff nachweisen konnten. Seit längerem weiß man, daß besonders Phosphat-Gruppen (wie sie auch in der Phagen-DNS vorhanden sind) in der Lage sind, H-Atome zu stabilisieren. So fanden Cole und Silver (1963) in bestrahlten Milchzähnen sogar noch bei Zimmertemperatur das ESR-Signal des atomaren Wasserstoffs. Wenn die H-Radikale nicht genügend Energie besitzen, die Potentialmulden zu verlassen, können sie lediglich mit einem anderen freien H-Atom rekombinieren, wodurch jeweils zwei potentiell schädigende Einheiten für weitere Reaktionen ausfallen. Durch Energiezufuhr können die Radikale aus den 'traps' freigesetzt werden und erhalten dadurch erneut eine Chance, mit einem Biomolekül Anlagerungs- oder Abstraktionsradikale zu bilden. Bisher ist nicht geklärt, welcher Teil des Temperaturexponenten E_a^D mit den Radikalhaftstellen bzw. den Diffusionserscheinungen in Zusammenhang gebracht werden kann, und welcher Teil als eigentliche Aktivierungsenergie für direkte Radikalreaktionen anzusehen ist. Cercek (1968) stellte vor kurzem eine Berechnung für ein entsprechendes Problem bei Bestrahlung im Flüssigen an. Er zeigte, daß in dem für eine Reaktion des hydratisierten Elektrons (e_{aq}^-) gefundenen Temperaturexponenten die Aktivierungsenergie für die Beweglichkeit des Radikals, also die Diffusionskomponente, den dominierenden Anteil ausmachen kann. Ganz entsprechend konnten Vacek und Schulte-Frohlinde (1968) nachweisen, daß die Reaktionen von H-Radikalen in fester Matrix (Schwefelsäure-Glas) diffusionskontrolliert sind.

Die in Gl. 14 formulierte Empfindlichkeit von T1-Phagen gegenüber strahleninduzierten H-Radikalen in Abhängigkeit von der Temperatur läßt sich nun genauer angeben durch die Beziehung

$$(15) \quad 1/t_{37} = c_B e^{-(E_a^L + E_a^D)/RT} \quad [\text{sec}^{-1}]$$

mit $E_a^L = 0.3$ kcal/Mol und $E_a^D = 0.65$ kcal/Mol.

Im Vorstehenden konnte nur eine grob simplifizierte Interpretation des Temperatureinflusses auf die Sekundärschädigung durch Radikalprozesse bei ionisierender Bestrahlung gegeben werden (so wurde z.B. nicht berücksichtigt, daß auch in der Folie neben der unmittelbaren Radikalauslösung Diffusionsvorgänge eine Rolle spielen). Diese Interpretation hat in manchen Details noch hypothetischen Charakter. Doch scheint es mit diesen Experimenten gelungen zu sein, die in fast allen einschlägigen Untersuchungen gefundenen Aktivierungsenergien von etwa 1 kcal/Mol auf temperaturabhängige Radikalreaktionen zurückzuführen.

V. Schlußfolgerungen und Ausblick

Eine Analyse der in der vorliegenden Arbeit zusammengefaßten experimentellen Fakten macht deutlich, daß die noch vielfach übliche Einteilung der Strahlenwirkung, nach der man bei Bestrahlung im trockenen System ausschließlich von 'direktem Effekt' spricht und nur in Lösung Inaktivierung durch 'indirekten Effekt' über Radiolyseprodukte des Wassers annimmt, in ihrer bisherigen Form nicht länger haltbar ist. Man sollte deshalb dazu übergehen, den Begriff des 'direkten Effektes' enger zu fassen und nur auf jene Veränderungen anzuwenden, die durch die unmittelbare Energieabsorption entstehen und auf den Ort (meist das Molekül) der primären Wechselwirkung zwischen Strahlung und untersuchter Materie begrenzt bleiben. Alle sekundären Radikalprozesse, wie sie in dieser Studie auch für trockene Systeme nachgewiesen werden konnten, sollten eindeutig als solche gekennzeichnet werden.

Wenn in diesem Punkte auch eine klare qualitative Aussage über die Inaktivierung verschiedener elementarbiologisch interessanter Objekte durch strahleninduzierte diffusible Agentien erarbeitet wurde, so bleibt eine quantitative

Erfassung solcher Prozesse doch unerläßliche Voraussetzung für ein fundiertes Verständnis der nach Bestrahlung zur biochemischen Schädigung führenden Reaktionsfolge. Hierzu ist insbesondere eine 'Dosimetrie' für die Expositionsversuche mit atomarem Wasserstoff anzustreben. Gerade im Hinblick auf die Beurteilung der Relevanz von H-Radikal-Reaktionen für die Temperaturabhängigkeit der Strahleninaktivierung, für die sich durch unsere Untersuchungen sehr starke Argumente ergeben haben, kommt den diesbezüglichen Bemühungen große Bedeutung zu. Doch schon die hier zusammengetragenen Befunde verleihen der Hypothese einen hohen Grad an Wahrscheinlichkeit, daß in der Folge von primären Energieabsorptions-Ereignissen ablaufende Radikalprozesse zumindest bei dünn-ionisierender Strahlung für das Phänomen des Temperatur-Effektes verantwortlich sind. Bei sehr hohen LET-Werten (z.B. bei schweren Ionen) kann dagegen die Hitze-Inaktivierung in den 'thermal spikes', deren Ausbildung von der Umgebungstemperatur abhängt, ausschlaggebend für diesen Effekt werden, wie Butts und Katz (1967) in einer überzeugenden mathematischen Behandlung des Problems zeigen konnten. Weitreichende Aufschlüsse über den physiko-chemischen Problemkomplex der Sekundärreaktionen bei Bestrahlung sind von der Aufstellung von Radikal-Bilanzen zu erwarten, in die durch ESR-Messung während der Bestrahlung und bei extrem tiefen Temperaturen auch kurzlebige Zwischenprodukte einbezogen werden. Allerdings sind eindeutige Antworten auf die Frage nach Radikalumwandlungen praktisch nur an Einkristallen zu erhalten, und die damit gewonnenen Befunde lassen nur unter Vorbehalt Schlüsse auf die Verhältnisse in biologischen Systemen zu.

In unmittelbarem Zusammenhang mit den in unseren Untersuchungen angeschnittenen Themen ergab sich eine Reihe von neuen Fragen, deren Lösung weitere Argumente für oder gegen noch weitgehend spekulative Hypothesen erbringen und den

hier behandelten begrenzten Problemkreis in einen umfassenderen Rahmen einordnen könnten. Es wurde bereits auf die Möglichkeit hingewiesen, eine eventuelle Korrelation zwischen Radikalreaktionen und der beim Temperatureffekt auftretenden dritten Komponente mit Aktivierungsenergien von 3 - 6.5 kcal/Mol durch H-Exposition von thermisch resistenten ØX-DNS- oder RNase-Präparationen bei hohen Temperaturen zu untersuchen. Die BU-Sensibilisierung ist von so grundlegendem Interesse, daß einer Erklärung für das Ausbleiben dieses Effektes bei Einwirkung von atomarem Wasserstoff auf ganze Phagen besondere Bedeutung zukommt. Hier dürften entsprechende Expositionsversuche mit normaler und BU-substituierter infektiöser Einzel- und Doppelstrang-DNS (der Phagen ØX-174 bzw. T1) zur Aufklärung beitragen, für die auch der bei diesen Systemen beachtliche experimentelle Aufwand nicht gescheut werden sollte.

Aus einem Vergleich der mit den beiden Verfahren der Radikalerzeugung (Hochfrequenz-Entladung und 'Kondensator'-Experiment) ermittelten Resultate konnte gefolgert werden, daß es sich bei den strahleninduzierten diffusiblen Agentien größtenteils um atomaren Wasserstoff handeln muß. Doch liegt die Vermutung nahe, daß bei ionisierender Bestrahlung auch größere radikalische Produkte (z.B. Methylgruppen, Aminogruppen) abgespalten werden, die vielleicht ebenfalls in geringem Umfang an Sekundärreaktionen teilnehmen können. Ob und wie weit dies der Fall ist, läßt sich beispielsweise dadurch untersuchen, daß man molekulare Mischungen zweier unterschiedlich und mit hoher spezifischer Aktivität markierter Molekülsorten (etwa Proteine, markiert mit ^3H , ^{14}C , ^{15}N) im Trockenen bestrahlt. Nach dem Ablösen und der Trennung durch Zentrifugation, Chromatographie oder Elektrophorese kann man die einzelnen Präparationen auf etwaige Anlagerungen von Bruchstücken 'artfremder' Moleküle testen.

Das Hauptinteresse im Zusammenhang mit indirekten Effekten bei Bestrahlung trockener Substanzen (bzw. hochkonzentrierter Lösungen oder weitgehend wasserfreier Systeme) kommt jedoch den H-Radikalen zu. Eine Spezifizierung der durch ihren Angriff auf molekularbiologische Systeme hervorgerufenen Schäden muß angestrebt werden. Gerade bei Nukleinsäuren kommt eine Vielzahl von Läsionen - wie etwa Vernetzungen, Basenveränderungen, Strangbrüche, lokale Denaturierungen durch das Aufbrechen von Wasserstoffbrücken - als Ursache für eine Inaktivierung in Frage. In diese Richtung weisende Bemühungen stellen eine Verbindung zwischen physiko-chemischen und biochemischen Interessensbereichen her, wie sie immer nachdrücklicher von den mehr phänomenologisch orientierten Disziplinen der Genetik, Biologie und Medizin gefordert wird.

VI. Zusammenfassung

Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in dem Nachweis strahleninduzierter Radikal-Reaktionen in trockenen Präparationen von Biomolekülen sowie in der Aufdeckung eines möglichen Zusammenhangs zwischen solchen Sekundärreaktionen und dem bei Bestrahlungsexperimenten auftretenden Temperatureffekt. Zu diesem Zweck wurden in zwei grundsätzlich voneinander abweichenden Versuchsanordnungen Radikal-Expositionsversuche mit Ribonuklease, T1- und BUT1-Phagen sowie isolierter Einstrang-DNS des Phagen ØX174 durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, daß bei ionisierender Bestrahlung organischer Substanzen mit großer Ausbeute diffusible Agentien entstehen, die zur Inaktivierung von elementaren biologischen Einheiten beitragen. Ein Vergleich der mit beiden Anordnungen gewonnenen Ergebnisse macht deutlich, daß die reaktiven Bestrahlungsprodukte größtenteils atomarer Wasserstoff sein müssen. An T1-Phagen wurde der Einfluß der Temperatur auf die Inaktivierungsrate bei Einwirkung strahleninduzierter Radikale untersucht. Anhand der aus zwei unterschiedlichen

Expositionsmethoden resultierenden Daten wurde eine Modellvorstellung für das Zustandekommen des temperaturabhängigen Anteils der Inaktivierungsrate bei ionisierender Bestrahlung entwickelt. Im Rahmen der hier mitgeteilten Untersuchungen wurde außerdem die inaktivierende Wirkung elastischer Kernstoßprozesse an Nukleinsäuremolekülen durch Bestrahlung infektiöser DNS des Phagen ØX174 mit niederenergetischen Protonen nachgewiesen. In einem Experiment zur Temperaturabhängigkeit der Strahlenschädigung konnte für den Inaktivierungsquerschnitt von Ribonuklease gegenüber 2 MeV-Protonen neben den beiden bereits bekannten Komponenten ein dritter Term gefunden werden, der bei hohen Temperaturen dominierend ist.

VII. Anhang: Biochemische und mikrobiologische Verfahren und Nachweismethoden

Bestimmung der enzymatischen Aktivität von RNase:

Lösung der Testpräparation in 1 ml Azetatpuffer (0.1 molar, pH 5.0) - Zugabe von 1 ml gereinigter 1 %iger RNS-Lösung in 0.01 m Azetatpuffer (pH 5.0) - 30minütige Inkubation im Wasserbad bei 30 °C - Unterbindung der Reaktion durch RNS-Ausfällung mit 1 ml 0.75 %iger Uranylazetatlösung in 25 %iger Perchlorsäure - sofortige Abkühlung im Eisbad - Abzentrifugation des Niederschlages (10 min/6000 UpM) - 1:3-Verdünnung des Überstandes mit destilliertem Wasser - Messung der optischen Dichte dieser Lösung mit Spektralphotometer bei 2600 Å.

Isolierung der DNS aus ØX174-Phagen ('heiße Phenolextraktion'):

Erwärmung von 1 ml Phagenkonzentrat in 0.1 m Natriumtetraboratlösung auf 70 °C - Erwärmung von 1 ml Borat-gesättigter Phenollösung auf 70 °C - Vermischung der beiden Flüssigkeitsmengen - wiederholtes Schütteln und Wiedererwärmen auf 70 °C während 5 Minuten - Abkühlung auf Zimmertempe-

ratur - Zentrifugation (5 min/6000 UpM) - zweimalige Wiederholung der Phenolextraktion mit der DNS-haltigen wässrigen Phase - aufeinanderfolgende Rückgewinnung der DNS-Reste aus den drei Phenolphasen mit 0.5 ml 0.1 m Boratlösung - Vermischung der beiden wässrigen Phasen - 5maliges Ausschütteln des restlichen Phenols mit einigen ml Äther - Dialyse des Extraktes gegen NCE-Puffer (9 g NaCl, 3.87 g Na-Citrat und 0.58 g ÄDTA pro 1000 ml).

Sphäroplastengewinnung:

Zentrifugation (15 min/5000 UpM) von 80 ml einer frischen Kultur von E.coli K12-Bakterien mit einem Titer von $2 - 5 \times 10^8$ /ml in 3XD-Medium (Fraser und Jerrel, 1953) - Auflösung des Sediments in 1.4 ml Sucroslösung (1.5 molar) - Zugabe von 0.68 ml 30 %igem Rinderserum-Albumin, 0.08 ml Lysozymbilösung (0.2 %ig in 0.25 m Tris-Puffer), 0.16 ml ÄDTA (4 %ig) und 10 ml PA-Medium (1 % Casaminsäure, 1 % Difco-Nährbrühe, 1 % Glucose, 10 % Sucrose) - 15 minütige Inkubation bei Zimmertemperatur - Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 0.8 ml $MgSO_4$ -Lösung (10%ig) - Aufbewahrung im Kühlschrank.

Test auf Infektiosität der ØX174-DNS:

Ablösung der DNS-Präparation in 0.5 ml 0.05 m Tris-Puffer (pH 8.1) - Vermischung mit 0.5 ml Sphäroplastenkonzentrat - 20minütige Inkubation bei 37 °C - Zugabe von 1 ml PAM-Medium mit 0.2 % $MgSO_4$) - weitere 100 min Inkubation bei 37 °C - 1:10-Verdünnung in destilliertes Wasser - Platieren von 0.1 ml geeigneter Verdünnungen (in Borat-Puffer) mit einigen Tropfen E.coli C/1-Lösungen auf Agar-Platten - mehrstündiges Bebrüten der Platten - Auszählen der 'plaques'.

VIII. Literaturhinweise

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

Combined thermal and primary ionization effects on a bacterial virus.

Arch. Biochem. Biophys. 36, 311-322

Alexander, P. und A. Charlesby (1955)

Energy transfer in macromolecules exposed to ionizing radiations.

Nature (London) 173, 578-579

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

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

Braams, R. (1963)

A mechanism for the direct action of ionizing radiations.

Nature 200, 752-754

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

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

Butts, J.J. und R. Katz (1967)

Theory of RBE for heavy ion bombardment of dry enzymes and viruses.
Rad. Res. 30, 855-871

Cercek, B. (1968)

Activation energy for the mobility of the hydrated electron.
J. Phys. Chem. 72, 2279

Cole, T. und A.H. Silver (1963)

Production of hydrogen atoms in teeth by X-irradiation. Nature (London) 200, 700

Copeland, E.S., T. Sanner und A. Pihl (1968)

Role of intermolecular reactions in the formation of secondary radicals in protein irradiated in the dry state.
Radiat. Res. 35, 437-450

Dewey, D.L. und G. Stein (1968)

Action of atomic hydrogen on aqueous bacteriophage T7. Nature 217, 351-353

Drosd, G.G. (1968)

Probegi protonow w biologizeskoj tkani. Radiobiologija VIII, 142-145 (1968)

Fano, U. (1954)

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

Fluke, D.J. (1966)

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

Radiat. Res. 28, 677-693

Franck, J. und E. Rabinowitsch (1934)

Some remarks about free radicals and the photochemistry of solutions.

Trans. Farad. Soc. 30, 120-130

Fraser, D. und E.A. Jerrel (1953)

The amino acid composition of T3 bacteriophage.

J. Biol. Chem. 205, 291-295

Günther, H.H. und K.O. Hermann (1967)

Temperatur- und Schutzstoffeffekte bei der Inaktivierung von ØX174-Phagen mit Protonen.

Z. Naturforschg. 22b, 53-57

Günther, W. und H. Jung (1967)

Der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuklease.

Z. Naturforschg. 22b, 313-320

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)

Wirkung von Wasserstoffatomen auf DNS.

studia biophysica 12, 29-37

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 bombardment 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

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 (1967)
An ESR 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

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

Hotz, G. und A. Müller (1968)
The action of heat and ionizing radiation on the infecti-
vity of isolated ϕ X174-DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 60, 251-257

Hotz, G. und K.G. Zimmer (1963)
Experiments in radiation chemistry of T1-phage.
Int. J. Rad. Biol. 7, 75-86

Howard-Flanders, P. (1960)
Effect of oxygen on the radiosensitivity of bacteriophage
in the presence of sulfhydryl compounds.
Nature 186, 485-487

Howard-Flanders, P., J. Levin und L. Theriot (1963)
Reactions of deoxyribonucleic acid radicals with sulfhy-
dryl compounds in X-irradiated bacteriophage-systems.
Rad. Res. 18, 593-606

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

Jacobs, S.S. (1962)

The solid state gamma irradiation of crystalline amino acids and sugars.

Dissertation, University of Colorado

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 Ribonuklease durch langsame Protonen.

Z. Naturforschg. 20b, 764-772

Jung, H. (1966)

Zur biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße.

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

Z. Naturforschg. 21b, 1165-1170

Jung, H. und H. Schüßler (1966)

Zur Strahleninaktivierung von Ribonuklease. I. Auftrennung der Bestrahlungsprodukte.

Z. Naturforschg. 21b, 224-231

Jung, H. und H. Schüßler (1968)

Zur Strahleninaktivierung von Ribonuklease. III. Aminosäure-Veränderungen nach Bestrahlung im Trockenen.

Z. Naturforschg. 23b, 934-943

Kalnitzky, G., J.P. Hummel, H. Resnick, J.R. Carter, L.B. Barnett und C. Diercks (1959)

The relation of structure to enzymatic activity in ribonuclease.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 81, 542-569

Kürzinger, K. (1965)

Streuung energiereicher Spaltproduktstrahlen beim Durchgang durch dünne Folien.

Diplomarbeit, Technische Hochschule München

Lea, D.E. (1946)

Actions of radiations on living cells.

University Press, Cambridge

Marshall, R.M. und J.H. Purnell (1968)

The temperature-dependence of Arrhenius parameters.

J. Chem. Soc. (A), 2301-2304

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 γ -bestrahltem ^3H -Thymin und ^3H -Uracil.

Dissertation, Universität Karlsruhe

Molière, G. (1948)

Theorie der Streuung schneller geladener Teilchen.

II. Mehrfach- und Vielfachstreuung.

Z. Naturforschg. 3a, 78-97

Müller, A. (1964)

Spektrographische Untersuchungen mittels paramagnetischer Elektronenresonanz über die Wirkung ionisierender Strahlen auf elementare biologische Objekte.

Habilitationsschrift / Verlag der Akademie der Wissenschaften und der Literatur in Mainz

Müller, A. und H. Dertinger (1968)

Die Erzeugung atomaren Wasserstoffs in γ -bestrahlten Bakteriophagen und deren DNS.

Z. Naturforschg. 23b, 83-89

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

Norman, A. und P. Spiegler (1962)
Thermal spikes in protein.
J. Appl. Phys. 32, 2658

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

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

Pollard, E.C. (1959)
Radiation inactivation of enzymes nucleic acids, and
phage particles.
Rev. Mod. Phys. 31, 273-281

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 G.F. Whitmore (1955)
Deuteron bombardment of oriented tobacco mosaic virus
preparations.
Science 122, 335

Riehl, N. (1956)
Einige Wirkungen des radioaktiven Rückstoßes.
Atomenergie 1, 297-300

Setlow, R.B. (1952)

The radiation sensitivity of catalase as a function of temperature.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 38, 166-172

Sinsheimer, R.L. (1959a)

Purification and properties of bacteriophage ϕ X174.

J. Mol. Biol. 1, 37-42

Sinsheimer, R.L. (1959b)

A single-stranded deoxyribonucleic acid from bacteriophage ϕ X174.

J. Mol. Biol. 1, 43-53

Snipes, W. und J. Schmidt (1966)

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

Radiat. Res. 29, 194-202

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

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

Vacek, K. und D. Schulte-Frohlinde (1968)

The kinetics of the reaction of trapped hydrogen atoms in sulfuric acid glasses.

J. Phys. Chem. 72, 2686-2688

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

Temperature dependence of ionizing radiation effect on dry hyaluronidase.

Radiat. Res. 31, 867-875

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

Zimmer, K.G. (1956)

Probleme der Neutronendosimetrie.

Strahlentherapie 101, 143-151

Zimmer, K.G. (1960)

Studien zur quantitativen Strahlenbiologie.

Verlag der Akademie der Wissenschaften und der Literatur in Mainz

IX. Tabelle und Abbildungen

T a b e l l e

Aktivierungsenergien E_0 , E_1 und E_2 für die Beschreibung der Temperaturabhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts $S(T)$ (vergl. Gl. (8)) bzw. der Ausbeute an beobachtbaren Radikalen (f).

| Objekt | Strahlung | Aktivierungsenergien [kcal/Mol] | | | Autoren |
|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------|------------------|-------------------------|
| | | E_0 | E_1 | E_2 | |
| Ribonuklease | Co- γ | fehlt ^b | 1 | - ^a | Günther und Jung (1967) |
| Ribonuklease (O ₂) | Co- γ | fehlt ^b | 1 | - | " " " |
| Ribonuklease | 2 MeV-d | 0 | 1.05 | - | " " " |
| " | 2 MeV-p | 0 | 1 | 6.5 | diese Arbeit |
| " | 1.4 keV-p | 0 | fehlt ^e | - | Jung (1966) |
| " | 3 MeV-e | 0 | 1.06 | 6.1 | Fluke (1966) |
| " | 6.5 MeV-e ^f | 0 | 1.1 | - | Henriksen (1967) |
| Lysozym | 3 MeV-e | 0 | 0.62 | 2.54 | Fluke (1966) |
| " | 6.5 MeV-e ^f | 0 | 1.2 | 6.6 | Henriksen (1967) |
| " | 33 MeV- α ^f | 0 | 1 | 5 | Henriksen (1966) |
| " | 100 MeV-C ^f | 0 | 1 | 4 | " |
| Trypsin | 6.5 MeV-e ^f | 0 | 1.45 | - | Henriksen (1967) |
| " | 18 MeV-d | 0 | 1.1 ^c | 4.5 ^c | Brustad (1964) |
| " | 33 MeV- α | 0 | 1.2 ^c | 5 ^c | " |
| " | 90 MeV-B | 0 | 0.9 ^c | 2.9 ^c | " |
| " | 100 MeV-C | 0 | 1 ^c | 3.1 ^c | " |
| " | 116 MeV-Ne | 0 | 1 ^c | 3.7 ^c | " |

Fortsetzung nächste Seite

- a Komponente wurde nicht untersucht
- b Komponente tritt nicht auf
- c dies sind die Temperaturexponenten, die von Günther und Jung (1967) aus den experimentellen Daten von Brustad (1964) ermittelt wurden. Brustad (1967) korrigierte seine ursprünglich veröffentlichten Werte (1964) und gab zwei Komponenten mit 0 bzw. 1.5 kcal/Mol an
- d hier tritt eine zusätzliche Komponente mit 0.35 kcal/Mol auf
- e die Inaktivierung erfolgte in diesen Experimenten überwiegend durch elastische Kernstöße, weshalb keine Temperaturabhängigkeit zu erwarten ist
- f die Ergebnisse stammen aus ESR-Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit von Radikal-Ausbeuten

Abb. 1: Wirkungsquerschnitte für die Abbremsung von Protonen in Gewebe durch Wechselwirkung mit Elektronen (σ_e) bzw. durch elastische Kernstöße (σ_n) (Neufeld und Snyder, 1961)

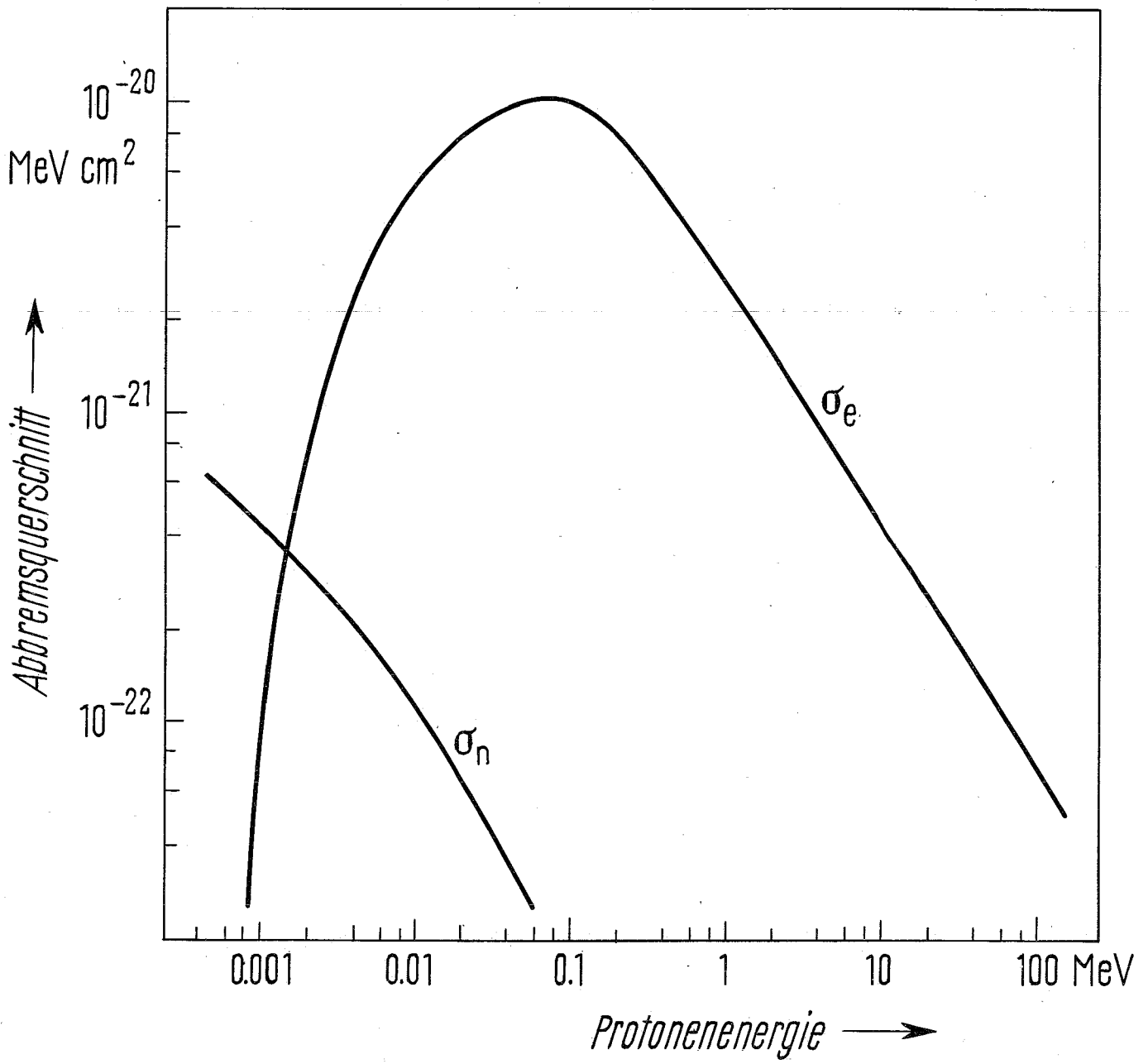


Abb. 2: Kalibrierungskurve für die Zahl der produzierten
ØX174-Phagen pro ml (= Plaque Titer) als Funktion
der relativen DNS-Konzentration

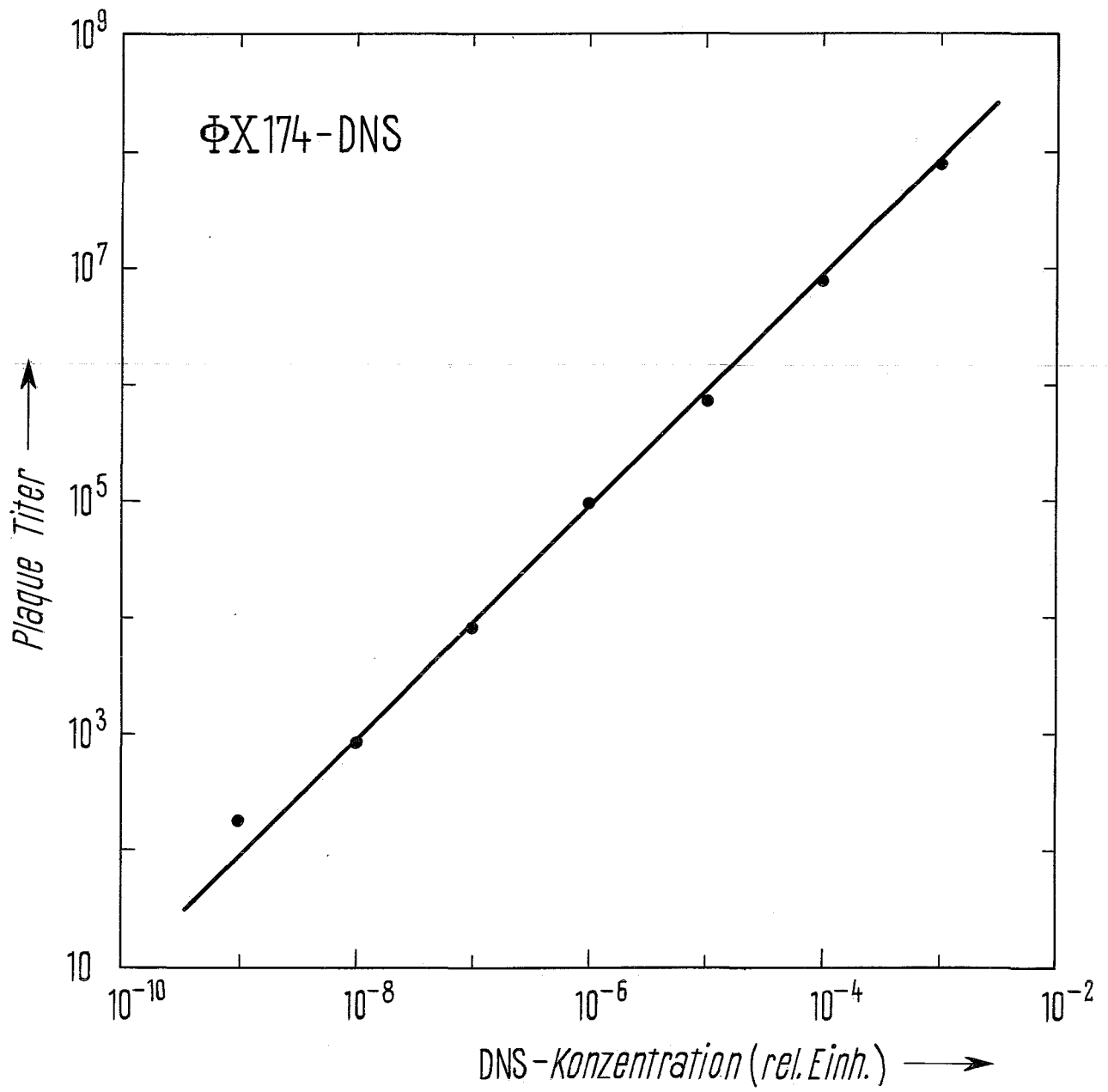


Abb. 3: Aufbau des Protonenbeschleunigers (halbschematisch). U = Beschleunigungsspannung; T = Trenntransformator; C = Coronaschutz; I_q = Ionenquelle; R = Reihenwiderstand; R_1, R_2, R_3 = Beschleunigungsröhren; B_1, B_2, B_3 = Blenden; F = Federbalg; M = Analysiermagnet; Str = Protonenstrahl; S = Schieberventil; K = Bestrahlungskammer; FB = Faradaybecher; A = Nanoampèremeter; P 15 = Pumpstand

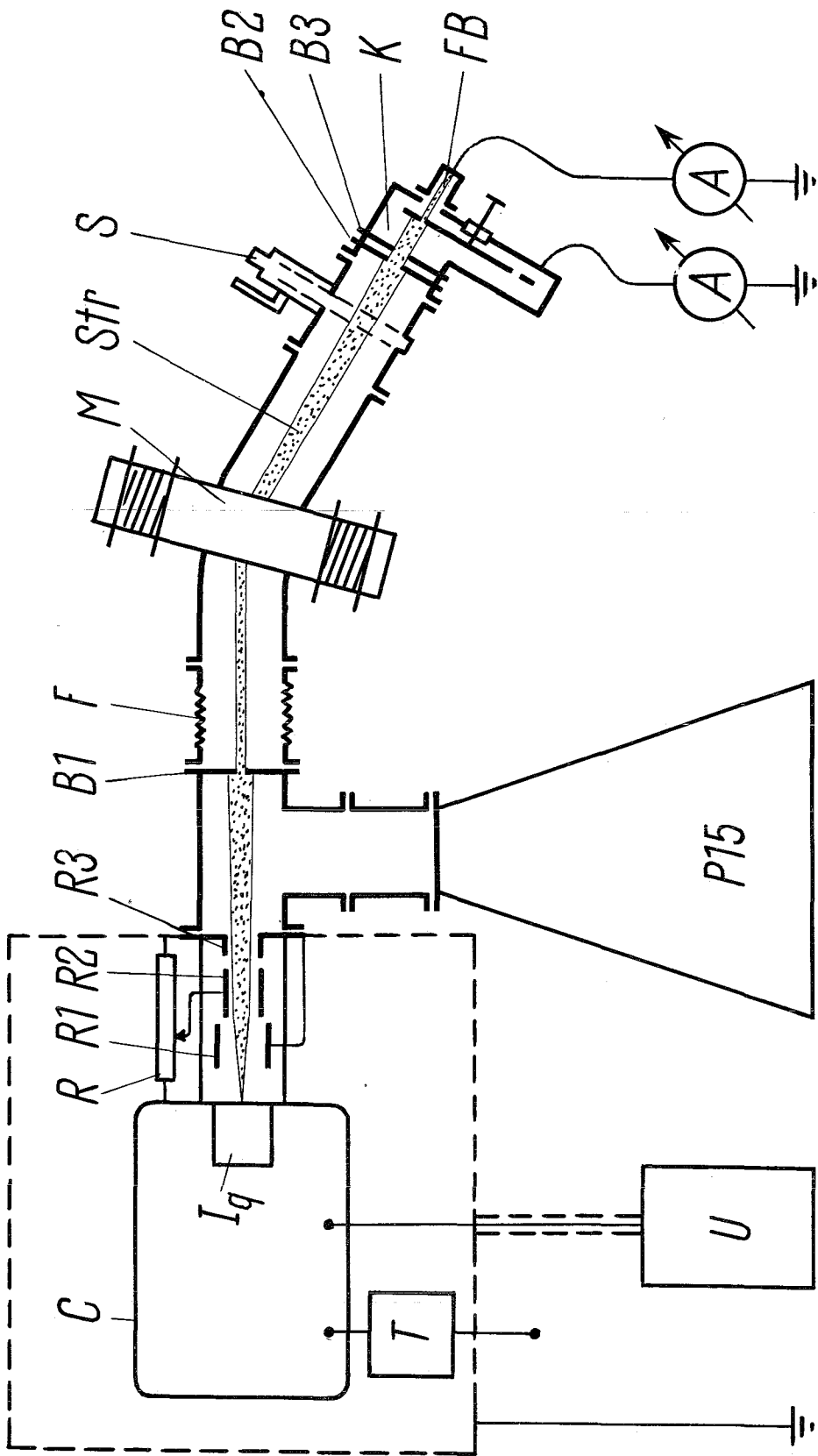


Abb. 4: Bestrahlungskammer für die Kernstoßversuche
(halbschematisch). B_2 , B_3 = Blenden; FB = Faraday-Becher; M = Magnetfeld; D = Drehdurchführung; P = Positionsanzeige; Dr = Drehknopf; BP = Bestrahlungsplatte; HP = Halterung für die zu bestrahlenden Proben; HK = Halterung für die Kontrollproben; Str = Protonenstrahl

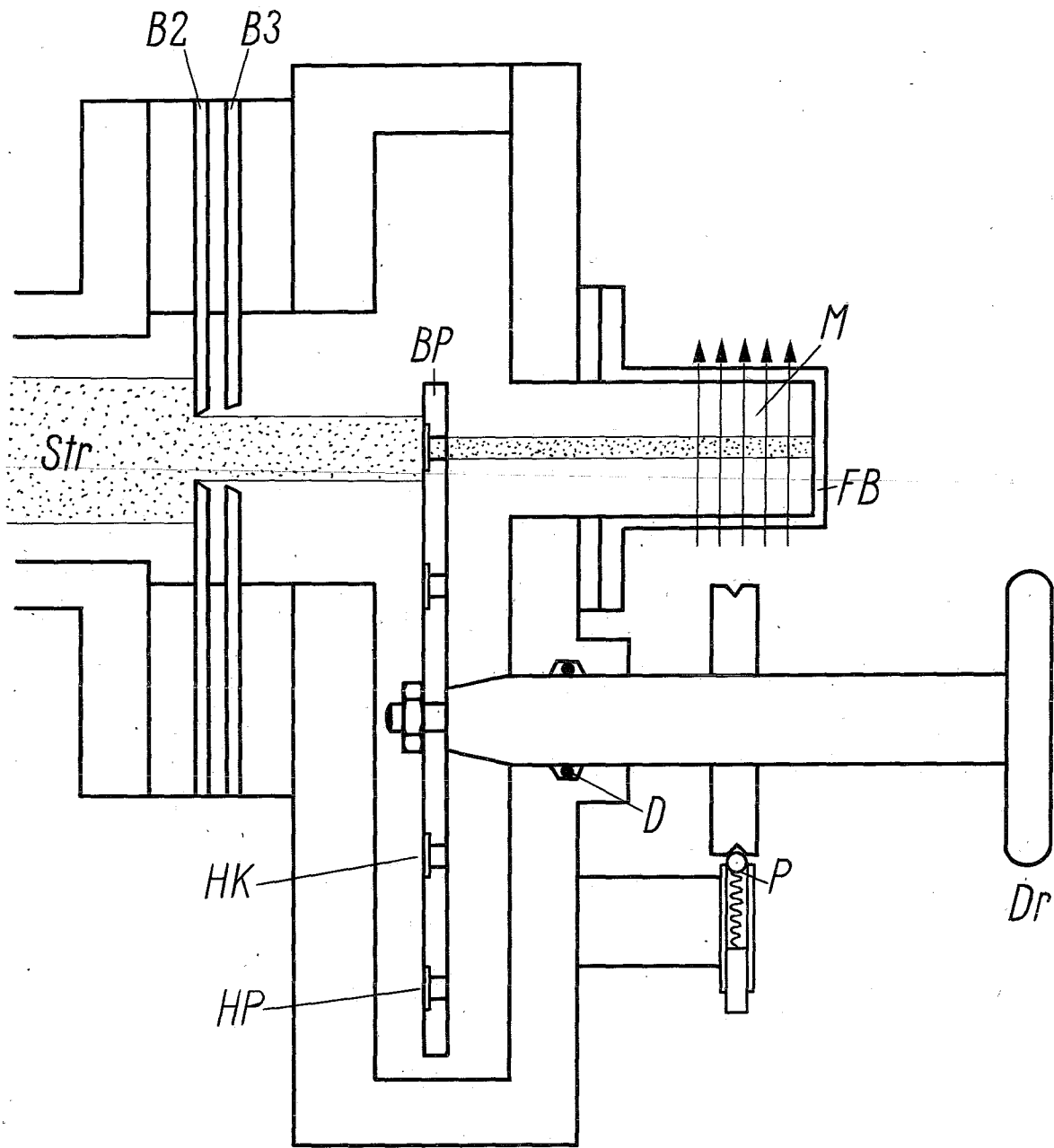


Abb. 5: Van de Graaff-Beschleuniger. B = Beschleuniger;
V = Vakuumventil; MGH 300 Diffusionspumpe; AM =
Ablenkmagnet; S = energiedefinierendes Schlitz-
system; F = Folienhalter mit Strahlverschluß;
PL 15 = Pumpstand; K = Bestrahlungskammer

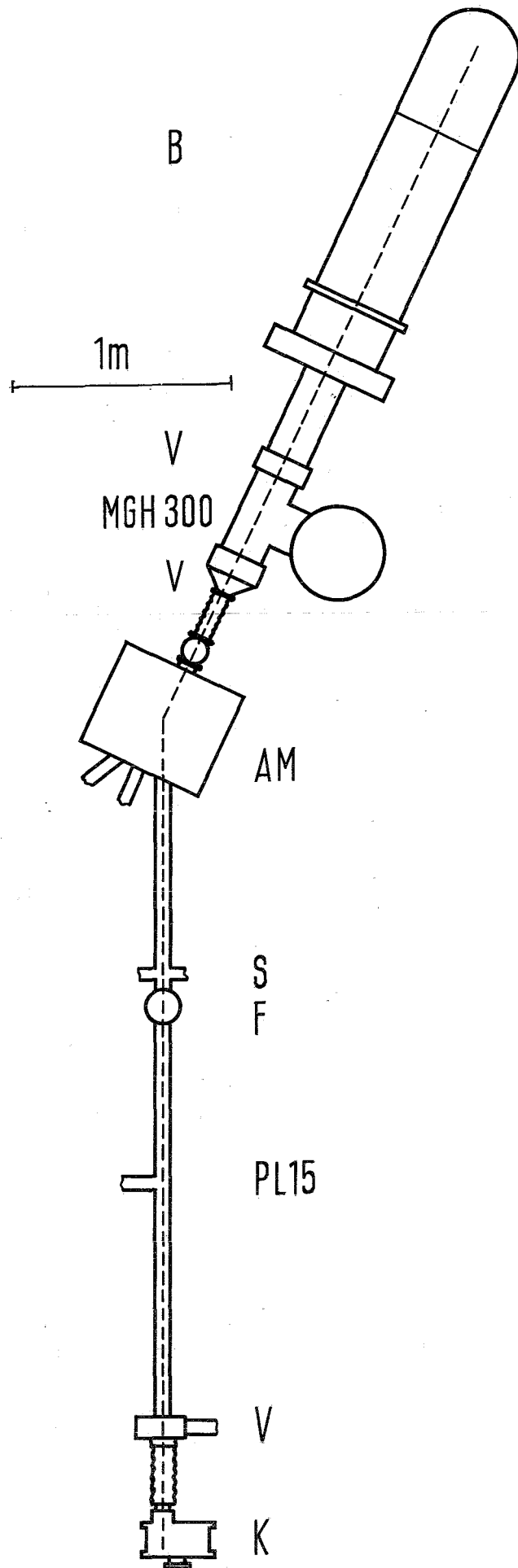





Abb. 6: Bestrahlungskammer für die Inaktivierung von RNase durch 2 MeV-Protonen-Bestrahlung bei erhöhten Temperaturen; B = Eintrittsblenden, D = Probenhalter; E = Einfüllstutzen der Thermostattrommel; F = Absaugstutzen; TT = Thermostattrommel; P = Proben; R = Abdeckplatte; S = Strahlachse; T = Thermoelement

-  V2A
-  Messing
-  Aluminium
-  Teflon
-  PVC

10 cm

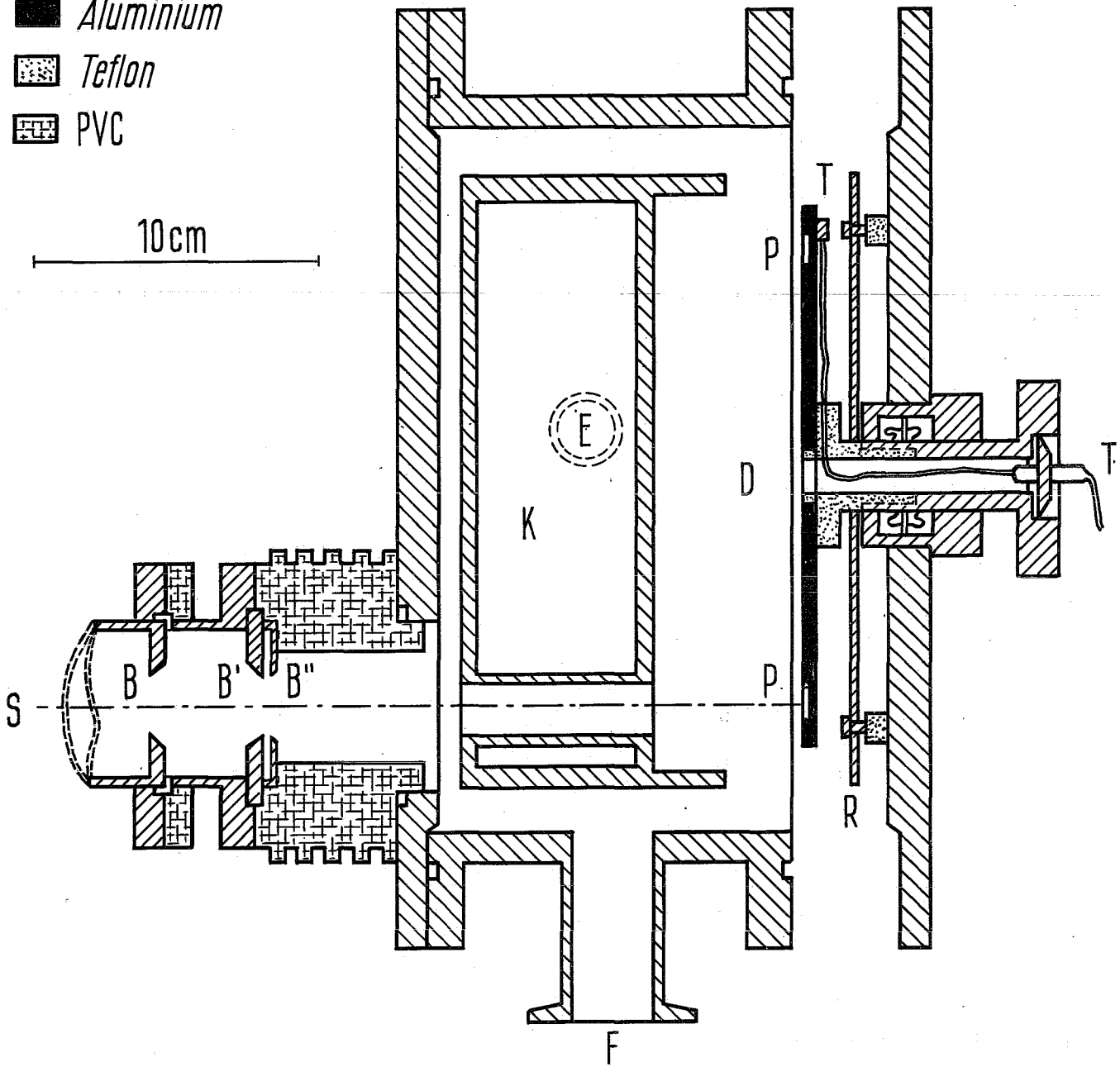


Abb. 7: Erzeugung von atomarem Wasserstoff in einer
Hochfrequenz-Entladung (System I)

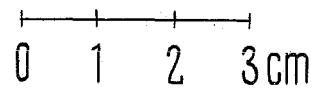
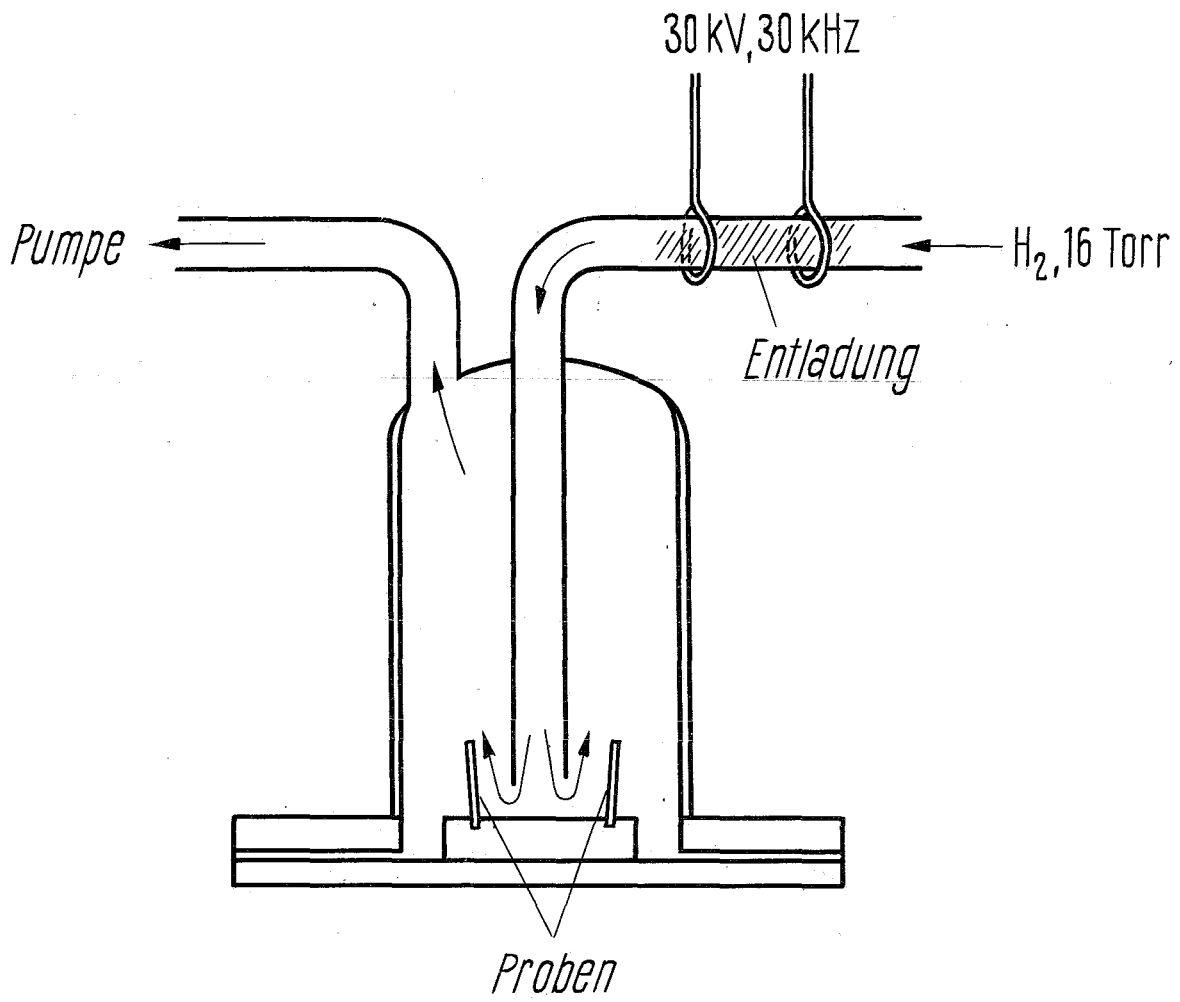


Abb. 8: Erzeugung von atomarem Wasserstoff durch Bestrahlung einer Folie aus organischem Material mit 2 MeV-Protonen (System II)

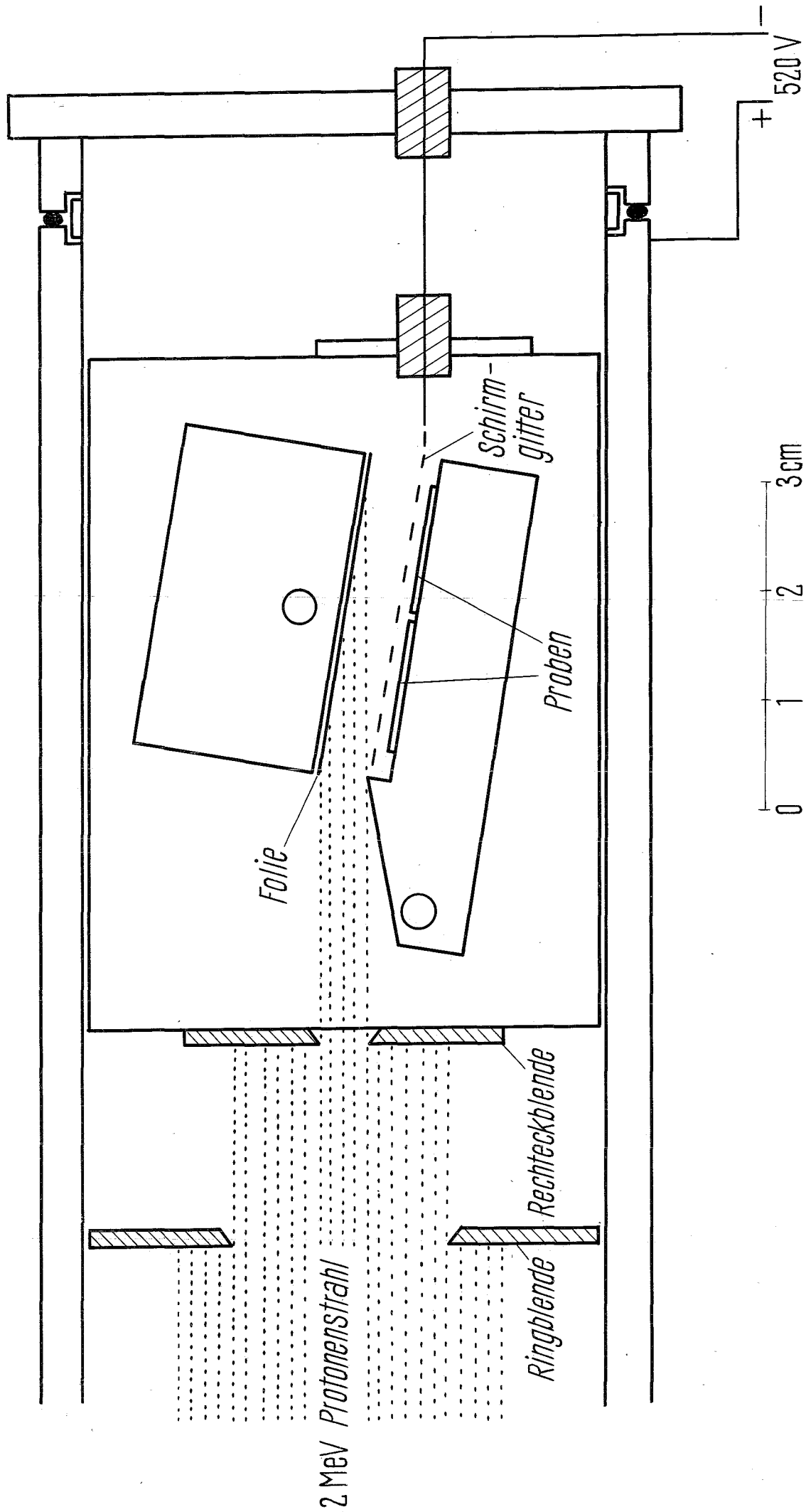


Abb. 9: Stromdichte der von den 2 MeV-Protonen aus der bestrahlten Folie ausgelösten Sekundärelektronen gemessen am Ort der Proben in Abhängigkeit von der Schirmgitterspannung

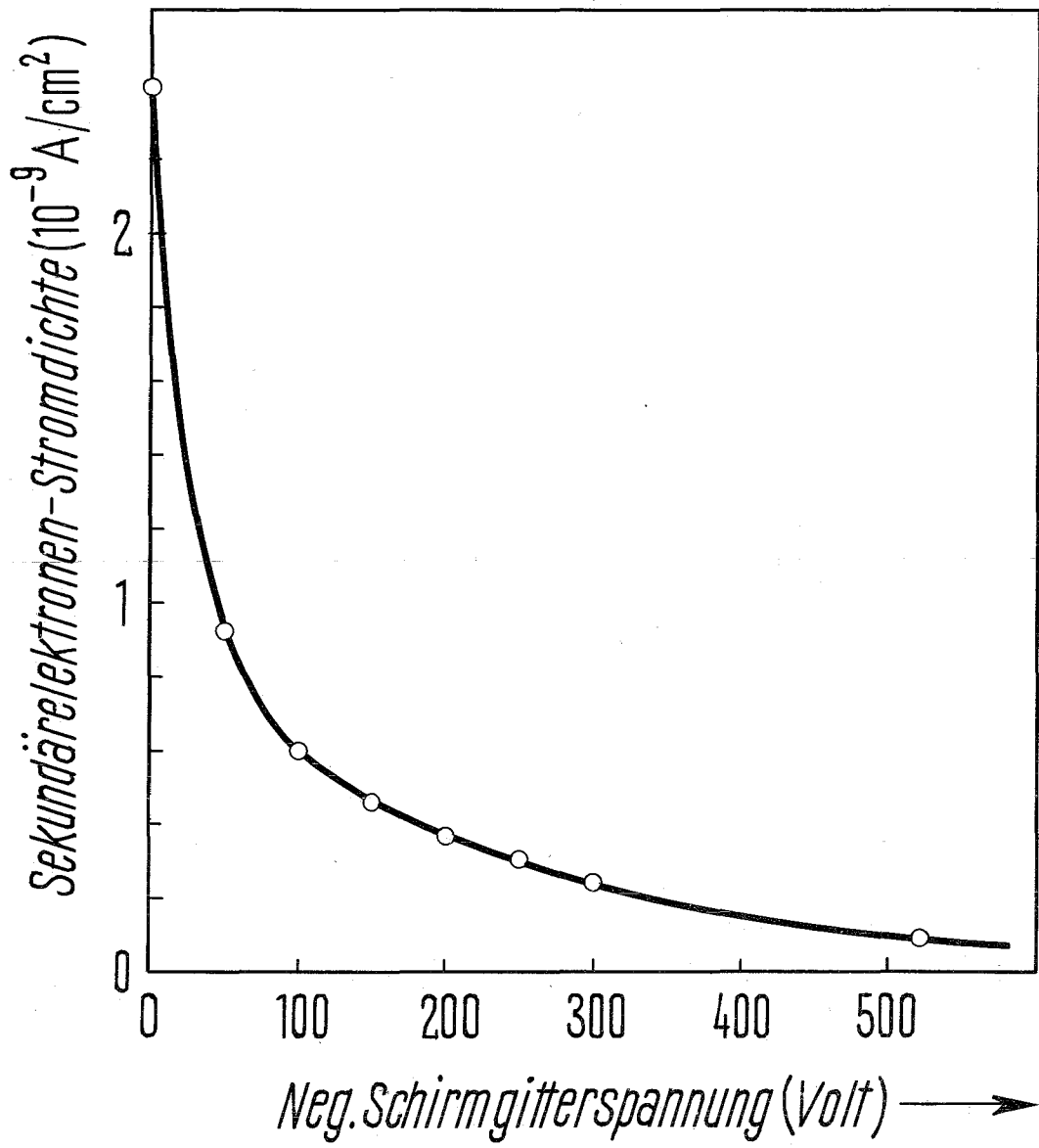
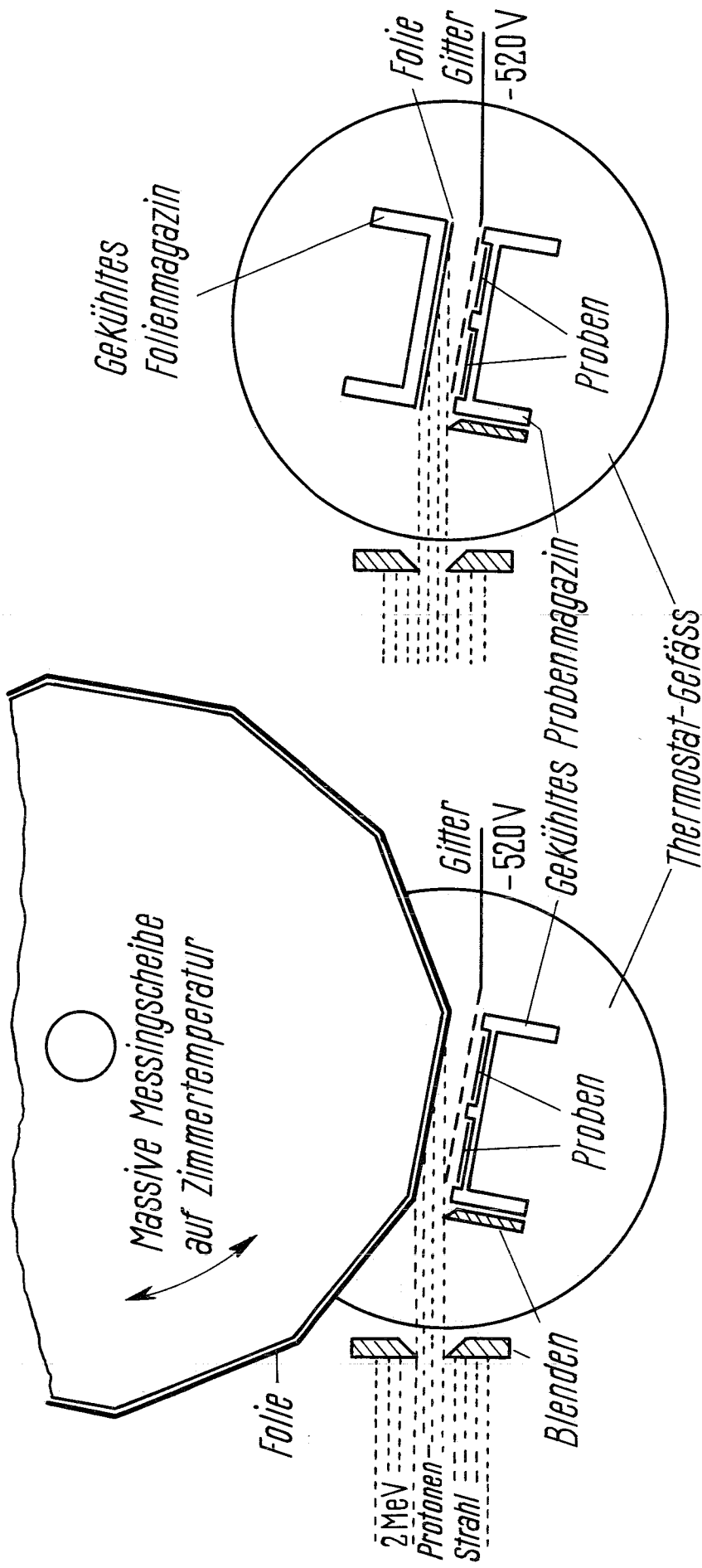


Abb. 10: Messung der Temperaturabhängigkeit der Inaktivierungsrate bei der Einwirkung von H-Atomen, die durch 2 MeV-Protonen-Bestrahlung einer organischen Folie erzeugt werden. Schematische Darstellung der beiden Anordnungen für die Probenexposition nach Methode A bzw. B



Methode A

Methode B

Abb. 11: Halbschematische Darstellung der H-Atom-Expositionskammer. Die beiden unterschiedlichen Anordnungen für die Probenexposition (Methoden A und B) sind in einer Zeichnung gezeigt

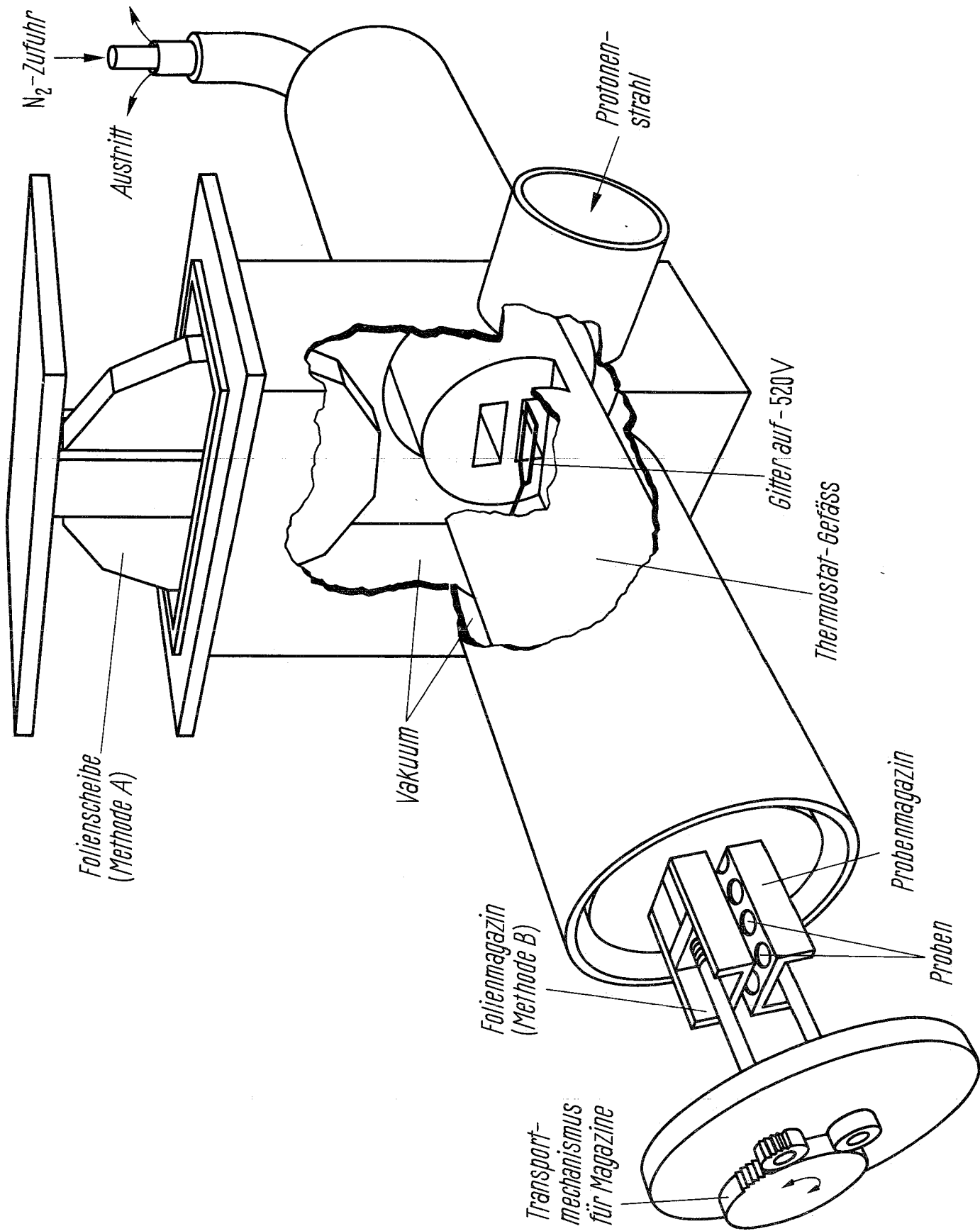


Abb. 12: Typische Kurve für die Inaktivierung von
ØX174-DNS mit niederenergetischen Protonen

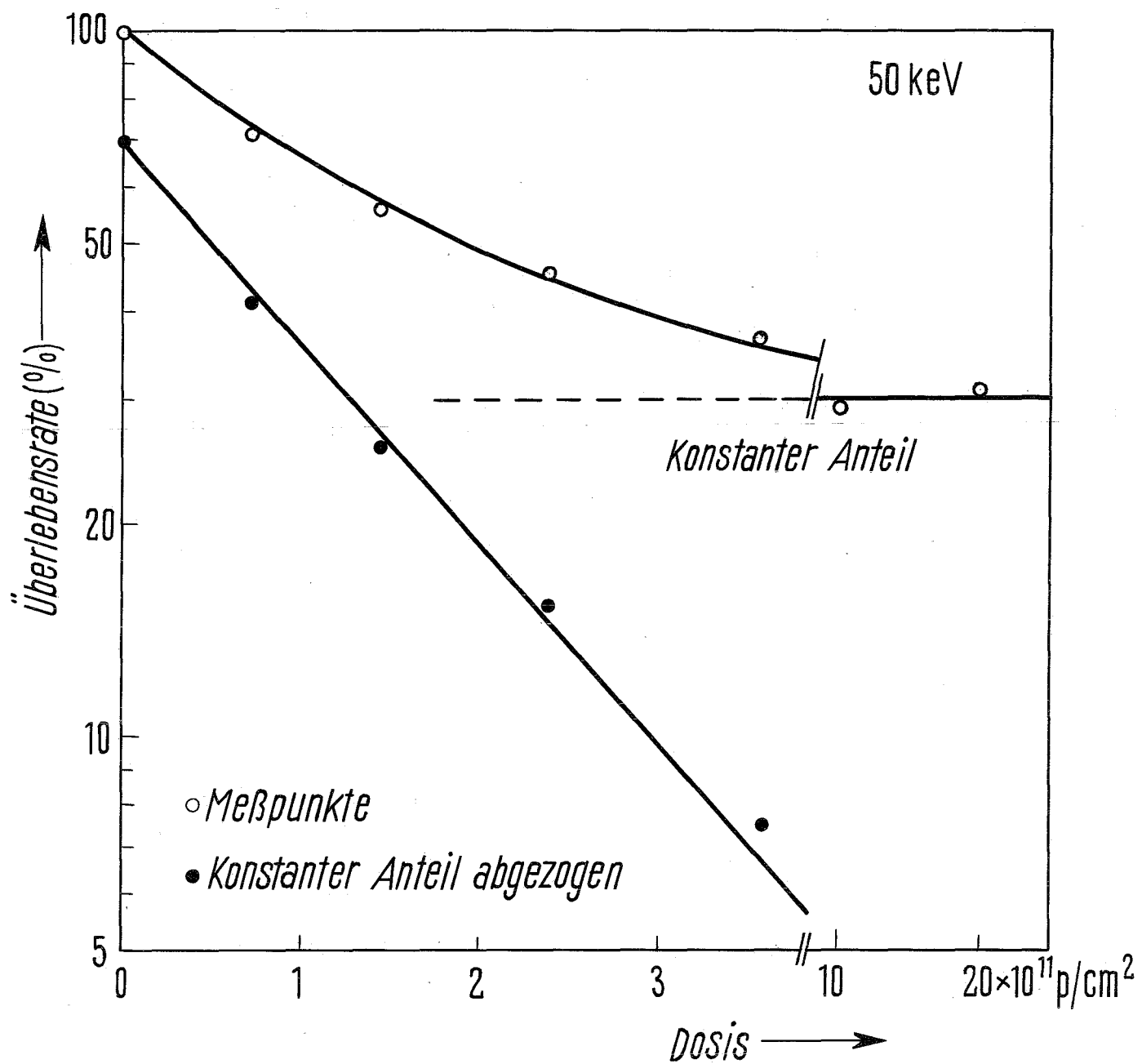


Abb. 13: Inaktivierung von ØX174-DNS durch Protonen von
0.8, 1.2 und 35 keV Energie

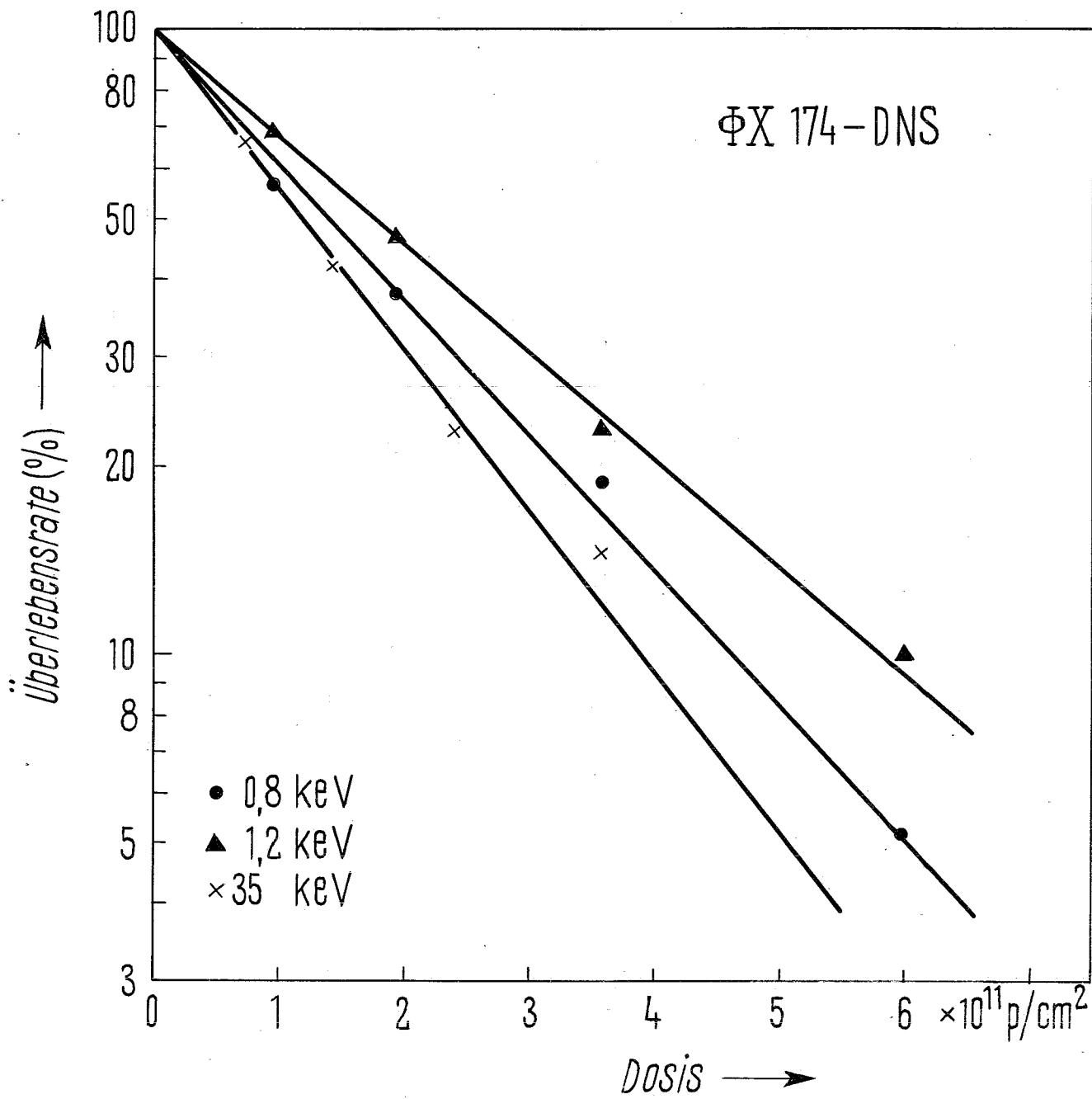


Abb. 14: Verlauf des Wirkungsquerschnitts für die Inaktivierung von ØX174-DNS in Abhängigkeit von der Energie der eingestrahlten Protonen. Gestrichelt: entsprechende Kurve für RNase bei willkürlicher Anpassung bei 50 keV (n. Jung, 1964)

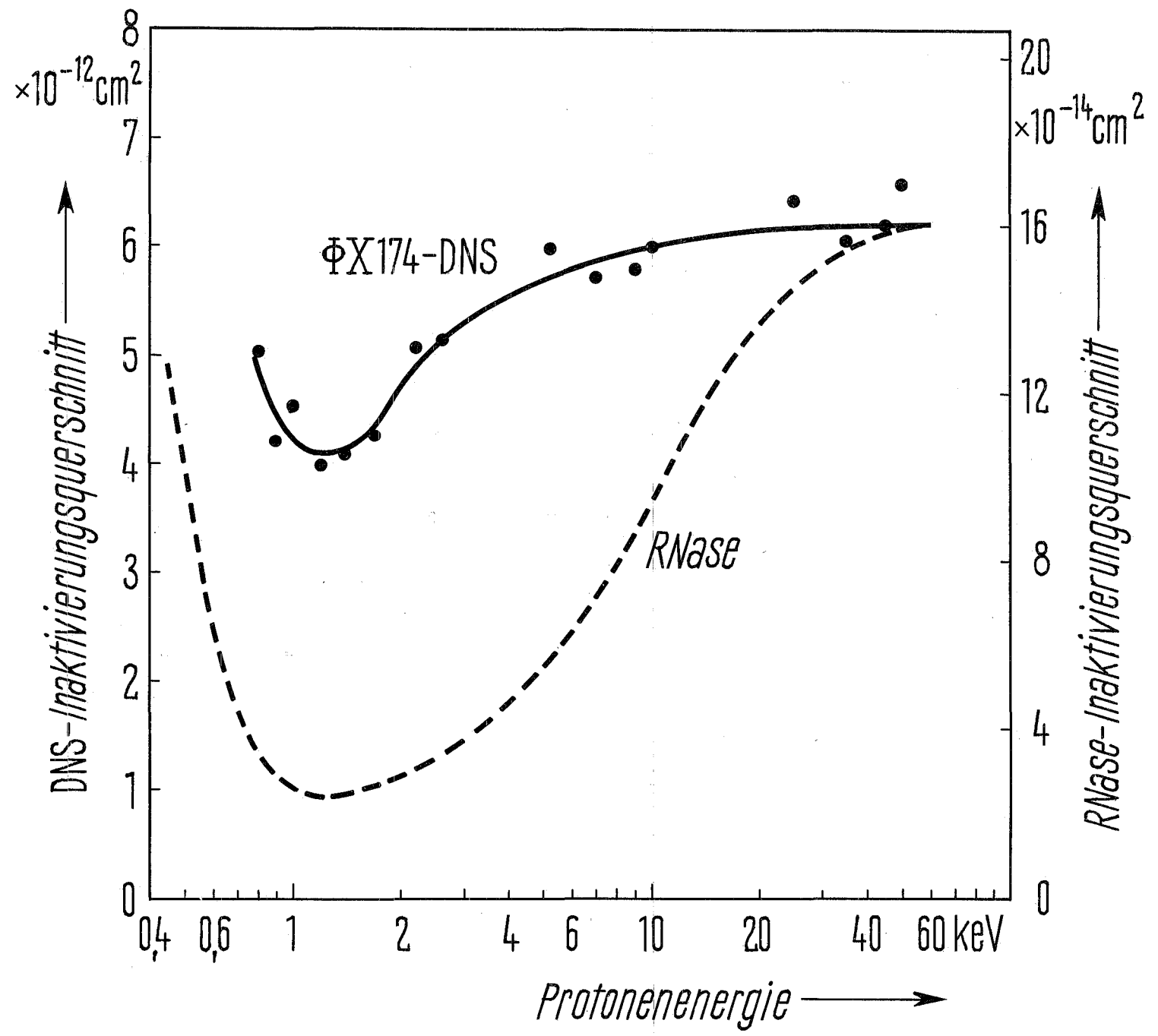


Abb. 15: Vergleich der experimentell bestimmten Wirkungsquerschnitte für die Inaktivierung von ØX174-DNS (●) mit dem nach der Treffbereichstheorie unter verschiedenen Voraussetzungen zu erwartenden Kurvenverlauf (Erläuterungen s. Abschn. IV.1)

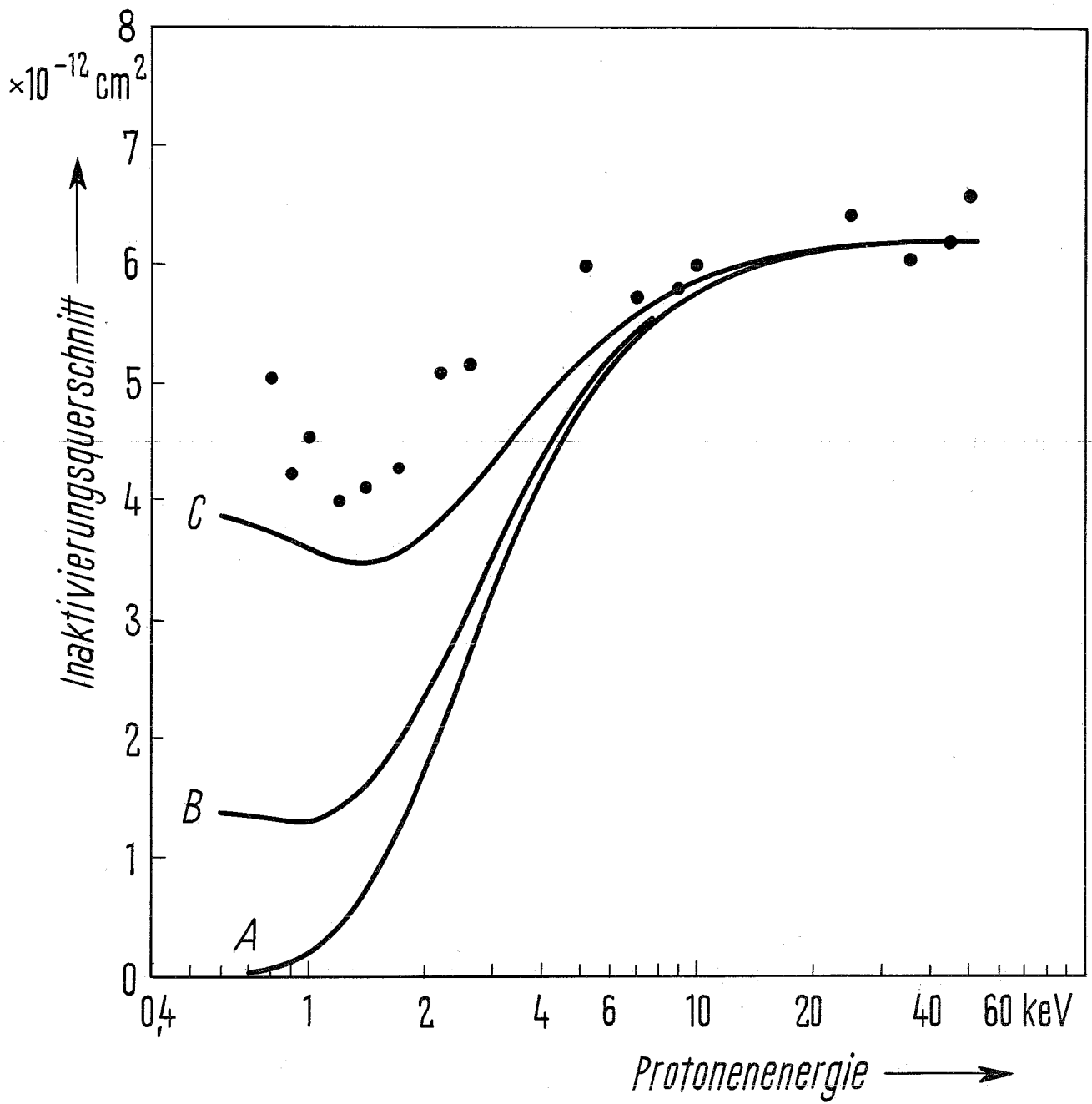


Abb. 16: Inaktivierung von RNase durch 2 MeV-Protonen
bei verschiedenen Temperaturen

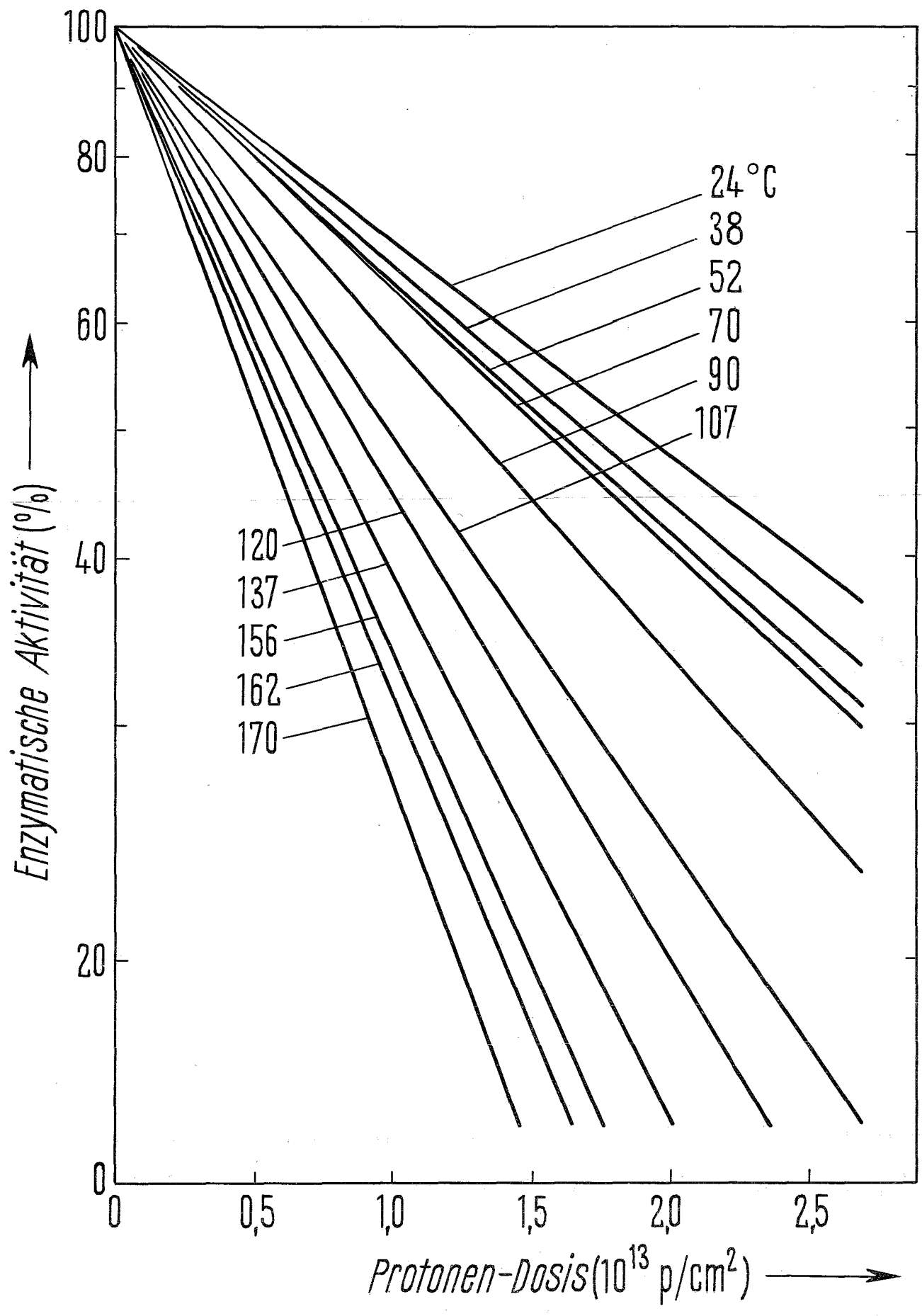


Abb. 17: D_{37} -Werte für die Inaktivierung von RNase durch 2 MeV-Protonen in Abhängigkeit von der Temperatur. Gestrichelt: Messungen von Günther und Jung (1967)

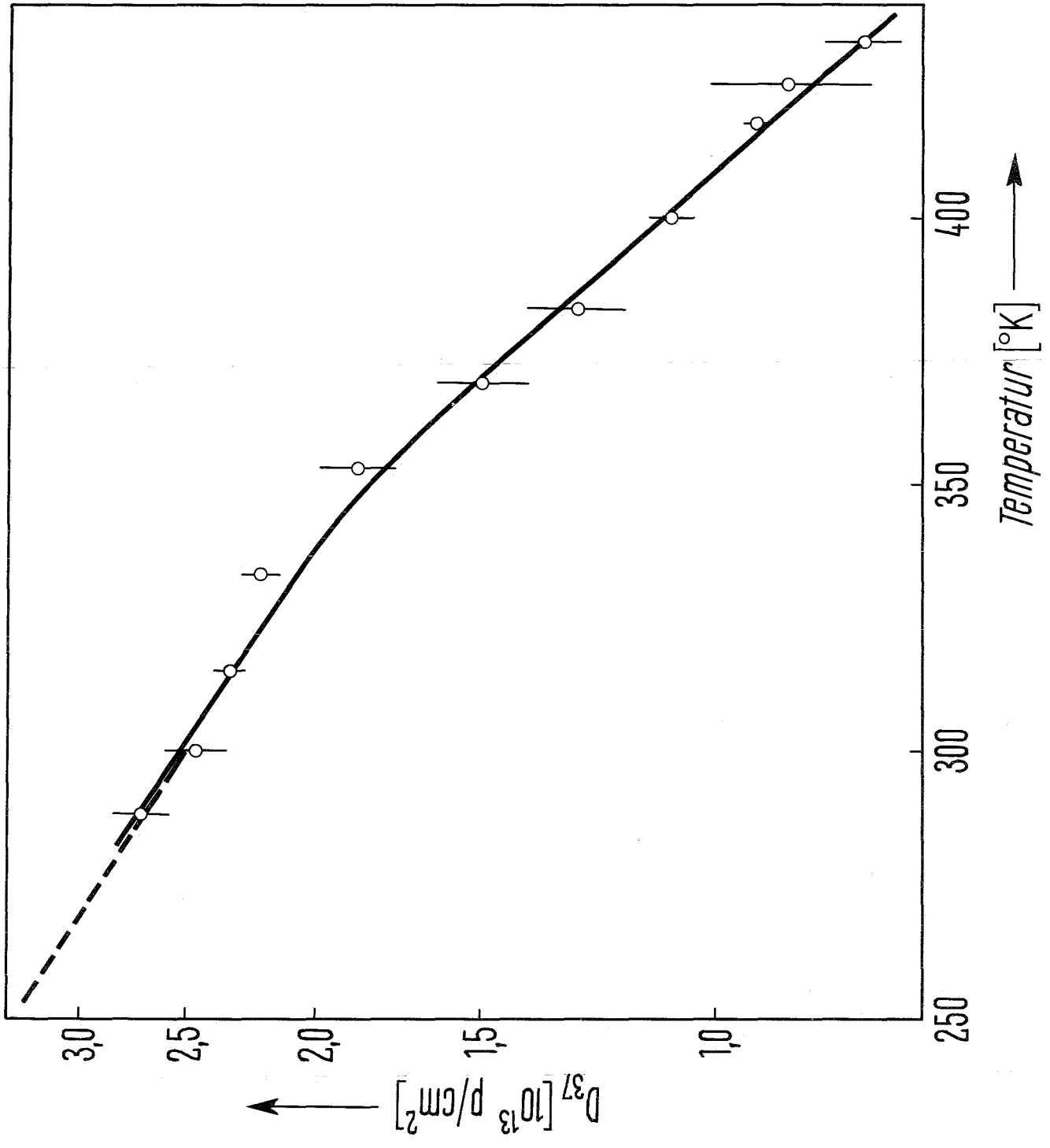


Abb. 18: Wirkungsquerschnitte für die Inaktivierung von RNase durch 2 MeV-Protonen (●) in Abhängigkeit von der reziproken absoluten Temperatur (Arrhenius-Darstellung). Zerlegung in drei Komponenten (Erläuterungen s. Abschn. IV.2)

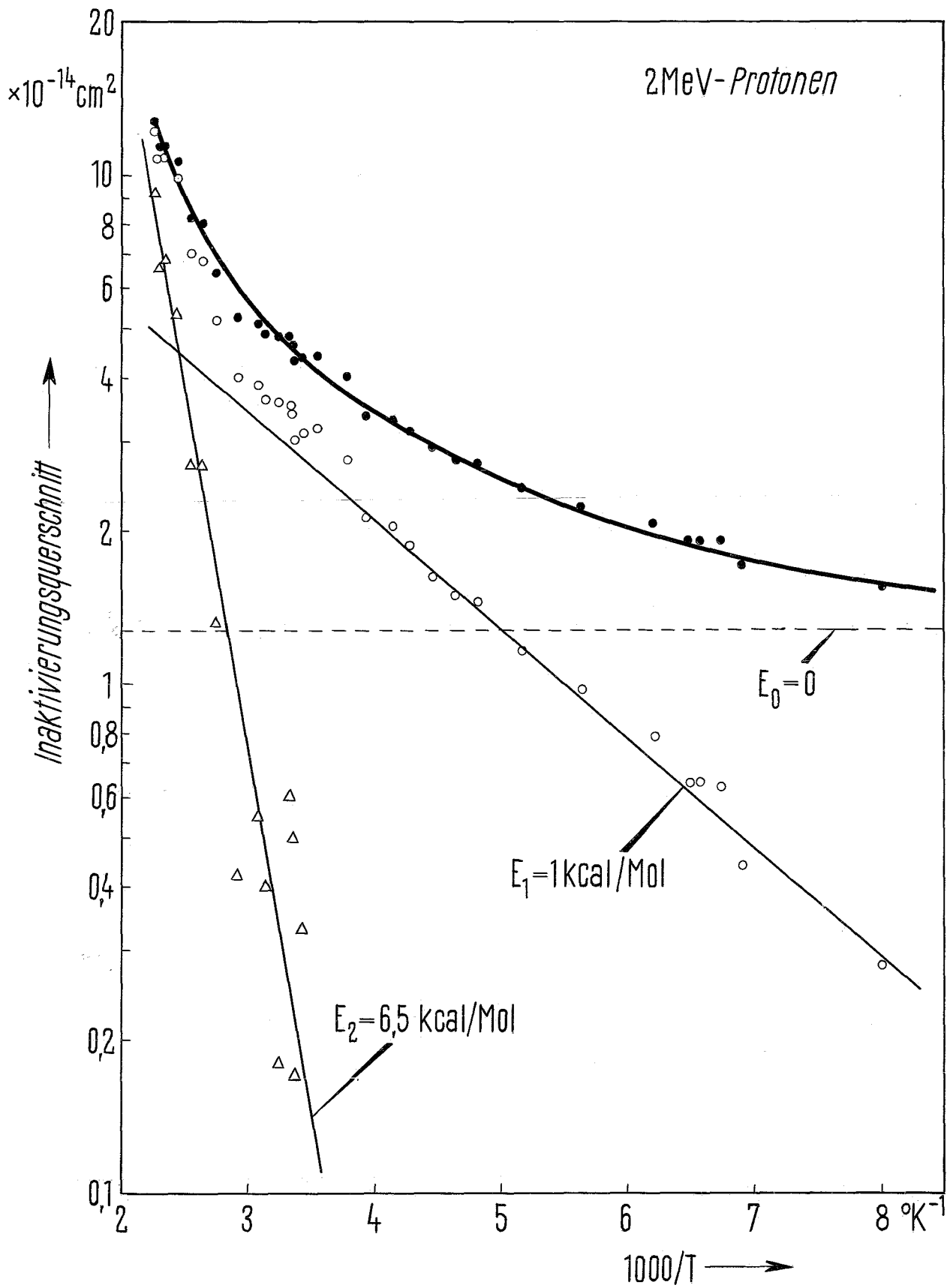


Abb. 19: Typischer Kurvenverlauf für die Inaktivierung durch H-Atom-Einwirkung auf trockene Probenpräparationen in der Expositionskammer

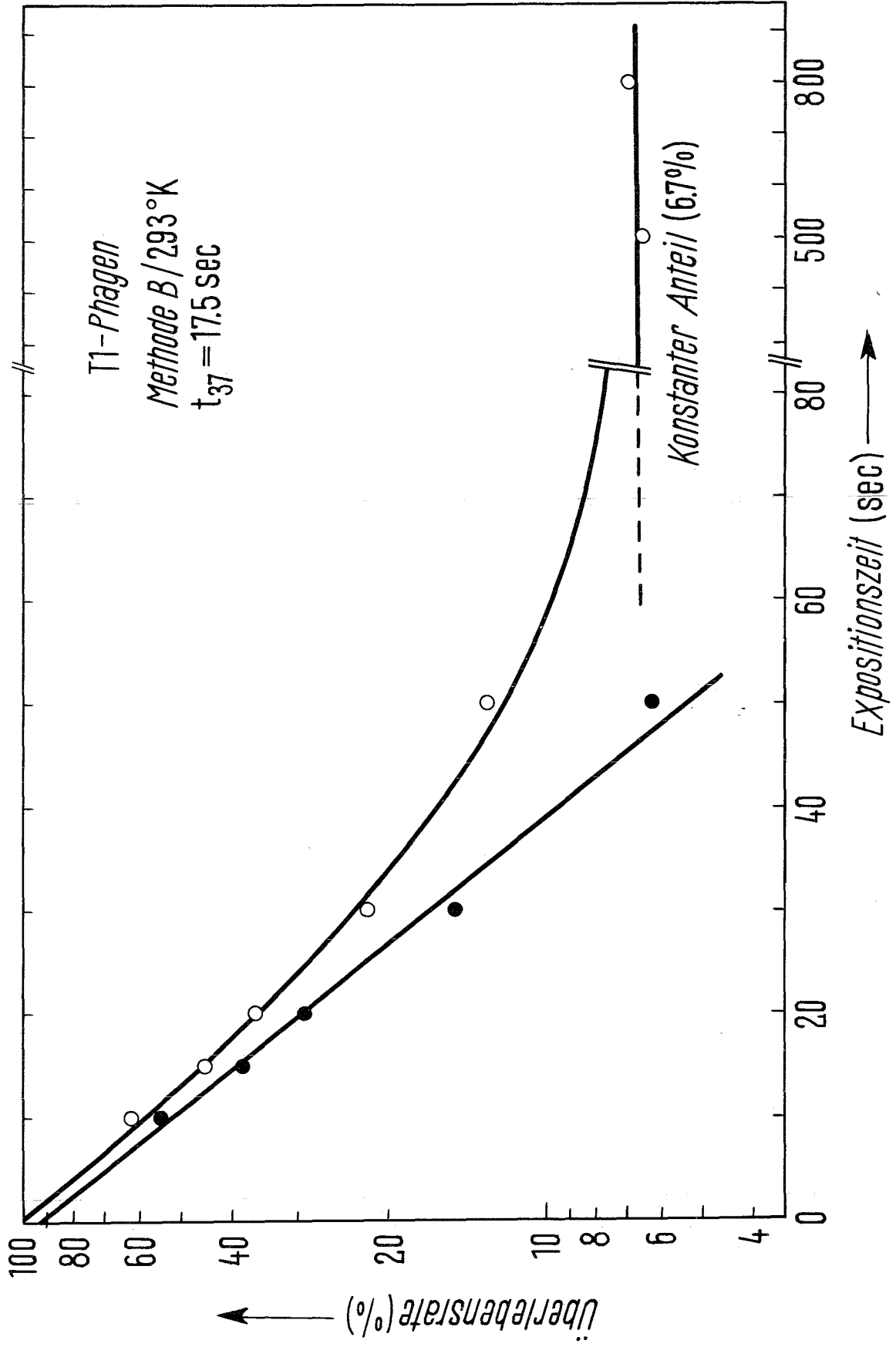


Abb. 20: Inaktivierung von trockenen T1-Bakteriophagen (●)
und BUT1-Phagen (▲) durch atomaren Wasserstoff
(System I und II)

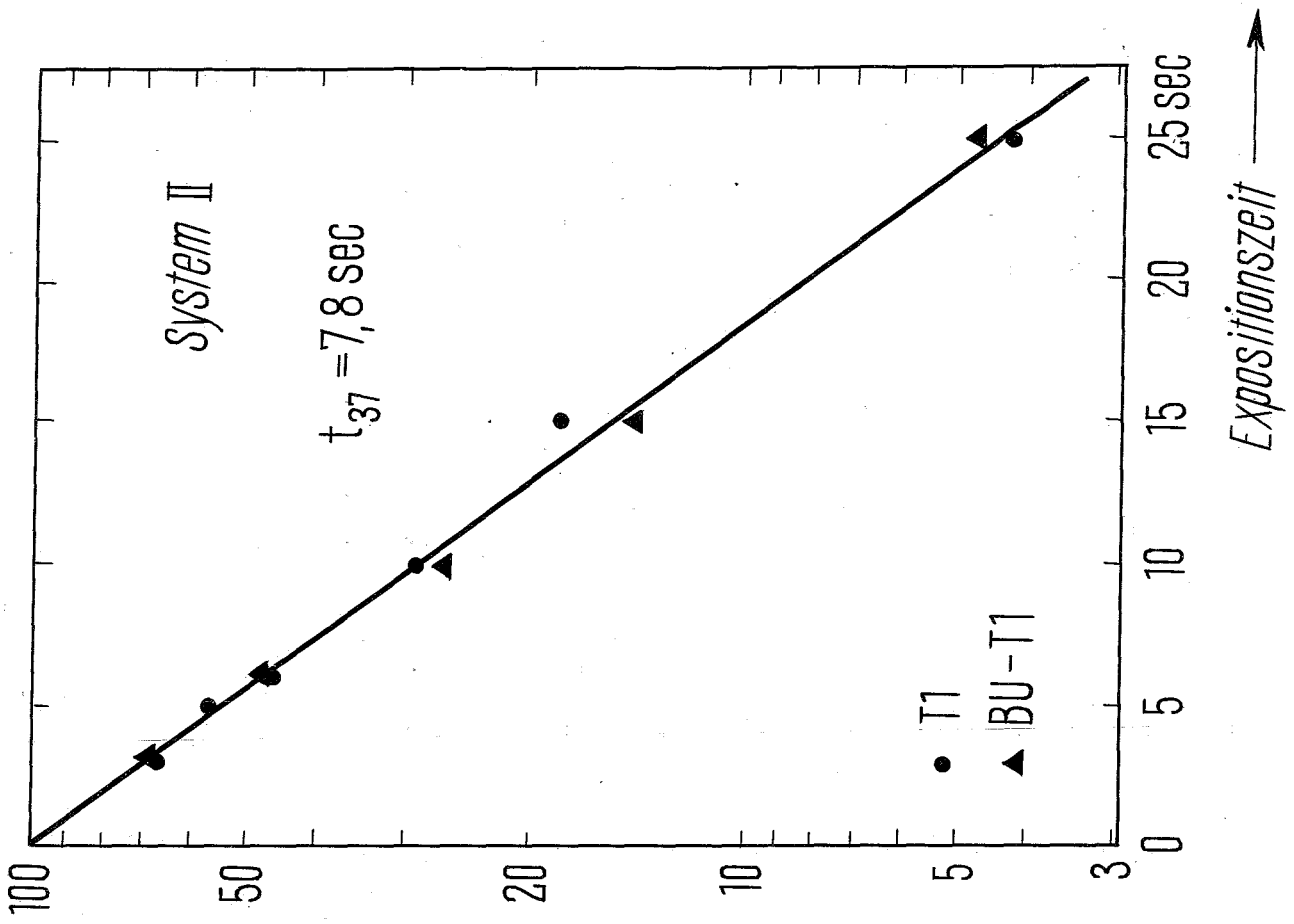
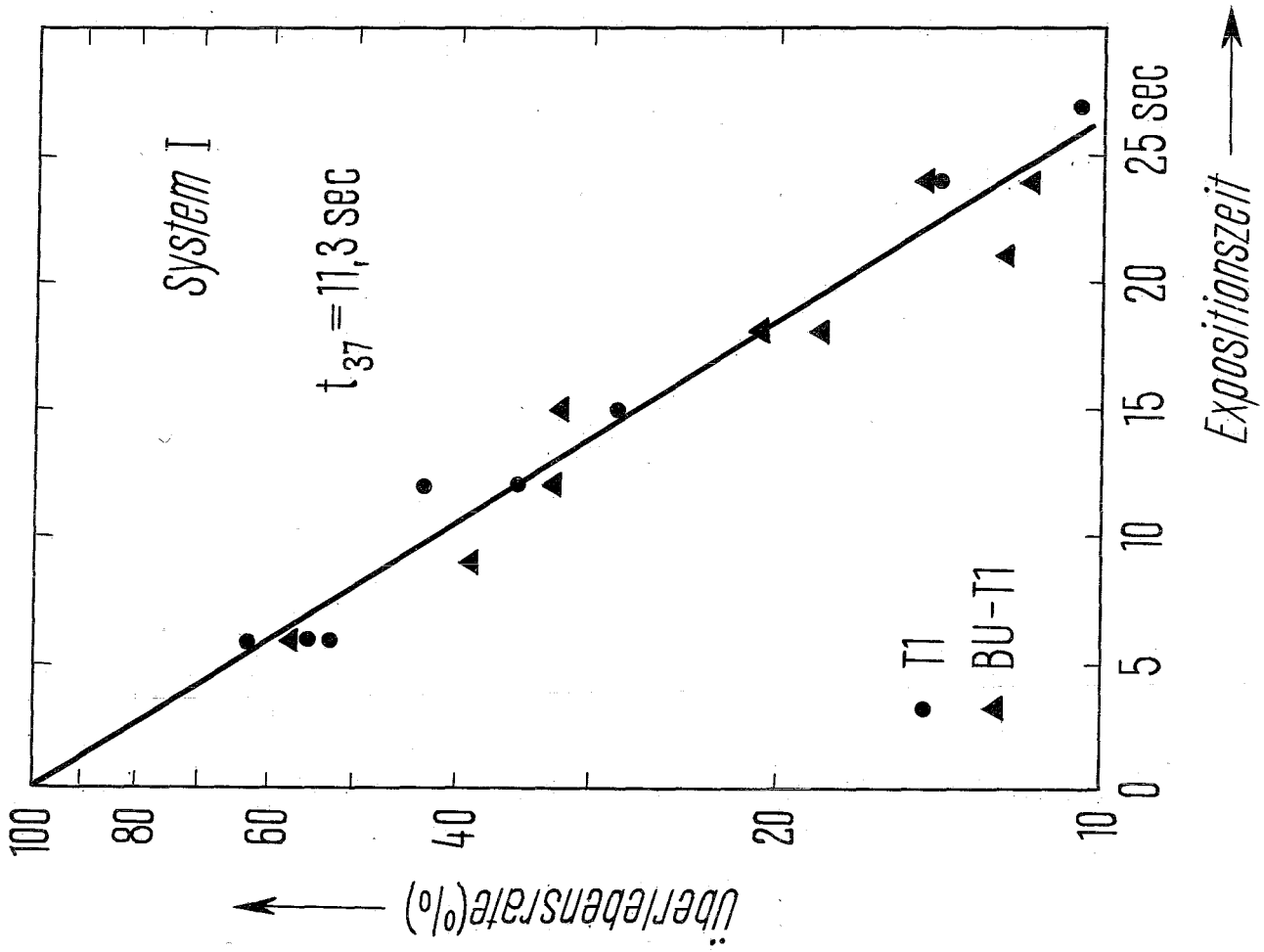


Abb. 21: Inaktivierung von trockener infektiöser ØX174-
DNS durch atomaren Wasserstoff (System I und II)

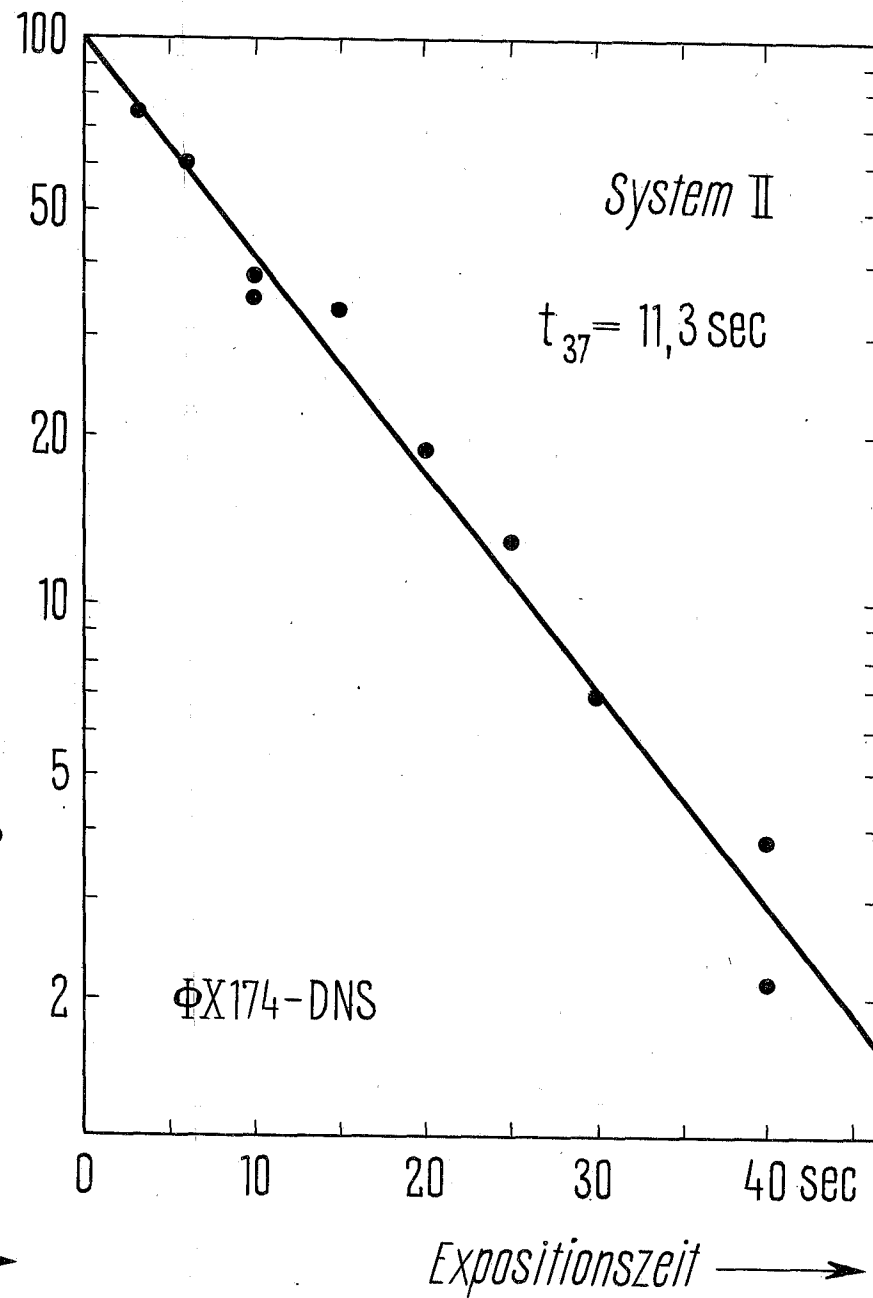
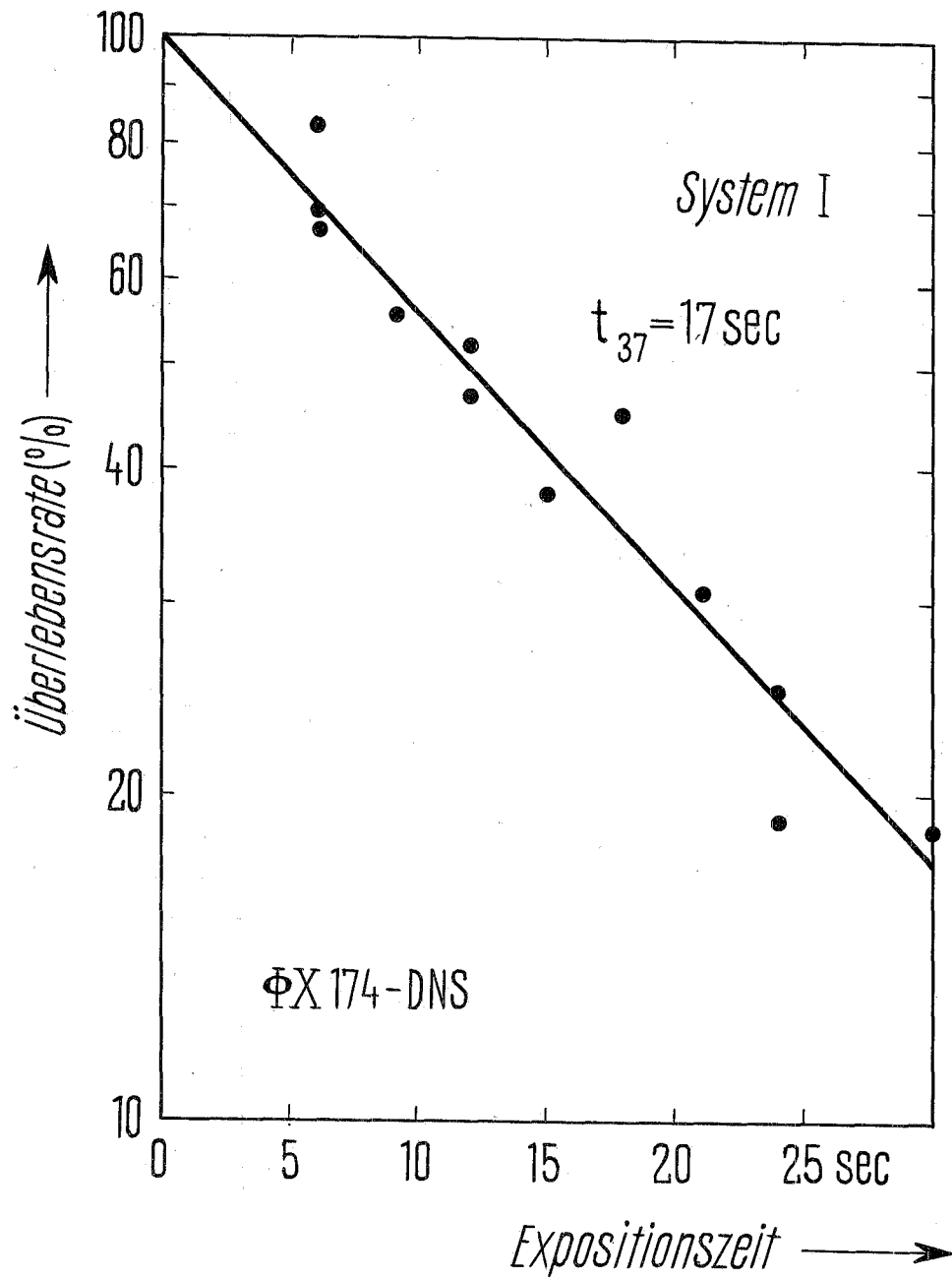


Abb. 22: Inaktivierung von trockener RNase durch atomaren
Wasserstoff (System I und II)

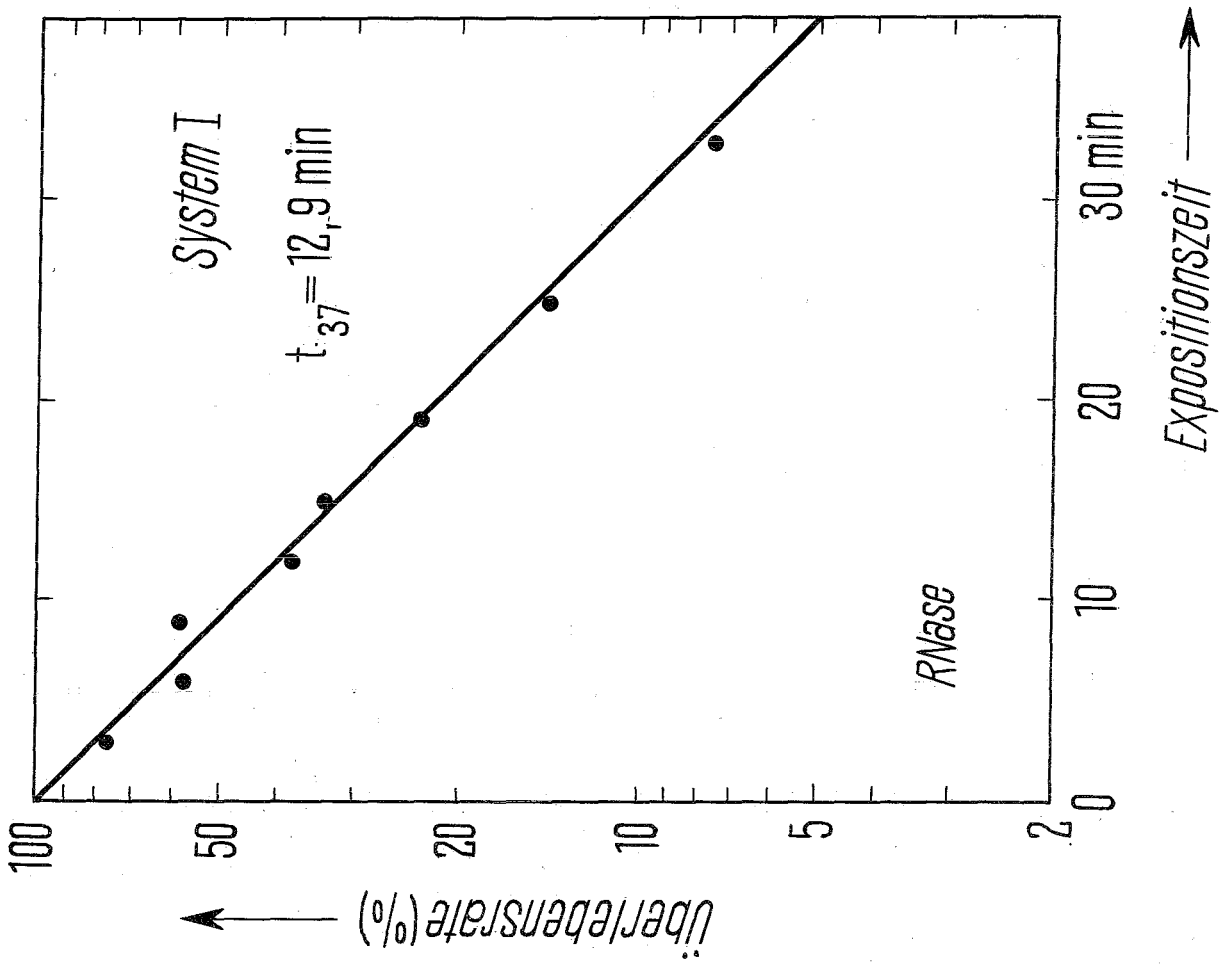
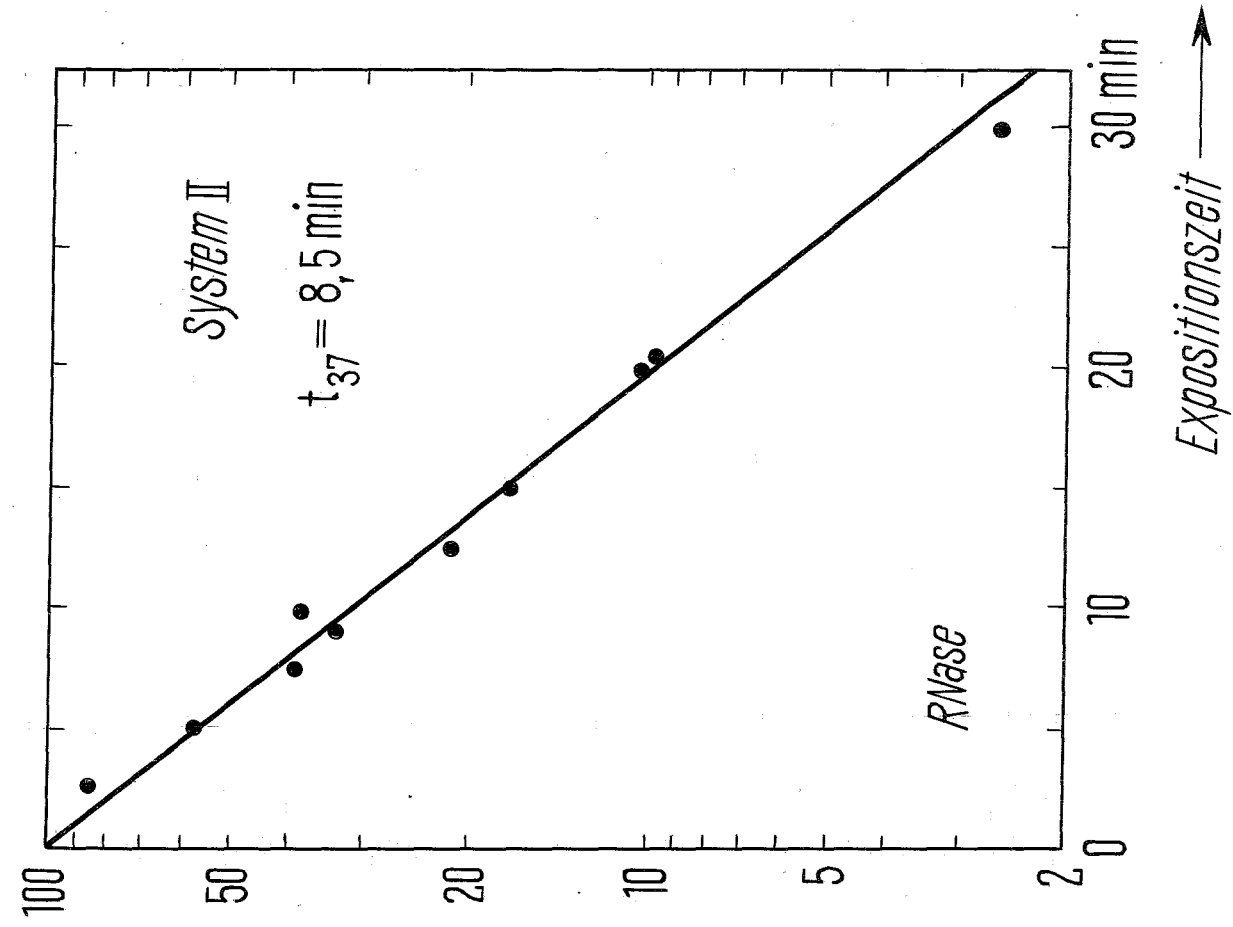


Abb. 23: Inaktivierung von T1-Phagen (●) und BUT1-Phagen (▲) durch atomaren Wasserstoff (System I und II) und durch Bestrahlung mit ^{60}Co - γ -Strahlen und UV-Licht von 2537 Å Wellenlänge

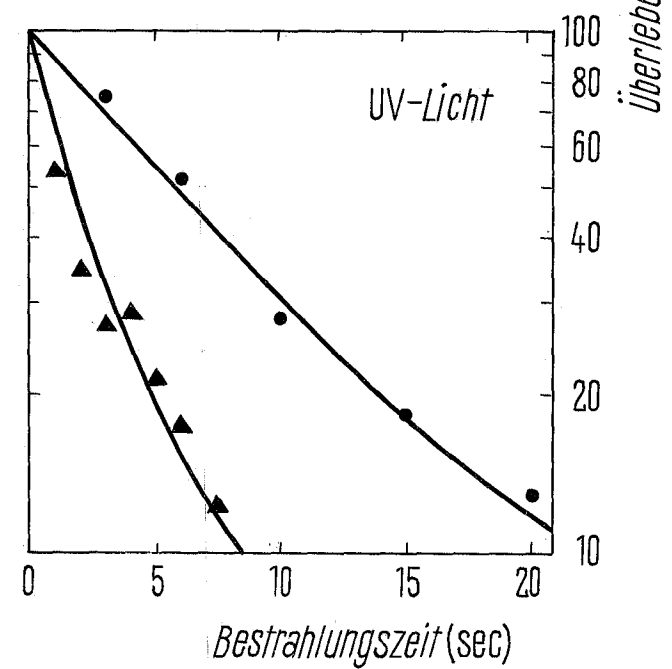
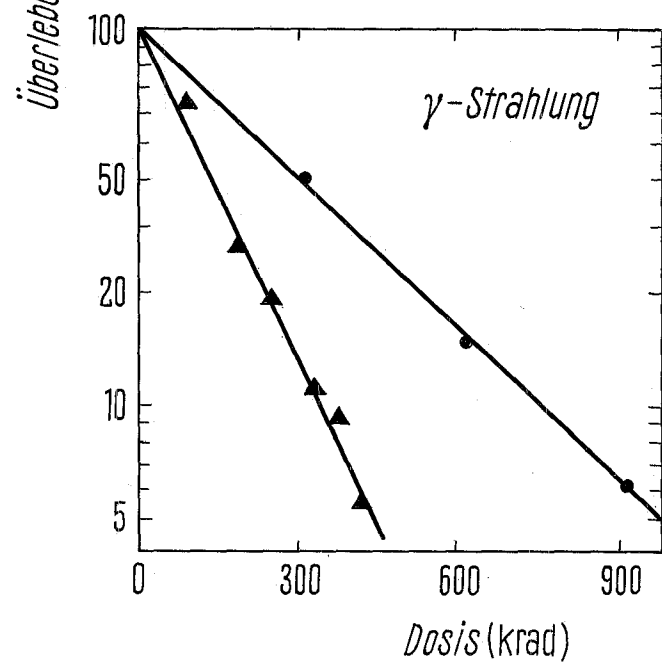
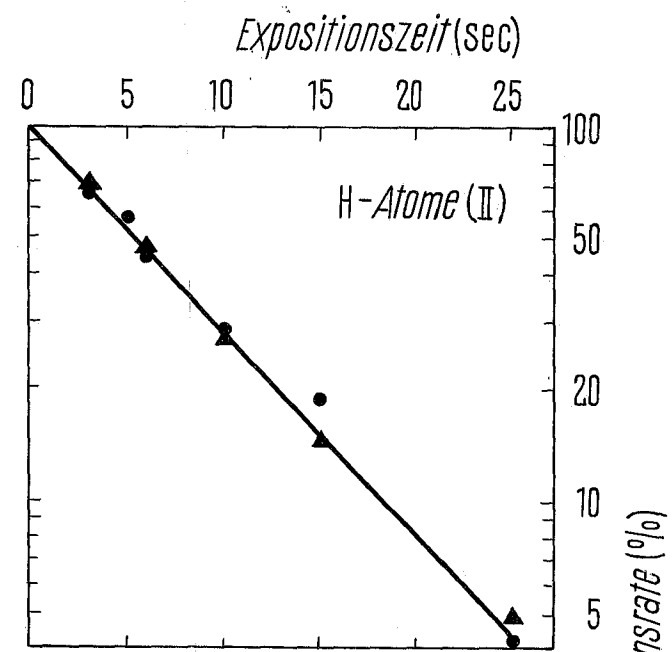
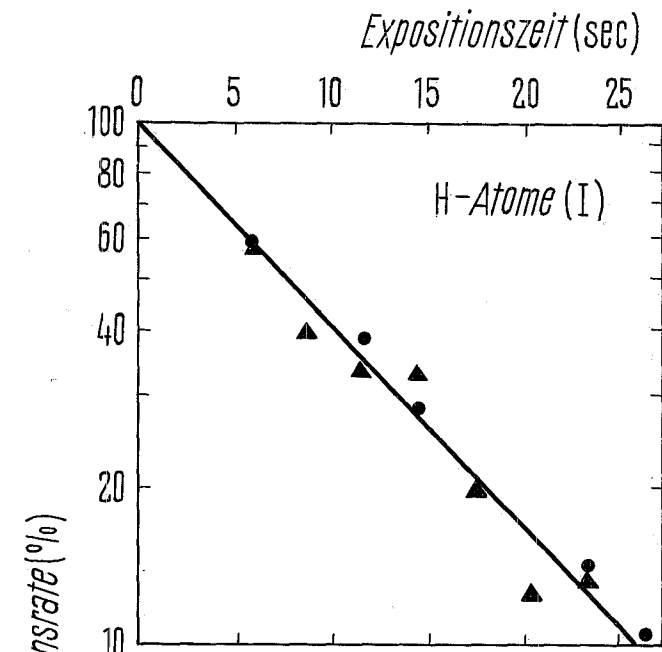


Abb. 24: Dosis-Effekt-Kurven für die Inaktivierung von T1-Phagen, BUT1-Phagen, infektiöser ØX174-DNS und RNase durch atomaren Wasserstoff (System I und II) und durch ^{60}Co - γ -Strahlung (D_{37} für T1-Phagen jeweils auf 1 normiert)

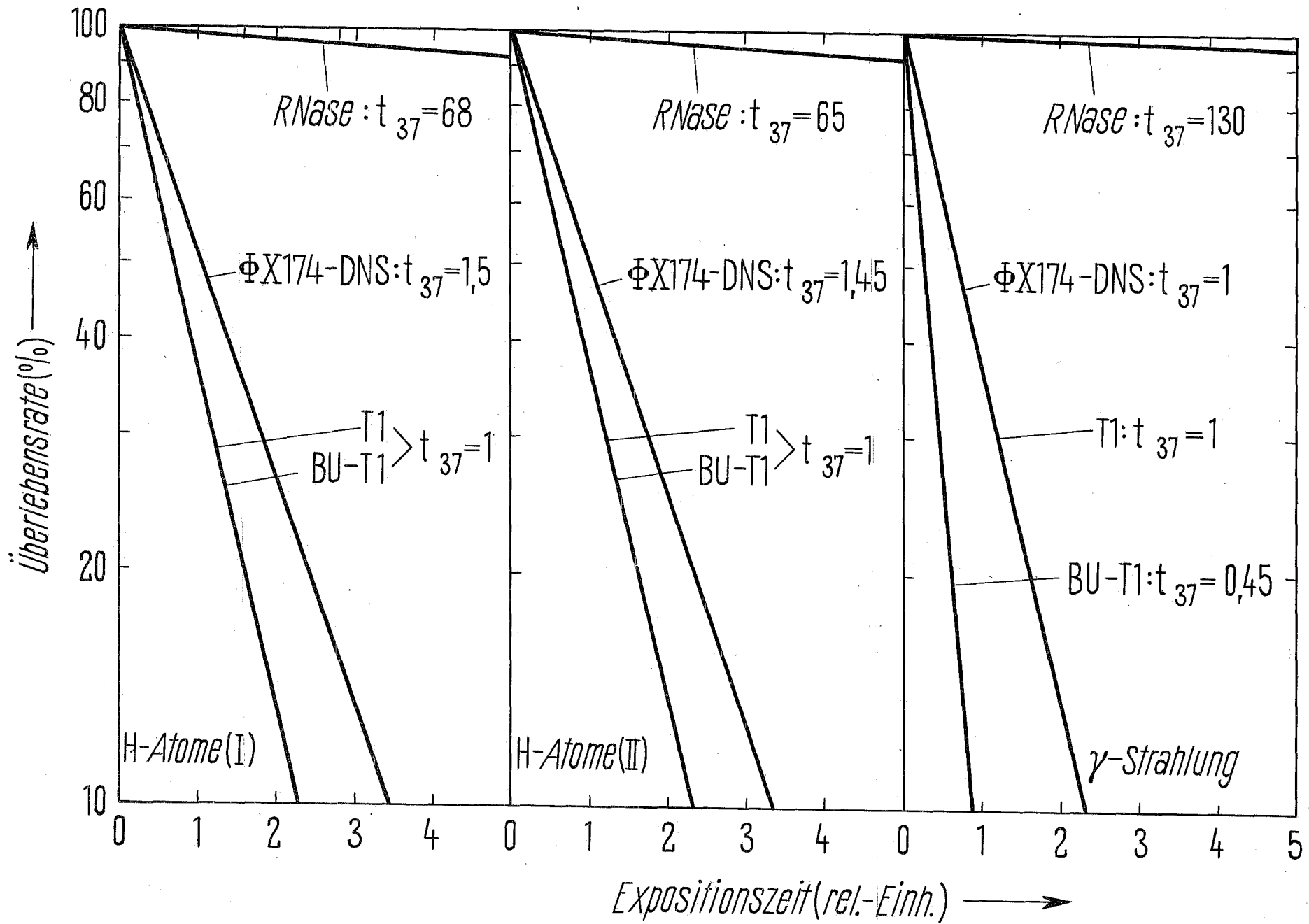


Abb. 25: Reziproke 37 %-Expositionszeit für die Inaktivierung trockener T1-Phagen durch strahleninduzierten atomaren Wasserstoff in Abhängigkeit von der Intensität des primären 2 MeV-Protonen-Strahls (Methode B; Zimmertemperatur)

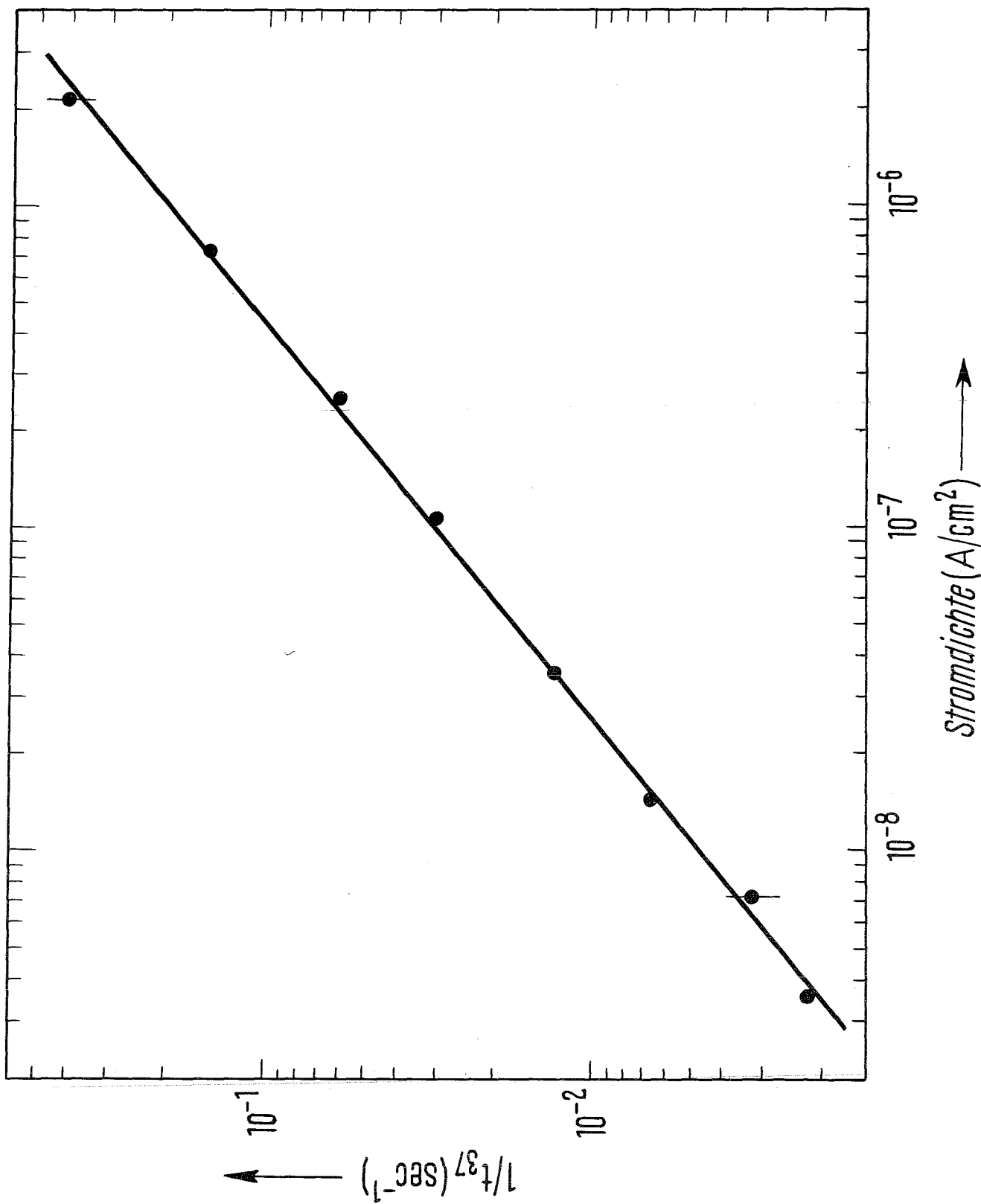


Abb. 26: Reziproke 37 %-Expositionszeit für die Inaktivierung trockener T1-Phagen durch strahleninduzierten atomaren Wasserstoff in Abhängigkeit von Materialart und Dicke der bestrahlten Folie

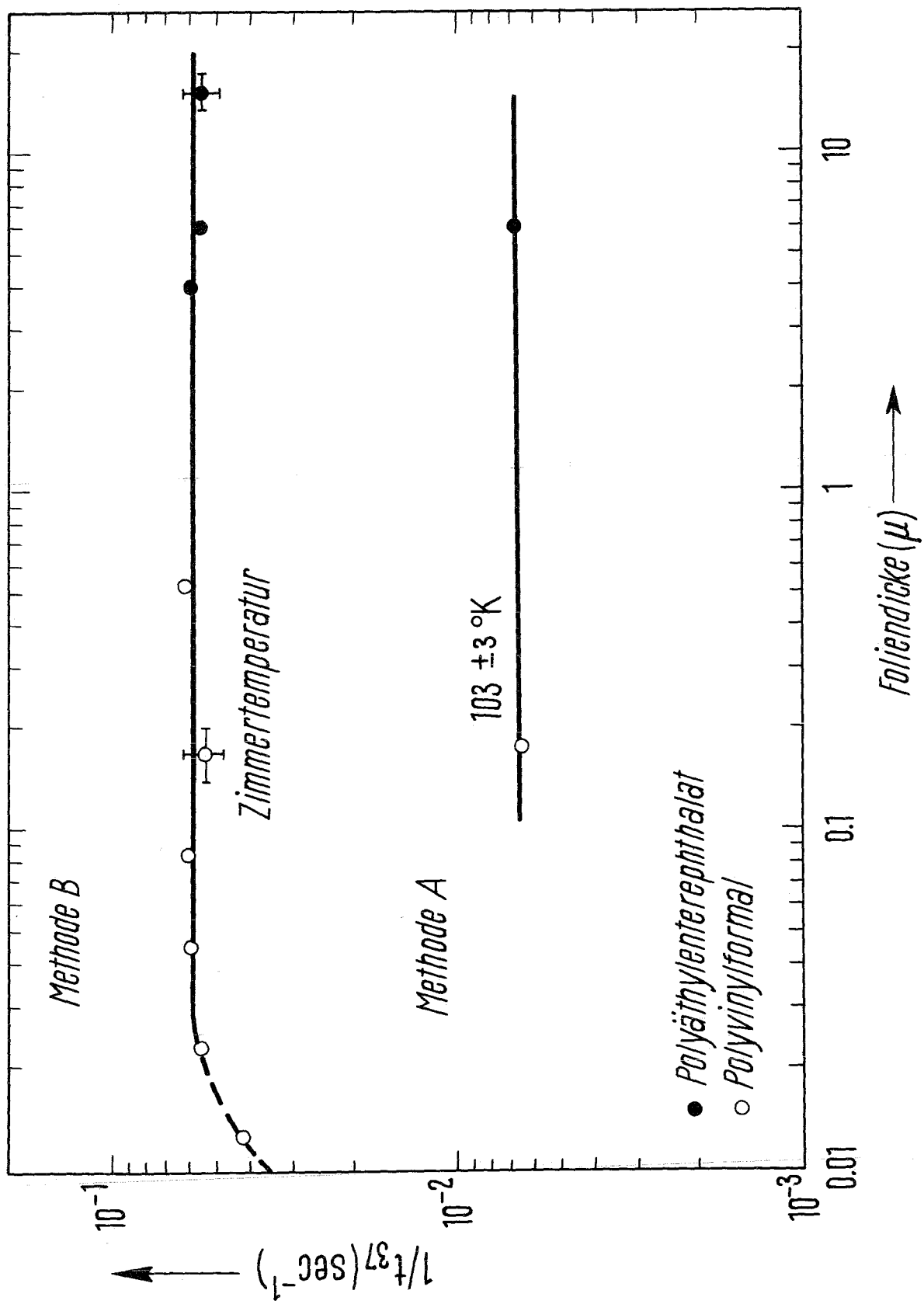


Abb. 27: Inaktivierung trockener T1-Phagen durch strahleninduzierten atomaren Wasserstoff bei verschiedenen Probertemperaturen (Methode A - Folie jeweils auf Zimmertemperatur)

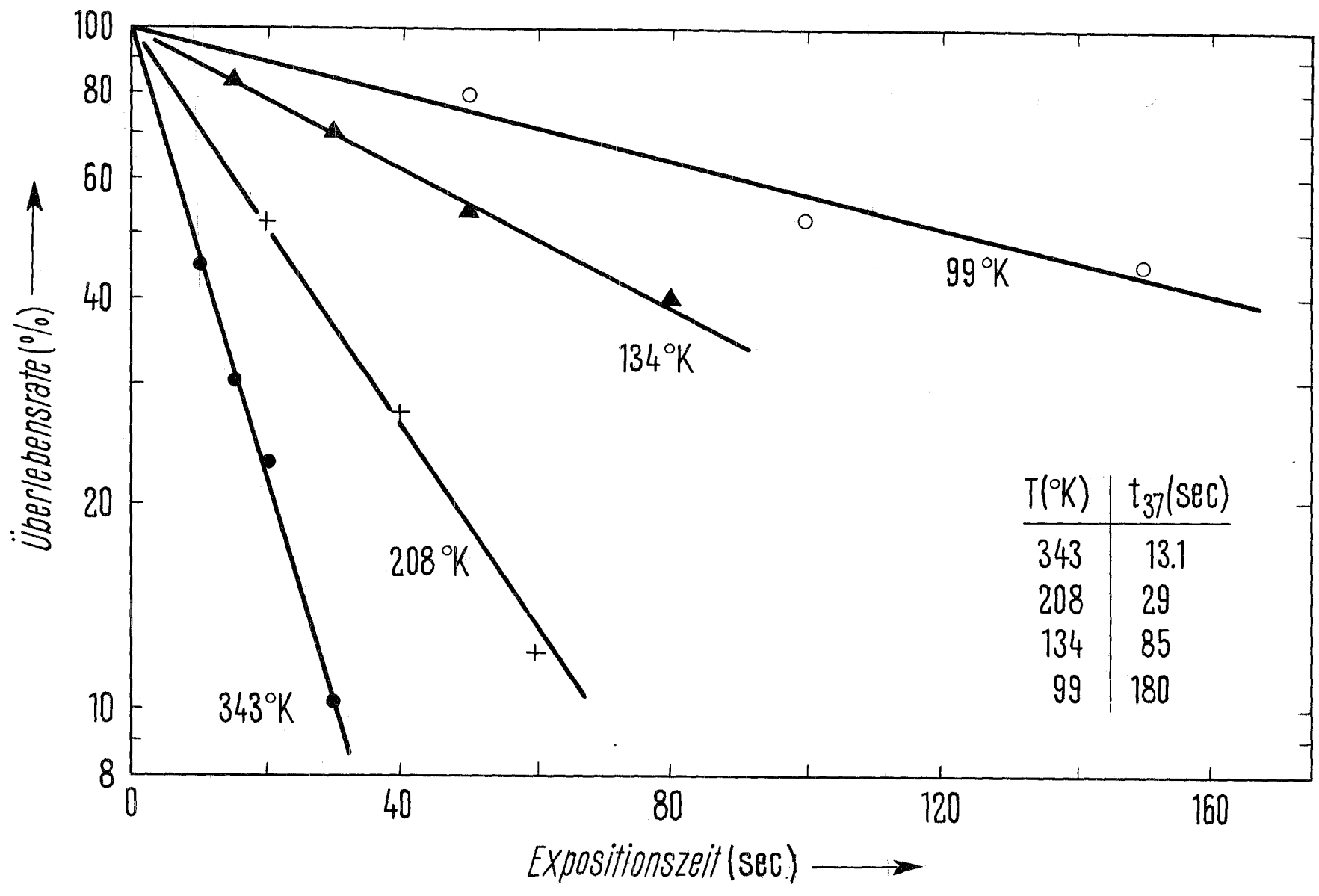


Abb. 28: Inaktivierung trockener T1-Phagen durch strahleninduzierten atomaren Wasserstoff (Methode B - Proben und Folie jeweils auf einheitlicher Temperatur)

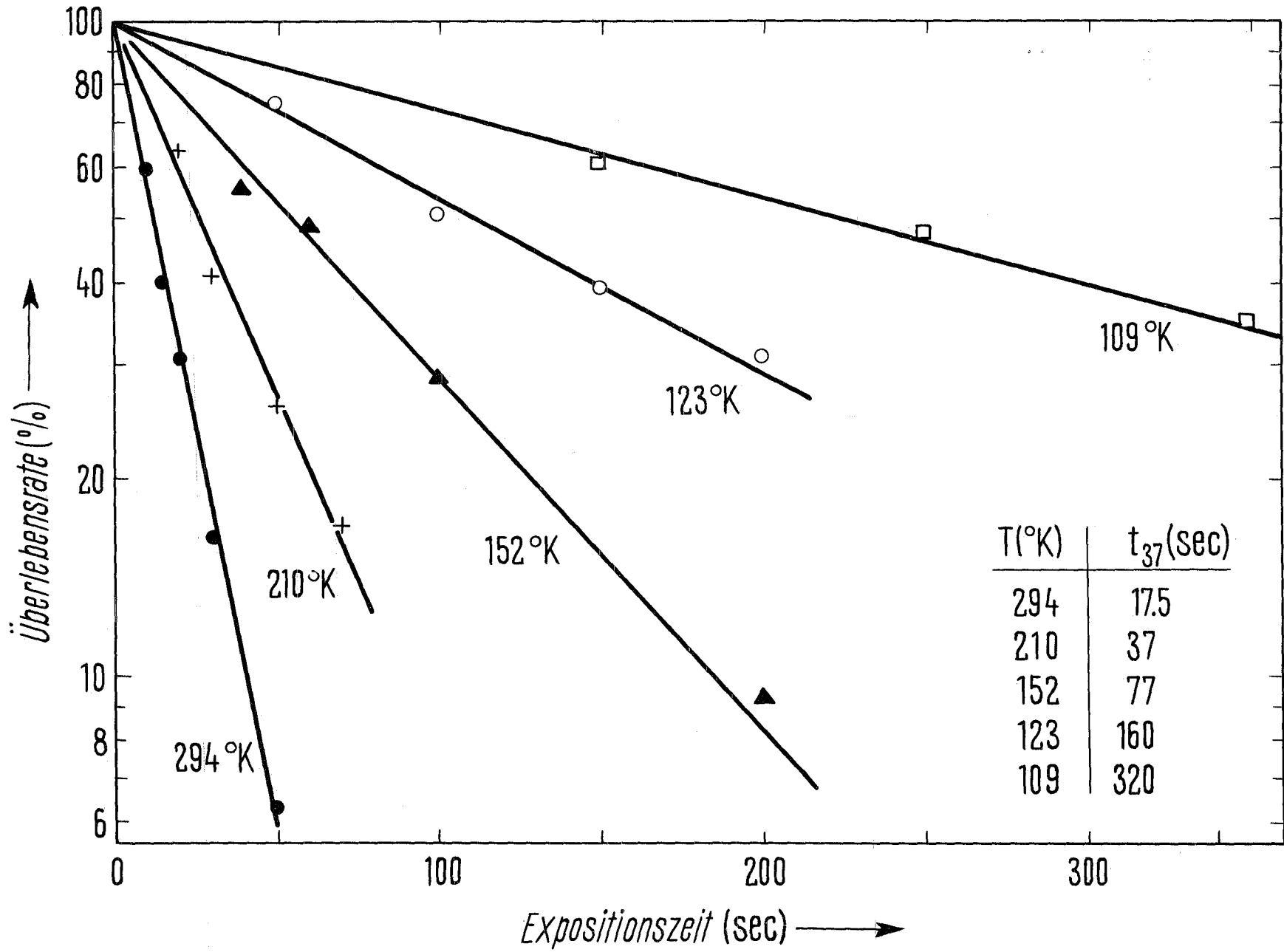


Abb. 29: Reziproke 37 %-Expositionszeit für die Inaktivierung trockener T1-Phagen durch strahleninduzierten atomaren Wasserstoff in Abhängigkeit von der reziproken absoluten Temperatur (Arrhenius-Darstellung). Offene Kreise: 1700 Å Formvar-Folie, Methode B. Volle Kreise: 6 μ Hostaphan-Folie, Methode A

