

KFK-26

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

JULI 1960

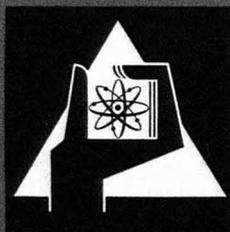
KERNREAKTOR
Bau- und Betriebs-Gesellschaft m. b. H.
11. OKT. 1960 Zentralbücherei

KFK 26

INSTITUT FÜR STRAHLENBIOLOGIE

**CYSTEINSCHUTZ UND SAUERSTOFFEINFLUß BEI
SUSPENDIERTEN T-PHAGEN UNTER RÖNTGENBESTRAHLUNG**

1960
1960
G. HOTZ UND A. MÜLLER



KERNREAKTOR

BAU- UND BETRIEBS-GESELLSCHAFT M. B. H.

KARLSRUHE

Cysteinschutz und Sauerstoffeinfluß bei suspendierten
T-Phagen unter Röntgenbestrahlung

Von G. Hotz und A. Müller

Cysteinschutz und Sauerstoffeinfluß bei suspendierten T-Phagen unter Röntgenbestrahlung

Von G. HOTZ und A. MÜLLER

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe
(Z. Naturforsch. 15 b, 450—452 [1960]; eingegangen am 26. März 1960)

Coliphages of the strains T1, T2, and T7 suspended in broth have been inactivated by X-rays. Under these conditions the phages should be protected from indirect effects. The action of cysteine and removal of oxygen were investigated. With T1, T2, and T7 hyperprotection by cysteine was found, which could not be substituted by anoxia. None of these phages showed a marked decrease in radiation sensitivity on removal of oxygen, whereas hyperprotection was strongly affected by air with T1 and T7 but not with T2. Tentative explanations for the differences between T1 and T2 are given.

Für die Aufklärung des Mechanismus der Strahlenwirkung sind quantitative Versuche an möglichst einfachen biologischen Systemen wegen ihrer Übersichtlichkeit von besonderem Interesse¹. Dabei spielt die Beeinflussung der Strahlenwirkung durch schwefelhaltige Schutzsubstanzen und O₂-Entzug wegen ihres Vorhandenseins bei fast allen untersuchten Organismen eine wichtige Rolle. Schon 1948 beschrieben LATARJET und EPHRATI die Strahlenschutzwirkung von Cystein auf Bakteriophagen² und 1951 wurde von DOERMANN der Begriff des Hyperschutzes geprägt³. Dieser Hyperschutz besteht in einer erhöhten Strahlenresistenz nach Zugabe von schwefelhaltigen Verbindungen wie Cystein, wenn das in wäßriger Suspension untersuchte Material schon durch Zusatz organischer Substanz (z. B. Nährbouillon) gegen indirekte Strahlenwirkung geschützt war⁴. Der gleiche Begriff wird auch auf die Schutzwirkung solcher Substanzen bei getrockneten Phagen⁵ angewandt, bei denen keine indirekten Strahlenwirkungen auftreten können. Zur Erklärung des Wirkungsmechanismus dieser Schutzstoffe wurde von ELDJARN und PIHL⁶ die Hypothese der Bildung gemischter Disulfide vorgeschlagen. Ob sie auch auf den bei Bakteriophagen beobachteten Hyperschutz angewendet werden darf, ist eine noch ungeklärte Frage, zu deren Lösung weitere Untersuchungen beitragen sollen. Der Einfluß des O₂ bei Bestrahlung von Coliphagen wurde schon 1950 von HEWITT und READ⁷ untersucht. Die allgemein als „O₂-Effekt“ bekannte und bei höheren Organismen beobachtete

Verminderung der Strahlenwirkung durch O₂-Entzug wurde bei freien Phagen nicht beobachtet.

Phagen-Stamm	Gasgehalt der Bouillon	ohne Cystein	mit Cystein (0,15-molar)
T1	Stickstoff, gesättigt Luft, gesättigt	170 ± 7,5	510 ± 60
		170 ± 15	300 ± 17
T2	Stickstoff, gesättigt Luft, gesättigt	52 ± 5	108 ± 9,2
		63 ± 2,5	103 ± 4,5
T7	Stickstoff, gesättigt Luft, gesättigt	134 ± 8	—
		161 ± 7	280 ± 18,5

Tab. 1. Die zur Herabsetzung der Plaque-Bildung auf 37% bei Bestrahlung in Bouillon unter verschiedenen Bedingungen erforderlichen Röntgendosen in kr. (Standardfehler für $p=0,05$).

Da sowohl Hyperschutz als auch Einfluß von O₂ bisher nur unabhängig voneinander und bei Phagen lediglich an T2 untersucht wurden, erschien es wünschenswert, diese Probleme kombiniert und auch an anderen Bakteriophagen zu studieren, die sich in mehreren Eigenschaften vom Stamm T2 unterscheiden. Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen stellen einen Teil einer längeren Versuchsreihe dar, die fortgesetzt wird.

Erst nach der Durchführung der hier beschriebenen Experimente wurden die ersten Untersuchungen bekannt, die O₂-Effekt und Hyperschutz bei Bakterio-

¹ N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY u. K. G. ZIMMER, in: Biophysik I. Das Trefferprinzip in der Biologie. pp. 32—76, Hirzel-Verlag, Leipzig 1947.

² R. LATARJET u. E. EPHRATI, C. R. Séances Soc. Biol. 142, 497 [1948].

³ A. H. DOERMANN, zitiert bei J. D. WATSON, J. Bacteriol. 63, 473 [1952].

⁴ H. T. EPSTEIN u. D. SCHARDL, Nature [London] 179, 100 [1957].

⁵ Eigene, bisher unveröffentlichte Experimente.

⁶ L. ELDJARN u. A. PIHL, in: Progress in Radiobiology, pp. 249—259. Oliver and Boyd, London 1956.

⁷ H. B. HEWITT u. J. READ, Brit. J. Radiol. 23, 416 [1950].

phagen gleichzeitig behandeln^{8,9}. Diese wurden an Coliphagen des Stammes T2 durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit werden dagegen Versuche mit T2 sowie den ungeradzahigen Stämmen T1 und T7 behandelt.

Methode

Von den Wildstämmen der Coliphagen T1, T7 und T2 wurden in synthetischem Medium Lysate hergestellt und durch fraktionierte Zentrifugation gereinigt. Konzentrate in Puffer suspendiert und mit einem Titer von etwa 10^{10} plaquebildenden Einheiten pro ml dienten als Vorratssuspension für alle Versuche. Zum Einzelversuch wurde diese 1 : 10 in 4-proz. Difco-Nährbouillon verdünnt und davon 0,6 ml in Plexiglaströgen von 20 mm Durchmesser und 0,5 mm Bodenstärke bestrahlt. In dieser Lösung soll die indirekte Strahlenwirkung durch die organischen Bestandteile der Bouillon ausgeschaltet sein. Nach bestimmten Dosen wurde die plaquebildende Fähigkeit bzw. die „killing ability“ der Phagen getestet. Plattierungen erfolgten bei T1 und T7 auf Farbplatten¹⁰ und bei T2 nach der Agar-layer-Methode¹¹ auf *E. coli* B.

Als Schutzsubstanzen verwendeten wir eine Cysteinbase der Fa. Nordmark, Hamburg, und Cysteinhydrochlorid der Fa. Fluka, Schweiz. Sie wurden etwa 15 Min. vor der Bestrahlung in 0,15-m. Konzentration zur Phagensuspension gegeben.

Anaerobe Bedingungen erhielten wir durch gereinigten Stickstoff (Fa. Linde, Nürnberg; O₂-Gehalt < 0,001%) oder kommerziellen Flaschenstickstoff, der durch Pyrogallol O₂-frei gemacht und in die Bestrahlungskammer eingeblasen wurde.

Als Strahlenquelle diente ein Röntgengerät, das mit 150 kV und 20 mA betrieben wurde und am Ort der Suspension einige 10^3 r/min einer Strahlung mit einer HWS von 6 mm Al abgab.

Die den Phagensuspensionen applizierten Dosen haben wir in der gleichen Geometrie mit dem Fricke-Aktinometer (Oxydation von Fe²⁺ zu Fe³⁺ in 0,8-m. H₂SO₄) gemessen, dessen Resultate mit der Anzeige eines Schlauchkammer-Dosimeters der Fa. PTW, Freiburg, und einer Kondensator-Ionisationskammer eines Baldwin-Farmer-Dosimeters verglichen worden waren, die beide unabhängig voneinander geeicht waren. Die Vergleiche aller drei Methoden ergaben Übereinstimmung innerhalb 5 Prozent.

Ergebnisse

In der Abb. 1 sind die mit T1 erhaltenen Ergebnisse wiedergegeben. In der halblogarithmischen Darstellung sind zwei Geraden eingezeichnet. Die untere stellt die Inaktivierung in Nährbouillon an der Luft und unter Stickstoff dar, die obere erhält man in cysteinhaltiger Bouillon und unter Stickstoff.

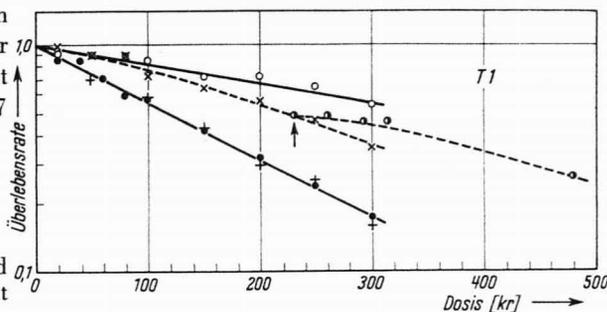


Abb. 1. Überlebensrate von T1-Bakteriophagen in 4-proz. Difco-Nährbouillon nach Röntgenbestrahlung. ● aerobe und + anaerobe Bestrahlung ohne Cystein; ○ anaerobe Bestrahlung mit Cystein; × und ◐ aerobe Bestrahlung mit Cystein. Der Pfeil bezeichnet die Dosis, bei der Cystein erneut zugegeben wurde.

Das Verhältnis der zur gleichen Inaktivierung erforderlichen Dosen bei den beiden anaeroben Bedingungen ist etwa drei. In Abb. 1 sind ferner unterbrochen gezeichnete Kurven enthalten, die keine Geraden sind und bei Anwesenheit von Luft und Cystein während der Bestrahlung entstehen. Als Ursache der auftretenden Krümmung wurde eine mit der Dosis zunehmende Verarmung der Suspension an Cystein vermutet, da sich bei der Bestrahlung ein mit der Dosis stärker werdender Niederschlag – vermutlich aus Cystin bestehend – bildete. Durch eine erneute Zugabe von Cystein nach einer Bestrahlung mit etwa 250 000 r verlief die Dosis-Effekt-Kurve bei weiterer Bestrahlung nicht wie die ohne diese Zugabe erhaltene weiter, sondern wie am Beginn der Bestrahlung, womit die Cysteinverarmung als Ursache der Krümmung bestätigt war. Die anfängliche Steigung ist innerhalb der Fehlergrenzen gleich der unter anaeroben Bedingungen gefundenen, während sie sich mit zunehmender Dosis der unter aeroben Bedingungen und ohne Cystein aufgenommenen Kurvenneigung nähert.

Die in Abb. 2 zusammengefaßten Daten an T2 lassen sich alle durch Geraden beschreiben. Die beiden unteren wurden in Bouillon und ohne Cystein-zusatz, die obere bei Anwesenheit von Cystein erhalten. Die letztere wurde nur aus den unter aeroben Bedingungen gemessenen Werten erhalten. Die ebenfalls eingezeichneten unter anaeroben und sonst gleichen Bedingungen erhaltenen Punkte lassen sich durch eine nicht gezeichnete Gerade verbinden, deren

⁸ H. MARCOVICH, *Radiation Res.* **9**, 149 [1958].

⁹ P. HOWARD-FLANDERS u. P. JOCKEY, *Virology*, im Druck.

¹⁰ C. BRESCH, *Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I*, Orig. **159**, 47 [1952].

Steigung um 5% von der der dargestellten abweicht. Ohne Cysteinzusatz beträgt die Neigungsdifferenz der Geraden 17 Prozent. Der Dosis-Reduktionsfaktor bei Anwesenheit von Luft ist 1,6 bei Ausschluß von O₂ dagegen 2,1. Hinsichtlich des Hyperschutzes folgt aus den Experimenten mit T2 in Übereinstimmung mit anderen Autoren, daß erstens ein Cysteinschutz vorhanden ist, der sich nicht durch Herbeiführung anaerober Bedingungen ersetzen läßt, und

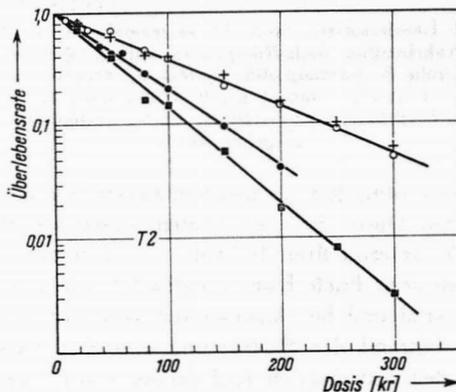


Abb. 2. Überlebensrate von T2-Bakteriophagen in 4-proz. Difco-Nährbouillon nach Röntgenbestrahlung. ● aerobe und ■ anaerobe Bestrahlung ohne Cystein; ○ aerobe und + anaerobe Bestrahlung mit Cystein.

daß zweitens die Dosiseffektcurve eine Gerade ist, also der Schutzfaktor sich nicht mit der Dosis ändert. Der Unterschied des Krümmungscharakters der mit Luft und Cystein bei T1 und T7 gegenüber T2 gefundenen Ergebnisse läßt sich durch verschiedene Konzentrations-Abhängigkeit der Schutzeffekte erklären: Während bei T1 und T7 eine verhältnismäßig große Konzentration von Cystein vorhanden sein muß, um den Schutzeffekt zu erzielen, genügen bei T2 weit kleinere Konzentrationen, die auch bei starker Cysteinverarmung der Suspension noch ausreichenden Schutz geben.

Da bisher in der Literatur nur Untersuchungen über den Schutz der plaquebildenden Aktivität durch SH-Körper beschrieben sind, erschien es uns zweckmäßig, auch andere der zahlreichen biologischen Phagenaktivitäten auf Schutzmöglichkeiten zu prüfen. Wir untersuchten die Dosisabhängigkeit der „killing ability“ bei T-Phagen. Strahleninaktivierte Phagen, deren Fähigkeit zur Plaquebildung zerstört ist, können trotzdem noch an ihre Wirtsbakterien adsorbieren und diese abtöten. Diese Fähigkeit ist um einen Faktor von etwa 3 strahlenresistenter als die der Plaquebildung^{12,13}. Auch bei diesem Bakte-

riekilling der Phagen des Stammes T2 konnten wir einen Cysteinschutzeffekt nachweisen, der bei aeroben Versuchsbedingungen bei 2,3 lag.

Wie bei früheren Untersuchungen, die sich allerdings auf T2 beschränkten, wurde im Gegensatz zu einer großen Zahl anderer Organismen¹⁴ keine Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit durch O₂ beobachtet. Das gleiche Ergebnis wurde bei T1 und T7 sowie vorläufigen Untersuchungen an einer Reihe anderer Phagenstämme (T3, T4, T5, T6 sowie P22

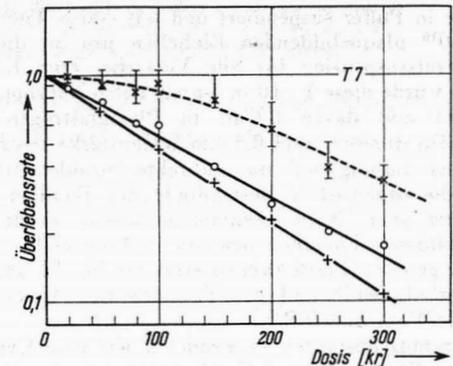


Abb. 3. Überlebensrate von T7-Bakteriophagen in 4-proz. Difco-Nährbouillon nach Röntgenbestrahlung. ○ aerobe und + anaerobe Bestrahlung ohne Cystein; ● aerobe Bestrahlung mit Cystein. Die Marken an der mit Cystein aufgenommenen Kurve geben den jeweils größten bzw. niedrigsten Meßpunkt an.

und Φ X-174) erhalten⁵. Jedoch wurde inzwischen von HOWARD-FLANDERS und JOCKEY an Phagen-Bakterienkomplexen, d. h. an solcher T2-Phagen-DNS, die sich nach der Injektion bereits innerhalb des Wirtsbakteriums befindet, der O₂-Effekt beobachtet⁹.

Schließlich seien noch in Abb. 3 einige Versuche mit T7 dargestellt, die den bei T1 und T2 gefundenen Ergebnissen entsprechen. In Tab. 1 sind zusammenfassend die sorgfältig gemessenen 37%-Dosen angegeben. Der angegebene Fehler ist lediglich der statistisch berechnete.

Für zahlreiche Diskussionen und Hinweise danken wir Herrn Professor K. G. ZIMMER und Herrn Professor A. CATSCH, Herrn Dipl. Phys. W. KÖHNLEIN sei für Dosismessungen und den Damen E. KNORR und K. HOLSTE für technische Assistenz sowie Herrn Uhrmachermeister TH. MOHR für sehr präzise Herstellung von Apparaten gedankt.

¹¹ M. H. ADAMS, in: *Methods in Med. Res.* Vol. 2, pp. 1–73, Year Book Publishers, Chicago 1950.

¹² J. D. WATSON, *J. Bacteriol.* **60**, 697 [1950].

¹³ D. J. FLUKE u. E. C. POLLARD, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **59**, 484 [1955].

¹⁴ P. HOWARD-FLANDERS, *Advances in Biological and Medical Physics* **6**, 554 [1958].