

KFK-94

# KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

NOVEMBER 1961/JANUAR 1962

KFK 94

INSTITUT FÜR STRAHLENBIOLOGIE

CYSTEAMIN-SAUERSTOFF-ANTAGONISMUS BEI DER STRAHLENWIRKUNG  
AUF T2-BAKTERIOPHAGEN

G. HOTZ

DER EINFLUSS VON CYSTEIN- UND CYSTEAMIN-KONZENTRATION AUF DIE  
INAKTIVIERUNG RÖNTGENBESTRAHLTER T-PHAGEN

G. HOTZ, A. MÜLLER

DIE KOMBINIERTE SCHUTZWIRKUNG VON CYSTEAMIN UND GLYCERIN  
BEI RÖNTGENBESTRAHLTEN T1-PHAGEN

G. HOTZ

KERNREAKTOR  
Bau- und Betriebs-Gesellschaft m. b. H.  
Verwaltung der Zentralbücherei

1. Aug 1962



KERNREAKTOR

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

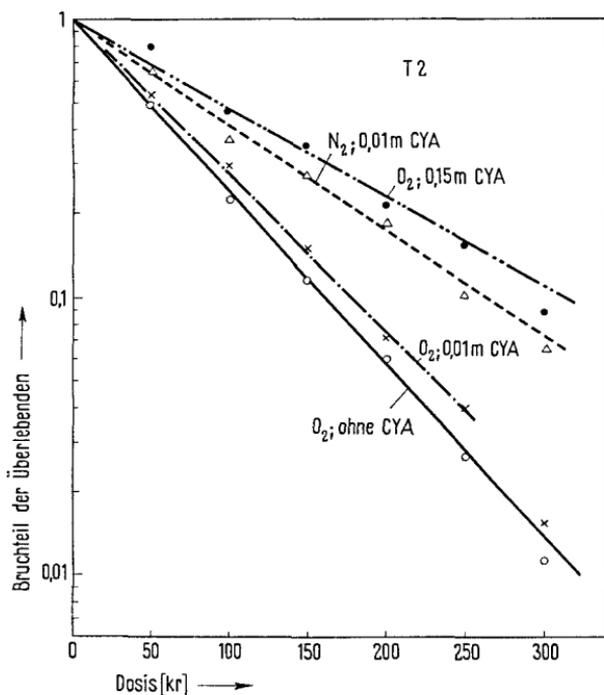
KARLSRUHE

## Cysteamin-Sauerstoff-Antagonismus bei der Strahlenwirkung auf T2-Bakteriophagen

Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen über die Schutzwirkung von Cystein<sup>1-4</sup> oder Cysteamin<sup>4-6</sup> gegenüber sogenannten direkten Röntgenstrahleneffekten auf suspendierte Bakteriophagen durchgeführt wurden, war bisher keine einheitliche Deutung der Resultate erkennbar. So fanden MARCOVICH<sup>5</sup> und HOWARD-FLANDERS<sup>6</sup> beim Phagen T2 nach Cysteaminzugabe *keinen* Schutzeffekt, wenn Sauerstoff während der Bestrahlung anwesend war. Dies schien im Widerspruch zu den Befunden von HOTZ und MÜLLER<sup>4</sup> zu stehen, die sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen den gleichen Schutzfaktor beobachten konnten. Die hier mitgeteilten Ergebnisse ermöglichen es nun, eine einfache Erklärung für diese nicht ohne weiteres verständlichen Unterschiede zu geben.

Die in früher<sup>7</sup> beschriebener Weise gereinigten und titrierten Konzentrate des Coliphagen T2 (wild) enthielten zwischen  $10^{10}$  und  $10^{12}$  plaquebildende Einheiten pro ml Phagenpuffer. Diese Stammsuspensionen wurden zum Versuch 1:10 in Difco Nährbouillon (4%) ohne bzw. mit einem Zusatz von Cysteamin (Fa. Fluka, Schweiz) bei pH 7 verdünnt. Bei Bestrahlung in schutzstoffhaltigen Suspensionen liessen wir diese vor Bestrahlungsbeginn 10 min bei Zimmertemperatur auf die Phagen einwirken. Zur Bestrahlung wurden 0,6 ml der Phagensuspension in Plexiglasschälchen von 20 mm Durchmesser abgefüllt. Der mehrfach beschriebene Einfluss des Sauerstoffs auf die Strahlenempfindlichkeit cysteamingeschützter T2-Phagen<sup>4-6</sup> machte es erforderlich, unter kontrollierten Gasbedingungen zu bestrahlen. Mittels eines kleinen Gebläses wurde die Suspension vor und während der Bestrahlung durchmischt und auf diese Weise gleichzeitig mit Sauerstoff oder gereinigtem Stickstoff äquilibriert. Eine Röntgenröhre mit Berylliumfenster von 1,5 mm Stärke gab bei 100 kV<sub>s</sub> und 25 mA am Ort der Suspension eine Dosisleistung von 500 kr/min bei einer effektiven Wellenlänge von 1,4 Å. Die in der Phagensuspension absorbierte Strahlenenergie wurde in der gleichen Geometrie mit dem Fricke-Aktinometer ( $\text{Fe}^{++} \rightarrow \text{Fe}^{+++}$ ) gemessen. Als Kriterium des Strahleneffektes wurde die Plaquebildungsfähigkeit gewählt.

Die Figur veranschaulicht den Einfluss von Sauerstoff während der Röntgenbestrahlung auf die Neigung der Dosis-Effektkurve bei in Cysteaminbouillon suspendierten Phagen T2. Alle experimentellen Daten lassen sich im halblogarithmischen Raster durch Gerade darstellen. Die Neigungsdifferenz der Geraden für Bestrahlung *ohne* Cysteamin und mit 0,01 m Cysteamin (beide Versuche unter  $O_2$ ) liegt innerhalb der Fehlergrenzen, das heisst, bei Anwesenheit von Sauerstoff bewirkt 0,01 m Cysteamin keinen Schutz. Unter Stickstoff (das ist bei Ausschluss von Sauerstoff) liefert Zusatz von m/100 Cysteamin zur Bouillon eine Schutzwirkung entsprechend einem Dosisreduktionsfaktor von 1,6<sup>8</sup>. Praktisch der gleiche Schutzeffekt ergibt sich auch unter Sauerstoff nach Erhöhen der Cysteaminkonzentration auf 0,15 m; die Neigungen der entsprechenden Kurven unterscheiden sich um weniger als 10%.



Überlebensrate von T2-Bakteriophagen in 4% Difco-Nährbouillon nach Röntgenbestrahlung unter verschiedenen Bedingungen.

Wendet man den von HOWARD-FLANDERS für Bakteriophagen vorgeschlagenen Konkurrenzmechanismus zwischen Sauerstoff und Wasserstoff-Donatoren in Form der Schutzmoleküle um strahleninduzierte freie Radikale in den Phagen auf unsere Ergebnisse an, so ergeben sich zwanglos folgende Schlüsse: Bei Zugabe von Cysteamin zur Bestrahlungsbouillon in Konzentrationen von  $\leq m/100$  gelingt es den Wasserstoff-Donatoren nicht, in Konkurrenz mit den Sauerstoffmolekülen zu treten, die in einer  $O_2$ -gesättigten Bouillon überwiegen. Wird dagegen die Cysteaminkonzentration um etwa eine Größenordnung erhöht, so ist das Gleichgewicht zugunsten der Wasserstoff-Donatoren verschoben, und es kommt zur Reparatur der etwa als strahleninduzierte Carbonium-Radikale angenommenen latenten Strahlenschäden. Abgesehen von der Aufklärung der oben erwähnten scheinbaren Widersprüche, die beim Vergleich von Versuchsergebnissen aus verschiedenen Arbeitskreisen auftraten, scheinen die hier mitgeteilten Ergebnisse geeignet zu sein, das Verständnis für den Schutzmechanismus sulfhydrylhaltiger Verbindungen bei suspensierten röntgenbestrahlten Bakteriophagen zu vertiefen.

*Summary.* T2 phage suspended in broth and irradiated in the presence of cysteamine in high concentration is protected against the action of X-rays equally well under oxygen as under nitrogen. Low concentrations of cysteamine, however, give protection under nitrogen only. These results resolve apparant contradictions in earlier work and lend support to the mechanism of reaction as proposed by HOWARD-FLANDERS.

G. HOTZ

*Institut für Strahlenbiologie am Kernforschungszentrum Karlsruhe (Deutschland), 10. Juli 1961.*

- <sup>1</sup> A. H. DOERMANN, zitiert bei J. D. WATSON, *J. Bacteriol.* **63**, 473 (1952).
- <sup>2</sup> H. T. EPSTEIN und D. SCHARDL, *Nature* **179**, 100 (1957).
- <sup>3</sup> G. HOTZ und A. MÜLLER, *Z. Naturforsch.* **15b**, 450 (1960).
- <sup>4</sup> G. HOTZ und A. MÜLLER, *Z. Naturforsch.* **16b**, 282 (1961).
- <sup>5</sup> H. MARCOVICH, *Radiation Res.* **9**, 149 (1958).
- <sup>6</sup> P. HOWARD-FLANDERS, *Nature* **186**, 485 (1960).
- <sup>7</sup> A. MÜLLER, G. HOTZ und K. G. ZIMMER, *Z. Naturforsch.*, im Druck.
- <sup>8</sup> G. HOTZ und A. MÜLLER, *Z. Naturforsch.*, im Druck.

# Der Einfluß von Cystein- und Cysteamin-Konzentration auf die Inaktivierung röntgenbestrahlter T-Phagen

Von <sup>[Lehant]</sup> G. Horz und <sup>[Edelt]</sup> A. MÜLLER

# Der Einfluß von Cystein- und Cysteamin-Konzentration auf die Inaktivierung röntgenbestrahlter T-Phagen

Von G. HOTZ und A. MÜLLER

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe  
(Z. Naturforschg. 17 b, 34—37 [1962]; eingegangen am 9. August 1961)

The plaque forming ability of T1 and T2 bacteriophage has been inactivated by X rays. The protective action of different concentrations of the sulphhydryl compounds cysteine and cysteamine in broth, buffer and water was investigated.

T1 and T2 showed marked differences in the amount of protective cysteine molecules necessary for the same dose reduction factor. Also the formation of phage-sulphhydryl complexes was observed in T2 but not in T1.

In protein free solutions the inactivation of T1 can be varied with cysteamine concentration from highest sensitivity obtained in water to maximum resistance which is not changed by the addition of broth.

Eine Schutzwirkung sulfhydrylhaltiger Verbindungen bei Röntgenbestrahlung von Bakteriophagen wurde zum ersten Male von Lатарjet und Ephrati beschrieben<sup>1</sup>. Das Studium des Schutzmechanismus

bei Phagen könnte, obwohl selbst interessant, vielleicht auch zur Untersuchung der Wirkung der gleichen Substanzen bei höher organisierten biologischen Objekten beitragen, da sowohl die quantitative als auch systematische Analyse der Ergebnisse dadurch erleichtert wird, daß Phagen keine Stoff-

<sup>1</sup> R. Lатарjet u. E. Ephrati, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 142, 497 [1948].

wechselsektivität zeigen und im wesentlichen aus Eiweiß und Nucleinsäure bestehen. Trotzdem gelang es bisher noch nicht, auch bei diesen einfachen Organismen, ein allgemein gültiges Bild der Vorgänge zu gewinnen.

In einer früheren Veröffentlichung haben wir die kombinierte Wirkung von Cystein und Sauerstoff während der Bestrahlung von T1, T2 und T7 beschrieben<sup>2</sup>. Dabei wurde ein Unterschied in der Dosisabhängigkeit bei der Inaktivierung von T1 bzw. T7 und T2 festgestellt. Diese Beobachtung wurde mit einer unterschiedlichen Abhängigkeit des Schutzes der einzelnen Phagenstämme von der Cystein-Konzentration erklärt. In der vorliegenden Arbeit sollen die Ergebnisse weiterer Untersuchungen in dieser Richtung dargestellt werden, durch die die frühere Annahme experimentell gestützt wird. Weiterhin wird gezeigt, daß der volle durch Cysteamin erzielbare Schutzeffekt von der Anwesenheit unspezifischer Schutzstoffe — wie z. B. Nährbouillon — unabhängig auftritt.

### Material und Methodik

Die in früher beschriebener Weise<sup>3</sup> gereinigten und titrierten Konzentrate der Coliphagen T1 (wild) und T2 (wild) enthielten zwischen  $10^{10}$  und  $10^{11}$  plaquebildende Einheiten pro ml Phagenpuffer. Diese Stammsuspensionen wurden zum Versuch 1 : 10 in Difco Nährbouillon (4%) pH 7, ohne bzw. mit Zusatz von Cysteinbase (Fa. Nordmark, Hamburg) oder Cysteamin (Fa. Fluka, Schweiz) verdünnt. Bei einigen Versuchen wurde anstatt Bouillon entionisiertes und bidest. Wasser bzw. Sørensen-Puffer zur Phagensuspension verwendet. Bei Bestrahlung in schutzstoffhaltigen Suspensionen ließen wir diese vor Bestrahlungsbeginn 10 min bei Zimmertemperatur auf die Phagen einwirken. Zur Bestrahlung wurden 0,6 ml der Phagensuspension in Plexiglas-Schälchen von 20 mm Durchmesser abgefüllt. Mittels eines kleinen Gebläses wurde die Suspension vor und während der Bestrahlung gemischt und mit gereinigtem Stickstoff oder Sauerstoff äquilibriert. Eine Röntgenröhre mit Berylliumfenster von 1,5 mm Stärke gab bei 100 kV<sub>s</sub> und 25 mA am Ort der Suspension eine Dosisleistung von 500 kr/min bei einer effektiven Wellenlänge von 1,4 Å-Einheiten. Die in der Phagensuspension absorbierte Strahlenenergie wurde in der gleichen Geometrie mit dem Fricke-Aktinometer ( $\text{Fe}^{2\oplus} \rightarrow \text{Fe}^{3\oplus}$ ) gemessen. Als Kriterium des Strahleneffektes wurde bei allen bei den Ergebnissen beschriebenen Versuchen die Plaquebildungsfähigkeit gewählt.

<sup>2</sup> G. Hotz u.A. MÜLLER, Z. Naturforschg. 15b, 450 [1960].

### Ergebnisse und Diskussion

Im Abb. 1 wurde der bei Anwesenheit von Cystein unter der Bestrahlung erhaltene Schutzfaktor gegen die Cystein-Konzentration aufgetragen. Der Schutzfaktor ist hier als Quotient aus der 37%-Dosis cysteingeschützter Phagen und der 37%-Dosis von bouillonsuspendierten Phagen ohne Zusatz von Cystein definiert. Jeder Punkt der Abb. 1 entspricht dem Mittelwert von mindestens 2 vollständigen Dosis-Effektkurven, von denen jede aus 7 Meßpunkten besteht und die halblogarithmisch aufgetragen stets linear verliefen. Diese Inaktivierungskurven wurden unter anaeroben Bedingungen und an bouillonsuspendierten Phagen aufgenommen. Die

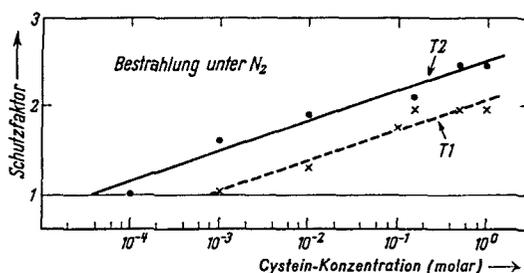


Abb. 1. Abhängigkeit des Strahlenschutzfaktors der Überlebenskurven röntgenbestrahlter T1 und T2-Bakteriophagen vom Logarithmus der Cystein-Konzentration. Die Bestrahlung wurde unter anaeroben Bedingungen und in 4-proz. Difco-Nährbouillon durchgeführt.

experimentellen Daten lassen sich am besten durch zwei Ausgleichsgeraden verbinden. Die untere gibt die mit T1, die obere die mit T2 gemessenen Werte wieder. Die Beziehung zwischen dem Schutzfaktor  $F$  und der Schutzstoffkonzentration  $C$  kann durch folgende einfache Gleichung dargestellt werden:

$$\text{T1: } F = 0,35 \log C + 2,08,$$

$$\text{T2: } F = 0,35 \log C + 2,52.$$

Aus den Versuchen folgt, daß zum Erreichen des gleichen Strahlenschutzes bei T1 eine 18-fach höhere Schutzstoffkonzentration als bei T2 benötigt wird. Die verwendeten Cystein-Konzentrationen waren nicht toxisch.

Aus Abb. 2 sind die Verhältnisse bei Verwendung von Cysteamin als Schutzstoff unter sonst gleichen experimentellen Bedingungen zu ersehen. Auch hier können die zu Konzentrationen unterhalb 0,1-

<sup>3</sup> A. MÜLLER, G. Hotz u. K. G. ZIMMER, Z. Naturforschg. 16b, 658 [1961].

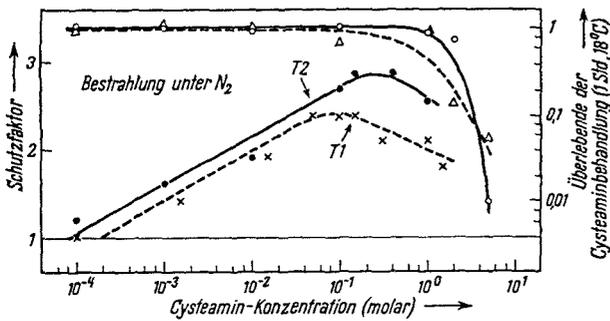


Abb. 2. Abhängigkeit des Strahlenschutzfaktors der Überlebenskurven röntgenbestrahlter T1 und T2-Bakteriophagen vom Logarithmus der Cysteamin-Konzentration. Die Bestrahlung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei den in Abb. 1 dargestellten Versuchen. Die beiden oberen Kurven geben die toxische Wirkung (rechte Ordinate) der Cysteamin-Konzentration auf T1  $\cdot\cdot\Delta\cdot\cdot$  und T2  $\text{---}\circ\text{---}$  ohne Röntgenbestrahlung wieder.

molar gehörenden Punkte durch Ausgleichsgeraden mit folgenden Gleichungen verbunden werden:

$$T1: F = 0,57 \log C + 3,12,$$

$$T2: F = 0,57 \log C + 3,31.$$

Die Neigung der Kurven ist die gleiche bei T1 und T2, jedoch größer als bei Verwendung von Cystein. Dagegen ist der Unterschied im Schutzstoffbedarf beider Phagen kaum mehr signifikant. Die in Abb. 1 und 2 eingezeichneten Geraden stellen innerhalb der Beobachtungsgenauigkeit genügend gute Näherungen des ansteigenden Stücks von Kurven dar, die, wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, tatsächlich in der gewählten Darstellung sigmoidale Form haben. Diese Form der Abhängigkeit der Schutzwirkung von der Konzentration ist die einfachste, die möglich ist. Die Unterschiede zwischen Cystein

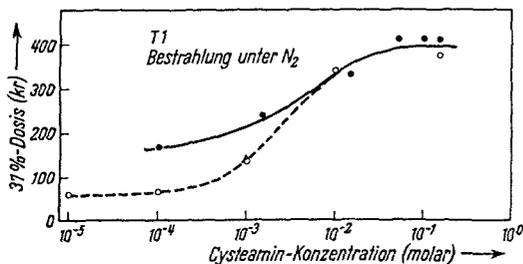


Abb. 3. Abhängigkeit der 37%-Dosis anaerob röntgenbestrahlter T1-Bakteriophagen vom Logarithmus der Cysteamin-Konzentration. ● Phagen in Bouillon-Cysteamin, ○ Phagen in Wasser-Cysteamin,  $\Delta$  Phagen in Sørensen-Puffer-Cysteamin.

und Cysteamin zeigen, daß nicht allein die Anwesenheit von SH-Gruppen für die Wirkung bestimmend ist, sondern auch die Struktur der ganzen Moleküle. Dies gilt nicht in gleichem Maß für die Unterschiede zwischen T1 und T2, da hier nur ein konstantes Verhältnis zwischen den für den gleichen Schutz erforderlichen Konzentrationen zu beobachten ist, also nur ein quantitativer, nicht aber ein qualitativer Unterschied vorliegt. Die in früheren Untersuchungen<sup>2</sup> gefundenen qualitativen Unterschiede zwischen T1 sowie T7 und T2 bezüglich der Inaktivierung an Luft werden dadurch bereits z. T. erklärt, da der Bedarf an Cystein bei T1 für den gleichen Schutz ja wesentlich größer ist als bei T2.

Ein weiterer Unterschied wurde in der Fähigkeit gefunden, Cystein oder Cysteamin zu binden. Wenn man T2 Bakteriophagen für die Dauer von etwa 60 sec in einer der beiden Schutzstofflösungen mit einer Konzentration von etwa 0,1-m. suspendiert, danach um den Faktor  $10^4$  verdünnt und in der schutzstoffarmen Lösung (s. Abb. 1 und 2) bestrahlt, so wird trotzdem noch fast vollständiger Strahlenschutz beobachtet. Diese Komplexbildung<sup>4</sup> zwischen T2 und Cystein wurde in schwächerem Maße auch mit Cysteamin, aber nicht beim Phagen T1 beobachtet.

Beim Vergleich der beiden Abbildungen fällt das Abbiegen der Cysteaminkurven im Konzentrationsbereich über 0,1-molar auf. Diese Umkehrung kann nicht der toxischen Wirkung des Schutzstoffes zugeschrieben werden, die ebenfalls in Abb. 2 eingezeichnet wurde und erst bei sehr hohen Konzentrationen ins Gewicht fällt. Die Zahl der in dem interessierenden Bereich durch Toxizität inaktivierten Phagen wurde in jedem Fall bei der Berechnung der Überlebenden berücksichtigt. Ob diesem Effekt eine echte Sensibilisierung zugrunde liegt, wie kürzlich an Mikroorganismen beobachtet wurde<sup>5</sup>, oder ob kurzlebige Strahlenprodukte des Cysteamins verantwortlich sind, wurde nicht näher untersucht. Langlebige, phageninaktivierende Produkte, wie sie im sog. „aftereffect“ bestrahlter Suspensionsmedien beobachtet werden, konnten wir in unserem Falle nicht feststellen.

Nach der quantitativen Bestimmung des Schutzes, den Cystein und Cysteamin zusätzlich zum Bouillon-

<sup>4</sup> G. Hotz (Manuskript in Vorbereitung).

<sup>5</sup> J. FRADY u. J. B. CLARK, *Experientia* [Basel] 16, 150 [1960].

schutz geben, wurde die Möglichkeit versucht, ohne Zusatz solch unspezifischer Proteine und nur mit Cysteamin allein die Strahlenempfindlichkeit wasser- bzw. puffersuspendierter Phagen zu modifizieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit T1 sind in Abb. 3 dargestellt, indem die unter anaeroben Bedingungen erhaltene 37%-Dosis gegen den Logarithmus der Cysteamin-Konzentration aufgetragen wurde. Während die durch Punkte gekennzeichneten Daten aus Abb. 2 entnommen sind, handelt es sich bei den durch Kreise bzw. offene Dreiecke markierten Werten um solche, die durch Zusatz von Cysteamin zu eiweißfreien Suspensionen (Puffer bzw. doppelt dest. Wasser) erhalten werden. Als diesen Werten am besten genügende Kurvenform wurde der sigmoidale Typ gewählt. Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß nur dann Bouillonschutz auftritt, wenn eine Cysteamin-Konzentration von geringerer Effektivität vorhanden ist; d. h., Cysteamin kann in einer Konzentration größer als  $5 \cdot 10^{-3}$  Bouillon vollständig ersetzen und einen von der Konzentration abhängigen Schutz bieten, der über den durch

Bouillon allein geleisteten hinausgeht. Der Schutzfaktor in bouillonfreiem Medium ist bei der benutzten Phagenkonzentration in weiten Grenzen vom Ionengehalt unabhängig (s. Abb. 3). In Übereinstimmung mit den an bouillonsuspendierten Phagen gewonnenen Resultaten<sup>6</sup> beobachteten wir auch in eiweißfreiem Medium eine Reduktion des Cysteaminschutzes durch Sauerstoff bei Bestrahlung. Zusammenfassend kann man aus den Versuchen folgern, daß Cystein einen geringeren Schutzeffekt besitzt als Cysteamin (in Abhängigkeit vom Phagenstamm), jedoch beide SH-Substanzen in ihrer Schutzwirkung auf röntgenbestrahlte Phagen der Nährbouillon überlegen sind. Der maximale durch diese drei Substanzen erzielbare Schutzfaktor bewegt sich innerhalb der gleichen Größenordnung.

Herrn Professor K. G. ZIMMER und Herrn Professor A. CATSCH möchten wir für wertvolle Diskussionen und Anregungen im Verlaufe der Arbeit, Fräulein E. KNORR und Fräulein R. MAUSER für gewissenhafte technische Hilfe danken.

<sup>6</sup> G. Horz, *Experientia* [Basel] 17, 498 [1961].

KERNREAKTOR  
Bau- und Betriebsamt des Instituts für m. b. H.  
Verwaltung der Zentralbibliothek

## Die kombinierte Schutzwirkung von Cysteamin und Glycerin bei röntgenbestrahlten T1-Phagen

Von G. <sup>[erhart]</sup>Horz

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe  
(Z. Naturforschg. 17 b, 37—42 [1962]; eingegangen am 9. August 1961)

The plaque forming ability of coliphage T1 suspended in glycerol solutions was inactivated by X rays. A marked decrease in radiosensitivity was observed which was highest at a glycerol molarity of 10. At higher concentrations the protective effect decreases but this decrease could be avoided by adding cysteamine before irradiation. It was found that the protection afforded by 0.15 M cysteamine was additive to that observed with glycerol from zero concentration to 10 molar. The highest ratio of sensitivity obtained was 6 as observed between T1 phage suspended in a cysteamine-glycerol-broth mixture and broth-suspended T1 without any addition. Tentative explanations are given for the remarkably efficient radioprotective actions found and some consequences thereof for further work are indicated.

In zunehmendem Maße finden bei der Bearbeitung strahlenbiologischer Probleme solche chemischen und physikalischen Methoden Beachtung, die eine Veränderung der Strahlenempfindlichkeit biologischer Objekte zur Folge haben, denn hierdurch ergeben sich häufig neue Gesichtspunkte theoretischer

wie auch praktischer Art. Eine Reihe von Untersuchungen der vergangenen Jahre beschäftigte sich mit der Schutzwirkung von Alkoholen und Glycerinen und insbesondere mit der des Glycerins bei Röntgenbestrahlung von Säugetieren<sup>1</sup>, Hefezellen<sup>2,3</sup> und Bakterien<sup>4-6</sup>. Da die allgemein aktivi-

<sup>1</sup> R. H. MOLE, J. Chim. physique Physico-Chim. biol. 48, 258 [1951].

<sup>2</sup> A. M. ROSENBERG, Ph. D. THESIS, Univ. Pennsylvania, 1958, zitiert bei T. H. WOOD, Rev. Modern Physics 31, 282 [1959].

<sup>3</sup> T. R. MONNEY, T. BRUSTAD, J. BARR u. C. A. TOBIAS, Ra-

diation Res. 12, 455 [1960].

<sup>4</sup> W. T. BURNETT, G. E. STAPLETON, M. L. MORSE u. A. HOLLANDER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 77, 636 [1961].

<sup>5</sup> M. MARCOVICH, in: Les peroxydes organiques en radiobiologie. p. 117. Masson et Cie, Paris 1958.

<sup>6</sup> D. L. DEWEY, Nature [London] 187, 1008 [1960].

tätscherhaltende Eigenschaft des Glycerins<sup>7</sup> bei einer Vielzahl von Virusarten schon lange bekannt ist und ferner Untersuchungen über den dehydrierenden Einfluß von Glycerin auf solche Objekte vorliegen<sup>2, 8</sup>, womit nach Erfahrungen an vakuumgetrockneten Phagen<sup>9, 10</sup> eine Veränderung der Strahlenresistenz verbunden ist, erschien es naheliegend, nun die noch gänzlich fehlenden Erfahrungen über eine strahlenschützende Wirkung von Glycerin allein, aber auch in Kombination mit bereits untersuchten sulfhydrylhaltigen Schutzstoffen<sup>11-13</sup> an diesen biologischen Elementareinheiten zu sammeln. Unabhängig davon, ob die von ELDJARN und PIHL<sup>14</sup> für den Schutzmechanismus von Cystein- und Cysteaminverbindungen vorgeschlagene Hypothese der Bildung gemischter Disulfide, oder (und) die von HOWARD-FLANDERS<sup>15</sup> auf die Verhältnisse bei Bakteriophagen angewandte Hypothese der Wasserstoff-Donatoren Gültigkeit besitzt, erschien es denkbar, daß die Schutzwirkung von Glycerin nach einem anderen Mechanismus verläuft und sich beide Schutzwirkungen addieren. Praktisch-methodische Fortschritte waren von Versuchen mit Strahlenschutzsubstanzen z. B. nach folgenden Gesichtspunkten denkbar: Untersuchungen von MARCOVICH<sup>5</sup> an glyceringeschützten Bakterien des Stammes *E. coli* K12 hatten gezeigt, daß zwar die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien, nicht aber die Strahlenwirkung auf Phageninduktion abgeschwächt wird. Sollte sich in Analogie hierzu ebenfalls keine Schutzwirkung bei verwandten Mutationsauslösungen zeigen, so wäre die Möglichkeit einer Erhöhung der Anzahl strahleninduzierter Mutationen bei gleichhoher Überlebensrate gegeben. Der gleiche Vorteil, d. h. relative Zunahme eines Teils der strahlenbedingten Effekte bei gleichbleibender Vermehrungsfähigkeit des biologischen Objektes wäre für die Untersuchung der Elektronen-Spin-Resonanz strahleninduzierter freier Radikale, wie sie von uns an lebenden Bakteriophagen begonnen wurde<sup>16</sup>, interessant.

## Material und Methodik

Die Arbeitsmethoden waren im allgemeinen dieselben, wie sie schon in unseren früheren Veröffentlichungen beschrieben wurden<sup>11, 17</sup>. Die gereinigten Konzentrate des Coliphagen T1 verdünnten wir 1:10 in 4% Difco-Bouillon, hergestellt mit bidest. Glycerin bzw. in Glycerin-Aqua bidest. und bestrahlten 10 min später jeweils 0,6 ml in Plexiglas-Schälchen. Bei einigen Versuchsreihen versetzten wir die Phagen vor dem Verdünnen in die Glycerinlösungen für 10 min mit einer Cysteamin-Bouillonlösung (Cysteamin der Firma Fluka, Schweiz). Eine Röntgenröhre der Firma C. H. F. Müller, Hamburg, mit einem Berylliumfenster von 1,5 mm Stärke, betrieben bei 100 kV<sub>s</sub> und 25 bzw. 2,5 mA gab am Ort der Suspension eine Dosisleistung von 500 bzw. 50 kr/min bei einer effektiven Wellenlänge von 1,4 Å. Zur Kontrolle wurden einige Bestrahlungsversuche mit einer Röhre gleichen Fabrikates durchgeführt, die mit 150 kV<sub>s</sub> und 20 mA betrieben wurde. Hierbei wurde eine Dosisleistung von 10 kr/min bei einer effektiven Wellenlänge von 0,26 Å erreicht. Die in der Phagensuspension absorbierte Strahlenergie wurde in der gleichen Geometrie mit dem Fricke-Aktinometer ( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ) gemessen. Hierbei sei erwähnt, daß die Bestrahlungen von Bakteriophagen erst dann begonnen wurden, als Absolutmessungen mit dem Aktinometer (unter Verwendung des Standard G-Wertes) mit den Anzeigen zweier unabhängig voneinander geeichter Ionisationsdosimeter auf wenige Prozent übereinstimmten, und damit die Beseitigung der vielen möglichen Fehlerquellen gezeigt war. Als Kriterium der Strahleneinwirkung diente bei allen in der Folge zu beschreibenden Versuchen die Inaktivierung der Plaquebildungsfähigkeit.

## Ergebnisse

Die im halblogarithmischen Raster der Abb. 1 unterbrochen dargestellte Gerade (Kurve 2) ist die schon in früheren Untersuchungen<sup>11</sup> an T1 bestimmte Dosis-Effektkurve der in Difco-Nährbouillon (4%) inaktivierten Plaquebildungsfähigkeit mit einer 37%-Dosis von 180 kr. Ein Zusatz von 0,1-m. (= 0,75 Vol.-%) Glycerin zur Bouillon ändert die Strahlenempfindlichkeit von T1 nicht. Wird die Glycerinkonzentration jedoch erhöht, so erhält man proportional ihrer Zunahme bis zu 10-m.-Lösungen eine Schar immer flacher verlaufender Dosis-Effekt-

<sup>7</sup> S. GARD u. O. MAALØE, in: The Viruses, Vol. I, p. 359. Academic Press, New York 1959.

<sup>8</sup> J. E. SMADEL, E. G. PICKELS u. T. SHEDLOVSKY, J. exp. Medicine 68, 607 [1938].

<sup>9</sup> D. E. WILSON, Virology 11, 533 [1960].

<sup>10</sup> G. HOTZ, zitiert bei M. EBERT, Int. J. Rad. Biol. 2, 407 [1960].

<sup>11</sup> G. HOTZ u. A. MÜLLER, Z. Naturforschg. 15 b, 450 [1960].

<sup>12</sup> G. HOTZ u. A. MÜLLER, Z. Naturforschg. 16 b, 282 [1961].

<sup>13</sup> G. Hotz, Experientia [Basel] 17, 498 [1961].

<sup>14</sup> L. ELDJARN u. A. PIHL, in: Progress in Radiobiology, p. 249. Oliver and Boyd, Edinburgh and London 1956.

<sup>15</sup> P. HOWARD-FLANDERS, in: Advances Biol. Med. Physics 6, 533 [1958].

<sup>16</sup> A. MÜLLER, G. HOTZ u. K. G. ZIMMER, Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, 214 [1961].

<sup>17</sup> A. MÜLLER, G. HOTZ u. K. G. ZIMMER, Z. Naturforschg. 16 b, 658 [1961].

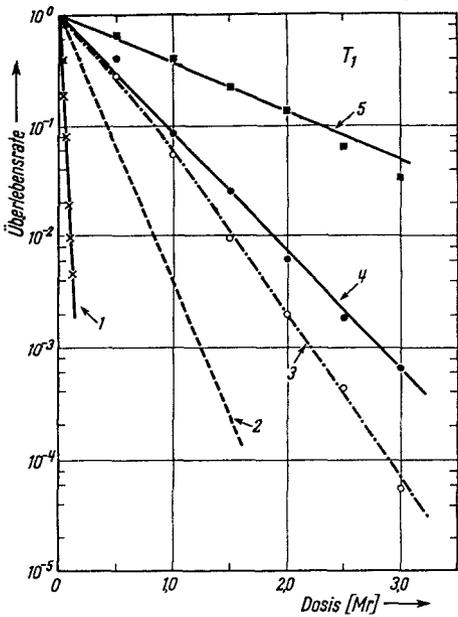


Abb. 1. Überlebensrate suspendierter T1-Bakteriophagen nach Röntgenbestrahlung unter folgenden Bedingungen: 1. x suspendiert in doppelt dest. Wasser, aerob, Dosisleistung 500 kr/min; 2. --- suspendiert in 4% Difco-Nährbouillon, aerob, Dosisleistung 500 kr/min; 3. o suspendiert in 4% Difco in 10-m. Glycerin, aerob und anaerob, Dosisleistung 500 kr/min; 4. ● ebenso, Dosisleistung 50 kr/min; 5. ■ suspendiert in 4% Difco in 13-m. Glycerin nach Vorbehandlung mit 0,15-m. Cysteamin in 4% Difco, Dosisleistung 500 kr/min.

kurven. In Abb. 1 ist als Beispiel Kurve 4, erhalten mit 10-m. Glycerin und einer Dosisleistung von 50 kr/min, eingezeichnet. An dieser Stelle ist zu erwähnen, daß wir bei sehr großer Dosisleistung (500 kr/min) und ebenfalls 10-m. Glycerin einen mit steigender Strahlendosis abnehmenden Glycerin-Schutz beobachten konnten (Kurve 3). Die 37%-Dosis liegt bei der günstigsten Glycerinkonzentration (10-m.) bei etwa 0,4 Mr. Bei weiterer Verringerung des Wasseranteils der Phagensuspension erhöht sich die Strahlenempfindlichkeit von T1 wieder, und die 37%-Dosis nähert sich in konzentriertem Glycerin der einer Dosis-Effektkurve aufgenommen in Bouillon ohne Glycerinzusatz. Die Schutzfaktoren dieser Kurven, d. h. der Quotient aus der 37%-Dosis von T1 bestrahlt in Bouillon bestimmter Glycerinkonzentration und der von T1 bestrahlt in Bouillon ohne Glycerin, sind in Abb. 2 (Kurve 1) gegen die Glycerinkonzentration aufgetragen.

Die Daten der Kurve 2 (Abb. 2), die sich durch eine Ausgleichsgerade wiedergeben lassen, wurden

aus den 37%-Dosen von T1-Phagen erhalten, die mit Cysteamin (0,15-m.) behandelt und in Glycerin steigender Konzentration bestrahlt worden waren. Die gewählte Cysteaminkonzentration gibt bei bouillonsuspendierten T1-Phagen maximalen Schutz<sup>18</sup>. Unter diesen Umständen addiert sich offenbar der schon ohne Glycerinzusatz zu beobachtende Cysteaminschutz nach Zugabe von Glycerin (bis zu etwa 10-molaren Lösungen) zu dem durch Glycerin erzielbaren Schutz; denn das Produkt der Einzel-Schutzfaktoren ergibt angenähert den der Schutzstoff-Kombination. Bei höheren Glycerin-Konzentrationen nimmt der Schutz im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Abwesenheit der sulfhydrylhaltigen Verbindung nicht wieder ab, sondern steigt weiter bis zum Erreichen eines maximalen Schutzes in konzentriertem Glycerin. Die beim Bestrahlen in Glycerinlösungen beobachtete und oben erwähnte Krümmung der Inaktivierungskurven bei großer Dosisrate ist bei kombinierter Cysteamin-Glycerinbehandlung, wenn überhaupt vorhanden, so weniger stark, obwohl auch diese Versuche mit einer Dosisrate von 500 kr/min durchgeführt wurden. Als typisches Beispiel einer solchen Dosis-effektkurve wird in Abb. 1 die Inaktivierungskurve 5 wiedergegeben. Sie wurde nach Behandlung der Phagen mit 0,15-m. Cysteamin-Bouillon und folgender Bestrahlung in 13-m. Glycerin-Bouillon erhalten. Der auf diese Weise erzielte Schutzfaktor beträgt etwa 6. Bei Erhöhen der Cysteaminkonzentration um den Faktor 10 konnte keine weitere Verstärkung der Strahlenresistenz bemerkt werden.

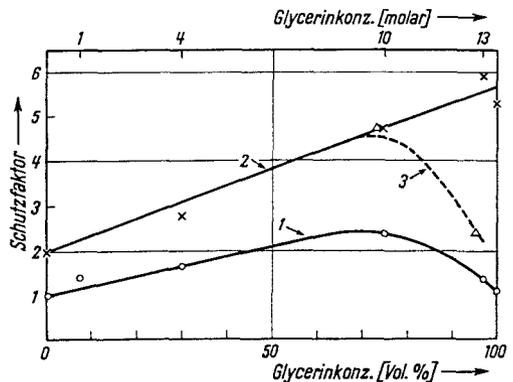


Abb. 2. Schutzfaktor (Definition s. Text) in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration während der Röntgenbestrahlung von T1 in 1. o Glycerin-Bouillon-Lösungen; 2. x ebenso, nach Vorbehandlung mit 0,15-m. Cysteamin; 3. Δ Glycerin-Wasser-Lösungen, nach Vorbehandlung mit 0,15-m. Cysteamin.

<sup>18</sup> G. Hotz u. A. Müller, Z. Naturforsch. 16b, im Druck.

Außer den bisher beschriebenen Versuchen an T1 suspendiert in Glycerin-Bouillon-Systemen wurden ähnliche Experimente mit Glycerin-Wasser-Lösungen durchgeführt. Die größte im 0,15-m. Cysteamin-10-m. Glycerin-Wasser-System beobachtete 37%-Dosis entspricht etwa der unter gleichen Bedingungen im Bouillonssystem beobachteten. Im Gegensatz zu den Versuchen im Cysteamin-Glycerin-Bouillon-System war jedoch die Neigung der 13-m. Glycerin-Wasser-Cysteamin-Kurve steiler als bei 10-m.-Glycerin-Wasser-Cysteamin. Sie entsprach der einer T1-Inaktivierung in 10-m. Glycerin-Bouillon ohne Cysteamin. Die Strahlenresistenz wird also durch Zugabe unspezifischer „Schutzproteine“ (Nährbouillon), die gewöhnlich zum Eliminieren der sog. indirekten Effekte röntgenbestrahlten Wassers dienen<sup>19, 20</sup>, bei kleinerer Glycerinkonzentration innerhalb der Fehlergrenze nicht beeinflusst, während bei hoher Glycerinkonzentration und Fehlen der Bouillon-Stoffe der Schutzfaktor sehr stark abnimmt.

### Diskussion

Auf Grund von Messungen an Zentrifugensedimenten glycerinsuspendierter Hefezellen<sup>2</sup>, die auf eine Zellschrumpfung hindeuteten, schlug Wood<sup>21</sup> die Dehydrierung als Ursache der erhöhten Strahlenresistenz derart behandelter Zellen vor. Biophysikalische Untersuchungen der in der analytischen Ultrazentrifuge gemessenen Sedimentationskonstante glycerinsuspendierter Viren<sup>8</sup> zeigten einen eindeutig veränderten Hydrationsgrad, hervorgerufen durch Wasserentzug aus den Partikeln. Als weiteren Beweis, Viren durch Suspension in Glycerin dehydrieren zu können, möchten wir die Tatsache anführen, daß Phagen nach Aufenthalt in Glycerinlösungen durch rasches Verdünnen in Wasser „osmotisch geschockt“<sup>22</sup>, d. h. durch die hohen osmotischen Druckunterschiede zwischen Phageninnerem und umgebendem Medium gesprengt werden. Eine notwendige Voraussetzung für einen solchen Mechanismus ist der Wasserentzug durch Glycerin. In der gleichen Richtung muß auch die bekannte konservierende Eigenschaft des Glycerins gedeutet werden,

die man sich schon lange besonders beim Aufbewahren von Viren in empfindlichen Geweben zunutze gemacht hat und die gleichgute Ergebnisse bringt wie Lyophilisieren des Materials. Aus diesen Tatsachen in Verbindung mit neueren Untersuchungsergebnissen über die Steigerung der Strahlenresistenz bei Phagen nach Trocknen im Vakuum<sup>9, 10</sup> kann man folgern, daß bei Bakteriophagen ein Teil der Strahlenresistenz bei Bestrahlung in glycerinhaltigen Medien auf einem Wasserentzug im Phagen selbst und in seiner Umgebung beruht. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, die von uns an T1 beobachtete 37%-Dosis von 0,4 Mr nach Suspension in 10-m. Glycerin-Bouillon mit dem fast identischen Wert zu vergleichen, der nach Röntgenbestrahlung vakuumgetrockneter T1-Phagen gemessen wurde<sup>23</sup>.

Trotz dieser Argumente scheint uns die von verschiedenen Autoren vorgeschlagene „Deutung der Schutzwirkung von Glycerin durch Dehydrierung“ nicht ausreichend zu sein, da diese Hypothese nicht alle mit der Glycerinwirkung zusammenhängenden Beobachtungen erklären kann. Außerdem muß man in Rechnung stellen, daß je nach vorliegenden Konzentrations-, Diffusions- und osmotischen Bedingungen dem biologischen Material nicht nur Wasser entzogen, sondern auch Glycerin zugeführt wird, was man besonders beim Phagen T1 erwarten muß, da dieser Phage osmotisch nicht geschockt werden kann. Die in der oben genannten „Deutung durch Dehydrierung“ offenbar oft, wenn auch unausgesprochen enthaltene Annahme, daß bei Wasserentzug durch Glycerin nur eine Schutzwirkung durch Einschränkung oder Fortfall der Wirkungen zustande kommt, die durch strahleninduzierte Reaktionsprodukte des Wassers ausgelöst werden können, ist sicher weder ausreichend noch allgemein zutreffend:

1. Es gibt Objekte, bei denen Wasserentzug die Strahlenwirkung steigert, Glycerin aber dennoch schützt (*B. megatherium*-Sporen, WEBB und POWERS<sup>24</sup>).

2. Wasserentzug durch Glycerin ist nicht dasselbe wie etwa Wasserentzug durch Vakuum; er bedeutet vielmehr teilweisen oder völligen Ersatz der

<sup>19</sup> D. E. LEA, Action of Radiations on Living Cells. University Press, Cambridge 1956.

<sup>20</sup> S. E. LURIA u. F. M. EXNER, Proc. nat. Acad. Sci. USA 27, 370 [1941].

<sup>21</sup> T. H. WOOD, Rev. Modern Physics 31, 282 [1959].

<sup>22</sup> T. F. ANDERSON, J. appl. Physics 21, 70 [1950].

<sup>23</sup> D. J. FLUKE u. F. FORRO JR., Radiation Res. 13, 305 [1960].

<sup>24</sup> R. B. WEBB u. E. L. POWERS, Radiation Res. 14, 515 [1961].

strahlenchemischen Effekte des Wassers durch die des Glycerins. Im Zusammenhang damit darf auch nicht übersehen werden, daß Glycerin außer nach sorgfältiger Entgasung ebenso wie Wasser Sauerstoff enthält.

3. Die Wirkungen der strahleninduzierten Reaktionsprodukte des Glycerins sind jedenfalls zu berücksichtigen, wenn, wie im vorliegenden Falle die Phagen, sehr kleine biologische Objekte in glycerinhaltigen Lösungen suspendiert und so bestrahlt werden. Dabei ist es unter Umständen in erster Annäherung unnötig zu wissen, ob und in welchem Maße den Objekten Wasser entzogen und/oder ob Glycerin aufgenommen wird.

Die einschlägigen Monographien (s. z. B. SWALLOW<sup>25</sup>) geben keine Hinweise auf die Strahlenchemie von Glycerin oder Glycerin-Wasser-Lösungen, die bisher nicht näher untersucht zu sein scheint. Immerhin kann man auf eine Reihe in den Jahren 1944–1945 durchgeführter Untersuchungen über die Entfärbung von Redox-Indikatoren in verschiedenen Lösungsmitteln zurückgreifen, die wegen der Zeitverhältnisse nur teilweise veröffentlicht und weitgehend unbekannt geblieben sind (ZIMMER<sup>26</sup>, ZIMMER und CRON<sup>27</sup>, siehe auch TIMOFÉEFF-RESOVSKYY und ZIMMER<sup>28</sup>, Kapitel 10). Aus diesen folgt für unsere Fragestellung, daß in Glycerin gelöstes Methylenblau unter Röntgenbestrahlung entfärbt wird (teils durch reversible Reduktion zur Leukoform, teils irreversibel durch Oxydation), wobei ungeklärt ist, ob die Reduktion nur über Radikale verläuft, oder ob und in welchem Umfange Elektronen-Einfang eine Rolle spielt (STEIN<sup>29</sup>). Bakteriophagen können unter Bestrahlung unzweifelhaft durch Oxydation *und* durch Reduktion inaktiviert werden. Die Inaktivierung durch reduzierende Agentien wurde von EBERT und ALPER<sup>30</sup> experimentell gezeigt, die Bedeutung oxydierender Agentien geht z. B. aus den Befunden von HOTZ und MÜLLER<sup>11, 13</sup> hervor, wobei man als Mechanismus mit HOWARD-FLANDERS<sup>15</sup> ein Reagieren durch direkte Treffer im Phagen erzeugter Carbonium-Radikale mit Sauerstoff annehmen kann. Eine gewisse Analogie zwischen den röntgenbestrahlten Systemen

Phage-Glycerin und Methylenblau-Glycerin scheint gegeben, eine geschlossene Deutung der mit steigender Glycerin-Konzentration zuerst zunehmenden und dann wieder verschwindenden Schutzwirkung (Abb. 2, Kurve 1) ist aber im Augenblick noch unmöglich. Dies um so weniger, da sowohl in Puffer<sup>31, 32</sup> als auch in Bouillon<sup>11</sup> eine Schutzwirkung des Sauerstoffs bei röntgenbestrahlten Phagen beschrieben, dagegen von DEWEY<sup>6</sup> keine Wirkung des Sauerstoffs bei Bestrahlung glycerinsuspendierter Bakterien festgestellt wurde. Viele dieser Vorgänge erfordern Diffusion der Reaktionspartner. Die Feststellung einer Abhängigkeit ihrer Wirkung von der Dosisleistung der Bestrahlung (Abb. 1, Kurven 3 und 4) ist daher nach unseren Vorstellungen zu erwarten (insbesondere bei den sehr viskosen Suspensionen mit hohem Glyceringehalt). Auch das Auftreten einer weitgehend additiven und vom Glycerin unabhängigen Schutzwirkung durch Cysteamin erscheint verständlich, da die Tatsache bekannt ist, daß die verschiedensten durch ionisierende Strahlen in Wasser erzeugten Reaktionsprodukte durch Cysteamin unwirksam gemacht werden (HOTZ und MÜLLER<sup>18</sup>).

Es gibt, um die Analogie fortzuführen, auch Untersuchungen über folgende Systeme: Redoxfarbstoffe – organisches Lösungsmittel – SH-Körper-Sauerstoff unter Röntgenbestrahlung. Doch möchten wir von einer Diskussion derselben hier ebenso absehen, wie vom Versuch einer weiteren Analyse der erwähnten wie auch anderer möglicher Deutungen unserer Befunde. Eine zusammenfassende Darstellung der sehr zahlreichen Arbeiten an Redox-Indikatoren (SWALLOW<sup>25</sup>) zeigt, wie vielfältig und daher schwer quantitativ analysierbar die Erscheinungen bei solchen Systemen mit vielen Komponenten sind, obwohl man bei diesen Farbstoffen die Entfärbung durch Reduktion wegen ihrer Reversibilität meist einfach von der Oxydation trennen kann. Bei Phagen ist das schwieriger, wenn auch wohl möglich, weil die Reaktionen trotz gleichen Endeffekts (Inaktivierung der Plaquebildung) verschieden sein können. Eine zusätzliche, die Deutung erschwerende Komponente in dem hier beschriebenen Pha-

<sup>25</sup> A. J. SWALLOW, *Radiation Chemistry of Organic Compounds*. Pergamon Press, London 1960.

<sup>26</sup> K. G. ZIMMER, *Naturwissenschaften* **32**, 375 [1944].

<sup>27</sup> K. G. ZIMMER u. E. C. CRON, unveröff. Verss. 1944/45.

<sup>28</sup> K. G. ZIMMER u. N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, *Biophysik I*, Hirzel, Leipzig 1947.

<sup>29</sup> G. STEIN, *Discuss. Faraday Soc.* **12**, 227 [1952].

<sup>30</sup> M. EBERT u. T. ALPER, *Nature [London]* **173**, 987 [1954].

<sup>31</sup> T. ALPER, *Nature [London]* **169**, 964 [1952].

<sup>32</sup> C. S. BACHOFER u. M. A. POTTINGER, *Science [Washington]* **119**, 378 [1954].

gen-Glycerin-System ist der durch Wasserentzug erzeugte Schutzeffekt.

Zusammenfassend betrachten wir — aus theoretischen wie auch praktischen Gründen — die Möglichkeit, bei *suspendierten* Bakteriophagen die gleiche Strahlenresistenz zu erzielen wie bei *vakuumgetrockneten*, sowie das Auftreten eines darüber hinaus zu beobachtenden „additiven“ Schutzes durch sulfhydrylhaltige Verbindungen der Cystein-

Cysteamingruppe, wie er in ähnlicher Form bei getrockneten T1-Phagen<sup>11</sup> schon früher gefunden wurde, als wesentliche Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen.

Den Herren Professor K. G. ZIMMER, Professor A. CATSCH, Dr. A. MÜLLER und Dr. H. TRAUT möchte ich für zahlreiche, anregende Diskussionen, Fr. E. KNORR und Fr. R. MAUSER für sorgfältige technische Unterstützung danken.