

KFK-333

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM  
KARLSRUHE**

April 1965

KFK 333

Institut für Strahlenbiologie

Strahlenbiologische Untersuchungen am T5-Rezeptor

Felicitas Bohne



**GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.  
KARLSRUHE**

*Sonderdruck aus*

**STRALENTHERAPIE Band 126, Heft 4 (1965)**

Herausgegeben von Josef Becker, Rudolf Birkner, Hanns Langendorff

VERLAG URBAN & SCHWARZENBERG : MÜNCHEN UND BERLIN

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten

---

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

**Strahlenbiologische Untersuchungen am T5-Rezeptor**

Von

**Felicitas Bohne**

Mit 5 Abbildungen

## A. Einleitung

Die Wahl geeigneter Untersuchungsobjekte ist in der Strahlenbiologie von großer Bedeutung und weitgehend durch die jeweilige Fragestellung bestimmt. Handelt es sich um Untersuchungen, die sich die Aufgabe stellen, die für die biologische Wirkung ionisierender Strahlen relevanten *primären*, d. h. sich im physiko-chemischen Bereich abspielenden Reaktionen zu klären, ist es zweckmäßig, solche Objekte zu wählen, bei denen keine komplizierten metabolischen oder nervös regulierten Reaktionen die durch Bestrahlung ausgelösten Primäreignisse überlagern. Als besonders geeignet hierfür erscheinen sog. biologische Elementareinheiten, zu denen beispielsweise Viren, Bakteriophagen, transformierende Desoxyribonukleinsäure u. a. gehören. Um der Gefahr zu begegnen, daß Hypothesen auf Grund von Untersuchungen an nur einem oder wenigen Objekten gebildet werden, ist es wünschenswert, quantitative strahlenbiologische Untersuchungen auf eine möglichst große Zahl von Objekten auszudehnen. Eine biologische Elementarstruktur, deren Kenntnis wir erst seit kurzem den Untersuchungen von *Weidel* und *Mitarb* (1954, 1963) verdanken und die strahlenbiologisch bisher nur orientierend untersucht wurde, ist der sog. T5-Rezeptor. Darunter wird eine für die Anheftung des T5-Bakteriophagen verantwortliche Struktur der Wand von *E. coli* B verstanden. Form, Größe, Aufbau sowie chemische Zusammensetzung des Rezeptors sind recht genau bekannt, auch kann seine biologische Aktivität mit Hilfe relativ einfacher mikrobiologischer Methoden quantitativ exakt bestimmt werden.

Da Phagenrezeptoren noch nicht so allgemein bekannt sind wie andere Objekte der Strahlenbiologie (z. B. Phagen, Enzyme), sollen die Eigenschaften des T5-Rezeptors zunächst kurz umrissen werden. Eine ausführliche Darstellung findet man bei *Weidel, Koch* und *Bobosch* (1954), *Weidel* und *Kellenberger* (1955), *Weidel* und *Koch* (1955), *Koch* und *Weidel* (1956), *Weidel* und *Homann* (1960), *Zarnitz* und *Weidel* (1963) und *Frank, Zarnitz* und *Weidel* (1963). Der T5-Rezeptor ist, wie erwähnt, der Bestandteil der Bakterienwand von *E. coli* B, an dem die Adsorption des T5-Phagen erfolgt. Er läßt sich relativ leicht von der Bakterienwand ablösen ohne Verlust der Fähigkeit, T5-Phagen irreversibel zu binden. Werden Phagen am isolierten Rezeptor gebunden, so können sie nicht

mehr durch intakte Bakterien adsorbiert werden, und da dies die Voraussetzung zu ihrer Vermehrung ist, kommt die Adsorption von Phagen am T5-Rezeptor ihrer Inaktivierung gleich. Diese Tatsache bildet auch den Ausgangspunkt für die Bestimmung der Rezeptoraktivität. Isolierter T5-Rezeptor besteht aus einzelnen kugelförmigen Teilchen von etwa 30 m $\mu$  Durchmesser. Betrachtet man ein Teilchen als ein Molekül, so ergibt sich ein Molekulargewicht von  $1-4 \cdot 10^7$ . Die Dichte beträgt 1,15. Bezüglich der chemischen Zusammensetzung ist die Substanz aus einer Hülle aufgebaut, die aus Protein besteht, und aus einem Lipopolysaccharidkern. Damit liegt insofern ein wesentlicher Unterschied zu den meisten der bisher untersuchten biologischen Einheiten vor, als der Rezeptor keine Nukleinsäuren besitzt, deren Strahlenreaktion für die Schädigung anderer Objekte bekanntlich von ausschlaggebender Bedeutung ist. Die Aminosäurezusammensetzung des Proteinanteils ist durch besonders hohe Konzentrationen von Asparagin, Glycin, Tyrosin, aber — im Gegensatz zur kompletten Bakterienmembran — durch das Fehlen von schwefelhaltigen Aminosäuren gekennzeichnet. Die beiden Komponenten des Rezeptors können relativ leicht durch Phenol-extraktion voneinander getrennt werden, wobei die proteinhaltige äußere Schicht unter Verlust der Aktivität gegenüber dem Phagen T5 in Lösung geht. Der unzerstörte Kern weist dagegen interessanterweise Rezeptoraktivität gegenüber den Phagen T3, T4 und T7 auf, die das intakte Teilchen nicht besitzt.

Der Adsorptionsmechanismus besteht wahrscheinlich in der Errichtung einer kovalenten Bindung zwischen den beiden Reaktionspartnern; es liegen somit ähnliche Verhältnisse wie bei Enzymen und Substrat vor, nur daß in letzterem Fall die Bindung reversibel ist. Elektronenoptische Bilder zeigen, daß bei Zusammenbringen von T5-Phagen mit T5-Rezeptor im allgemeinen jedes Teilchen nur *einen* Phagen bindet, obwohl auf seiner Oberfläche genügend Platz für eine größere Anzahl wäre. Dieser Befund könnte so gedeutet werden, daß jedes Rezepterteilchen nur *ein* rezeptoraktives Areal besitzt, dessen Oberfläche ungefähr dem Querschnitt eines T5-Phagenschwanzes entspricht. Eine andere Denkmöglichkeit wäre, daß jedes Teilchen zwar mehrere solcher Areale aufweist, diese jedoch, nachdem die Bindung zwischen einem Areal und einem Phagen hergestellt ist, sehr schnell durch Sekundärprozesse inaktiviert werden. Zur Klärung dieser Frage untersuchten *Weidel* und *Homann* (1960) die Strahleninaktivierung des T5-Rezeptors, wobei sie zur quantitativen Bestimmung der Rezeptoraktivität zwei voneinander unabhängige Methoden benutzten, welche sowohl die Konzentration *aller* rezeptoraktiven Areale (unabhängig von ihrer räumlichen Anordnung) als auch die Anzahl der Rezepterteilchen zu erfassen gestatten. Der Vergleich der nach Bestrahlung noch aktiven Areale mit der Zahl der intakt gebliebenen Teilchen führte zu der Folgerung, daß jedes Teilchen mehr als ein rezeptoraktives Areal besitzt. Die Zahl der Areale ist nicht konstant, sondern variiert zwischen 2 und 5 pro Teilchen. Die strahleninduzierte Inaktivierung eines Areals hat keinen Einfluß auf die Funktionsfähigkeit der übrigen Areale des gleichen Teilchens; es ist aber offenbar nicht möglich, daß nach Anheftung eines Phagen ein weiterer vom gleichen Rezepterteilchen adsorbiert wird.

Die vorliegende Untersuchung stellt sich die Aufgabe, die Inaktivierung des Rezeptors durch ionisierende Strahlung in Abhängigkeit von einer Reihe von Parametern zu untersuchen, die sich für die biologischen Strahlenwirkungen generell als bedeutungsvoll erwiesen haben.

## B. Material und Methoden

Der zur Gewinnung und Darstellung des T5-Rezeptors verwendete Stamm von *Escherichia coli* B sowie der Testphagenstamm T5 wurden uns freundlicherweise vom Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen (Prof. Dr. W. Weidel), zur Verfügung gestellt. Bei der Kultivierung der Bakterien für die Rezeptorgewinnung und der Isolierung des T5-Rezeptors folgten wir den von Weidel, Koch und Bobosch (1954) angegebenen Verfahren.

Für die quantitative Messung der Rezeptoraktivität stehen — wie bereits in der Einleitung erwähnt — zwei voneinander unabhängige Tests zur Verfügung, denen beiden die Reaktion zwischen Rezeptor und T5-Phagen zugrunde liegt. Bei Aktivitätsbestimmungen mit Hilfe des sog. Abzähltests, bei dem die Zahl der Rezeptorteilchen bestimmt wird, erhält man wegen der variablen Zahl der aktiven Areale pro Teilchen keine treffertheoretisch eindeutigen Dosiseffektkurven (Weidel u. Homann, 1960). Wir benutzten daher ausschließlich den sog. kinetischen Test, bei dem die Konzentration der Areale ein Maß für die Rezeptoraktivität ist. Die reagierende Einheit ist somit ein rezeptoraktives Areal und nicht ein Rezeptorteilchen, wenn auch im folgenden der Einfachheit halber von der „Inaktivierung des Rezeptors“ gesprochen wird. Im kinetischen Test ist die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Rezeptor und Phagen ein Maß für die Zahl der vorhandenen Areale. Gibt man zu einer T5-Suspension mit einem Titer von  $3 \cdot 10^3$  ml einen Überschuß an Rezeptor, so läuft die Reaktion mit monomolekularer Kinetik ab, und der Logarithmus des Bruchteils noch aktiver Phagen ist bei sonst konstanten Bedingungen proportional zur Konzentration der rezeptoraktiven Areale. Die sog. Rezeptoreinheit E ist als diejenige Menge T5-Rezeptor definiert, die in 1 ml Difco-Nährbouillon gelöst, bei 37° C innerhalb von 20 min 50% der zugesetzten  $3 \cdot 10^3$  T5-Phagen „inaktiviert“, d. h. ihre Adsorption durch intakte *E. coli* verhindert. Zur Durchführung des Tests sind nur hochgereinigte Phagensuspensionen verwendbar, da ungereinigte Lysate außer den T5-Phagen einen den Rezeptor inaktivierenden unbekanntem Stoff enthalten.

Für den kinetischen Test zur Bestimmung der T5-Rezeptoraktivität verdünnten wir das nach Standardmethoden hergestellte Phagenkonzentrat in Difco-Nährbouillon auf den gewünschten Titer. Der in verdünnten Phagensuspensionen nach unseren Erfahrungen leicht eintretende Aktivitätsverlust läßt sich durch Zusatz von  $2 \cdot 10^{-5}$  Mol Spermin-Tetrahydrochlorid 1 weitgehend verhindern (Tabor, 1960). Spermin selbst übt keinen Einfluß auf die Rezeptoraktivität in der Phagensuspension aus. Die Bestimmung des Phagentiters erfolgte nach der Agarlayer-Methode von Adams (1959).

Für die Röntgenbestrahlungen verwendeten wir eine Röntgenröhre der Firma C. H. F. Muller, Hamburg, vom Typ MC 50. Sie besitzt ein 1,5 mm dickes Berylliumfenster und emittiert Röntgenstrahlen mit einer effektiven Wellenlänge von 1,4 Å, was einer Halbwertschicht von 0,065 mm Aluminium entspricht. Die Dosisleistung am Ort der bestrahlten Rezeptorproben betrug bei 100 kV und 25 mA  $3,5 \cdot 10^5$  R/min, bei 100 kV und 1,5 mA  $2,0 \cdot 10^4$  R/min. Für die Gammabestrahlungen benutzten wir zwei verschieden starke <sup>60</sup>Co-Quellen (Atomic Energy of Canada Ltd.). Die Dosisleistung der stärkeren Quelle („Gamma-Cell 220“) am Ort der Probe entsprach  $1,5 \cdot 10^4$  R/min, die der schwächeren („Gamma-Cell 200“)  $1,7 \cdot 10^3$  R/min.

Die Röntgenbestrahlung der Proben erfolgte in Polystyrolgefäßen (20 mm Durchmesser, 10 mm Höhe und 0,5 mm Bodenstärke) mit einem 0,5 mm dicken Deckel. Das Gefäß wurde zur Bestrahlung in einen gasdichten und an die Röntgenröhre angeschraubten Probenhalter eingesetzt; der Abstand zwischen Rohrfenster und Boden des Bestrahlungsgefäßes betrug 1,7 cm. In den Probenhalter ragte eine Duse hinein, durch welche die jeweils verwendeten Gase während der Bestrahlung in einem feinen kräftigen Strom schräg zur Flüssigkeitsoberfläche aufgeblasen wurden, so daß eine dauernde Durchmischung der Probe und Äquilibrieren mit dem Gas gewährleistet waren. Das Gas strömte vor dem Eintritt in die Bestrahlungskammer durch eine mit warmem destilliertem Wasser gefüllte Waschflasche und war dadurch mit Wasserdampf gesättigt. Unter

dem Probenschälchen war eine mit Leitungswasser gekühlte Kupferplatte angebracht, so daß während der gesamten Bestrahlungszeit in der Suspension eine konstante Temperatur von 15° C herrschte. Diese Maßnahme verhinderte die in Vorversuchen beobachtete Temperaturerhöhung auf 45° C während der 3 Stunden dauernden Bestrahlung und die damit verbundene Verdunstung der Suspension. Erfolgte die Bestrahlung unter Ausschluß von Sauerstoff, so sättigten wir die Proben vorher mit Stickstoff. Alle Verbindungen zwischen Gasflasche und Bestrahlungskammer waren aus Nylon oder Glas, um zu vermeiden, daß Luftsauerstoff durch Diffusion in die Schläuche gelangt, was bei Verwendung von Gummischläuchen der Fall ist (*Dewey*, 1963). Bei Bestrahlungen unter Schwefelwasserstoff oder Sauerstoff wurden die Proben in analoger Weise vorbehandelt. Die Strömungsgeschwindigkeit war bei allen Gasen mit Hilfe eines Strömungsmessers auf etwa 7 l/Std. eingestellt.

Da die Bestrahlungsdauer bei Verwendung der Gammaquellen bis zu mehreren Tagen betrug, schmolzen wir die Proben in Glasampullen ein oder benutzten geschlossene Polystyrolgefäße von 20 mm Durchmesser, 20 mm Höhe und 4 mm Wandstärke (zur Erzielung eines Elektronengleichgewichts). Orientierende Versuche, in denen Proben in Polystyrolgefäßen bzw. Glasampullen, aber unter sonst gleichen Bedingungen bestrahlt wurden, ergaben keinerlei Unterschiede. Glasampullen benutzten wir für Gammastrahlungen unter anaeroben Bedingungen. Die vorher mit Stickstoff gesättigten Proben brachten wir in die mit Stickstoff gefüllten Ampullen und ließen vor dem Abschmelzen noch einige Minuten einen feinen Strom von Stickstoff durch die Rezeptorsuspension hindurchperlen. Bei Bestrahlung in Polystyroltöpfchen wurde Sauerstoff durch eine mit destilliertem Wasser gefüllte Waschflasche und dann durch eine Glasfritte in die Bestrahlungssuspension geleitet.

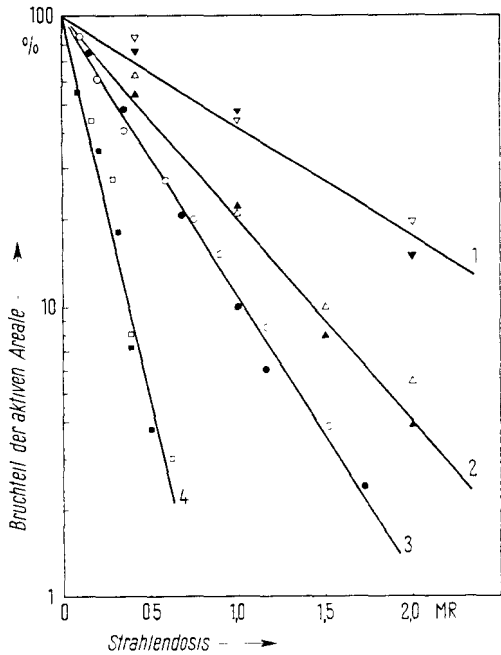
Die Bestimmung der in der Probe absorbierten Röntgenstrahlung erfolgte mittels des sog. Fricke-Aktinometers (*Fricke* u. *Morse*, 1927, NBS-Handbook 78, 1961). Mit Hilfe einer parallel zur chemischen Dosimetrie durchgeführten Messung mit einer unter dem Bestrahlungsgefäß angebrachten Duplex-Weichstrahlionsationskammer (Physikalisch-Technische Werkstätten, Freiburg/BrsG.) wurde die letztere geeicht und zur Routinedosisbestimmung bei jeder Bestrahlung verwendet. Für die Dosimetrie der <sup>60</sup>Co-Gammastrahlung dienten als Ausgangspunkt die Eichkurven und Isodosenkurven der Bestrahlungskammern, die wir mit Hilfe des Fricke-Aktinometers verifizierten.

Als Suspensionsmedium dienten 1. Bouillon, bestehend aus 40 g Bacto Nutrient Broth und 5 g NaCl pro Liter dest. Wasser, 2. Hefeextrakt (80 g Bacto Yeast pro Liter dest. Wasser) und 3. 0,06 molarer Phosphatpuffer nach *Sørensen* (pH 8,2). Die Rezeptorstamm suspension (1000 bis 2000 E/ml Puffer) wurde mit einem der angeführten Medien auf die für die Versuche vorgesehene Konzentration verdünnt. Da der verdünnte Rezeptor vor der Bestrahlung so lange stehen muß, bis er einen konstanten E-Titer erreicht hat, d. h., bis Aggregate, die sich in höherer Konzentration (> 500 E/ml) leicht bilden, gelöst sind, stellten wir in der Regel eine für eine größere Versuchsreihe ausreichende Menge in entsprechender Verdünnung her. Für den verwendeten Stickstoff (Firma Osram, Berlin) wird eine Zusammensetzung von etwa 99% Stickstoff, etwa 1% Argon, weniger als 0,001% Wasserstoff und Kohlenwasserstoffe angegeben; das sauerstofffreie Gas ist über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet. Das Schwefelwasserstoffgas (Firma Gerling Holz & Co., Hanau) enthielt etwa 97% Schwefelwasserstoff und etwa 3% Wasserstoff; der Sauerstoff (Firma Knapsack-Griesheim AG) 99,7% Sauerstoff und 0,3% Wasserstoff und Kohlendioxyd. Cysteamin (L-Cysteinamin purum) bezogen wir von der Firma Fluka, Schweiz, Cysteamin·HCl von der Firma Light, England, und Cystamin·2 HCl (A Grade) von der Firma Calbiochem, USA. Keines der Suspensionsmittel, Chemikalien und Gase beeinflusste als solches die Rezeptoraktivität.

In den Versuchen unter anaeroben Bedingungen wurde die tatsächliche Sauerstoffkonzentration in den Proben mit Hilfe des von *Tödt* (1958) entwickelten Sauerstoffmeßgerätes bestimmt. Sie betrug nach der üblichen Vorbehandlung mit Stickstoff

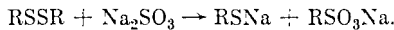
Abb. 1. Inaktivierung des T5-Rezeptors durch ionisierende Strahlen. Bestrahlung in Phosphatpuffer unter Stickstoff (geschlossene Symbole) bzw Sauerstoff (offene Symbole). Dosisleistung:  $3,5 \cdot 10^5$  R/min (Röntgenbestrahlung) bzw.  $1,7 \cdot 10^4$  R/min ( $\gamma$ -Bestrahlung).

- 1 = 200 E/ml, Röntgenbestrahlung ( $\nabla \triangle$ )
- 2 = 50 E/ml, Röntgenbestrahlung ( $\blacktriangle \triangle$ )
- 3 = 200 E/ml,  $\gamma$ -Bestrahlung ( $\bullet \circ$ )
- 4 = 50 E/ml,  $\gamma$ -Bestrahlung ( $\blacksquare \square$ )



$0,04 \mu \text{O}_2/\text{ml}$ , ein Wert, der mit den Angaben anderer Autoren (z. B. *Kohn u. Gunter*, 1960) für sauerstoff-, „freie“ Lösungen gut übereinstimmt.

Die quantitative Bestimmung freier SH-Gruppen in den Suspensionsmedien erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden: Die Bestimmung mit p-Chloromercuribenzoat als Reagens und Natrium-Nitroprussid als Farbindikator (*MacDonnell, Silva u. Feeney*, 1951) sowie die amperometrische Bestimmung mit Silbernitrat unter Benutzung der rotierenden Platinelektrode (*Kolthoff u. Harris*, 1946; *Kolthoff u. Stricks*, 1950). Um Disulfidgruppen zu bestimmen, werden sie zunächst mit 0.1 molarer  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -Lösung reduziert:



Die dabei frei werdenden SH-Gruppen titriert man nach der oben beschriebenen Methode.

Alle Versuche wurden bis zu einer Rezeptor-, „Überlebens“-Rate von etwa  $10^{-2}$  durchgeführt. Jeder Meßpunkt ist der Mittelwert von mindestens zwei Bestimmungen. Sowohl die Dosiseffektkurven als auch die Mutungsgrenzen (für  $P = 0.05$ ) wurden mit Hilfe der Varianzanalyse (*Quenouille*, 1953) ermittelt, wobei den Berechnungen logarithmisch transformierte Einzelwerte zugrunde lagen. Alle von uns erhaltenen Kurven sind exponentielle Gerade, die sich durch die Gleichung

$$N/N_0 = e^{-\alpha D}$$

wiedergeben lassen.  $N_0$  ist die Zahl der bestrahlten Rezeptorareale,  $N$  die Zahl der nach der Bestrahlung mit der Dosis  $D$  noch aktiven Areale. Die Neigung der Geraden ist durch den Exponenten  $\alpha$  gekennzeichnet. Wenn – wie in unserem Fall – exponentielle Dosiseffektkurven vorliegen, ist es allgemein üblich, sie durch Angabe derjenigen Strahlendosis zu charakterisieren, bei der der Bruchteil nicht geschädigter Einheiten  $e^{-1} = 37\%$  beträgt (sog.  $D_{37\%}$ ).

Tabelle 1. Inaktivierungsdosen ( $D_{37\%}$  in MR und Mutungsgrenzen für  $P = 0,05$ ) bei Bestrahlung des T5-Rezeptors in Phosphatpuffer unter verschiedenen Bedingungen.

Strahlenart	R/min	Gas	
		N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
Konzentration: 500 E/ml			
Röntgenstrahlen	$3,5 \cdot 10^5$	$1,18 \pm 0,09$	$1,20 \pm 0,08$
Röntgenstrahlen	$2,0 \cdot 10^4$	$1,25 \pm 0,10$	—
$\gamma$ -Strahlen	$1,5 \cdot 10^4$	$0,42 \pm 0,05$	$0,44 \pm 0,04$
$\gamma$ -Strahlen	$1,7 \cdot 10^3$	$0,45 \pm 0,04$	—
Konzentration: 200 E/ml			
Röntgenstrahlen	$3,5 \cdot 10^5$	$1,14 \pm 0,08$	$1,16 \pm 0,08$
Röntgenstrahlen	$2,0 \cdot 10^4$	$1,16 \pm 0,06$	—
$\gamma$ -Strahlen	$1,5 \cdot 10^4$	$0,45 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,03$
$\gamma$ -Strahlen	$1,7 \cdot 10^3$	$0,47 \pm 0,03$	—
Konzentration: 50 E/ml			
Röntgenstrahlen	$3,5 \cdot 10^5$	$0,63 \pm 0,07$	$0,68 \pm 0,08$
Röntgenstrahlen	$2,0 \cdot 10^4$	$0,58 \pm 0,08$	—
$\gamma$ -Strahlen	$1,5 \cdot 10^4$	$0,16 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$
$\gamma$ -Strahlen	$1,7 \cdot 10^3$	$0,17 \pm 0,02$	—

### C. Ergebnisse

#### I. Bestrahlung in Pufferlösung

Bei Bestrahlung von T5-Rezeptor in 0,06 molarem Phosphatpuffer ( $p_H$  8,2) mit weichen Röntgenstrahlen unter anaeroben Bedingungen ergeben sich Inaktivierungskurven, die in dem untersuchten Dosisbereich keine Abweichungen von einem exponentiellen Verlauf zeigen (Abb. 1). Ihre Neigung hängt, wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, von der Konzentration des Rezeptors ab: Die  $D_{37\%}$  für eine Konzentration von 50 bis 70 E/ml Puffer beträgt 0,625 MR; erhöht man die Konzentration auf etwa 200 E/ml, so nimmt die  $D_{37\%}$  auf 1,14 MR zu, d. h., die Strahlenempfindlichkeit des Rezeptors wird um den Faktor 1,8 herabgesetzt. Eine weitere Konzentrationserhöhung von 200 auf 500 E/ml bleibt dagegen ohne Einfluß auf die Inaktivierungsdosis. Noch höhere Konzentrationen konnten nicht untersucht werden, da der T5-Rezeptor bei Konzentrationen von  $> 500$  E/ml zu einer Aggregation neigt, so daß eine exakte Aktivitätsbestimmung nicht mehr möglich ist. Suspensionen mit weniger als 50 E/ml konnten ebenfalls nicht verwendet werden, da in diesem Fall die Genauigkeit des kinetischen Tests nicht mehr ausreicht.

Die Gammabestrahlung von Rezeptorsuspensionen führt zu einer erheblich stärkeren Inaktivierung als Röntgenbestrahlung (Tab. 1). Der Unterschied ist besonders bei der niedrigen Rezeptorkonzentration von 50 bis 70 E/ml ausgeprägt; die  $D_{37\%}$  beträgt 0,16 MR. Bei einer Konzentration von  $> 200$  E/ml ist die  $D_{37\%}$  0,45 MR. Die relative biologische Wirksamkeit (RBW) irgendeiner Strahlenart — relativ, indem die Gammastrahlung des  $^{60}\text{Co}$  als Vergleichsstrahlung gewählt wird — ist definiert als das Verhältnis gleich wirksamer



Tabelle 2. Inaktivierungsdosen (D 37% in MR und Mutungsgrenzen für P = 0,05) bei Röntgenbestrahlung ( $3,5 \cdot 10^5$  R/min) des T5-Rezeptors (200 E/ml) in Phosphatpuffer nach Zusatz verschiedener Stoffe.

Zusatz von		Gas	
		N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
—		1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Glukose	4,0%	4,7 ± 0,8	4,6 ± 1,1
Glukose	20,0%	9,7 ± 1,3	9,8 ± 1,4
Glukose	30,0%	9,8 ± 1,8	9,7 ± 1,6
Bouillon	0,4%	7,1 ± 0,8	7,0 ± 1,0
Bouillon	1,0%	9,7 ± 1,3	9,8 ± 0,7
Bouillon	10,0%	9,8 ± 1,5	9,6 ± 0,6
Hefextrakt	4,0%	10,0 ± 1,0	9,9 ± 0,8
Hefextrakt	8,0%	15,4 ± 1,6	16,2 ± 1,7

Strahlendosen, d. h. in unserem Fall durch D 37% Gamma / D 37% Röntgen. Die RBW beträgt somit für die niedrige Konzentration 0,26, für die höhere 0,40.

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen Versuche unterscheiden sich allerdings in der Dosisleistung, die im Fall der Gammaquelle  $1,5 \cdot 10^4$  R/min und bei der Röntgenbestrahlung  $3,5 \cdot 10^5$  R/min betrug. Dies bedeutet, daß die Bestrahlungszeiten bei der Gammaquelle rund 20mal größer waren. Es war deshalb notwendig zu prüfen, ob die Unterschiede in der Wirksamkeit der Röntgen- und Gammastrahlen nicht nur eine Folge der unterschiedlichen Dosisleistung sind. Wir führten zu diesem Zweck Röntgenbestrahlungen mit einer Dosisleistung von  $2 \cdot 10^4$  R/min und Gammabestrahlungen mit einer solchen von  $1,7 \cdot 10^3$  R/min durch. Die in Tabelle 1 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen jedoch, daß die Dosisleistung offenbar ohne Einfluß ist, so daß die weiter oben angeführten RBW-Werte als reell anzusehen sind.

Tabelle 1 ist weiter zu entnehmen, daß bei den gegebenen Rezeptorkonzentrationen kein Unterschied zwischen Bestrahlungen besteht, die in Gegenwart oder Abwesenheit von Sauerstoff ausgeführt wurden.

## II. Bestrahlung in anderen Medien

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse von Versuchen, in denen der Rezeptor (in einer Konzentration von 200 E/ml) in Puffer bestrahlt wurde, der Bouillon, Hefextrakt bzw. Glukose in verschiedenen Konzentrationen enthielt. Die D 37% ist in allen Medien im Vergleich zum reinen Puffer erhöht, wobei deutliche Unterschiede in der Wirksamkeit der einzelnen „Fremd“-Substanzen vorliegen: Während im Fall der Bouillon im Bereich von 0,8 bis 8% offenbar ein Plateau auftritt, d. h., die Strahlensensibilität des Rezeptors trotz zunehmender Konzentration konstant bleibt, scheint der maximale Schutzeffekt des Hefextraktes erst bei einer höheren Konzentration erreicht zu sein, wobei der Schutz allerdings statistisch gesichert stärker als der von Bouillon ist. Die Wirksamkeit 20%iger Glukose ist der von Bouillon vergleichbar, im niederen Konzentrationsbereich ist Glukose dagegen den anderen Medien deutlich unterlegen. Die Dosis-

Tabelle 3. Inaktivierungsdosen ( $D_{37\%}$  in MR und Mutungsgrenzen für  $P = 0,05$ ) bei Bestrahlung des T5-Rezeptors in 4%iger Bouillon unter verschiedenen Bedingungen.

Strahlenart	R/min	Gas	
		N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
Konzentration: 200 E/ml			
Röntgenstrahlen	$3,5 \cdot 10^5$	$9,7 \pm 1,3$	$9,8 \pm 0,7$
Röntgenstrahlen	$2,0 \cdot 10^4$	$10,4 \pm 0,9$	—
$\gamma$ -Strahlen	$1,5 \cdot 10^4$	$5,8 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,4$
$\gamma$ -Strahlen	$1,7 \cdot 10^3$	$6,2 \pm 0,4$	—
Konzentration: 50 E/ml			
Röntgenstrahlen	$3,5 \cdot 10^5$	$9,6 \pm 1,2$	$9,5 \pm 0,9$
Röntgenstrahlen	$2,0 \cdot 10^4$	$9,7 \pm 0,9$	—
$\gamma$ -Strahlen	$1,5 \cdot 10^4$	$6,2 \pm 0,4$	$6,4 \pm 0,4$
$\gamma$ -Strahlen	$1,7 \cdot 10^3$	$6,1 \pm 0,4$	—

abhängigkeit der Rezeptorinaktivierung folgt, wie auch bei Bestrahlung in reinem Puffer, einer einfachen exponentiellen Beziehung. Desgleichen ist die Wirksamkeit einer Bestrahlung unabhängig davon, ob sie unter aeroben oder anaeroben Bedingungen durchgeführt wird (Tab. 2).

Im Gegensatz zu den Versuchen mit Puffer steht jedoch die Tatsache, daß die Inaktivierungsdosen in Bouillon und Hefeextrakt unabhängig von der Rezeptorkonzentration sind (Tab. 3 u. 4). Die in den Tabellen zusammengestellten Daten zeigen weiterhin, daß die Gammastrahlen wiederum wirksamer als weiche Röntgenstrahlen sind, daß aber die RBW mit einem Wert von rund 0,6 größer ist als bei Bestrahlung in Puffer (vgl. oben), d. h. der LET-Einfluß ist schwächer ausgeprägt. Eine Abhängigkeit von der Dosisleistung war weder bei Röntgen- noch bei Gammastrahlen festzustellen. Sulfhydrylgruppen enthaltende Substanzen, insbesondere der Cystein-Cysteamin-Gruppe, gehören zu den wirksamsten und deshalb auch am eingehendsten untersuchten Strahlenschutzstoffen (Bibliographie bei *Bacq* u. *Alexander*, 1955; *Eldjarn* u. *Pihl*, 1960). Für unsere Untersuchungen wählten wir das Cysteamin, da Cystein durch hohe Strahledosen, wie sie zur Inaktivierung des Rezeptors benötigt werden, leichter als

Tabelle 4. Inaktivierungsdosen ( $D_{37\%}$  in MR und Mutungsgrenzen für  $P = 0,05$ ) bei Bestrahlung des T5-Rezeptors in 8%igem Hefeextrakt unter verschiedenen Bedingungen. Dosisleistung:  $3,5 \cdot 10^5$  R/min (Röntgenbestrahlung) bzw.  $1,7 \cdot 10^4$  R/min (Gammastrahlung).

Strahlenart	Konzentration (E/ml)	Gas	
		N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
Röntgenstrahlen	200	$15,4 \pm 1,6$	$16,2 \pm 1,7$
Röntgenstrahlen	50	$16,3 \pm 1,5$	$15,8 \pm 1,6$
$\gamma$ -Strahlen	200	$9,2 \pm 0,6$	$9,5 \pm 0,8$
$\gamma$ -Strahlen	50	$9,0 \pm 0,7$	$9,4 \pm 1,0$

Tabelle 5. Inaktivierungsdosen ( $D_{37\%}$  in MR und Mutungsgrenzen für  $P = 0,05$ ) bei Röntgenbestrahlung ( $3,5 \cdot 10^5$  R/min) des T5-Rezeptors in Phosphatpuffer nach Zusatz schwefelhaltiger Schutzstoffe.

Zusatz von	Gas	
	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
—	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$
Schwefel kolloidal etwa 1 ‰	$9,5 \pm 0,8$	$9,3 \pm 0,6$
Schwefelwasserstoff 0,3 ‰	$10,6 \pm 1,2$	—
Cysteamin · HCl 1 ‰	$10,8 \pm 1,1$	$12,0 \pm 1,4$

Cysteamin zerstört wird und es daher zu einem Verlust der Schutzwirkung kommt (Hotz, 1961). Zusatz von Cysteamin zu Puffer (Tab. 5) führt zu einer Erhöhung der  $D_{37\%}$  in praktisch dem gleichen Maße, wie sie durch Zusatz von Bouillon oder Glukose erreicht wird (vgl. Tab. 2). Die  $D_{37\%}$  ist bei aerober Bestrahlung etwas höher als bei anaerober Bestrahlung, doch ist der Unterschied nur geringfügig und auch statistisch nicht gesichert. Zusatz von Cysteamin — unabhängig davon, ob es sich um die Base oder das Hydrochlorid handelt — zur Bouillon hat dagegen einen relativ geringen und in der Regel nicht gesicherten Einfluß auf die Überlebensrate (Tab. 6); im Hinblick auf die nicht zu übersehende Gleichsinnigkeit der Ergebnisse bei allen Versuchsvarianten sind wir jedoch geneigt, die Schutzwirkung des Cysteamin auch in diesem Fall für reell anzusehen. Sie kommt einem Dosisreduktionsfaktor (DRF) von etwa 1,15 gleich und ist damit allerdings erheblich geringer als bei Bestrahlung in Puffer, bei dem der DRF des Cysteamin 9,5 beträgt. Eine Erhöhung der Cysteaminkonzentration von 0,01 auf 0,15 molar war ohne Einfluß auf die Schutzwirksamkeit. Die Untersuchung noch höherer Konzentrationen war wegen der toxischen Wirkung des Cysteamin auf den Testphagen T5 nicht möglich.

Vergleicht man die Inaktivierungsdosen bei Anwesenheit von Cysteamin unter aeroben und anaeroben Bedingungen, so ist unverkennbar, daß die Inaktivierungsdosen bei Bestrahlung unter Sauerstoff durchgehend höher liegen (Tab. 5 u. 6). Obwohl auch hier der Unterschied in der Regel statistische Signifikanz

Tabelle 6. Inaktivierungsdosen ( $D_{37\%}$  in MR und Mutungsgrenzen für  $P = 0,05$ ) bei Röntgenbestrahlung ( $3,5 \cdot 10^5$  R/min) des T5-Rezeptors in 4%iger Bouillon nach Zusatz schwefelhaltiger Schutzstoffe.

Zusatz von	Gas	
	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
—	$9,7 \pm 1,3$	$9,8 \pm 0,7$
Schwefelwasserstoff	$10,5 \pm 0,9$	—
Cysteamin Base 0,01 molar	$11,3 \pm 1,0$	$11,0 \pm 1,5$
Cysteamin Base 0,15 molar	$11,2 \pm 1,9$	$13,6 \pm 1,5$
Cysteamin · HCl 0,15 molar	$11,4 \pm 1,2$	$13,8 \pm 1,6$
Cystamin · 2 HCl 0,005 molar	$13,6 \pm 1,8$	$13,5 \pm 1,6$
Cystamin · 2 HCl 0,1 molar	$17,4 \pm 1,2$	$20,4 \pm 1,5$

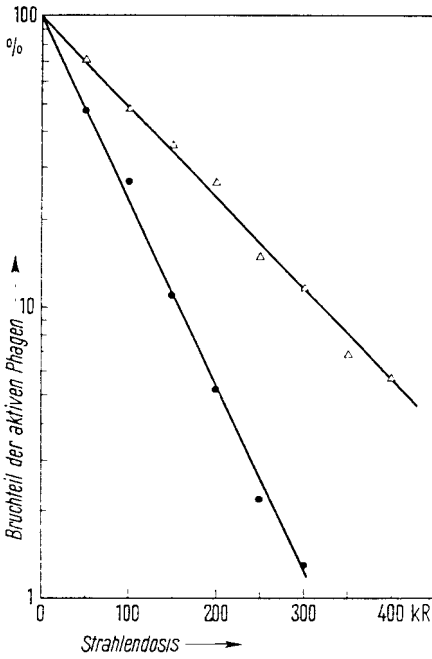


Abb. 2

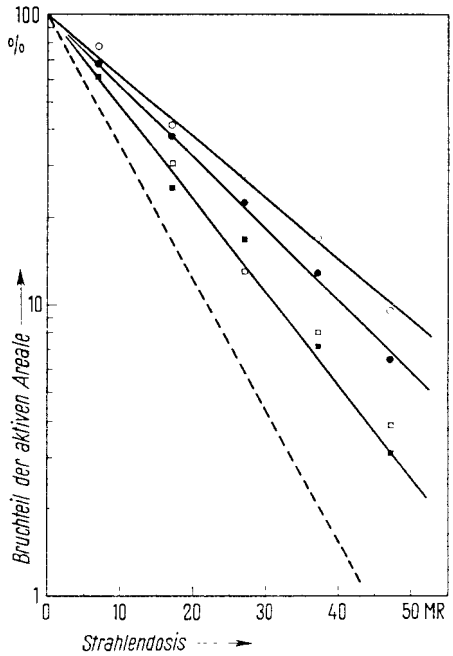


Abb. 3

Abb. 2 Inaktivierung von T5-Phagen durch Röntgenstrahlen ( $3,5 \cdot 10^5$  R/min). Bestrahlung in 4%iger Bouillon unter Stickstoff (●) bzw. Schwefelwasserstoff (△). — Abb. 3. Inaktivierung des T5-Rezeptors (200 E/ml) durch Röntgenstrahlen ( $3,5 \cdot 10^5$  R/min). Bestrahlung in 4%iger Bouillon unter Stickstoff: — — —, mit Zusatz von 0,005 molar (■ □) und 0,1 molar (● ○) Cystamin unter Stickstoff (geschlossene Symbole) bzw. Sauerstoff (offene Symbole)

nicht erreicht, halten wir ihn wegen der Reproduzierbarkeit bei allen Versuchsvarianten für reell. Der Dosisreduktionsfaktor würde sich somit von 1,15 bei anaerober Bestrahlung auf 1,4 bei aerober Bestrahlung erhöhen. Da die zur Inaktivierung des T5-Rezeptors benötigten Strahlendosen um etwa eine Größenordnung höher liegen als bei den meisten anderen bisher untersuchten biologischen Objekten, war es nicht ausgeschlossen, daß die Schutzwirksamkeit des Cysteamin in unserem Fall abgeschwächt wird, und zwar infolge einer strahlenchemischen Umsetzung des Cysteamin und eines Verlustes an SH-Gruppen, denen allgemein die entscheidende Rolle bei der Schutzwirkung zugeschrieben wird. Wir führten daher eine Bestrahlung von Rezeptor in Puffer bzw. Bouillon durch, wobei während der gesamten Bestrahlung Schwefelwasserstoff durch das Suspensionsmedium geleitet wurde, so daß eine konstante und mit 0,1 molar gesättigte  $H_2S$ -Konzentration vorlag. Es ist nämlich bekannt, daß  $H_2S$  die Strahlenempfindlichkeit von Bakteriosporen (Powers u. Kaleta, 1960), Pflanzensamen (Ehrenberg u. Nybom, 1954) in gleichem Maße wie Cystein oder Cysteamin herabsetzt. Abbildung 2 sowie die Tabellen 5 und 6 zeigen, daß  $H_2S$  sowohl in Puffer als auch in Bouillon praktisch die gleichen  $D_{37\%}$ -Werte wie Cysteamin zeigt. Bei Bestrahlung in reinem Puffer trat bereits nach kurzer Bestrahlungszeit eine starke Trübung der Suspension auf, die offenbar von ausgefallenem Schwefel herrührte. Ein entsprechender Kontrollversuch, in dem der

Tabelle 7. Konzentration der SH- bzw. S-S-Gruppen in Lösungen von Cystein, Cysteamin und Cystamin unter dem Einfluß von Sauerstoff. Die Konzentrationen, bestimmt mit Hilfe der amperometrischen (a) und der titrimetrischen Methode (b), sind in Prozent der Kontrolle (Bestimmung sofort nach Ansetzen der Lösungen) ausgedrückt. Molarität der Ausgangslösungen: 0,1 molar in bidest. Wasser (pH 5).

Behandlung der Lösungen	SH-Gruppen				S-S-Gruppen	
	Cystein-Base		Cysteamin-Base		Cystamin · 2HCl	
	a	b	a	b	a	b
15 min mit O <sub>2</sub> äquilibriert	100	100	100	100	100	100
90 min mit O <sub>2</sub> äquilibriert	72	95	84	96	99	100
24 Stunden offen an der Luft gestanden	46	51	70	74	95	100

Rezeptor in einer etwa 1%igen Schwefelmilch unter Stickstoff bestrahlt wurde, ergab die gleiche D 37% wie bei Bestrahlung in gesättigter H<sub>2</sub>S-Lösung (Tab. 5).

Das Oxydationsprodukt des Cysteamin, das Cystamin · 2 HCl, zeigt erheblich größere Schutzwirksamkeit als Cysteamin (Tab. 6, Abb. 3): Bereits eine 0,005 molare Konzentration ergibt einen signifikanten und von der Anwesenheit von Sauerstoff unabhängigen Schutz (DRF = 1,4). Bei Erhöhung der Cystamin-konzentration auf 0,1 molar erreichten wir einen DRF von 1,8, der sich bei Anwesenheit von Sauerstoff noch signifikant auf 2,2 erhöht.

### III. Bestimmungen von SH- und S-S-Gruppen

Da die Inaktivierungsdosen des T5-Rezeptors im Vergleich zu anderen biologischen Objekten besonders hoch liegen, mußte mit der Möglichkeit einer strahlenchemischen Umsetzung der Cysteamin- bzw. Cystaminlösungen gerechnet werden. Es war deshalb nicht unwesentlich, zu prüfen, ob sich die Konzentration der SH- bzw. S-S-Gruppen unter dem Einfluß der Strahlung, aber auch unter dem Einfluß von Sauerstoff verändert. Zunächst untersuchten wir den Einfluß von Sauerstoff auf Cysteamin- und Cystaminlösungen; zum Vergleich wurde auch Cystein herangezogen. Die anfängliche Konzentration der Lösungen war 0,1 molar, Lösungsmittel war dest. Wasser (pH 5) bzw. Bouillon (pH 8), nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß in Bouillon, auch nach Bestrahlung, weder SH- noch S-S-Gruppen nachweisbar sind. Die in Tabelle 7 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß die SH-Konzentration nur bei längerer Einwirkung von Luftsauerstoff abnimmt, und zwar bei Cystein in stärkerem Maße als bei Cysteamin. Die S-S-Konzentration des Cystamin blieb praktisch unverändert. Abbildung 4 zeigt Ergebnisse eines Versuchs, in dem Cysteamin, in 4%iger Bouillon gelöst, mit Röntgendosen bis zu 40 MR bestrahlt wurde. In einem aliquoten Teil der bestrahlten Lösung bestimmten wir freie SH-Gruppen, in einem anderen Teil die SH-Gruppen nach Zusatz eines Reduktionsmittels, d. h. die Disulfidgruppen. Bei Bestrahlung unter Sauerstoff kann die Abnahme der SH-Konzentration nur zum Teil auf eine Zerstörung der SH-Gruppen zurückgeführt werden; es tritt vielmehr daneben eine Oxydation zum Disulfid auf, die maximal etwa 5% ausmacht. Bei Bestrahlung unter Stickstoff dagegen konnten wir im gesamten Dosisbereich Disulfidgruppen nicht nachweisen. Ein unter

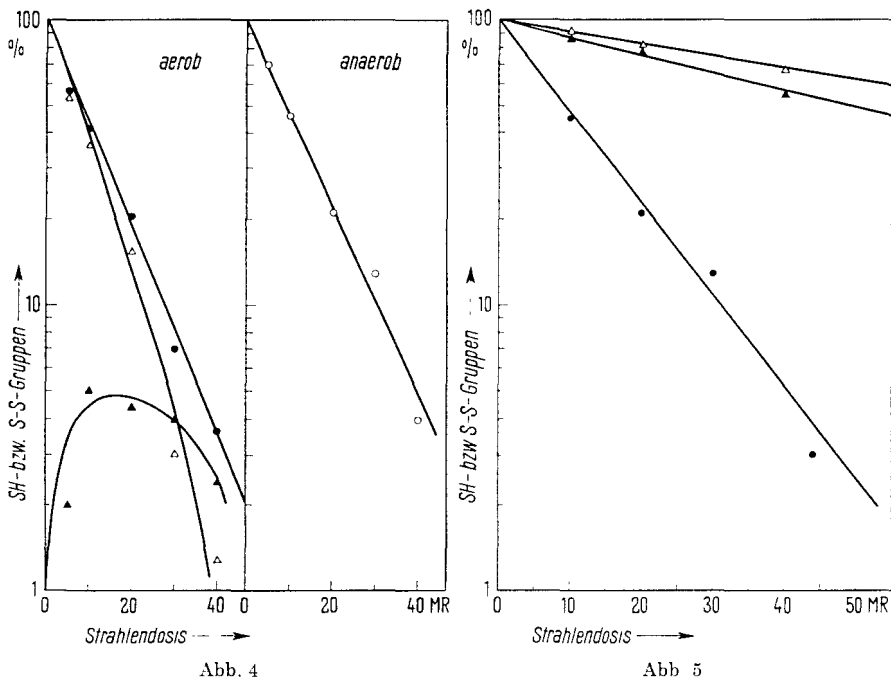


Abb. 4 Zerstörung von Cysteamin durch Röntgenstrahlen ( $3,5 \cdot 10^5$  R/min). Bestrahlung einer 0,1 molaren Cysteaminlösung (= 100%) in 4%iger Bouillon. Unter Sauerstoff Freie SH-Gruppen ( $\Delta$ ), S-S-Gruppen ( $\blacktriangle$ ), freie SH- + 2 · S-S-Gruppen ( $\bullet$ ). Unter Stickstoff. Freie SH-Gruppen ( $\circ$ ). — Abb. 5. Zerstörung von Cysteamin ( $\bullet$ ) bzw. Cystamin ( $\blacktriangle$ ) durch Röntgenstrahlen ( $3,5 \cdot 10^5$  R/min). Bestrahlung 0,1 molarer Lösungen (= 100%) in 4%iger Bouillon unter Stickstoff (geschlossene Symbole) bzw. Sauerstoff (offene Symbole).

analogen Bedingungen durchgeführter Versuch mit Cystamin (Abb. 5) zeigte eine im Vergleich zu Cysteamin erheblich geringere Strahlenempfindlichkeit sowie das Auftreten freier SH-Gruppen, wobei die SH-Konzentration unter Stickstoff rund zweimal höher als unter Sauerstoff ist.

Von einigen Autoren (z. B. Braams, 1960) wird angegeben, daß Hefeextrakt freie SH-Gruppen enthält. In dem von uns verwendeten Hefeextrakt konnten wir bei  $p_H$  8 keine freien SH-Gruppen nachweisen, wohl aber etwa 0,002 Mole Disulfidgruppen pro Liter 8%igen Hefeextraktes. Der Widerspruch zu Braams dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach darauf zurückzuführen sein, daß die Bestimmungen von Braams bei  $p_H$  5 durchgeführt wurden.

#### D. Diskussion

Es ist zweckmäßig, die Bestrahlungsversuche in Puffer von den in anderen Medien gesondert zu besprechen, und zwar deswegen, weil — wie weiter unten erläutert wird — der Mechanismus der Strahlenwirkung bei den zwei Versuchsanordnungen grundsätzlich verschieden ist: Während in reinem Puffer sog. indirekte Wirkungen überwiegen, spielt bei Bestrahlung in Bouillon (oder ähnlichen Suspensionsmedien) die direkte Strahlenwirkung eine entscheidende Rolle.

## 1. Indirekte Strahlenwirkungen

Betrachten wir zunächst die Strahleninaktivierung des in reinem Puffer suspendierten T5-Rezeptors. Die höchste Rezeptorkonzentration betrug 500 E/ml; dies entspricht bei einem „Molekular“-Gewicht von  $1-4 \cdot 10^7$  (Weidel, Koch u. Bobosch, 1954) etwa 0,002 g/ml. Dazu kommt noch etwa die gleiche Menge an organischen Verunreinigungen, die sich bei der Aufarbeitung vom Rezeptor nicht trennen lassen. 1 ml Rezeptorsuspension (500 E/ml) enthält somit 1000 mg  $H_2O$ , 6,2 mg  $Na_2HPO_4$  und etwa 4 mg organische Substanz. Aus diesem Massenverhältnis folgt, daß der überwiegende Teil der Strahlenenergie nicht im Rezeptor selbst, sondern vom Wasser absorbiert wird. Die Inaktivierung des Rezeptors könnte somit vorwiegend auf Wasserradikale bzw. deren Reaktionsprodukte zurückzuführen sein. Daß dies tatsächlich der Fall ist, machen die Versuche wahrscheinlich, in denen bei Zusatz steigender Konzentrationen von „Fremd“-Substanzen die Inaktivierungsdosis zunächst zunimmt und dann einen konstanten Wert erreicht, der etwa das 10fache der Inaktivierungsdosis in reinem Puffer ausmacht. Der Unterschied in der Schutzwirksamkeit von Bouillon und Glukose besteht darin, daß zur Erreichung des (für beide Substanzen identischen) maximalen Schutzeffekts höhere Glukosekonzentrationen benötigt werden, d. h. daß Bouillon offenbar ein besserer Radikalfänger ist. Auffallend ist die besonders hohe Wirksamkeit des Hefeextraktes, auf die wir in einem späteren Zusammenhang ausführlicher zu sprechen kommen werden. Den auf indirekte Effekte zurückführbaren Anteil der Inaktivierung biologischer Einheiten kann man dadurch ermitteln, daß man von der durch Bestrahlung in wäßriger Lösung erhaltenen Inaktivierung die durch indirekte Strahlenwirkung erhaltene abzieht. Wenn die auf direkte und indirekte Effekte zurückzuführende Kurve (Bestrahlung in Puffer)  $N/N_0 = e^{-x_1 D}$  und die auf direkte Inaktivierung zurückzuführende (Bestrahlung in  $> 1\%$ iger Bouillon)  $N/N_0 = e^{-x_2 D}$  folgt, erhält man die Dosisabhängigkeit des indirekten Effekts allein durch  $N/N_0 = e^{-(x_1 + x_2) D}$ . Die entsprechenden für unsere Versuche durchgeführten Rechnungen zeigen, daß der Rezeptor in Puffer, wie oben vermutet, fast ausschließlich durch indirekte Strahlenwirkung inaktiviert wird. Der exponentielle Verlauf der Dosiseffekt-kurven weist ferner darauf hin, daß der bereits inaktivierte Rezeptor mit den Radikalen genauso leicht wie der aktive Rezeptor reagiert

Wie für indirekte Strahlenwirkungen zu erwarten, nimmt die relative Ausbeute mit steigender Rezeptorkonzentration ab. Betrachtet man nicht den Bruchteil, sondern die absolute Zahl inaktivierter Einheiten, so zeigt Tabelle 8, daß sie mit steigender Konzentration zunimmt. Diese Erhöhung des absoluten Umsatzes mit steigender Konzentration deutet darauf hin, daß offenbar bei einer Konzentration von 50 E/ml die Reaktion von Radikalen untereinander wahrscheinlicher wird als eine Reaktion mit dem Rezeptor. Aus Untersuchungen an Carboxypeptidase (Dale, Davies u. Meredith, 1949) und Tabakmosaikvirus (Lea, 1955) schloß man, daß erst bei Konzentrationen von  $> 0.1\%$ igem Protein die obige Möglichkeit auszuschließen ist. Da jedoch, wie früher erwähnt, 50 E/ml einer Konzentration von nur rund 0,04% organischer Substanz entsprechen, steht die festgestellte Abnahme der absoluten Ausbeute nicht im Widerspruch zu der Annahme einer indirekten Wirkung. Bei Bestrahlung von Rezeptor in Puffer mit Röntgen- bzw. Gammastrahlen fanden wir eine größere Wirkung der Gammastrahlen. Wie einer Zusammenstellung bei Hochanadel (1960) zu ent-

Tabelle 8. Abhängigkeit der Inaktivierung des T5-Rezeptors von der Konzentration (Suspensionsmittel: Phosphatpuffer).

Konzentration der Lösung (in E/ml)	Dosis in $10^5$ R		Zahl der je ml durch $10^5$ R inaktivierten E
	vor Bestrahlung	nach Bestrahlung	
10% Inaktivierung durch Röntgenstrahlen			
200	180	1,30	15,5
50	45	0,83	6
10% Inaktivierung durch $\gamma$ -Strahlen			
200	180	0,55	36
50	45	0,25	20

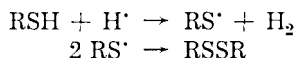
nehmen ist, nimmt die Radikalausbeute bei einem LET-Wert, welcher der von uns verwendeten weichen Röntgenstrahlung entspricht, im Vergleich zur Gammastrahlung des  $^{60}\text{Co}$  merklich ab, während die Ausbeute an Molekularprodukten größer wird. Die kleinere RBW der Röntgenstrahlung läßt daher vermuten, daß die Primärradikale beim Rezeptor die wirksamen Agentien sind. Wir erwähnen in einem früheren Zusammenhang, daß erst bei der Dosisleistung von  $10^{10}$  rad  $\cdot$  min $^{-1}$  eine eindeutige Verminderung der Radikalausbeute auftritt. Für die wesentlich niedrigeren Dosisleistungen in unseren Versuchen war somit ein Zeitfaktor von vornherein nicht zu erwarten und wurde auch nicht beobachtet.

Bereits die im Vergleich zur Gammastrahlung geringere Wirksamkeit der Röntgenstrahlung ließ vermuten, daß die Primärradikale bei der indirekten Strahleninaktivierung des Rezeptors eine wesentliche Rolle spielen. In die gleiche Richtung weist auch die Tatsache, daß die Inaktivierungsdosen bei Anwesenheit und Ausschluß von Sauerstoff identisch sind. Wären nämlich  $\text{HO}_2$  oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  die wirksamen Agentien, so müßte eine Bestrahlung unter aeroben Bedingungen, zumindest im Fall der Gammastrahlung, wirksamer sein. Die Anwesenheit von Sauerstoff beeinflußt die Ausbeute an  $\text{OH}^{\cdot}$ -Radikalen nicht, vermindert aber die von  $\text{H}^{\cdot}$  und  $\text{H}_2\text{O}^{\cdot}$ , so daß — falls  $\text{H}^{\cdot}$  und  $\text{H}_2\text{O}^{\cdot}$  die wirksamen Agentien wären — Sauerstoff einen Schutz ausüben sollte. Da dies aber nicht der Fall ist, könnte man annehmen, daß  $\text{OH}^{\cdot}$  das wirksame Agens ist. Dieser Schluß ist jedoch insofern verfrüht, als unsere Versuche im basischen Bereich durchgeführt wurden und es bekannt ist, daß bei niedrigen  $\text{pH}$ -Werten die Abnahme der  $\text{H}^{\cdot}$ -Ausbeute bei Anwesenheit von Sauerstoff kleiner oder sogar ganz aufgehoben sein kann (*Alper, 1955; Butler u. Robins, 1961*). Eine Klärung dieser Frage durch Bestrahlungsversuche bei niedrigem  $\text{pH}$  war nicht möglich, da die Aktivität des T5-Rezeptors bei  $\text{pH} \leq 5$  verlorengeht.

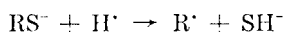
Unsere Resultate über den Einfluß von Cysteamin und Schwefelwasserstoff auf die Strahlenempfindlichkeit des Rezeptors — wir finden einen Dosisreduktionsfaktor (DRF) von rund 10 — stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen an anderen biologischen Elementareinheiten (z. B. *Charlesby, Garrat u. Kopp, 1962; Dickens u. Shapiro, 1961; Latarjet, Ekert u. Demerseman, 1963; Quintiliani u. Boccacci, 1963*). Die Schutzwirksamkeit von Sulfhydrylverbindungen im Fall indirekter Strahlenwirkungen wird allgemein auf ihre Eigen-



schaften als Radikalfänger zurückgeführt (Dale u. Davies, 1951). Entgegen der häufig vorgebrachten Ansicht (z. B. Barron u. Flood, 1950), daß die SH-Schutzsubstanzen nur mit oxydierenden Radikalen bzw. ihren Sekundärprodukten, d. h. OH<sup>•</sup>, HO<sub>2</sub><sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reagieren, ist zu betonen, daß nach Littman, Carr und Brady (1957) auch ein Abfangen der reduzierenden H<sup>•</sup>-Radikale möglich ist, indem zum Beispiel Cystein im sauren p<sub>H</sub>-Bereich entsprechend



und im alkalischen Bereich entsprechend



reagiert. Da analoge Reaktionen auch für Cysteamin und H<sub>2</sub>S zu vermuten sind, lassen unsere Versuche mit SH-haltigen Substanzen ebenfalls keine Schlüsse über die Art der bei der indirekten Strahleninaktivierung des Rezeptors entscheidenden Radikale zu.

## II. Direkte Strahlenwirkungen

Wie in dem vorangehenden Abschnitt ausgeführt wurde, kann mit einer gewissen Berechtigung angenommen werden, daß bei Bestrahlung von Rezeptor in  $\geq 1\%$  Bouillon direkte Wirkungen stark überwiegen. Untersuchungen an Bakteriophagen (Hotz u. Zimmer, 1963), in denen gezeigt wurde, daß — obwohl die Konzentrationserhöhung eines Radikalfängers keinen zusätzlichen Schutz mehr ergibt — die Bestrahlung in trockenem Zustand zu einer weiteren Erhöhung der Inaktivierungsdosis führt, weisen allerdings darauf hin, daß auch bei Zusatz von Schutzsubstanzen ein kleiner Bruchteil der Effekte noch indirekt bedingt ist. Dies hängt vermutlich von der Konfiguration der bestrahlten Einheiten, d. h. vom Verhältnis der Oberfläche zum Volumen, ab: bei großer Oberfläche wäre der Einfluß indirekter Effekte besonders stark ausgeprägt (Latarjet, 1959; Bhattacharjee u. Das Gupta, 1961). Nach Hutchinson (1962) können gelöste Stoffe (z. B. Enzyme) von einer Wasserhülle umgeben sein, deren Dicke bis zu 30 Å betragen kann. In der gleichen Größenordnung liegt aber auch die mittlere Diffusionsstrecke von Radikalen. Da eine Trocknung des Rezeptors mit einem Aktivitätsverlust verbunden ist, mußten wir auf entsprechende Versuche verzichten.

Nach den Vorstellungen der Treffertheorie wird eine strahleninduzierte Veränderung durch eine bestimmte Mindestanzahl von Absorptionseignissen in einem für die Aktivität des Objektes wesentlichen Teilvolumen (oder seiner nächsten Umgebung), dem sog. Trefferbereich, hervorgerufen. Oft sind die Absorptionseignisse mit Ionisationen gleichzusetzen, die beim Durchgang eines geladenen Teilchens im Trefferbereich auftreten. Sowohl die Anzahl der „Treffer“ als auch die Trefferbereiche hängen von der Art des biologischen Objektes ab. Der einfachste (und aller Wahrscheinlichkeit nach auch für den Rezeptor zutreffende) Fall ist der, daß ein Absorptionseignis in *einem* Trefferbereich genügt, um den Effekt auszulösen. Da die Treffer voneinander unabhängig und statistisch verteilt sind, ist die Poissonverteilung anwendbar, d. h., der Bruchteil nichtgeschädigter Einheiten nimmt mit steigender Dosis exponentiell ab ( $N/N_0 = e^{-\lambda D}$ ). Derartige Eintrefferkurven können aber auch durch Überlagerung mehrerer Mehrtrefferkurven vorgetäuscht werden (Dittrich, 1960; Zimmer, 1960), so daß die

Feststellung einer exponentiellen Dosisabhängigkeit allein noch keinen eindeutigen Beweis für ein Eintrefferereignis darstellt. Es müssen noch weitere Kriterien erfüllt sein, wie zum Beispiel die Unabhängigkeit der Inaktivierungsrate von der Dosisleistung. Wesentlich ist weiterhin die Abhängigkeit von der räumlichen Ionisierungsdichte der verwendeten Strahlung (LET). Bei Annahme eines in einem Ionisationsereignis bestehenden Treffers in einem Treffbereich sollte die Wirksamkeit der Strahlen mit zunehmender Ionisierungsdichte abnehmen, da bei einem bestimmten LET-Wert damit zu rechnen ist, daß bei Durchgang eines geladenen Teilchens im Treffbereich mehr Ionisationen auftreten, als für die Inaktivierung benötigt werden, und die überzähligen Treffer zur Inaktivierung nicht mehr beitragen (sog. Sättigungseffekt). Die RBW nimmt dementsprechend ab, wie man es zum Beispiel beim Phagen S13 feststellte (Lea, 1955). Bei Mehrtrefferereignissen dagegen sollte die RBW mit steigendem LET-Wert im Sinne eines sog. Konzentrationseffektes zunehmen. Unter der Voraussetzung, daß die Wirkungswahrscheinlichkeit eines Treffers 1 ist, und wenn ein kugelförmiger Treffbereich angenommen wird, ist eine Berechnung der Größe des Treffbereichs möglich. Bei Strahlungen mit hoher Ionisierungsdichte muß bei den Berechnungen der sog. Überlappungsfaktor berücksichtigt werden (Lea, 1955): Denkt man sich um jede Ionisation ein kugelförmiges Volumen von der Größe des Treffbereichs, so werden sich die Kugeln mit zunehmender Ionisierungsdichte in immer stärkerem Maße überschneiden. Das gesamte von ihnen eingeschlossene, das sog. assoziierte Volumen ist um den Überlappungsfaktor  $F$  kleiner als das Produkt aus Treffbereichsvolumen und Zahl der Ionisationen. Dieser Faktor ist eine Funktion des Verhältnisses des Treffvolumens (berechnet für einen LET-Wert, bei der keine Überlappung stattfindet, d. h.  $F = 1$  ist) und der räumlichen Ionisationsdichte der dicht ionisierenden Strahlung.

Betrachten wir nun unter diesen Gesichtspunkten die Versuche, in denen der in 40/oiger Bouillon suspendierte Rezeptor bestrahlt wurde und für die wir annehmen, daß der überwiegende Teil der Inaktivierung auf direkte Strahleneffekte zurückzuführen ist. Aus dem exponentiellen Verlauf der Dosiseffektkurven sowie dem fehlenden Einfluß der Dosisleistung kann auf ein Eintrefferereignis geschlossen werden, und Berechnungen des Treffbereichsvolumens sind zulässig. Im Fall des niedrigen LET-Wertes der Gammastrahlung des  $^{60}\text{Co}$  hielten wir die Voraussetzungen für die Anwendbarkeit des einfachen „klassischen“ Ansatzes für erfüllt. Die Dosis  $D$ , die im Durchschnitt ein Absorptionsereignis pro Treffbereichsvolumen  $v$  hervorruft (d. h. die  $D$  37/o), ist diejenige Dosis, der  $1/v$  Absorptionsereignisse entsprechen, und wird in Einheiten der absorbierten Energie (rad) wiedergegeben. Den Berechnungen legten wir im einzelnen folgende Werte zugrunde: Dichte des Rezeptors  $\rho = 1,15$  (Weidel, Koch u. Bobosch, 1954);  $D$  37/o (Gammabestrahlung) =  $5,8 \cdot 10^6$  R;  $1 \text{ R} = 0,935$  rad, berechnet mit Hilfe der Tabellen für Massenabsorptionskoeffizienten (NBS-Handbook 78, 1961) für die atomare Zusammensetzung des T5-Rezeptors:  $1 \text{ rad} = 100 \text{ erg/g} = 6,24 \cdot 10^{13} \text{ eV/g}$ . Schließlich wurde angenommen, daß ein inaktivierendes Ereignis der Absorption von 100 eV entspricht, d. h. der Energieabgabe einer sog. Primärionisation, unter der eine Gruppe dicht benachbarter Ionisationen verstanden wird. Da Ionisationen in der Regel nicht einzeln, sondern bevorzugt in Häufchen auftreten, ist es auch zweckmäßig, eine Primärionisation und nicht eine Einzelionisation mit einer Energieabgabe von 38 eV als Treffereignis anzusehen. Wir erhalten mit diesen Zahlen  $v_1 = 2,57 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^3$ ,

wobei der Berechnung die Annahme eines kugelförmigen Treffvolumens zugrunde liegt, dessen Durchmesser somit  $79 \text{ \AA}$  beträgt. Führt man die gleiche Berechnung für weiche Röntgenstrahlen durch, so ergibt sich nach Einsetzen von  $D 37\% = 9,65 \cdot 10^6 \text{ R}$  und  $1 \text{ R} = 0,88 \text{ rad}$  ein Treffbereich von  $v_2 = 1,64 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^3$ . Dieser Wert muß jedoch noch durch den Überlappungsfaktor  $F$  korrigiert werden, der eine Funktion von  $v_1$  und der räumlichen Ionisierungsdichte der Röntgenstrahlung ( $\lambda_{\text{eff}} = 1,4 \text{ \AA}$ ) ist. Die letztere setzten wir mit der Ionisationsdichte monochromatischer Röntgenstrahlen der Wellenlänge  $\lambda = 1,5 \text{ \AA}$  gleich und erhielten nach Einsetzen des entsprechenden Wertes und des für Gammastrahlung errechneten Treffbereichsradius in die von *Lea* (1955) angegebene Tabelle für  $F$  einen Wert von 1,53. Damit ergibt sich  $v_3 = 1,53 \cdot 1,64 \cdot 10^{-19} = 2,51 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^3$ . Dieser Wert  $v_3$  kommt dem für Gammastrahlung errechneten Volumen  $v_1$  nahe. Aus der guten Übereinstimmung kann geschlossen werden, daß die bereits auf Grund der Eintrefferkurven sowie des fehlenden Zeitfaktors vorgeschlagene Deutung der Inaktivierung des Rezeptors als ein Ionisierungsereignis gerechtfertigt ist.

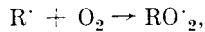
Eine Abschätzung des Treffvolumens wurde bereits von *Weidel* und *Homann* (1960) durchgeführt, die einen Wert von  $v_4 = 3,1 \cdot 10^{-20} \text{ cm}^3$  ergab. Die Diskrepanz zu dem von uns erhaltenen Wert von  $v_1 = 2,57 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^3$  ist unseres Erachtens durch folgendes bedingt: *Weidel* und *Homann* legten ihrer Berechnung die  $D 37\%$  bei Bestrahlung in Hefeextrakt zugrunde. Wir konnten jedoch zeigen, daß Hefeextrakt einen zusätzlichen Schutz ausübt, durch den sich die  $D 37\%$  im Vergleich zu Bouillon auf das 1,63fache erhöht. Als Primärereignis wurde weiterhin nicht die sog. Primäriodisation, sondern die Erzeugung eines Ionenpaares (Energiezufuhr von 38 eV) angesehen. Nicht berücksichtigt wurde schließlich der Überlappungsfaktor  $F = 1,53$  für die von den Autoren verwendete weiche Röntgenstrahlung ( $\lambda_{\text{eff}} = 1,4 \text{ \AA}$ ). Multipliziert man dementsprechend das von *Weidel* und *Homann* angegebene Volumen von  $v_4 = 3,1 \cdot 10^{-20} \text{ cm}^3$  mit  $1,63 \cdot 2,63 \cdot 1,53$ , so erhöht es sich auf  $v_5 = 2,04 \cdot 10^{-19} \text{ cm}^3$  und unterscheidet sich damit nicht mehr wesentlich von dem von uns berechneten Wert. Wir müssen uns natürlich darüber klar sein, daß die berechneten Treffvolumina im Hinblick auf die bereits erwähnte Möglichkeit, daß indirekte Strahlenwirkungen in unserem System noch eine gewisse Rolle spielen, nur als Näherungswerte angesehen werden dürfen und daß sie weiterhin keine Aussage über die Form des Treffbereichs gestatten. Der sehr niedrige Wert des Volumens steht jedenfalls nicht im Widerspruch zu den Vorstellungen, die man sich unter Heranziehung anderer Argumente vom Rezeptorareal machen kann. Da die Bindung des T5-Bakteriophagen an das kugelförmige Rezeptorteilchen auf einem Kontakt beruht und somit eine dem Durchmesser des Phagenschwanzes von etwa  $150 \text{ \AA}$  entsprechend große Fläche des Areal zur Voraussetzung haben muß, könnte man sich — im Hinblick auf den niedrigen Wert des Treffvolumens — das Areal als eine aus dem Rezeptorteilchen herausgeschnittene Kugelkalotte von sehr kleiner Dicke vorstellen.

Nicht nur indirekte Strahleneffekte, sondern auch die durch direkte Energieabsorption im Treffbereich selbst verursachten Strahlenwirkungen zeigen häufig eine Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration: Eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit bei Anwesenheit von Sauerstoff wurde zum Beispiel bei Bakterien (*Alper*, 1961), bei Bakteriophagen, wenn sie als Bakterien-Phagen-

Tabelle 9. Die Schutzwirkung von Sulfhydrylverbindungen auf die Strahlenempfindlichkeit verschiedener biologischer Objekte bei direkter Strahlenwirkung. DRF = Dosisreduktionsfaktor; Cy = Cystein; CyA = Cysteamin; MÄ = Mercaptoäthanol; G = Glutathion.

Objekt	Bestrahlung	Schutzstoff	DRF	Literatur
T1-Phage	trocken und gefroren	CyA	2	<i>Hotz u. Zimmer (1963)</i>
T1-Phage	4 <sup>0</sup> /oige Bouillon	Cy	2	<i>Hotz u. Muller (1960)</i>
T2-Phage	4 <sup>0</sup> /oige Bouillon	Cy	2,5	<i>Hotz u. Muller (1960)</i>
T7-Phage	4 <sup>0</sup> /oige Bouillon	Cy	2,4	<i>Hotz u. Muller (1960)</i>
T5-Phage	4 <sup>0</sup> /oige Bouillon	H <sub>2</sub> S	2	eigene Versuche
T2-Phage	4 <sup>0</sup> /oige Bouillon	CyA	2,5	<i>Marcovich (1958)</i>
T2-Phage	4 <sup>0</sup> /oige Bouillon	MÄ	1,9	<i>Howard-Flanders u. a (1963)</i>
T2H-Phage	4 <sup>0</sup> oige Bouillon	Cy	2	<i>Doerman (1951)</i>
T2r-Phage	gefroren	Cy	1,7	<i>Epstein u. Schardl (1957)</i>
Transform DNS	intrazellulär	CyA	2,8	<i>Hutchinson u. Arena (1960)</i>
Invertase	trocken	Cy	2	<i>Braams u a (1958)</i>
Invertase	trocken	G	2	<i>Braams u. a (1958)</i>
Ribonuclease	trocken	G	1,8	<i>Braams u a (1958)</i>
Urease	trocken	Cy	1,8	<i>Braams (1960)</i>
Katalase	trocken	G	1,7	<i>Norman u. Ginoza (1958)</i>
Bac megatherium	trocken	H <sub>2</sub> S	2	<i>Powers u. Kaleta (1960)</i>
Gerstensamen	trocken	H <sub>2</sub> S	2	<i>Ehrenberg u. Nybom (1954)</i>

Komplex bestrahlt werden (*Howard-Flanders u. Jockey, 1960*), sowie bei intrazellulärer DNS (*Hutchinson u. Arena, 1960*) beobachtet. Bei Bestrahlung von Phagen im Ruhezustand (*Hewitt u. Read, 1950*) dagegen und bei extrazellulärer DNS (*Hutchinson, 1961*) war die Anwesenheit von Sauerstoff während der Bestrahlung ohne Einfluß. Die Potenzierung des direkten Strahlenschadens durch Sauerstoff wird allgemein so gedeutet, daß die durch Bestrahlung gebildeten „Bioradikale“ mit den Sauerstoffmolekülen, die biradikalischen Charakter haben, unter Bildung von Peroxyradikalen reagieren:



wobei diese Reaktion eine sonst unter Umständen mögliche Reparation des Schadens durch zelleigene Schutzstoffe verhindern könnte (*van Dyke, 1959; Marcovich, 1958; usw.*). Das Fehlen eines Sauerstoffeffektes andererseits könnte mit dem Fehlen eines endogenen Schutzstoffes erklärt werden, so daß der maximal mögliche Schaden auch in Abwesenheit von Sauerstoff auftritt. Von *Gordy (1959)* wurde außerdem darauf hingewiesen, daß in trockenen Systemen bestimmte Radikale mit Sauerstoff überhaupt nicht reagieren. Diese sehr unwahrscheinliche Möglichkeit braucht jedoch für unser wasserhaltiges System nicht berücksichtigt zu werden.

In den letzten Jahren wurde wiederholt über eine Schutzwirksamkeit von SH-haltigen Substanzen unter Versuchsbedingungen berichtet, bei denen die Strahleneffekte durch Wasserradikale keine oder eine nur untergeordnete Rolle

spielen (Tab. 9). Als Erklärung für diese auch als sog. Superschutz bezeichnete Erscheinung sind verschiedene Mechanismen denkbar. *Gray* (1956) ging bei der Deutung der Schutzwirksamkeit von SH-Substanzen in Systemen, bei denen *indirekte* Wirkungen überwiegen, davon aus, daß die allgemein und insbesondere unter Bestrahlung auftretende Oxydation der SH-Substanzen zu einer Senkung des Sauerstoffpartialdrucks führt, die ihrerseits die Strahlenwirkungen infolge verminderter Ausbeute von  $\text{HO}\cdot_2$  bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$  herabsetzt. Diese Erklärung kann natürlich auch für den Superschutz bei direkten Strahlenwirkungen übernommen werden, und zwar dann, wenn eine Verstärkung des direkten Schadens durch Sauerstoff nachgewiesen ist. *Eldjarn* und *Pihl* (1956) konnten sowohl *in vitro* als auch beim Säugetier zeigen, daß SH-haltige Schutzstoffe mit freien Sulfhydrylgruppen des biologischen Objektes unter Bildung gemischter Disulfide reagieren können. Es wurde postuliert, daß dies die endogene SH-Gruppe sowohl vor dem Angriff oxydierender Wasserradikale als auch vor direkten Strahleneffekten schützt, und zwar sollte das nach Absorption von Strahlenenergie im biologischen Molekül selbst entstehende ungepaarte Elektron durch Energiewanderung an der Disulfidbindung lokalisiert werden. Nach Auflösen der S-S-Bindung würde ein intaktes Biomolekül zurückbleiben, während das Schutzstoffmolekül Radikalcharakter erhält. Es ist ohne weiteres klar, daß ein solcher Wirkungsmechanismus der Schutzstoffe nur dann in Betracht gezogen werden darf, wenn die biologische Einheit SH-Gruppen besitzt.

Für die Fälle, bei denen die obigen Voraussetzungen nicht gegeben sind und trotzdem ein Superschutz auftritt (z. B. bei Bakterien-DNS, s. Tab. 9), schlugen *Alexander* und *Charlesby* (1954) und *Howard-Flanders* (1960) den sog. H-Donatoren-Mechanismus vor. Es wird dabei angenommen, daß im bestrahlten Substrat folgende Reaktionen ablaufen:

1.  $\text{RH} \rightarrow \text{R}\cdot + \text{H}$ ;
2.  $\text{R}\cdot + \text{R}\cdot \rightarrow \text{R-R}$  (in Abwesenheit von  $\text{O}_2$ );
3.  $\text{R}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO}\cdot_2$  (in Anwesenheit von  $\text{O}_2$ );
4.  $\text{R}\cdot + \text{SH} \rightarrow \text{RH} + \text{S}\cdot$  (SH anwesend,  $\text{O}_2$  abwesend);
5. Konkurrenz zwischen Reaktion 3 und 4. wenn SH und  $\text{O}_2$  anwesend.

Hinweise für die Reaktion 1 geben Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen (ESR) an Phagen-DNS (*Müller*, 1962). Auch die Reaktionen 2 und 3 sind nach *in-vitro*-Untersuchungen von *Alexander* u. a. (1961) sowie *Lett*, *Stacey* und *Alexander* (1961) verifiziert, und es erscheint plausibel, daß die Bildung von R-R (z. B. Vernetzung von DNS) und Peroxyradikalen zu schweren Schäden biologischer Systeme führen kann. Für die Existenz der Reaktion 4 schließlich sprechen Untersuchungen von *Alexander* und *Ormerod* (1962) sowie *Ormerod* und *Alexander* (1963). Eine ausführliche Diskussion des H-Donator-Modells findet sich bei *Hotz* und *Zimmer* (1963).

Auch im Falle des Rezeptors ist ein Superschutz des Cysteamin nachweisbar, jedoch zeigt ein Vergleich mit T1-Bakteriophagen, dem bisher in dieser Hinsicht am eingehendsten untersuchten Objekt, eine Reihe wesentlicher Unterschiede (Tab. 10), und es ist zweckmäßig, bei der Diskussion unserer Ergebnisse von diesen Unterschieden auszugehen. Zunächst ist festzustellen, daß die Wirksamkeit des Cysteamin beim Rezeptor durchgehend schwächer als beim Bakteriophagen ausgeprägt ist. Da einerseits zur Inaktivierung des Rezeptors erheblich höhere Strahlendosen als beim Bakteriophagen erforderlich sind, auf der an-

Tabelle 10. Vergleich der Schutzwirkung von Cysteamin unter aeroben und anaeroben Bedingungen auf T5-Rezeptor und T1-Phagen.

Bedingungen		DRF	
		T5-Rezeptor	T1-Phage (Hotz 1964)*
4 <sup>0</sup> /oige Bouillon	N <sub>2</sub>	1,0	1,0
4 <sup>0</sup> /oige Bouillon	O <sub>2</sub>	1,02	1,17
4 <sup>0</sup> /oige Bouillon + 0,001 molar Cysteamin	N <sub>2</sub>	1,17	2,40
4 <sup>0</sup> /oige Bouillon + 0,001 molar Cysteamin	O <sub>2</sub>	1,14	1,50
4 <sup>0</sup> /oige Bouillon + 0,15 molar Cysteamin	N <sub>2</sub>	1,18	3,0
4 <sup>0</sup> /oige Bouillon + 0,15 molar Cysteamin	O <sub>2</sub>	1,43	2,5

\* Hotz, pers Mitt

deren Seite aber bekannt ist, daß SH-Substanzen durch ionisierende Strahlen zerstört werden (*Shapiro* u. *Eldjarn*, 1955), liegt die Annahme nahe, den geringeren Schutz des Cysteamin beim Rezeptor auf eine Abnahme der Konzentration während der Bestrahlung zurückzuführen. Auch wir konnten eine eindeutige Abnahme der Konzentration freier SH-Gruppen bei Bestrahlung von Cysteamin (Abb. 4) nachweisen; der Umsatz ist zwar kleiner als in den Versuchen von *Shapiro* und *Eldjarn*, die jedoch unter anderen Bedingungen (niedrigere Konzentration, Bestrahlung in Phosphatpuffer) durchgeführt wurden. Die oben in Betracht gezogene Erklärungsmöglichkeit kann jedoch auf Grund folgender Befunde und Überlegungen ausgeschlossen werden: Sowohl die Inaktivierung des Rezeptors als auch die Abnahme der SH-Konzentration zeigen eine exponentielle Dosisabhängigkeit und kaum voneinander verschiedene D 37<sup>0</sup>/o-Werte. Da weiterhin Cysteaminkonzentrationen im Bereich von 0,01 bis 0,15 molar gleich wirksam sind, besteht kein Grund, den geringen Schutz des Cysteamin auf eine strahlenbedingte Konzentrationsabnahme zurückzuführen. In die gleiche Richtung weist auch die Tatsache, daß die Wirksamkeit von H<sub>2</sub>S, dessen Konzentration ja während der gesamten Bestrahlungsdauer konstant bleibt, die von Cysteamin nicht übertrifft. Wir können somit annehmen, daß die im Vergleich zu Bakteriophagen geringere Schützbarkeit des Rezeptors unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine inhärente Besonderheit des Rezeptors ist.

Stellt man sich die Frage nach dem Mechanismus des Cysteaminsuperschutzes, so kann die von *Eldjarn* und *Pihl* (1956) vorgeschlagene Hypothese der gemischten Disulfide sofort ausgeschlossen werden, weil weder die Protein- noch die Lipopolysaccharidkomponente des Rezeptors SH-Gruppen aufweist. Ebenfalls auszuschließen ist die Erklärung, die von der Senkung des Sauerstoffpartialdrucks (infolge der Oxydation der SH-Gruppen) ausgeht, da in diesem Falle gefordert werden müßte, daß die Anwesenheit von Sauerstoff die Strahlenwirkung verstärkt, was aber beim Rezeptor nicht der Fall ist. Es kann somit zur Erklärung des Superschutzes nach Ausschluß der anderen Deutungsmöglich-

keiten nur der sog. H-Donatoren-Mechanismus herangezogen werden. Der starke Unterschied in der Schützbarkeit des Rezeptors und des T1-Bakteriophagen, für den aus prinzipiell den gleichen Überlegungen ebenfalls das Wirksamwerden des H-Donatoren-Mechanismus wahrscheinlich gemacht werden konnte (*Hotz u. Zimmer, 1963*), kann befriedigend nur durch die Annahme erklärt werden, daß die Überführung der biologischen Moleküle in einen Radikalzustand im Falle des Rezeptors für einen nur verhältnismäßig kleinen Bruchteil der Schädigung verantwortlich zu machen ist, d. h. anders ausgedrückt, daß die primäre Energieabsorption häufiger zu anderen Sekundärreaktionen führt. Die andere Denkmöglichkeit, daß nämlich in beiden Objekten die Radikalausbeute identisch ist, daß aber die im Rezeptor ausgelösten Radikale eine wesentlich geringere Reaktionsfähigkeit mit H-Donatoren zeigen, erscheint weniger wahrscheinlich.

Ein weiterer Unterschied im Verhalten von Rezeptor und Bakteriophagen ist der, daß in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,15 molar Cysteamin beim Rezeptor gleich wirksam ist, während im Falle des Bakteriophagen die Wirksamkeit in diesem Konzentrationsbereich stark zunimmt und das Plateau erst bei Konzentrationen von  $> 0,15$  molar erreicht wird. Da aber der Bruchteil des durch SH-Substanzen grundsätzlich schützbaren Rezeptors nach dem oben Gesagten wesentlich kleiner als beim Bakteriophagen zu sein scheint, war ein solcher Unterschied auch zu erwarten. Ein letzter und sehr wesentlicher Unterschied betrifft den Einfluß von Sauerstoff auf die Schutzwirkung des Cysteamin. Wie der Zusammenstellung in Tabelle 10 zu entnehmen ist, reduziert Sauerstoff beim Bakteriophagen die Effektivität des Cysteamin, während beim Rezeptor eine entgegengesetzte Abhängigkeit besteht, indem die Anwesenheit von Sauerstoff die Cysteaminwirkung, zumindest bei der höheren Konzentration, deutlich erhöht. Das von *Alexander und Charlesby (1954)* vorgeschlagene Modell des H-Donatoren-Mechanismus postuliert, daß Sauerstoff durch Reaktion mit dem Bioradikal den Strahlenschaden irreversibel macht, und zwar unter Überführung des letzteren in ein Peroxyradikal. Die Herabsetzung des SH-Schutzes durch Sauerstoff wäre demzufolge auf eine Konkurrenz der Reaktionen 3 und 4 zurückzuführen. Aus dem Fehlen eines Sauerstoffeffektes beim Rezeptor hatten wir geschlossen, daß die Reaktion des Bioradikals mit Sauerstoff im Vergleich zu anderen Reaktionen eine nur untergeordnete Rolle spielt. Dies wurde zwar das Fehlen eines antagonistischen Sauerstoffeffektes bei Bestrahlung mit Cysteamin erklären, jedoch nicht die von uns beobachtete erhöhte Schutzwirkung des Cysteamin.

Einen Ansatzpunkt für eine Deutung des zuletzt erwähnten Befundes glauben wir in den Ergebnissen des Versuchs zu sehen, in dem die Strahlenumsetzung des Cysteamin unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht wird. Wir hatten gesehen, daß eine echte Zerstörung von SH-Gruppen — eine Diskussion der hierfür verantwortlichen Reaktionen liegt außerhalb des Rahmens der vorliegenden Untersuchung — von der Art des Gases unabhängig ist; wohl aber liegt insofern ein ausgeprägter Unterschied vor, als bei Anwesenheit von Sauerstoff ein gewisser und nicht unerheblicher Bruchteil der SH-Gruppen oxidiert wird, so daß sich im untersuchten Strahlendosisbereich eine annähernd konstante Konzentration des Oxydationsprodukts, des Cystamin, einstellt. Bei Bestrahlung unter anaeroben Bedingungen dagegen konnten wir bei keiner Strahlendosis Disulfidgruppen nachweisen. Im Lichte dieser Ergebnisse und, nachdem gezeigt werden konnte, daß Cystamin wesentlich strahlenresistenter

als Cysteamin ist, erschien es uns auch angezeigt zu prüfen, ob Cystamin selbst eine Schutzwirkung zeigt. Diese Vermutung konnte nicht nur bestätigt werden, sondern es zeigte sich überraschenderweise eine wesentlich höhere Wirksamkeit des Cystamin. Es liegt somit nahe, die Steigerung des Cysteaminschutzes durch Sauerstoff auf das bei der Bestrahlung entstehende Cystamin zurückzuführen. Der Vergleich der niedrigsten noch wirksamen Cystaminkonzentration (Tab. 6) mit der Cystaminausbeute bei Bestrahlung von Cysteamin (vgl. Abb. 4) zeigt, daß für eine solche Annahme in quantitativer Hinsicht keine Schwierigkeiten bestehen. Der Nachweis einer Schutzwirksamkeit des Cystamin könnte weiterhin auch zur Erklärung der auffallend hohen Inaktivierungsdosen herangezogen werden, die bei Bestrahlung des Rezeptors in Hefeextrakt erforderlich sind (Tab. 2); ein möglicher Zusammenhang ergibt sich hier insofern, als wir im Hefeextrakt, nicht aber in der Bouillon, eine verhältnismäßig hohe Konzentration an reduzierbaren Disulfidgruppen nachweisen konnten.

Eine Schutzwirksamkeit des Cystamin ist an sich nach den Vorstellungen von *Eldjarn* und *Pihl* (1960) durchaus plausibel und konnte auch bei Bestrahlung von Säugetieren nachgewiesen werden (*Bacq*, 1954). Desgleichen liegt eine neuere Untersuchung von *Quintiliani* und *Bocacci* (1963) vor, die unter dem Einfluß von Cystamin eine Herabsetzung der Strahlenempfindlichkeit der Aldolase bei Bestrahlung in Puffer feststellten. Unabhängig davon, ob man vom Modell der gemischten Disulfide ausgeht oder den Vorstellungen von *Bacq* (1954) folgt, denen zufolge Cystamin durch eine Reduktase in das wirksame Cysteamin überführt wird, sind die bisher angeführten Tatsachen und Überlegungen für unsere Fragestellung irrelevant, da sie bestenfalls eine dem Cysteamin vergleichbare Wirksamkeit des Disulfids, nicht aber eine Steigerung der Wirksamkeit, wie sie beim Rezeptor vorliegt, zu erklären imstande sind.

Um die höhere Schutzwirksamkeit des Cystamin befriedigend zu erklären, müßte folglich ein grundsätzlich anderer Wirkungsmechanismus des Cystamin angenommen werden, jedoch liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine experimentell oder theoretisch ausreichend begründeten Hinweise in dieser Richtung vor. Von *Pryor* und *Guard* (1964) konnte zwar gezeigt werden, daß bestimmte Phenylradikale mit verschiedenen aliphatischen Disulfiden unter Aufhebung des Radikalzustandes reagieren können, entweder durch Übertragung des (in bezug zum Schwefel) in  $\alpha$ -Stellung befindlichen Wasserstoffatoms oder durch Bildung eines Phenylthioäthers. Unabhängig davon, ob solche Reaktionen in dem uns interessierenden Fall überhaupt stattfinden können, müßte, bevor ein ähnlicher Mechanismus postuliert wird, auch der Nachweis geführt werden, daß in dem speziellen Fall der Phenylradikale sulphydrylhaltige Substanzen weniger wirksam als Disulfide sind. Wir sind bisher auch nicht imstande, eine befriedigende Erklärung für die Tatsache zu geben, daß die Wirksamkeit des Cystamin in Anwesenheit von Sauerstoff erhöht zu sein scheint, da in diesem Fall die für Cysteamin vorgeschlagene Deutung natürlich nicht in Frage kommt. Betrachten wir die Ergebnisse des Versuchs, in dem die Strahlenumsetzung des Cystamin bestimmt wurde, so ist bei Bestrahlung unter aeroben Bedingungen die Abnahme der Disulfidkonzentration zwar etwas geringer als bei Bestrahlung unter Stickstoff; doch ist der Unterschied nur geringfügig und kann im Hinblick auf die von uns festgestellte Wirksamkeit sehr kleiner Cystaminkonzentrationen nicht zur Erklärung herangezogen werden. Eine andere Denkmöglichkeit, deren experimentelle Prüfung den Rahmen der vorliegenden Untersuchung



allerdings übersteigt, könnte von der Annahme ausgehen, daß unter dem Einfluß der Strahlung Umsetzungsprodukte des Cystamin entstehen, die in höherer Konzentration auf den Rezeptor toxisch wirken. Der beobachtete Sauerstoffeffekt würde dann bedeuten, daß die hypothetischen toxischen Agentien durch Reaktion mit Sauerstoff unwirksam gemacht werden.

#### *Zusammenfassung*

Es wurden die Inaktivierung des T5-Rezeptors durch weiche Röntgen- und Gammastrahlen sowie deren Abhängigkeit von der Art des Suspensionsmediums, der Sauerstoffkonzentration und der Anwesenheit S-haltiger Substanzen untersucht. Bei Bestrahlung in reinem Puffer wurde festgestellt, daß die Inaktivierung im wesentlichen indirekt, d. h. durch Produkte der Radiolyse des Wassers, erfolgt. Die Abnahme der Inaktivierungsrate bei Strahlung mit hohem linearem Energietransfer und der fehlende Einfluß von Sauerstoff machen es wahrscheinlich, daß die Primärradikale  $H^{\cdot}$ ,  $OH^{\cdot}$  sowie  $H_2O^{\cdot-}$  die inaktivierenden Agentien sind. Bei Bestrahlung in Bouillon (und ähnlichen Medien) überwiegen direkte Strahlenwirkungen.

Die Anwesenheit von Cysteamin bzw. Schwefelwasserstoff bei Bestrahlung in Puffer erhöht die Inaktivierungsdosen auf rund das 10fache; die Schutzwirkung der SH-Substanzen wird in diesem Fall auf ihre Eigenschaften als Radikalfänger zurückgeführt. Die Schutzwirkung des Cysteamin bei überwiegender direkter Strahlenwirkung ist erheblich schwächer und wird auf die Eigenschaften der SH-Substanzen als H-Donatoren zurückgeführt. Erstmals wurde für Cystamin eine Schutzwirkung gefunden, welche die von Cysteamin erheblich übertrifft.

#### *Summary*

The inactivation of the T5-receptors was investigated by means of soft X-rays and  $\gamma$ -rays, and its dependence upon the kind of medium of suspension, the oxygen concentration, and the presence of sulfur-containing substances. It was observed that under irradiation in buffer the inactivation is primarily due to indirect effects, i. e. through products of water radiolysis. A decrease of the inactivation rate under irradiation with high linear energy transfer, and the absence of the influence of oxygen points to the probability that the primary radicals  $H^{\cdot}$ ,  $OH^{\cdot}$  and  $H_2O^{\cdot-}$  are the inactivating agents. During irradiation in broth (and in similar media) damage is mainly due to direct radiation effects.

If cysteamine or hydrogen sulfide are present during irradiation in buffer, the inactivation-dose is increased approximately 10 fold; in this case the protective effect of the SH-substances is attributed to their capacity as radical scavenger. The protective effect of cysteamine in the case of primarily direct action of radiation is considerably weaker and is attributed to the properties of the SH-substances as H-donators. It has been found for the first time that cystamine gives far stronger protection than cysteamine.

#### *Résumé*

L'inactivation des récepteurs du phage T5 par les rayons X-mous et  $\gamma$ ; ainsi que l'influence du milieu de suspension, de la concentration en oxygène et de la présence de substances soufrées sur cette inactivation, ont fait l'objet des recherches relatées ici. On a constaté que, pour l'irradiation en tampon pur, l'inactivation a lieu essentiellement par un processus indirect, c'est-à-dire par l'intermédiaire des produits de radiolyse de l'eau. La décroissance du pourcentage de radioinactivation avec l'accroissement du "LET" d'une part, et l'absence d'influence de l'oxygène d'autre part, conduisent à penser que les radicaux primaires  $H^{\cdot}$  et  $OH^{\cdot}$ , ainsi que  $H_2O^{\cdot-}$ , sont les agents inactifs. Lorsque l'irradiation a lieu en bouillon (ou en milieux semblables) l'action directe des radiations est prépondérante.

La présence de cystéamine ou de  $H_2S$  dans le tampon au cours de l'irradiation élève les doses inactivantes d'environ 10 fois; l'action protectrice des substances à groupements-SII est dans ce cas attribuée à leur affinité pour les radicaux. La protection par la cystéamine est nettement affaiblie lorsque l'effet des radiations est direct, et est expliquée par la propriété qu'ont les substances à groupements-SII de donner des atomes d'hydrogène. Pour la première fois la cystamine a été trouvée exercer une action protectrice, qui, de plus, est très supérieure à celle de la cystéamine

#### Schrifttum

- Adams, M. H.: Bakteriophages Interscience Publ. New York 1959. — Alexander, P., A. Charlesby: Nature 173 (1954), 578. — Alexander, P., J. T. Lett, P. Kopp, R. Itzhaki: Radiat. Res. 14 (1961), 363. — Alexander, P., M. G. Ormerod: in: Biological Effects of Ionizing Radiations at the Molecular Level, S. 399. Wien 1962. — Alper, T.: Radiat. Res. 2 (1955), 119; Int. J. Radiat. Biol. 3 (1961), 369. — Bacq, Z. M.: Acta radiol. (Stockh.) 41 (1954), 47. — Bacq, Z. M., P. Alexander: Fundamentals of Radiobiology, S. 290. London 1955. — Barron, E. S. G., V. Flood: J. gen. Physiol. 33 (1950), 229. — Bhattacharjee, S. B., N. N. das Gupta: Indian J. Physiol. 35 (1961), 604. — Braams, R.: Radiat. Res. 12 (1960), 113. — Braams, R., F. Hutchinson, D. Ray: Nature 182 (1958), 1506. — Butler, J. A. V., A. B. Robins: Nature 189 (1961), 852. — Charlesby, A., P. G. Garrat, P. M. Kopp: Int. J. Radiat. Biol. 5 (1962), 439. — Dale, W. M., J. V. Davies: Biochem. J. 48 (1951), 129. — Dale, W. M., J. V. Davies, W. J. Meredith: Brit. J. Cancer 3 (1949), 31. — Dewey, D. L.: Radiat. Res. 19 (1963), 64. — Dickens, E. A., B. Shapiro: Radiat. Res. 14 (1961), 308. — Dittrich, W.: Z. Naturforsch. 15b (1960), 261. — Doermann, A. D.: Zit. bei J. D. Watson — van Dyke, J. G.: Biochem. biophys. Res. Commun. 1 (1959), 54. — Ehrenberg, L., N. Nybom: Acta agriculturæ scand. 4 (1954), 396. — Eldjarn, L., A. Pihl, in: Progress in Radiobiology von J. S. Mitchell, B. E. Holmes u. C. L. Smith, S. 249. London 1956; in: Mechanisms in Radiobiology, Bd. II, S. 231. von M. Erreza u. A. Forssberg. London 1960. — Epstein, H. T., D. Schardl: Nature 179 (1957), 100. — Frank, H., M. L. Zarnitz, W. Weidel: Z. Naturforsch. 18b (1963), 281. — Fricke, H., St. Morse: Strahlentherapie 26 (1927), 757. — Gordy, W.: Radiat. Res. Suppl. 1 (1959), 491. — Gray, L. H.: in: Progress in Radiobiology von J. S. Mitchell, B. E. Holmes u. C. L. Smith, S. 267. London 1956. — Hewitt, H. B., J. Reed: Brit. J. Radiol. 23 (1950), 416. — Hochanadel, C. J.: in: Comparative Effects of Radiation, von M. Burton, J. S. Kirby-Smith u. J. L. Magee New York 1960. — Hotz, G.: Experientia (Basel) 17 (1961), 498. — Hotz, G., A. Müller: Z. Naturforsch. 15b (1960), 450. — Hotz, G., K. G. Zimmer: Int. J. Radiat. Biol. 7 (1963), 75. — Howard-Flanders, P.: Nature 186 (1960), 485. — Howard-Flanders, P., P. Jockey: Int. J. Radiat. Biol. 2 (1960), 361. — Howard-Flanders, P., J. Levin, L. Theriot: Radiat. Res. 18 (1963), 593. — Hutchinson, F.: Science 134 (1961), 533; Sdbde zur Strahlentherapie 51 (1962), 58. — Hutchinson, F., J. Arena: Radiat. Res. 13 (1960), 137. — Koch, G., W. Weidel: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 303 (1956), 213. — Kohn, H. J., S. E. Gunter: Radiat. Res. 13 (1960), 250. — Kolthoff, I. M., W. E. Harris: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 18 (1946), 161. — Kolthoff, I. M., W. Stricks: J. Amer. Chem. Soc. 72 (1950), 1952. — Latarjet, R.: Strahlentherapie 110 (1959), 443. — Latarjet, R., B. Ekert, P. Demerseman: Radiat. Res. Suppl. 3 (1963), 247. — Lea, D. E.: Actions of Radiations on Living Cells Cambridge 1955. — Lett, J. T., K. A. Stacey, P. Alexander: Radiat. Res. 14 (1961), 349. — Littman, F. E., E. M. Carr, A. P. Brady: Radiat. Res. 7 (1957), 107. — MacDonnell, L. R., R. B. Silva, R. E. Feeney: Arch. Biochem. 32 (1951), 288. — Marcovich, H.: Radiat. Res. 9 (1958), 149. — Müller, A.: Int. J. Radiat. Biol. 5 (1962), 199. — Norman, A., W. Gmoza: Radiat. Res. 9 (1958), 77. — NBS-Handbook 78: Rep. of the Int. Comm. on Radiol. Units and Measurements, 1961. — Ormerod, M. G., P. Alexander: Radiat. Res. 18 (1963), 495. — Powers, E. L., B. F. Kaleta: Science 132 (1960), 959. — Pryor, W. A., H. Guard: J. Amer. Chem. Soc. 86 (1964), 1150. — Quenouille, M. H.: The Design and Analysis of Experiment London 1953. — Quantiliani, M., M. Boccacci:

Int. J. Radiat. Biol. 7 (1963), 255. — *Shapiro, B., L. Eldjarn*: Radiat. Res. 3 (1955), 255. — *Tabor, H.*: Biochem. biophys. Res. Commun. 3 (1960), 382. — *Todt, F.*: Elektrochemische Sauerstoffmessungen. Berlin 1958. — *Watson, J. D.*: J. Bact. 60 (1952), 473. — *Weidel, W., J. Homann*: Z. Naturforsch. 15 b (1960), 34. — *Weidel, W., E. Kellenberger*: Biochim. biophys. Acta (Amst.) 17 (1955), 1. — *Weidel, W., G. Koch*: Z. Naturforsch. 10 b (1955), 694. — *Weidel, W., G. Koch, K. Bobosch*: Z. Naturforsch. 9 b (1954), 573. — *Zarnitz, M. L., W. Weidel*: Z. Naturforsch. 18 b (1963), 276. — *Zimmer, K. G.* Studien zur quantitativen Strahlenbiologie. Akad. Wiss. Lit. (Mainz), Abh. Math.-Naturwiss. Klasse Nr. 3 (1960).

*Anschrift d. Verf.: Dr. F. Bohne, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum, 75 Karlsruhe, Postfach 947.*