

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM  
KARLSRUHE**

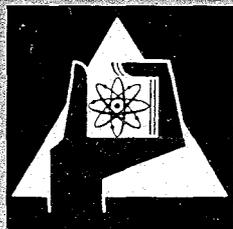
März 1967

KFK 587

Institut für Strahlenbiologie

Der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease

W. Günther, H. Jung



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.  
KARLSRUHE



## Der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease

WOLFGANG GÜNTHER und HORST JUNG

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforschg. 22 b, 313—320 [1967]; eingegangen am 27. September 1966)

The radiosensitivity of dry ribonuclease was determined at various temperatures ranging from 90 °K to 300 °K and using  $^{60}\text{Co}$  gamma-radiation, 2 MeV protons, and 2 MeV deuterons. The cross section for the inactivation of RNase  $S(T)$  is, in this range, given as a function of temperature by

$$S(T) = S_0 + S_1 \cdot e^{-E_a/RT}$$

For inactivation of ribonuclease with Co gamma-rays we found  $S_0 = 0$  and  $E_a = 1000$  cal/mole;  $S_1 = 0.125$  Mrad $^{-1}$  when irradiation is carried out in vacuo, and  $S_1 = 0.265$  Mrad $^{-1}$  in oxygen. With protons and deuterons the following values were determined:  $S_0 = 1.28 \cdot 10^{-14}$  cm $^2$ ,  $S_1 = 19.5 \cdot 10^{-14}$  cm $^2$ ,  $E_a = 1050$  cal/mole for 2 MeV protons;  $S_0 = 2.45 \cdot 10^{-14}$  cm $^2$ ,  $S_1 = 31 \cdot 10^{-14}$  cm $^2$ , and  $E_a = 1050$  cal/mole for 2 MeV deuterons. Furthermore, by analysis of some recent data from the literature we found that the cross section for inactivation by ionizing radiation of various enzymes, bacteriophages, and bacterial spores in the range from 4 °K to temperatures higher than room temperature can satisfactorily be described by the more general equation

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

with  $E_1 = 1$  kcal/mole and  $E_2 = 4$  kcal/mole being constant for all objects and for all circumambient conditions tested. This correlation between inactivation cross section  $S(T)$  and temperature  $T$  shows three mechanisms of inactivation to occur in biological objects: one ( $S_0$ ) being independent of temperature, while the two others have apparent activation energies of 1 kcal/mole and 4 kcal/mole, respectively.

Untersuchungen über die Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf trockene Proteine haben eine besondere Bedeutung für die Aufklärung der Mechanismen, die zwischen der Absorption der Strahlung und den schließlich beobachteten chemischen und biologischen Veränderungen wirksam sind<sup>1</sup>. Diese sog. direkte Strahlenwirkung<sup>2</sup> wird durch eine Reihe von Parametern modifiziert, von denen Sauerstoffeffekt, Schutzeffekt und Temperatureffekt bisher besonders ausführlich untersucht worden sind. Die mitgeteilten Temperatureffekte zeigen allerdings beträchtliche Unterschiede, je nachdem ultraviolettes Licht,  $\gamma$ -Strahlung, schnelle Elektronen oder dichter ionisierende Teilchen für die betreffenden Experimente verwendet werden. Da in vielen Arbeiten meist nur wenige Temperaturen zwischen Zimmertemperatur und der Temperatur des flüssigen Stickstoffs untersucht wurden, versuchten wir die Unterschiede zwischen  $\gamma$ -Strahlung und dichter ionisierenden Teilchen in einer systematischen Studie aufzuklären. Ein wesentlicher Gesichtspunkt für die Aufnahme dieser Experimente war die Frage, ob die biologischen Wirkungen der verschiedenen Strahlen-

arten durch unterschiedliche Mechanismen modifiziert werden oder ob sie sich durch einen gemeinsamen Ansatz beschreiben lassen.

### Methodik

*Herstellung der Proben:* Für die vorliegenden Untersuchungen wurde Ribonuclease (RNase) aus Rinderpankreas verwendet, die nach Angaben der Hersteller (Sigma Chem. Co., St. Louis) fünfmal umkristallisiert und frei von Proteasen und Salzen ist. Für eine Reihe von Versuchen wurde diese RNase zusätzlich durch Chromatographie über Amberlite IRC-50 (XE-64) mit 0,2-m. Phosphatpuffer ( $p_H$  6,47) gereinigt<sup>3</sup>. Das Enzym wurde in doppelt-quarzdest. Wasser in einer Konzentration von 0,1 mg/ml gelöst. Jeweils 0,01 ml, bzw. 0,02 ml dieser Lösung wurden auf runde Mikroskop-Deckgläschen (12 mm  $\Phi$ , Stärke 0,1 mm) oder glanzgewalzte Feingoldronden (12 mm  $\Phi$ , Stärke 0,5 mm) aufpipettiert und auf eine Fläche von 0,5 cm $^2$  gleichmäßig verteilt. Die Proben wurden anschließend ca. 20 Stdn. im Exsikkator getrocknet.

*$\gamma$ -Bestrahlung:* Um mehrere Proben auf kleinem Raum unterzubringen, wurden jeweils 6–8 Mikroskop-Deckgläschen zwischen die Windungen einer Drahtspirale geklemmt. Zur Bestrahlung im Vakuum wurden

<sup>1</sup> R. BRAAMS, Nature [London] 200, 752 [1963].

<sup>2</sup> K. G. ZIMMER, Akad. Wiss. Lit. Mainz, Abh. math.-naturwiss. Kl. 3, 107 [1960].

<sup>3</sup> H. JUNG u. H. SCHÜSSLER, Z. Naturforschg. 21 b, 224 [1966].

die Spiralen mit den Plättchen in Ampullen aus Pyrexglas mindestens 24 Stdn. auf  $10^{-5}$  Torr evakuiert und anschließend darin eingeschmolzen. Um zu verhindern, daß hierbei Gaseinschlüsse aus dem Glas freiwerden könnten, waren die Ampullen in leerem Zustand ausgeglüht worden. Zur Bestrahlung in Sauerstoff-Atmosphäre wurden die Enzymproben in Glasampullen zunächst einige Stdn. im Vakuum entgast; dann wurde getrockneter Sauerstoff durch die Ampullen geleitet und diese abgeschmolzen. Die Bestrahlungen wurden in einer  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Quelle bei einer Dosisleistung von 0,6 Mrad/Stde. durchgeführt. Dabei wurden die Proben in einem Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff, mit Kohlendioxidschnee oder mit Hilfe eines Kryostaten (Fa. Haake, Berlin) bei der gewünschten Temperatur gehalten.

**Bestrahlung mit Protonen und Deuteronen:** Für diese Experimente stand ein Van-de-Graaff-Beschleuniger zur Verfügung, der Protonen und Deuteronen von 2 MeV Energie liefert. Das Auffächern des Protonenstrahls, die Methoden der Dosimetrie sowie der Aufbau der Bestrahlungskammer sind von HERMANN<sup>4</sup> beschrieben worden. Die Konstruktion der Bestrahlungskammer gewährleistete, daß die Proben – bis auf die Öffnung für den Protonenstrahl – allseitig von gekühlten schwarzen Flächen umgeben waren. Bei Verwendung von flüssigem Stickstoff als Kühlmittel erreichten die Enzymproben infolge Wärmestrahlung innerhalb von 3 Stdn. eine Temperatur von 120 °K. Da sich innerhalb der Bestrahlungszeit für eine Probe die Temperatur nur unwesentlich änderte, konnte bei jeder beliebigen Zwischentemperatur bestrahlt werden. Die Temperatur der Proben wurde mit einem häufig nachgeichteten Thermoelement gemessen.

**Enzymbestimmung:** Nach Ende der Bestrahlung wurde die Ribonuclease mit 1 ml 0,1-m. Acetatpuffer ( $\text{pH } 5,0$ ) von den Plättchen abgelöst und die restliche Enzym-Aktivität nach einer bereits beschriebenen<sup>5</sup> Modifikation der Methode von KALNITSKY et al.<sup>6</sup> bestimmt.

### Ergebnisse

Die Inaktivierung von Ribonuclease kann formal durch den Ausdruck  $N/N_0 = \exp(-SD)$  beschrieben werden. Dabei repräsentiert  $N/N_0$  den Anteil des Enzyms, der nach Bestrahlung mit der Dosis  $D$  noch funktionsfähig ist;  $S$  nennt man Inaktivierungskonstante ( $\text{Mrad}^{-1}$ ) oder Inaktivierungsquerschnitt ( $\text{cm}^2$ ), je nachdem ob  $D$  die Dosis (in Mrad) oder den Teilchenfluß (in Teilchen/ $\text{cm}^2$ ) bedeutet. Änderungen in der Strahlenempfindlichkeit können durch das Verhältnis der betreffenden 37%-Dosen ( $D_{37}$ ) beschrieben werden. Verläuft eine Kurve flacher

als die entsprechende Vergleichskurve, so spricht man von einem Schutzfaktor ( $p$ ), hat sie dagegen einen steileren Verlauf, von einem Sensibilisierungsfaktor ( $s$ ).

**Experimente mit  $\gamma$ -Strahlung:** Bei Bestrahlung von trockener Ribonuclease mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung ist die Inaktivierungskonstante außerordentlich stark temperaturabhängig (Abb. 1). Die 37%-Dosen betragen bei Bestrahlung im Vakuum ( $42 \pm 3$ ) Mrad für  $T = 310$  °K und ( $105 \pm 6$ ) Mrad für  $T = 195$  °K. Bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs ( $T = 77$  °K) ist innerhalb der Fehlergrenzen überhaupt keine Inaktivierung mehr festzustellen. Es kann lediglich eine untere Grenze für die  $D_{37}$  von mindestens 800 Mrad abgeschätzt werden. Bei einem Teil der erwähnten Versuche wurden die unter Vakuum bestrahlten Ampullen in einer Stickstoff-Atmosphäre aufgebrochen und die enzymatische Aktivität der Proben unter völligem Ausschluß von Sauerstoff bestimmt; bei den übrigen Proben erfolgte die Enzymbestimmung in Luft. Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist,

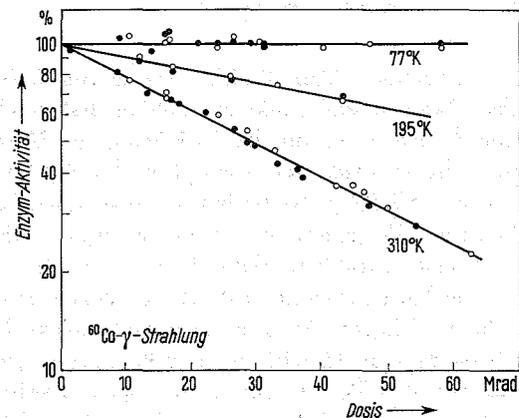


Abb. 1. Inaktivierung von trockener Ribonuclease mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung im Vakuum bei verschiedenen Temperaturen und anschließender Enzymbestimmung in Luft ( $\bullet$ ), bzw. unter Stickstoff ( $\circ$ ).

hat dieses Verfahren jedoch keinen Einfluß auf die Strahlenempfindlichkeit der Ribonuclease. Auch chromatographisch gereinigte RNase A zeigt, ebenso wie käufliche fünfmal umkristallisierte Ribonuclease, bei 77 °K innerhalb des untersuchten Dosisbereiches keine Abnahme der Enzym-Aktivität. Wenn die Bestrahlung in Sauerstoff-Atmosphäre durchgeführt wird, ist die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease

<sup>4</sup> K. O. HERMANN, Z. Naturforsch. **21 b**, 678 [1966].

<sup>5</sup> H. JUNG, Z. Naturforsch. **20 b**, 764 [1965].

<sup>6</sup> G. KALNITSKY, J. P. HUMMEL, H. RESNICK, J. R. CARTER, L. B. BARNETT u. C. DIERKS, Ann. New York Acad. Sci. **31**, 542 [1959].

nuclease 2,1-mal größer als bei Bestrahlung im Vakuum. Die 37%-Dosen betragen  $(20 \pm 2)$  Mrad für  $T = 310^\circ\text{K}$ ,  $(19 \pm 3)$  Mrad für  $T = 293^\circ\text{K}$ ,  $(30 \pm 3)$  Mrad für  $T = 256^\circ\text{K}$ ,  $(39 \pm 3)$  Mrad für  $T = 213^\circ\text{K}$  und  $(50 \pm 5)$  Mrad für  $T = 195^\circ\text{K}$ . Die Strahlenempfindlichkeit bei  $77^\circ\text{K}$  konnte in  $\text{O}_2$ -Atmosphäre nicht gemessen werden, da bei dieser Temperatur der Sauerstoff kondensiert.

Die unter den verschiedenen Versuchsbedingungen ermittelten Resultate sind in Abb. 2 zusammengefaßt. In dieser Darstellung sind die reziproken 37%-Dosen – die Inaktivierungskonstanten – in

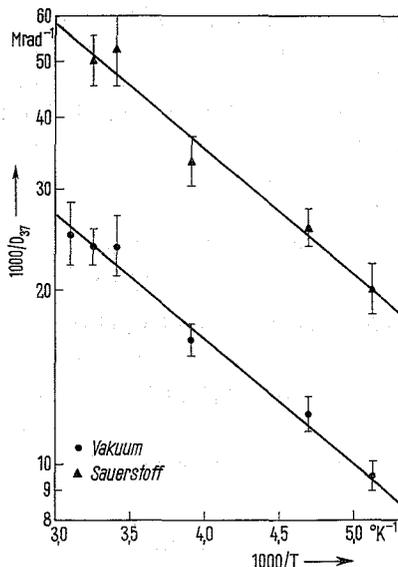


Abb. 2. Abhängigkeit der 37%-Dosen ( $D_{37}$ ) von der reziproken absoluten Temperatur bei Bestrahlung von trockener Ribonuclease mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlen im Vakuum (●), bzw. in  $\text{O}_2$ -Atmosphäre (▲).

halblogarithmischem Maßstab über der reziproken absoluten Temperatur aufgetragen („Arrhenius-Darstellung“). Die durch die Meßpunkte gelegten Geraden lassen sich durch die Gleichung

$$S(T) = S_1 \cdot e^{-E_a/RT} \quad (1)$$

beschreiben. Bei Bestrahlung im Vakuum beträgt  $S_1 = 0,125 \text{ Mrad}^{-1}$ , für Bestrahlung in  $\text{O}_2$ -Atmosphäre gilt  $S_1 = 0,265 \text{ Mrad}^{-1}$ . Aus der Steigung der Kurven einer Arrhenius-Darstellung kann die „Aktivierungsenergie“  $E_a$  bestimmt werden. Dieser Wert beläuft sich in unserem Falle auf  $1 \text{ kcal/Mol}$ , und zwar unabhängig davon, ob die Bestrahlung im Vakuum oder in  $\text{O}_2$  durchgeführt wurde. Bei Extrapolation der durch die Meßpunkte gelegten

Geraden auf Abb. 2 ergibt sich für  $77^\circ\text{K}$  und anaerobe Bedingungen ein Wert von  $1000/D_{37} \approx 0,25 \text{ Mrad}^{-1}$ , was mit der für diese Temperatur experimentell ermittelten unteren Grenze von  $D_{37} > 800 \text{ Mrad}$  (vgl. Abb. 1) nicht im Widerspruch steht.

*Experimente mit Protonen und Deuteronen:* Abb. 3 zeigt zwei Dosis-Effekt-Kurven, die mit  $2 \text{ MeV}$ -Protonen bei  $T = 300^\circ\text{K}$  und bei  $T = 125^\circ\text{K}$  aufgenommen wurden; ihre  $D_{37}$ -Werte betragen

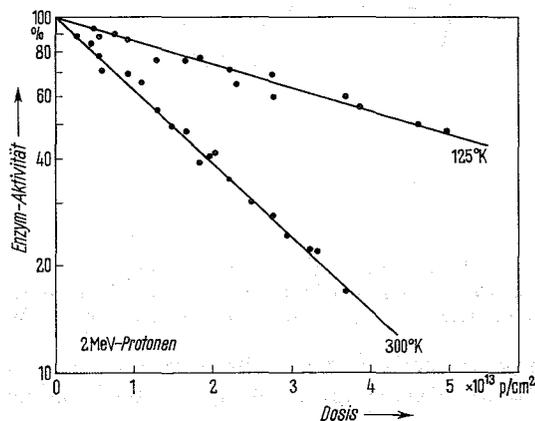


Abb. 3. Inaktivierung von trockener Ribonuclease mit  $2 \text{ MeV}$ -Protonen bei  $125^\circ\text{K}$  und  $300^\circ\text{K}$ .

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

Die Abhängigkeit der mit Protonen und Deuteronen erhaltenen Inaktivierungsquerschnitte von der reziproken absoluten Temperatur zeigt die Arrhenius-Darstellung in Abb. 4. Sowohl die Kurve für  $2 \text{ MeV}$ -Protonen als auch die für  $2 \text{ MeV}$ -Deuteronen haben einen gekrümmten Verlauf. Beide scheinen mit zunehmenden Werten von  $1/T$  einem konstanten Wert zuzustreben, der experimentell jedoch nicht erfaßt werden konnte. Die Extrapolation

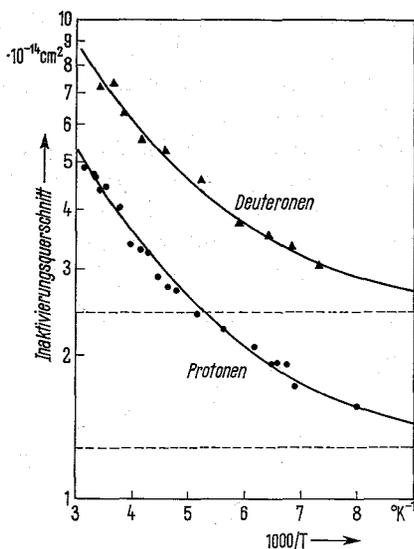


Abb. 4. Wirkungsquerschnitte für die Inaktivierung von Ribonuclease mit 2 MeV-Protonen und 2 MeV-Deuteronen in Abhängigkeit von der reziproken absoluten Temperatur.

der gemessenen Kurvenverläufe liefert als Grenzwerte die Temperatur-unabhängigen Wirkungsquerschnitte für Protonen  $S_0 = 1,28 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2$  und für Deuteronen  $S_0 = 2,45 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2$ . Werden diese konstanten Anteile (Abb. 4, unterbrochene Geraden) von den experimentell ermittelten Wirkungsquer-

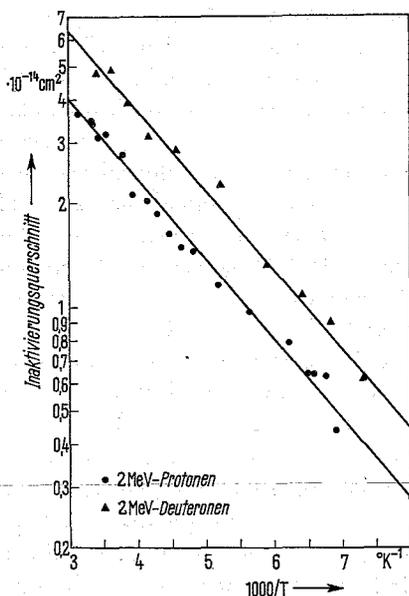


Abb. 5. Wirkungsquerschnitte für die Inaktivierung von Ribonuclease mit 2-MeV-Protonen und 2-MeV-Deuteronen in Abhängigkeit von der reziproken absoluten Temperatur nach Abzug der konstanten Anteile (unterbrochene Geraden auf Abb. 4).

schnitten subtrahiert, so resultieren daraus bei halblogarithmischer Auftragung über  $1/T$  Geraden (Abb. 5), deren Steigung in beiden Fällen einer Aktivierungsenergie von  $E_a = 1,05 \text{ kcal/Mol}$  entspricht. Die Abhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts von Ribonuclease von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur kann somit durch folgende Beziehungen beschrieben werden:

$$S(T) = 1,28 + 19,5 \cdot e^{-1050/RT} \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2 \quad \text{für Protonen,} \quad (2)$$

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

Die auf Abb. 4 eingezeichneten Kurven entsprechen obigen Gleichungen. Unter Verwendung einer linearen Energieabgabe von  $166,5 \text{ MeV/cm}$  für 2 MeV-Protonen und  $276,9 \text{ MeV/cm}$  für 2 MeV-Deuteronen<sup>7</sup> (für  $q=1$ ) wurden die Teilchenflüsse in die entsprechenden Dosen umgerechnet. Gl. (2) erhält damit die Form:

$$S(T) = 0,0048 + 0,073 \cdot e^{-1050/RT} \text{ Mrad}^{-1} \quad \text{für Protonen,} \quad (3)$$

$$S(T) = 0,0055 + 0,070 \cdot e^{-1050/RT} \text{ Mrad}^{-1} \quad \text{für Deuteronen.}$$

Dabei zeigt sich, daß bei gleicher Dosis die Wirkungen von 2 MeV-Protonen und 2 MeV-Deuteronen innerhalb unserer Versuchsgenauigkeit übereinstimmen.

### Diskussion

Wie aus unseren Untersuchungen hervorgeht, läßt sich der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease allgemein durch eine Temperatur-abhängige Komponente und eine von der Temperatur unabhängige Komponente in der Form  $S(T) = S_0 + S_1 \cdot e^{-E_a/RT}$  beschreiben. Bei Bestrahlung mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung tritt nur die Temperatur-abhängige Komponente auf ( $S_0 = 0$  oder zumindest nahe Null), während bei den Versuchen mit Protonen und Deuteronen bei nicht zu niedrigen Temperaturen beide Komponenten zur beobachteten Inaktivierung beitragen. Bemerkenswert ist, daß die unter verschiedenen Versuchsbedingungen ermittelten Aktivierungsenergien innerhalb der experimentellen Genauigkeit übereinstimmen. Dieser Wert von  $E_a = 1 \text{ kcal/Mol}$  liegt etwa eine Größenordnung

<sup>7</sup> D. E. LEA, Actions of Radiations on Living Cells. University Press, Cambridge 1946.

unter den Aktivierungsenergien, die für chemische Prozesse üblicherweise gemessen werden. Doch ist daraus nicht der Schluß zu ziehen, daß bei der Strahlungsinaktivierung grundsätzlich neue chemische Prozesse auftreten. Vielmehr ist zu berücksichtigen, daß die Angabe einer Aktivierungsenergie sinnlos ist, wenn nicht der zugehörige chemische Prozeß oder die Prozeßkette bekannt sind<sup>8</sup>. Es ist insbesondere nicht möglich, allein aus der gemessenen Aktivierungsenergie auf die ablaufenden Reaktionen zu schließen. Unter „Aktivierungsenergie“ soll deshalb im folgenden nur ein Temperatur-Exponent verstanden werden, der die Abhängigkeit der experimentell ermittelten Inaktivierungsraten von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur beschreibt.

Nach unseren Experimenten mit  $\gamma$ -Strahlung ist die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease bei 77 °K mehr als 20-mal geringer als bei Zimmertemperatur. Dieser große Temperatureffekt von  $p > 20$  rührt davon her, daß bei diesen Experimenten die Temperatur-unabhängige Komponente  $S_0$  nicht auftritt. Ähnlich große Temperatureffekte wurden bisher von SETLOW und DOYLE<sup>9</sup> für UV-Bestrahlung von kristalliner Catalase ( $p = 8$ ) und von SHALEK<sup>10</sup> für  $\gamma$ -Bestrahlung von Lysozym ( $p = 10$ ) mitgeteilt. Nach  $\gamma$ -Bestrahlung im Vakuum bei 77 °K und nachfolgender Enzymbestimmung unter Argon konnten GANASSI und Mitarbb.<sup>11</sup> nach einer Dosis von 10 Mrad keine Inaktivierung von Pepsin feststellen, was bei den angegebenen Fehlergrenzen von  $(100 \pm 4)\%$  einem Temperatureffekt von  $p > 10$  entspricht. Wir halten es für wahrscheinlich, daß nur unter bestimmten Versuchsbedingungen die Temperatur-abhängige Komponente  $S_0$  verschwindet: kleine Moleküle, dünn ionisierende Strahlung, geringe Dosisrate, dünne Proben, keine Verunreinigungen. Bei Bakteriophagen und Bakteriensporen wurden auch bei niedrigen Dosisraten (0,4 bzw. 0,15 Mrad/Stde.)

kleine Temperatureffekte von  $p = 2,8$  (HOTZ<sup>12</sup>) und  $p = 1,25$  (WEBB et al.<sup>13</sup>) gefunden und bei Verwendung von dicht ionisierenden Teilchen<sup>4, 14-19</sup> und von schnellen Elektronen bei hoher Dosisleistung<sup>15, 20, 21</sup> zeigte sich stets die Existenz eines  $S_0$ -Anteils. Beim Bestrahlen von dicken Enzymschichten (jeweils 7 mg RNase wurden aus wäßriger Lösung eingetrocknet und nach 24 Stdn. bei  $10^{-5}$  Torr in Ampullen eingeschmolzen) mit <sup>60</sup>Co- $\gamma$ -Strahlung fanden wir bei 77 °K eine  $D_{37} = (110 \pm 20)$  Mrad, was einem Temperatureffekt von  $p = 2,6$  entspricht. Werden jeweils 1  $\mu$ g RNase nur 2 Stdn. lang bei einem Druck von  $5 \cdot 10^{-2}$  Torr entgast und dann in Glasampullen eingeschmolzen, so zeigen sie bei Zimmertemperatur die gleiche Strahlenempfindlichkeit wie die im Hochvakuum bestrahlten Proben, bei 77 °K ergibt sich jedoch eine  $D_{37} = (190 \pm 15)$  Mrad oder ein Schutzfaktor von  $p = 4,5$ . Diese Versuche zeigen, daß die in den Proben vorhandenen Verunreinigungen, wie Wasser und O<sub>2</sub>, bei tiefen Temperaturen einen großen Einfluß auf die Inaktivierungsrate haben; darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß eine größere Schichtdicke das Entweichen von reaktionsfähigen diffusiblen Radikalen (z. B. von atomarem Wasserstoff) verhindert.

Bisher wurden nur wenige Inaktivierungsexperimente bei Temperaturen unterhalb von 77 °K durchgeführt. Da aber sowohl für Trypsin<sup>14</sup> als auch für Sporen von *Bacillus megaterium*<sup>13</sup> zwischen 4 °K und 80 °K eine konstante Inaktivierungsrate gefunden wurde, so erschien uns eine Zerlegung der mit Protonen und Deuteronen ermittelten Inaktivierungsquerschnitte in eine Temperatur-abhängige Komponente und in einen unterhalb von 80 °K von der Temperatur unabhängigen Anteil gerechtfertigt. Wie Versuche bei erhöhten Temperaturen zeigen<sup>14-16, 18-20</sup>, tritt oberhalb von 300 °K noch eine dritte Komponente auf, die ebenfalls Temperatur-abhängig ist. Deshalb versuchten wir, die Abhängig-

<sup>8</sup> A. A. FROST, Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen. Verlag Chemie, Weinheim 1964.

<sup>9</sup> R. B. SETLOW u. B. DOYLE, Arch. Biochem. Biophysics **46**, 31 [1953].

<sup>10</sup> R. SHALEK [1962], Pers. Mitteilung an AUGENSTEIN et al. <sup>23</sup>.

<sup>11</sup> E. E. GANASSI, L. KH. EIDUS u. R. A. ARIFULINA, Radiobiologiya **4**, 41 [1964].

<sup>12</sup> G. HOTZ u. K. G. ZIMMER, Int. J. Radiat. Biol. **7**, 75 [1963]; G. HOTZ, Z. Naturforsch. **21 b**, 148 [1966].

<sup>13</sup> R. B. WEBB, C. F. EHRET u. E. L. POWERS, Experientia [Basel] **14**, 324 [1958].

<sup>14</sup> T. BRUSTAD, in: Biological Effects of Neutron and Proton Irradiations II, S. 404. Intenat. Atomic Energy Agency, Vienna 1964.

<sup>15</sup> T. HENRIKSEN, University of California Radiation Laboratory Report UCRL-16358, Berkeley 1965.

<sup>16</sup> T. HENRIKSEN, Radiat. Res. **27**, 694 [1966].

<sup>17</sup> H. H. GÜNTHER u. K. O. HERMANN, Z. Naturforsch. **22 b**, 55 [1967].

<sup>18</sup> W. R. ADAMS u. E. C. POLLARD, Arch. Biochem. Biophysics **36**, 311 [1952].

<sup>19</sup> E. C. POLLARD, W. F. POWELL u. S. H. REAUME, Proc. nat. Acad. Sci. USA **38**, 173 [1952].

<sup>20</sup> D. J. FLUKE, Radiat. Res. **25**, 18 [1965].

<sup>21</sup> D. J. FLUKE, Radiat. Res. **28**, 677 [1966].

keit des Inaktivierungsquerschnitts oder der Inaktivierungskonstanten von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur in allgemeiner Form durch folgende Beziehung zu beschreiben:

$$S(T) = S_0 \cdot e^{-E_0/RT} + S_1 \cdot e^{-E_1/RT} + S_2 \cdot e^{-E_2/RT}. \quad (4)$$

Wir haben die bisher bekannt gewordenen Resultate gemäß Gl. (4) zerlegt und die Werte für  $E_0$ ,  $E_1$ ,  $E_2$  und  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  berechnet. Wie Tab. 1 zeigt, enthalten bis auf unsere Experimente mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung (vgl. Abb. 2) alle Wirkungsquerschnitte einen Temperatur-unabhängigen Anteil mit  $E_0 = 0$ . Allerdings konnten die Ergebnisse der bereits zitierten Arbeiten<sup>9-11</sup>, in denen ebenfalls große Temperatureffekte mitgeteilt wurden (was auf ein weitgehendes Verschwinden des konstanten Anteils schließen läßt), nicht nach Gl. (4) analysiert werden, da in ihnen wie auch in zahlreichen weiteren, nicht in Tab. 1 berücksichtigten Publikationen nur einige wenige Temperaturen untersucht worden sind. Besonders bemerkenswert ist, daß die nach Arrhenius-Darstellungen ermittelten Aktivierungsenergien  $E_1$  und  $E_2$  für die verschiedenen untersuchten Objekte die gleichen Werte haben, und zwar sowohl für die Inaktivierung der bestrahlten Objekte als auch für die Erzeugung von langlebigen Radikalen in denselben, wie sie mit der Methode der Elektron-Spin-Resonanz nachgewiesen werden können<sup>15, 16</sup>. Im Gegensatz dazu lassen die Koeffizienten  $S_0$ ,  $S_1$  und  $S_2$  keine Gesetzmäßigkeiten erkennen. Neben dieser auffallenden Übereinstimmung der ermittelten Aktivierungsenergien ist weiterhin interessant, daß der Wert von  $E_1 = 1$  kcal/Mol nicht von den Versuchsbedingungen abhängt. Bei Bestrahlung in  $\text{O}_2$ -Atmosphäre ist die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease zwar doppelt so groß wie im Vakuum, doch beträgt die aus der Arrhenius-Auftragung bestimmte Aktivierungsenergie in beiden Fällen  $E_1 = 1$  kcal/Mol (vgl. Abb. 2). Dieser Befund wird von den Beobachtungen von HERMANN und GÜNTHER<sup>4, 17</sup> gestützt, die an T1- bzw.  $\Phi\text{X 174}$ -Phagen bei Zugabe von Cystamin zwar verschiedene Schutzfaktoren von  $p = 2,5$  bzw.  $p = 1,26$  beobachteten, jedoch an beiden Phagen mit und ohne Cyst-

amin eine Aktivierungsenergie von  $E_1 = 1$  kcal/Mol ermittelten.

Der Wert von  $E_2$  läßt sich nicht so genau angeben wie der von  $E_1$ , da er durch doppelte Differenzbildung bestimmt werden muß. Nach unserer Zusammenstellung beläuft sich die Aktivierungsenergie der zweiten Temperatur-abhängigen Komponente auf etwa  $E_2 = 4$  kcal/Mol. Damit geht Gl. (4) über in den Ausdruck

$$S(T) = S_0 + S_1 \cdot e^{-1000/RT} + S_2 \cdot e^{-4000/RT}, \quad (5)$$

wobei die Gaskonstante mit  $R = 1,986$  cal/Grad · Mol einzusetzen ist. Beide hier aufgeführten Aktivierungsenergien  $E_1$  und  $E_2$  weisen eine bemerkenswerte Diskrepanz auf gegenüber den von AUGENSTEIN und BRUSTAD<sup>14, 22-24</sup> publizierten Werten von  $E_1 = 70 - 110$  cal/Mol und  $E_2 = 2,2 - 2,3$  kcal/Mol. Diese kleinen Aktivierungsenergien werden erhalten, wenn man die experimentellen Werte zwischen 4 °K und 80 °K außer acht läßt und, ohne einen konstanten Anteil abzuziehen, die Meßpunkte oberhalb von 80 °K durch zwei Komponenten beschreibt. Die gute Übereinstimmung der in Tab. 1 aufgeführten Werte für die Aktivierungsenergien  $E_0$ ,  $E_1$  und  $E_2$  läßt uns die Beschreibung der Temperaturabhängigkeit von  $S(T)$  nach Gl. (5) für zutreffend halten. Daß es prinzipiell Temperatur-unabhängige Inaktivierungsmechanismen gibt, konnten wir kürzlich durch Bestrahlung von Ribonuclease mit langsamen Protonen nachweisen<sup>25</sup>, die ihre kinetische Energie in elastischen Kernstößen an die durchstrahlte Materie abgeben<sup>26</sup>. Damit soll jedoch keinesfalls impliziert werden, daß beim Bestrahlen mit schnellen ionisierenden Teilchen die Komponente  $S_0$  von denselben Prozessen herrührt, wie sie beim Bestrahlen mit langsamen Protonen auftreten. Wahrscheinlicher ist, daß beide verschieden sind; denn die Temperatur-unabhängige Komponente der Wirkung ionisierender Strahlung verringert sich bei Zugabe von Cystamin<sup>4, 17</sup>, und zwar um den gleichen Faktor wie die Temperatur-abhängige, während die Wirkung von elastischen Kernstößen nicht durch Cystamin beeinflußt werden kann<sup>25</sup>. Dennoch zeigen diese Resultate, daß die Existenz einer von der Temperatur unabhängigen Komponente nicht a priori auszuschlie-

<sup>22</sup> L. G. AUGENSTEIN, C. A. GHIRON, K. L. GRIST u. R. MASON, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 1733 [1961].

<sup>23</sup> L. G. AUGENSTEIN u. R. MASON, in: Biological Effects of Ionizing Radiation at the Molecular Level, S. 227. Internat. Atomic Energy Agency, Vienna 1962.

<sup>24</sup> L. G. AUGENSTEIN, T. BRUSTAD u. R. MASON, Advances in Radiat. Biol. 1, 228 [1964].

<sup>25</sup> H. JUNG, Z. Naturforsch. 21b, 1165 [1966].

<sup>26</sup> H. JUNG u. K. G. ZIMMER, in: Current Topics in Radiation Research II (eds. EBERT u. HOWARD), S. 69. North-Holland Publishing Co., Amsterdam 1966.

Objekt	Strahlung	Messung	Aktivierungsenergien [kcal/Mol]			Autor
			$E_0$	$E_1$	$E_2$	
Glycin	33 MeV- $\alpha$	Radikale	0	0,8	— <sup>a</sup>	HENRIKSEN <sup>16</sup>
Glycin	100 MeV-C	Radikale	0	1,2	—	HENRIKSEN <sup>16</sup>
Glycin	330 MeV-Ar	Radikale	0	0,9	—	HENRIKSEN <sup>16</sup>
Ribonuclease	<sup>60</sup> Co- $\gamma$	Inakt.	(fehlt) <sup>b</sup>	1	—	diese Arbeit
Ribonuclease (O <sub>2</sub> )	<sup>60</sup> Co- $\gamma$	Inakt.	(fehlt)	1	—	diese Arbeit
Ribonuclease	2 MeV-p	Inakt.	0	1,05	—	diese Arbeit
Ribonuclease	2 MeV-d	Inakt.	0	1,05	—	diese Arbeit
Ribonuclease	1,4 keV-p	Inakt.	0	(fehlt)	—	JUNG <sup>25</sup>
Ribonuclease	3 MeV-e	Inakt.	0	1,06	6,1	FLUKE <sup>20</sup>
Ribonuclease	6,5 MeV-e	Radikale	0	1,1	—	HENRIKSEN <sup>15</sup>
Lysozym	3 MeV-e	Inakt.	0	0,62	2,54	FLUKE <sup>20</sup>
Lysozym	6,5 MeV-e	Radikale	0	1,2	6,6	HENRIKSEN <sup>15</sup>
Lysozym	33 MeV- $\alpha$	Radikale	0	1	5	HENRIKSEN <sup>16</sup>
Lysozym	100 MeV-C	Radikale	0	1	4	HENRIKSEN <sup>16</sup>
Trypsin	6,5 MeV-e	Radikale	0	1,45	—	HENRIKSEN <sup>15</sup>
Trypsin	18 MeV-d	Inakt.	0	1,1	4,5	BRUSTAD <sup>14</sup>
Trypsin	33 MeV- $\alpha$	Inakt.	0	1,2	5	BRUSTAD <sup>14</sup>
Trypsin	90 MeV-B	Inakt.	0	0,9	2,9	BRUSTAD <sup>14</sup>
Trypsin	100 MeV-C	Inakt.	0	1	3,1	BRUSTAD <sup>14</sup>
Trypsin	116 MeV-Ne	Inakt.	0	1	3,7	BRUSTAD <sup>14</sup>
Trypsin	330 MeV-Ar	Inakt.	0	1	3	BRUSTAD <sup>14</sup>
Trypsin	330 MeV-Ar	Radikale	0	1,3	—	HENRIKSEN <sup>16</sup>
Invertase	4 MeV-d	Inakt.	0	1	6	POLLARD et al. <sup>19</sup>
Invertase	8 MeV- $\alpha$	Inakt.	0	0,95	6	POLLARD et al. <sup>19</sup>
$\Phi$ X-174-Bakteriophagen	2 MeV-p	Inakt.	0	1	—	GÜNTHER u. HERMANN <sup>17</sup>
$\Phi$ X-174-Phagen + Cystamin	2 MeV-p	Inakt.	0	1	—	GÜNTHER u. HERMANN <sup>17</sup>
T1-Bakteriophagen	3,8 MeV-d	Inakt.	0	(fehlt)	5,4	ADAMS u. POLLARD <sup>18</sup>
T1-Bakteriophagen	2 MeV-p	Inakt.	0	1	—	HERMANN <sup>4</sup>
T1-Phagen + Cystamin	2 MeV-p	Inakt.	0	1	—	HERMANN <sup>4</sup>
T1-BUDR-Phagen	2 MeV-p	Inakt.	0	1	—	HERMANN <sup>4</sup>
T1-BUDR-Phagen + Cystamin	2 MeV-p	Inakt.	0	1	—	HERMANN <sup>4</sup>
Sporen v. B. megaterium	50 kVp-X	Inakt.	0	1,06	—	WEBB et al. <sup>13</sup>

Tab. 1. Aktivierungsenergien  $E_0$ ,  $E_1$  und  $E_2$  für die Beschreibung des Wirkungsquerschnitts  $S(T)$  als Funktion der absoluten Temperatur  $T$  durch die Gleichung  $S(T) = S_0 \cdot e^{-E_0/RT} + S_1 \cdot e^{-E_1/RT} + S_2 \cdot e^{-E_2/RT}$  ( $R$  = Gaskonstante). <sup>a</sup> Komponente wurde nicht untersucht. <sup>b</sup> Komponente wurde untersucht; sie tritt aber nicht auf.

ßen ist. Die Versuche mit 1,4 keV-Protonen können als Sonderfall von Gl. (5) angesehen werden:  $S(T) = S_0$ ;  $S_1 = 0$ . Ein weiterer Sonderfall sind unsere Experimente mit <sup>60</sup>Co- $\gamma$ -Strahlung; denn hier fehlt die konstante Komponente und  $S$  hat die Form  $S(T) = S_1 \cdot e^{-E_1/RT}$  mit  $S_0 \approx 0$ .

Gl. (5) zeigt, daß die Inaktivierungsquerschnitte von Enzymen, Bakteriophagen und Bakteriensporen sich additiv aus drei Komponenten zusammensetzen, deren Anteil an der insgesamt beobachteten Inaktivierung von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur abhängig ist. Da die Aktivierungsenergien der verschiedenen Komponenten in allen untersuchten Systemen übereinstimmen, kann man schließen, daß bei der Einwirkung von Strahlung auf biologische Objekte drei Inaktivierungsmechanismen wirksam sind, von denen einer temperatur-unabhängig ist, während die beiden übrigen in verschiedener Weise von der Bestrahlungstempe-

ratur beeinflusst werden. In welchem Maße die drei Mechanismen zur Inaktivierung beitragen, hängt vom bestrahlten Objekt, der verwendeten Strahlenart und evtl. von der Dosisrate und weiteren Parametern ab. Dieser Befund liefert eine Erklärung für die bisher unter verschiedenen experimentellen Bedingungen beobachteten unterschiedlich großen Temperatureffekte: Diese kommen nicht dadurch zustande, daß die Modifizierung der Strahlenschäden über qualitativ verschiedene Prozesse verläuft, sondern sie rühren von einer unterschiedlich großen Beteiligung der drei angeführten Inaktivierungsmechanismen am insgesamt beobachteten Effekt her. Allerdings läßt sich auf Grund unserer Untersuchungen noch keine Aussage über die Natur der drei auftretenden Inaktivierungsprozesse machen; denn bis jetzt können diese nur auf Grund ihrer Temperaturabhängigkeit unterschieden werden, was — wie bereits erwähnt — für eine eindeutige Charakterisie-

nung nicht ausreicht. Auf Grund der kleinen Aktivierungsenergien von  $E_1 = 1$  kcal/Mol und  $E_2 = 4$  kcal/Mol könnte man vermuten, daß es sich um Radikalreaktionen handelt. Dennoch halten wir es für interessant, daß sich die Strahlenempfindlichkeit von zahlreichen biologischen Objekten auf so bemerkenswert einheitliche Art und Weise als Funktion der Temperatur beschreiben läßt. Während man in den ersten Jahrzehnten strahlenbiologischer Forschung nach dem Mechanismus der Strahlenwirkung suchte, zeigte sich in den vergangenen Jahren bei chemischen Analysen ein solch breites Spektrum von strahleninduzierten Veränderungen, die nur zu einem geringen Teil für die Inaktivierung des bestrahlten Objektes von Bedeutung waren (vgl. z. B. SCHÜSSLER

und JUNG<sup>27</sup>), daß die Existenz irgendwelcher gemeinsamer Inaktivierungsmechanismen unwahrscheinlich erscheinen mußte. Vielleicht können die hier aufgezeigten Gesetzmäßigkeiten dazu beitragen, die vielen verschiedenen Erscheinungen bei der Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf biologisches Material stärker als bisher unter einheitlichen Gesichtspunkten zu beschreiben.

Herrn Professor Dr. K. G. ZIMMER danken wir für zahlreiche anregende Diskussionen, Frau Dr. HELGA SCHÜSSLER für die Überlassung der chromatographisch gereinigten Ribonuclease und Herrn P. KINDERMANN für die Durchführung der Bestrahlungen am Van-der-Graff-Beschleuniger.

<sup>27</sup> H. SCHÜSSLER u. H. JUNG, Z. Naturforschg. **22b**, im Druck.