

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

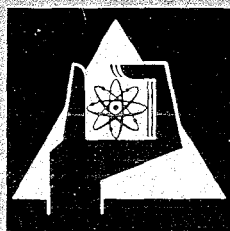
Juni 1969

KFK 1039

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen zur Wirkung von monochromatischer
Vakuum-UV-Strahlung auf DNS

K. U. Berger



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE



Untersuchungen zur Wirkung von monochromatischer Vakuump-UV-Strahlung auf DNS

Investigations on the Action of Monochromatic Vacuum-UV on DNA

K. U. BERGER

Physikalisches Institut der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 10, D-7200 Tübingen

Eingegangen am 12. März 1969, in revidierter Form am 10. April 1969

Die Wirkung von monochromatischer Vakuump-UV-Strahlung auf die DNA von *Escherichia coli* wurde untersucht. Die DNA wurde durch Bestrahlung mit 254 nm UV-Strahlung inaktiviert. Die Inaktivierung wurde durch die Bestrahlungsdosis und die Wellenlänge der UV-Strahlung beeinflusst. Die DNA wurde durch Bestrahlung mit 254 nm UV-Strahlung inaktiviert. Die Inaktivierung wurde durch die Bestrahlungsdosis und die Wellenlänge der UV-Strahlung beeinflusst.

Untersuchungen zur Wirkung von monochromatischer Vakuump-UV-Strahlung auf DNS

Investigations on the Action of Monochromatic Vacuum-UV on DNA

K. U. BERGER

Die Wirkung von monochromatischer Vakuump-UV-Strahlung auf die DNA von *Escherichia coli* wurde untersucht. Die DNA wurde durch Bestrahlung mit 254 nm UV-Strahlung inaktiviert. Die Inaktivierung wurde durch die Bestrahlungsdosis und die Wellenlänge der UV-Strahlung beeinflusst. Die DNA wurde durch Bestrahlung mit 254 nm UV-Strahlung inaktiviert. Die Inaktivierung wurde durch die Bestrahlungsdosis und die Wellenlänge der UV-Strahlung beeinflusst.

The action of monochromatic vacuum-UV radiation on the DNA of *Escherichia coli* was investigated. The DNA was inactivated by irradiation with 254 nm UV radiation. The inactivation was influenced by the dose of irradiation and the wavelength of the UV radiation. The DNA was inactivated by irradiation with 254 nm UV radiation. The inactivation was influenced by the dose of irradiation and the wavelength of the UV radiation.

Zusammenfassung: Die Wirkung von monochromatischer Vakuump-UV-Strahlung auf die DNA von *Escherichia coli* wurde untersucht. Die DNA wurde durch Bestrahlung mit 254 nm UV-Strahlung inaktiviert. Die Inaktivierung wurde durch die Bestrahlungsdosis und die Wellenlänge der UV-Strahlung beeinflusst.

Summary: The action of monochromatic vacuum-UV radiation on the DNA of *Escherichia coli* was investigated. The DNA was inactivated by irradiation with 254 nm UV radiation. The inactivation was influenced by the dose of irradiation and the wavelength of the UV radiation.

Untersuchungen zur Wirkung von monochromatischer Vakuum-UV-Strahlung auf DNS

Investigations on the Action of Monochromatic Vacuum-UV on DNA

K. U. BERGER

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforsch. 24 b, 722—728 [1969]; eingegangen am 26. Oktober 1968)

Inactivation cross sections of infectious Φ X-174-DNA in the extreme vacuum-ultraviolet were determined by irradiation of thin layers with monochromatic light down to 584 Å by means of a powerful grating-monochromator, the elements of which are described. Comparison of inactivation and light-induced electron emission shows that light of quantum energies below 7 eV inactivates by excitation only, whereas above 10.2 eV ionization is the predominant inactivation mechanism. Because of the satisfactory agreement of the curves for inactivation and electron emission, it is concluded that the remarkable increase of the inactivation cross section in the region of the short wavelength vacuum-uv is due to increasing ionization probability.

Sieht man von speziellen Fällen ab, so sind Anregungen und Ionisationen Ursache der durch elektromagnetische oder korpuskulare Strahlung hervorgerufenen bleibenden Veränderungen der bestrahlten Materie. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Anregung eines optischen Niveaus eine dauernde Strukturänderung erzeugt, bei biologisch wichtigen Molekülen oft klein. Werden etwa durch Einstrahlung von Lichtquanten der Resonanzenergie angeregte Zustände in einem Protein erzeugt, so wird im Mittel nur jedes hundertste oder tausendste Molekül die Anregungsenergie zu einer chemischen Veränderung verbrauchen¹. Dagegen besteht Grund zu der Annahme, daß bereits eine Ionisation genügt, um das Molekül strukturell umzuwandeln², was bei biologisch aktiven Molekülen meist dem Verlust der Aktivität gleichkommt. Während der wahrscheinlichste Energieverlust von 5-keV-Elektronen pro Wechselwirkung mit Desoxyribonucleinsäure zu 22 eV bestimmt wurde³, ist der reale Energieaufwand für einen inaktivierenden Molekülschaden zweifellos geringer, da bei energiereicher Strahlung kollektive Anregung der Molekülelektronen und Mehrfachionisierung nicht auszuschließen sind. Wird die Bestrahlung jedoch mit monoenergetischer Wellenstrahlung so geringer Quantenenergie ausgeführt, daß diese gerade genügt, um die Ionisierungsarbeit aufzubringen, so stammen freigesetzte Elektronen ausschließlich von Einzelionisierungen. Deren Folgen können wegen ihrer deutlich größeren Wir-

kungswahrscheinlichkeit unabhängig von den Auswirkungen der Anregungen studiert werden.

Die Ionisierungspotentiale der meisten organischen Moleküle liegen im Energiebereich oberhalb von 7,5 eV^{4,5}, was der Quantenenergie des Vakuum-UV-Lichts entspricht. Experimente mit diesem kurzwelligen Licht sind daher dem Verständnis der Wirkung ionisierender Strahlung besonders dienlich.

Obwohl schon vor längerer Zeit auf die Bedeutung solcher Untersuchungen für die strahlenbiologische Forschung hingewiesen wurde⁶, sind bislang nur vereinzelt biologische Experimente in diesem Wellenlängenbereich unternommen worden. Die Gründe dafür dürften in versuchstechnischen Schwierigkeiten zu suchen sein. Zum einen mangelt es in diesem Wellenlängenbereich an intensiven Lichtquellen, zum anderen stört die starke Absorption des Lichts durch praktisch alle Stoffe. Deshalb können zur Erhöhung der Beleuchtungsstärke keine optischen Linsen benutzt werden. Aus dem gleichen Grund sind Prismen zur Erzeugung monochromatischer Strahlung unbrauchbar, so daß nur Gittermonochromatoren Verwendung finden, die zur Vermeidung von Absorptionsverlusten durch Gase außerdem möglichst gut zu evakuieren sind. Die Strahlenexposition der Untersuchungsobjekte muß selbstverständlich ebenfalls im Vakuum stattfinden. Diese Bedingung schränkt die Auswahl geeigneter biologischer Objekte erheblich ein. Nur Enzyme, isolierte DNS und

¹ R. B. SETLOW, Radiat. Res. 2, 276 [1960].

² E. C. POLLARD, W. R. GUILD, F. HUTCHINSON u. R. B. SETLOW, Progr. Biophysics 5, 72 [1955].

³ C. D. JOHNSON u. T. B. RYMER, Nature [London] 11, 1045 [1967].

⁴ B. BREHM, Z. Naturforsch. 21 a, 196 [1966].

⁵ K. WATANABE, J. chem. Physics 26, 542 [1957].

⁶ J. FRANCK u. R. PLATZMAN, in: Radiation Biology I, 1 (ed. HOLAENDER), S. 191, McGraw-Hill, New York 1954.

einige Sporen niederer Lebewesen bewahren in salzfreier Präparation im Vakuum ihre biologische Funktionstüchtigkeit.

In der bislang einzigen uns bekannten Untersuchung mit streng monochromatischem Licht in diesem Bereich an den Enzymen Trypsin und RNase^{1, 7} wurden die Inaktivierungs- und Absorptionsquerschnitte von 3000 Å bis 1100 Å Wellenlänge gemessen. Dabei ergab sich am kurzwelligen Ende des Bereichs ein fast sprunghafter Anstieg der Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit, der auf beginnende Ionisation zurückgeführt wurde.

Die vorliegenden Untersuchungen im Wellenlängenbereich von 2537 Å bis 584 Å hatten zum Ziel, die biologische Wirkung auch des noch kurzwelligen Vakuum-UV zu studieren, das energetisch den Übergang zur langwelligen Röntgenstrahlung vermittelt und damit den Anschluß an die sogenannte ionisierende Strahlung herstellt. Insbesondere sollten die Experimente Aufschluß darüber geben, in welchem Wellenlängengebiet ausschließlich Anregungen wirksam sind, von welchen Quantenenergien an die beobachteten Wirkungen überwiegend auf Ionisationen zurückzuführen sind und welcher Energiebetrag mindestens zur Ionisation von DNS benötigt wird.

1. Monochromator

Für die Untersuchungen wurde ein lichtstarker Gitter-Monochromator für Vakuum-UV in SEYA-Anordnung⁸ konstruiert, dessen Aufbau in Abb. 1 schematisch

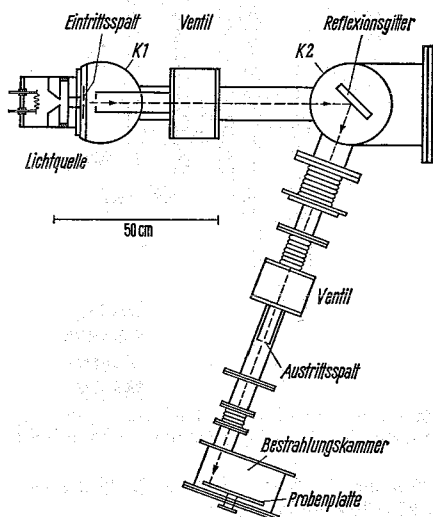


Abb. 1. Aufbau des Monochromators, K₁ = erster Rezipient, K₂ = zweiter Rezipient.

tisch dargestellt ist. Ein wesentliches Konstruktionsmerkmal des Geräts ist, daß der Strahlengang an keiner Stelle durch ein Fenster unterbrochen wird. Erst durch diese Maßnahme ist es möglich, auch im Bereich unterhalb von 1100 Å zu experimentieren; denn oberhalb dieser Grenzwellenlänge kann z. B. eine als Lichtquelle dienende Gasentladung durch ein dünnes LiF-Fenster vom Monochromator abgetrennt werden, wodurch sich die Aufrechterhaltung des Vakuums vereinfacht. Die optischen Spalte sind feststehend und bei einer Spalthöhe von 20 mm in der Breite von 0,02 bis 2,5 mm verstellbar. Zur Wellenlängenänderung wird das Konkavgitter um die zu den Gitterstrichen parallele Gitterscheiteltangente gedreht. Die dabei auftretende Defokussierung am Austrittsspalt läßt sich durch konstruktive Maßnahmen so verkleinern, daß die darauf beruhende Linienunschärfe die Größenordnung der anderen Abbildungsfehler unterschreitet. In Abhängigkeit vom Wellenlängenbereich lassen sich nach der Abbildungstheorie von SEYA⁸ die Apparatekonstanten zur Erzielung optimaler Fokussierung bei Gitterdrehung festlegen. Für ein Gitter mit 1 m Krümmungsradius und 1200 Gitterstrichen pro mm ergibt sich im Wellenlängenbereich von 0 bis 3500 Å minimale Defokussierung, wenn Einfalls- und Ausfallsrichtung des Strahls miteinander einen Winkel von 69°44' bilden und ferner die Eintrittslänge 821,7 mm und die Austrittslänge 818,4 mm betragen^{8, 9}.

Als Lichtquelle diente eine fensterlos betriebene Gasentladungslampe mit direkt geheizter Oxidkathode (Abb. 2), die nach dem Prinzip des Plasmatrons^{10, 11} arbeitet. Durch eine Blende wird die in H₂ oder He betriebene Gleichstromentladung (80 V, 15 A) eingeschnürt, wodurch sich in der Blendenöffnung ein Plasma hoher Stromdichte bildet. Das davon ausgehende intensive Licht beleuchtet durch einen Kanal von 30 mm

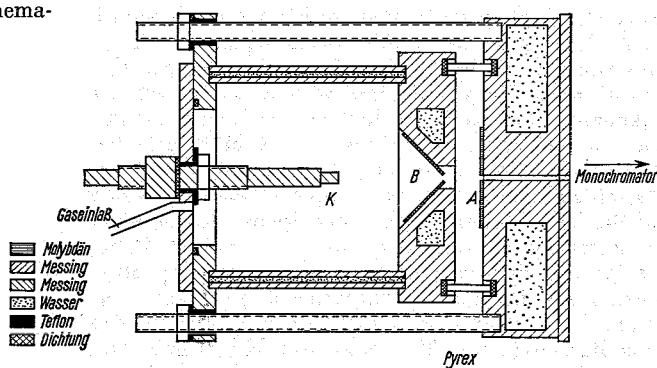


Abb. 2. Lichtquelle, K = Kathode, B = Molybdän-Blende, A = Molybdän-Anode.

⁷ R. SETLOW, G. WATTS u. C. DOUGLAS, in: Proceedings of the First Nation. Biophys. Conference, S. 174, Yale Univ. Press, New Haven, Conn. 1959.

⁸ M. SEYA, Sci. Light [Tokyo] 2, 8 [1952].

⁹ H. GREINER u. E. SCHÄFFER, Optik 15, 51 [1958].

¹⁰ A. ZIEGLER, Z. angew. Physik 10, 185 [1958].

¹¹ B. BREHM u. H. SIEGERT, Z. angew. Physik 19, 244 [1964].

Länge den Eintrittsspalt des Monochromators. Da die Lampe nicht verschlossen ist, kann das Gas aus der Lampe durch den Eintrittsspalt in den Rezipienten des Monochromators strömen. Die Regelung der Gaszufuhr erfolgte mit einem Nadelventil. Der Strömungswiderstand des Kanals vor dem Eintrittsspalt ist so bemessen, daß mit zwei Öldiffusionspumpen (Leybold DPL 250) durch differentielles Pumpen der Druck am Austrittsspalt unter 10^{-5} Torr bleibt, wenn der Druck in der Lampe auf 10 Torr H_2 gesteigert wird. Dazu ist der Rezipient in drei, durch Blenden als Strömungswiderstände getrennte Behälter unterteilt, die unabhängig voneinander evakuiert werden können. Durch alkoholgekühlte baffles an den Diffusionspumpen ($-30^\circ C$) wird eine Ölbedampfung des Gitters praktisch verhindert.

Der Gittertisch hängt an einer Drehdurchführung und ermöglicht alle zur Justierung des Gitters notwendigen Bewegungen. Die hängende Anordnung erleichtert die Reinigung des Gitters ohne Demontage durch Abspülen mit Xylol, die von Zeit zu Zeit vorzunehmen ist, da bereits geringe Verunreinigungen des Gitters die Reflexionseigenschaften außerordentlich verschlechtern. Je nach Wellenlängenbereich wurden zwei verschiedene Gitter benutzt, die beide einen Krümmungsradius von 1 m und 1200 Furchen pro mm hatten. Das oberhalb von 1200 \AA verwendete Gitter (Bausch & Lomb 35-52-25-71) besaß einen Belag aus Aluminium, der durch eine dünne MgF_2 -Bedampfung vor Oxidation geschützt war. Bei einem Glanzwinkel von $4^\circ 8'$ wird das Licht im Bereich um 1000 \AA Wellenlänge in der 1. Ordnung besonders intensiv reflektiert. Das zweite Gitter (Bausch & Lomb 35-52-23-70) hatte einen Platinbelag und einen Glanzwinkel von $2^\circ 45'$, wodurch der Wellenlängenbereich um 650 \AA in der 1. Ordnung verstärkt wird. Die Wellenlängenablesung erfolgte über eine mit der Gitterdrehachse starr verbundene Projektionskala. Die Reproduzierbarkeit der Einstellung entsprach $0,5 \text{ \AA}$. Das spektrale Auflösungsvermögen des Monochromators wird durch die Abbildungsfehler des Gitters begrenzt. Da alle Spiegelschichten im Bereich des Vakuum-UV ein geringes Reflexionsvermögen aufweisen, konnte keine Korrektur der Abbildungsfehler, etwa durch ein Spiegelsystem, ohne unerträgliche Intensitätseinbuße vorgenommen werden. Außerdem wurde auf die Verwendung gekrümmter Spalte, was zu einer Verbesserung der Auflösung führt¹², verzichtet. Daher beträgt die minimale Halbwertsbreite der Spektrallinien $1,5 \text{ \AA}$. Die hier beschriebenen Experimente wurden mit einer Spaltbreite von $1,8 \text{ mm}$ durchgeführt, was einer Bandbreite von 30 \AA entspricht. Hinter dem Austrittsspalt fällt das divergierende Lichtbündel in die Bestrahlungskammer¹³, in der sich 19 Proben auf einer drehbaren Platte befinden, die nacheinander exponiert werden. Der Abstand der Proben vom Austrittsspalt betrug 46 cm , so daß eine homogene Ausleuchtung der

Proben gewährleistet war. Der Intensitätsabfall von der Mitte zum Rand der Probe ($\phi 5 \text{ mm}$) betrug weniger als 3 Prozent.

Die Messung der auf die Proben fallenden Strahlung erfolgte durch einen Natrium-Salicylat-Schirm, dessen Fluoreszenzlicht mit einem Sekundärelektronen-Vervielfacher (Valvo 152 AVP) registriert wurde. Die Ausbeute an Fluoreszenzquanten von Na-Salicylat ist im Bereich von 500 bis 3400 \AA unabhängig von der Wellenlänge des einfallenden Lichts^{14, 15}. Der Fluoreszenzschirm bestand aus einem messinggefaßten Glasplättchen ($\phi 12 \text{ mm}$), auf das feinzerriebenes Salicylat in Benzin suspendiert aufgesprüht wurde. Der Schirm bildete gleichzeitig den Vakuumverschluß. Die Kalibrierung der Schirme erfolgte mit einer offenen Photozelle mit Nickelkathode. Dazu wurde die Elektronenausbeute von Ni bei 1216 \AA ($H\text{-I}_\alpha$) zugrunde gelegt. Nach Reinigung der Metalloberfläche mit Aceton werden bei 1216 \AA durch 100 Lichtquanten im Mittel $2,35$ Elektronen ausgelöst^{16, 17}. Die Anordnung von Photozelle und Fluoreszenzschirm ist aus Abb. 3 ersichtlich. Die Anodenplatte hat einen Spalt ($1 \times 10 \text{ mm}^2$), durch den das Licht auf die Kathoden K_1 und K_2 fällt. Hinter den Kathoden befindet sich der Fluoreszenzschirm, der gleichzeitig mit den Kathoden beleuchtet wird. Während der Bestrahlung fällt ein Teil des Lichts auf eine zweite Photozelle, deren Strom mit einem Elektrometerverstärker (EIL 33 B) gemessen wurde und nach Integration ein Maß für die auf die Probe gefallene Strahlung war.

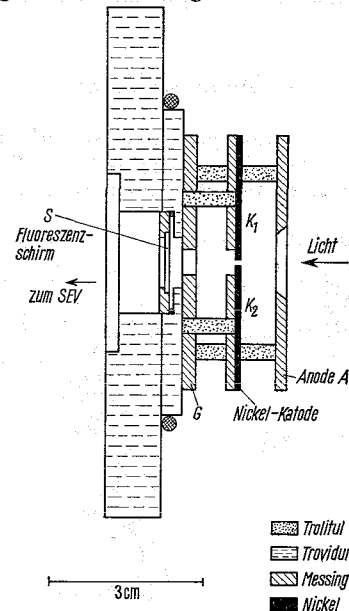


Abb. 3. Photozelle und Fluoreszenzschirm, K_1 und K_2 = Nickel-Kathoden, G = Grundplatte der Photozelle.

¹² K. L. BATH u. B. BREHM, Z. angew. Physik **19**, 39 [1964].

¹³ K. O. HERMANN, Z. Naturforsch. **21b**, 678 [1966].

¹⁴ J. A. R. SAMSON, J. opt. Soc. America **54**, 6 [1964].

¹⁵ K. WATANABE u. E. Y. INN, J. opt. Soc. America **43**, 32 [1953].

¹⁶ W. C. WALKER, N. WAINFAN u. G. L. WEISSLER, J. appl. Physics **26**, 1366 [1955].

¹⁷ H. E. HINTEREGGER u. K. WATANABE, J. opt. Soc. America **43**, 604 [1953].

2. Methodik

2.1 Infektiöse DNS

Für die Untersuchungen wurde als Objekt isolierte DNS des Bakteriophagen Φ X-174 gewählt und deren Infektiosität als Testfunktion gewertet. Diese ringförmige Einzelstrang-DNS mit dem Mol.-Gew. $1,7 \cdot 10^6$ ¹⁸ läßt sich mit großem Wirkungsgrad unversehrt aus dem Virus isolieren¹⁹. Dabei bewahrt sie ihre Infektionsfähigkeit gegenüber *E. coli*-Bakterien, wenn durch Behandlung der Bakterienwand mit Lysozym das Eindringen der DNS in die Wirtszelle ermöglicht wird²⁰. Die DNS-Isolierung wurde durch Schütteln einer gereinigten Suspension von Φ X-Phagen in gesättigter Boratpufferlösung mit Phenol vorgenommen²¹. Nach Extraktion des in der Lösung verbliebenen Phenols durch Äther wurde 24 h gegen NCE-Puffer bei 4 °C dialysiert.

2.2 Probenbereitung

Von der Ausgangslösung der DNS in NCE-Puffer wurde eine 1 : 500 Verdünnung in doppelt-quarz-dest. Wasser (pH 7,0 mit Ammoniak eingestellt) hergestellt. Aus der Verdünnung wurden je 0,01 ml auf Glasronden (Mikroskop-Deckgläschen ϕ 12 mm) aufpipettiert und sofort auf CO₂-Eis eingefroren. Anschließend wurden die Proben 10 h aus dem gefrorenen Zustand im Vakuum bei 10^{-2} Torr getrocknet. Etwa 50% der gefriergetrockneten Φ X-DNS war nach erneuter Lösung in Tris-Puffer noch biologisch aktiv.

2.3 Bestrahlung und DNS-Nachweis

Für jeden Bestrahlungsversuch wurden 19 Glasplättchen mit DNS auf dem äußeren Kreis der drehbaren Probenträgerplatte befestigt und nacheinander der Strahlung ausgesetzt. Jeweils 6 Proben befanden sich als unbestrahlte Kontrollen an lichtgeschützter Stelle in der Bestrahlungskammer. Die bestrahlten Proben wurden in je 0,5 ml Tris-Puffer (pH 8,1) gebracht. Nach 10 min war die Ablösung praktisch vollständig, jedoch blieben die Glasplättchen während der anschließenden Infektion der Sphäroplasten in den Reagenzgläsern. Die Herstellung der Sphäroplasten geschah nach einer Methode von GUTHRIE und SINSHEIMER²² aus Bakterien des Stammes *E. coli* K 12. Unter Belüftung wuchsen die Bakterien in 3XD-Medium bis zu einem Titer von $4 \cdot 10^8$ pro ml. Je 80 ml von dieser Zellsuspension wurden bei 5000 U_{pm} zentrifugiert, das Sediment in 1,4 ml Sucrose (1,5 M) resuspendiert und nacheinander 0,68 ml Rinderserum-Albumin (30%), 0,08 ml Lysozym (2 mg/ml in 0,25 M Tris-Puffer), 0,16 ml ÄDTA (4%) und 10 ml PA-Medium zugefügt. Nach 15 min Inkubation bei Zimmer-

temperatur beendet die Zugabe von 0,8 ml MgSO₄ (10%) die Reaktion²². Zur Prüfung der Infektiosität der von den Glasplättchen abgelösten DNS wurden je 0,5 ml Sphäroplastensuspension zur DNS-Lösung in Tris-Puffer (pH 8,1) zugefügt und nach 20 min Inkubation bei 35 °C 1 ml PAM-Medium zugegeben. Nach weiteren 100 min Inkubation bei 35 °C wurde im Verhältnis 1 : 10 mit dest. Wasser verdünnt, um durch osmotischen Schock die Lysis der Zellen zu vervollständigen²². Von der Verdünnung wurden 0,1 ml zusammen mit einigen Tropfen einer Flüssigkultur von *E. coli* C/1 auf einem Indikator Nährboden ausgestrichen²³ und anschließend 8 h bei 37 °C bebrütet.

3. Ergebnisse

Die Überlebensrate von infektiöser DNS nimmt bei Bestrahlung mit Vakuum-UV mit wachsender Dosis ab und strebt schließlich im Bereich hoher Dosen einem konstanten Wert zu (Abb. 4). Dieser nicht inaktivierbare Anteil der DNS betrug bei der gewählten Verdünnung der Ausgangslösung 1:500 im Mittel 30% und war unterhalb von 1700 Å nicht von der Wellenlänge des inaktivierenden Lichts, sondern nur vom Salzgehalt der Lösung abhängig. Die

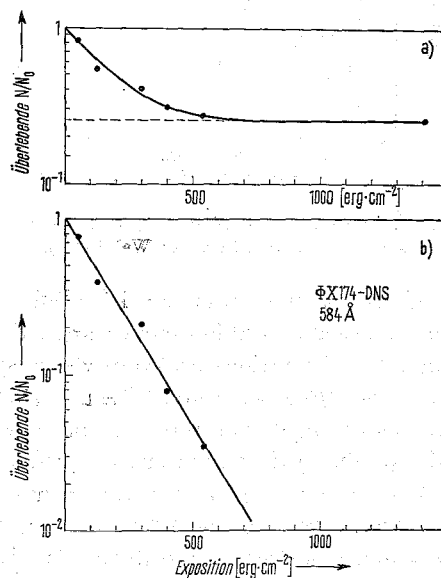


Abb. 4. Obere Kurve: Inaktivierung von Φ X-174-DNS durch 584-Å-Licht. Untere Kurve: Verlauf der Inaktivierungskurve nach Abzug des konstanten, nichtinaktivierbaren Anteils (---).

¹⁸ R. L. SINSHEIMER, J. molecular Biol. **1**, 43 [1959].

¹⁹ R. L. SINSHEIMER, J. molecular Biol. **1**, 37 [1959].

²⁰ G. G. GUTHRIE u. R. L. SINSHEIMER, J. molecular Biol. **2**, 297 [1960].

²¹ J. D. MANDELL u. A. D. HERSHEY, Analyt. Biochem. **1**, 66 [1960].

²² G. D. GUTHRIE u. R. L. SINSHEIMER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **72**, 290 [1963].

²³ C. BRESCH, Zbl. Bakteriologie. **159**, 32 [1952].

unvermeidbaren Salzspuren lagen in Form weniger winziger Kristalle vor, die jedoch dick genug waren, um infolge der äußerst geringen Durchdringungsfähigkeit des Vakuum-UV den von ihnen bedeckten Bruchteil der DNS völlig zu beschatten. Der überwiegende Teil der DNS lag jedoch in einer Schicht geringer Massenbelegung (ca. 10^{-11} g/cm²) vor, deren Dicke klein gegen die Halbwertsdicke für Licht dieser Wellenlänge war. Subtrahiert man nämlich den konstanten Anteil, dessen Größe durch häufige Messung für jede Versuchsreihe statistisch besonders gut gesichert war, von den einzelnen Meßpunkten, ergeben sich die eigentlichen Inaktivierungskurven mit exponentieller Überlebensrate (Abb. 5). Die Dosis wird nicht in erg/g angegeben,

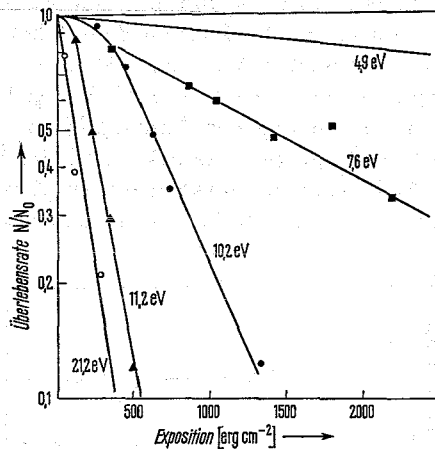


Abb. 5. Inaktivierung von infektiöser Φ X-174-DNS mit Vakuum-UV-Licht verschiedener Wellenlänge.

da das Absorptionsspektrum der DNS und damit die Quantenausbeute nicht bestimmt wurde. Frühere Messungen des Absorptionsspektrums von unspezifizierter trockener DNS zwischen 2600 Å und 1500 Å²⁴ sind auf unsere Ergebnisse nur begrenzt übertragbar, widersprechen jedoch nicht unseren Schlußfolgerungen. Wie aus der Neigung der Kurven zu entnehmen ist, führen mit zunehmender Quantenenergie des Lichts immer kleinere Expositionen zur Zerstörung der biologischen Aktivität der DNS-Molekeln. Bemerkenswerterweise zeigen die bei 1100 Å und 1216 Å gemessenen Kurven eine Schulter, während bei 2537 Å und 1630 Å wie auch bei 584 Å Wellenlänge die Inaktivierung nach einer Kinetik erster Ordnung erfolgt.

²⁴ J. W. PREISS u. R. SETLOW, J. chem. Physics 25, 138 [1956].

Aus dem exponentiellen Teil der Kurven wurden die Inaktivierungsquerschnitte ermittelt. Abb. 6 zeigt deutlich die größere Wirksamkeit des Vakuum-UV gegenüber dem langwelligeren UV-Licht. Es war

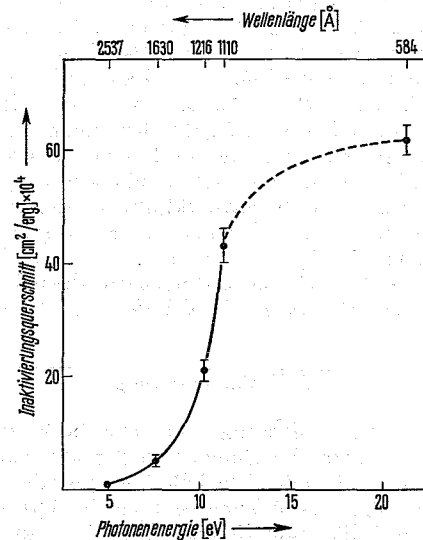


Abb. 6. Abhängigkeit des Inaktivierungsquerschnitts infektiöser Φ X-174-DNS von der Quantenenergie des eingestrahlten Lichts.

naheliegender, als Ursache dafür Ionisierung anzunehmen. Deshalb wurde neben der Inaktivierung der Φ X-DNS die Auslösung von Elektronen aus DNS durch Licht verschiedener Wellenlänge untersucht. Den dazu verwendeten experimentellen Aufbau zeigt Abb. 7. Vom Monochromator kommend fällt das Licht durch ein Loch in einer geerdeten Alu-

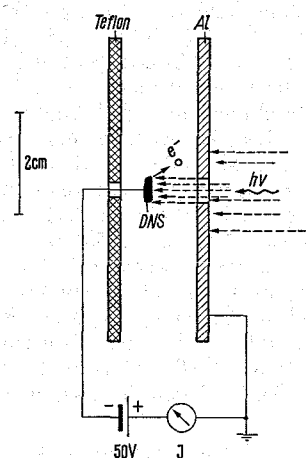


Abb. 7. Photozelle mit Kathode aus Kalbsthymus-DNS.

miniumscheibe auf ein linsenförmiges Stück gereinigter, gefriergetrockneter DNS. Da sich für diesen Versuch Φ X-DNS in ausreichender Menge nicht beschaffen ließ, wurde Kalbsthymus-DNS genommen. Wegen der nicht zu unterschiedlichen Basenzusammensetzung^{25, 18} war zu erwarten, daß sich auch die Ionisierungs-Wahrscheinlichkeiten nicht unterscheiden. Der DNS-Brocken war an einem Kupferdraht befestigt, über den die Kathodenspannung zugeführt wurde. Durch den Aufbau dieser Photozelle war völlig sichergestellt, daß ausschließlich die DNS-Schicht beleuchtet wurde. Deren Dicke (1,5 mm) garantierte die vollständige Absorption des Lichts in der Schicht, so daß die von der Anode gesammelten Elektronen nur aus der DNS entstammen konnten. Der mit einem Elektrometerverstärker registrierte Photozellenstrom ist ein direktes Maß für die relative Ionisierungs-Wahrscheinlichkeit der DNS. Die bei verschiedenen Wellenlängen ermittelten Elektronenausbeuten sind in Abb. 8 zusammen mit den Resultaten der Inaktivierungsversuche normalisiert

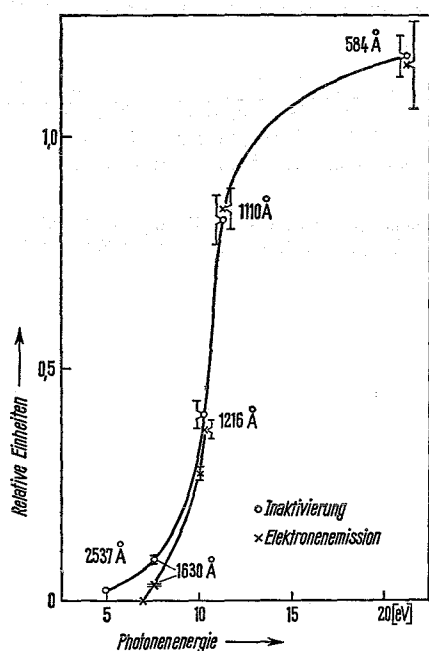


Abb. 8. Inaktivierungsquerschnitt und Elektronenemission in Abhängigkeit von der Quantenenergie des eingestrahnten Lichts.

aufgetragen. Bei Photonenergien oberhalb von 10,2 eV zeigen beide Kurven den gleichen Verlauf, während die Elektronenemission im Bereich kleiner

Energien viel schneller abnimmt als die Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit. Unterhalb von 7,1 eV war innerhalb der Meßgenauigkeit (10^{-14} A) keine Elektronenemission mehr feststellbar.

4. Diskussion

Aus der Ähnlichkeit des Kurvenverlaufs für Inaktivierung und Elektronenemission bei kleinen Wellenlängen unterhalb von 1216 Å ist zu ersehen, daß in diesem Bereich ein enger Zusammenhang von Ionisierung und Inaktivierung besteht. Unterhalb der Quantenenergie von 7,1 eV ist keine Ionisierung nachweisbar. Die Wirkung des Lichts beruht also hier, wie im Bereich des normalen UV, allein auf Anregungen optischer Niveaus der Moleküle, deren physiko-chemische Folgereaktionen zum Verlust der biologischen Funktionstüchtigkeit führen. Außerdem folgt aus der befriedigenden Korrelierbarkeit von Ionisierung und Inaktivierung, daß der Anteil der auf Anregungen zurückführbaren Veränderungen im kurzwelligen Bereich höchstens den gleichen Betrag wie im Bereich oberhalb von 1216 Å Wellenlänge erreicht. Die erheblich größere Effektivität des kurzwelligen Vakuum-UV gegenüber dem langwelligen UV-Licht, demonstriert durch die augenfällige Vergrößerung der Inaktivierungsquerschnitte mit abnehmender Wellenlänge, ist also ausschließlich auf Ionisierung der DNS-Molekeln zurückzuführen, so daß die Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit mit der Quantenenergie des Lichts im gleichen Maße zunimmt wie die Ionisierungs-Wahrscheinlichkeit.

In diesem Zusammenhang erhebt sich die Frage, welche Bedeutung den durch die Ionisierung der DNS ausgelösten Elektronen bei der Inaktivierung zugemessen werden muß. Diese Elektronen könnten einerseits Molekeln in der Umgebung des primär ionisierten Moleküls anregen oder ionisieren, so daß durch eine Primäriodisation mehrere Moleküle inaktiviert werden könnten. Es scheint aber sicher zu sein, daß die Energie der Photoelektronen selbst im günstigsten Fall, wenn die Ionisierung durch die kurzwelligste Vakuum-UV-Strahlung von 21,2 eV Quantenenergie erfolgt und zum Grundzustand des Ions führt, zu klein wäre, um eine Inaktivierung zu verursachen. HUTCHINSON²⁶, der den Verlust der Fähigkeit von Rinderserum-Albumin prüfte, mit dem spezifischen Antikörper nach Bestrahlung mit

²⁵ J. MARMUR u. P. DOTY, J. molecular Biol. 5, 109 [1962].

²⁶ F. HUTCHINSON, Radiat. Res. 1, 43 [1954].

langsamen Elektronen zu reagieren, fand, daß erst Elektronen mit einer Energie größer als 15 eV einen nicht mehr zu vernachlässigenden Beitrag zur Inaktivierung leisten.

Überraschend ist das Auftreten einer Schulter bei den Inaktivierungskurven für Bestrahlung mit Licht von 10,2 und 11,2 eV Quantenenergie, die auf eine Reaktionskinetik höherer Ordnung deuten. Dagegen zeigt die Inaktivierung sowohl bei 7,6 und 4,9 eV als auch bei 21,2 eV auch bei kleinen Dosen eine exponentielle Dosisabhängigkeit. Da auch bei γ -Bestrahlung von Φ X-174-Phagen exponentielle Inaktivierungskurven erhalten werden²⁷, ist dieser Effekt anscheinend auf das Übergangsgebiet von Anregungen und Ionisationen als bevorzugte Primärprozesse der Inaktivierung beschränkt. Obwohl auch bei UV-Bestrahlung mancher Bakteriophagen Schulterkurven auftreten²⁸, die in vielen Fällen als Ausdruck der Reparatur eines Schadens in der Wirtszelle gedeutet werden können, ist ein derartiger biologischer Effekt hier unwahrscheinlich, da Φ X-DNS in Einzelstrangform den bekannten Reparaturmechanismen nicht zugänglich ist. Bei der Klärung der Ursache könnte dem Umstand besondere Bedeutung zukommen, daß nach Absorption von Quanten mit 21,2 eV, dem doppelten Wert der Quantenenergie von 1216-Å-Licht, keine Schulterkurve resultiert. Welche Folgen

die Wechselwirkung des Moleküls mit Lichtquanten hat, deren Energie die Ionisierungsarbeit in diesem Maße übertrifft, kann aus den bisherigen Experimenten nicht gefolgert werden. Zum einen könnte sich eine Zweifachionisation ergeben. Daraus würde folgen, daß zur Inaktivierung des DNS-Moleküls mindestens zwei Ionisierungen notwendig sind, die bei Bestrahlung mit 1216-Å-Licht durch Absorption von zwei Quanten geschehen. Diese Möglichkeit besteht trotz geringer Dosisleistung, die eine gleichzeitige Absorption zweier Quanten praktisch ausschließt. Denn die Ionisation führt mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer langlebigen Radikalstelle²⁹, die erst nach Lösen der DNS-Schicht in Wasser weiterreagiert. Erst das Vorhandensein von zwei Radikalstellen an einem Molekül würde also den inaktivierenden Effekt erzeugen. Andererseits ist auch der Fall denkbar, daß auf Grund der sehr hohen Anregung durch ein 21,2-eV-Quant die Inaktivierung auf einem anderen Reaktionsweg erfolgt, als nach Absorption eines Quants von 10,2 eV, wobei auch die Ordnung der Reaktionskinetik unterschiedlich sein könnte.

Herrn Professor Dr. K. G. ZIMMER danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine fördernde Anteilnahme bei ihrer Durchführung, Herrn Dr. G. HOTZ für die Überlassung der Phagen-Suspension.

²⁷ G. HOTZ u. A. MÜLLER, Z. Naturforschg. **16b**, 282 [1961].

²⁸ U. WINKLER, H. E. JOHNS u. E. KELLENBERGER, Virology **18**, 343 [1962].

²⁹ A. MÜLLER, in: Progress in Biophys. and molecular Biol. Vol. **17**, Pergamon Press, New York 1967, S. 99.