

Die Konzentration der ätherischen Lösung des $Mn_2(CO)_8(C_{12}H_8N_2)$ betrug $2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l (Schichtdicke 0,5 cm); die Füllung der Küvetten erfolgte nach der früher beschriebenen Methode⁸. Für die Messung der zeitlichen Extinktionsabnahme wurde eine $2 \cdot 10^{-4}$ -molare benzolische Lösung (Schichtdicke 1 cm) verwendet; zur Einstrahlung wurde eine Quecksilberdampflampe der Firma Osram (HBO 200) mit vorgeschaltetem

Interferenzfilter (550 m μ ; Halbwertsbreite 12 m μ) benutzt.

Dem Fonds der Chemischen Industrie, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bund der Freunde der T. H. München danken wir verbindlichst für großzügige Unterstützung. Ebenso danken wir der Ethyl Corporation für die Überlassung von Mangancarbonyl.

Zur Inaktivierung von Milchsäure-Dehydrogenase mit langsamen Protonen

Von HEINZ KÜHN

Aus dem Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main

(Direktor: Prof. Dr. h. c. Dr. h. c. B. RAJEWSKY)

(Z. Naturforschg. 15 b, 277–284 [1960]; eingegangen am 10. Februar 1960)

Trockene Milchsäure-Dehydrogenase wurde mit Protonen verschiedener Energie bis maximal 80 keV in dünnen Schichten bestrahlt. Die Inaktivierungsquerschnitte betragen bei Zimmertemperatur ca. $0,4 \cdot 10^{-12}$ cm² und waren in dem gemessenen Energiebereich konstant. Der Einfluß der Teilchenenergie auf den Inaktivierungsverlauf wurde insbesondere bei sehr kleinen Energien abgeschätzt. Bestrahlungen bei verschiedenen Temperaturen zeigten eine Abnahme des Strahleneffektes nach niedrigeren Temperaturen.

Die systematischen Untersuchungen über die Wechselwirkung ionisierender Strahlen mit lebender Materie haben sich als außerordentlich fruchtbar erwiesen für die Erforschung der Wirkungsart dieser Strahlungen und des funktionellen und strukturellen Aufbaus des biologischen Materials. Die Untersuchungen erstreckten sich von komplizierten biologischen Systemen bis auf chemische Verbindungen, die als Grundsubstanzen der biologischen Materie angesehen werden müssen. Zum Teil können die Bestrahlungsergebnisse über Vorstellungen von den „direkten“ bzw. „indirekten“ Treffern gedeutet werden (B. RAJEWSKY, 1931–1959).

Wie sich herausstellte, können die Bestrahlungsergebnisse auch bei vorwiegend direkten Treffereignissen durch Umwelteinflüsse während und nach der Bestrahlung verändert werden^{1–7}. Insbesondere sind die grundlegenden Arbeiten von POLLARD und seiner Arbeitsgruppe⁸ zu nennen, die

über die Umwelteinflüsse die Theorie der direkten Treffer wesentlich erweiterten.

Die Untersuchungen erstreckten sich dabei vor allem auf energiereiche Teilchenstrahlungen. Arbeiten^{9–13}, die mit energiearmen Elektronen durchgeführt wurden, eröffneten weitere neue Einblicke in die biophysikalische Wirkung ionisierender Strahlung.

PERSON¹⁴ untersuchte die Wirkung langsamer Protonen auf einige Enzyme und auf *Bac. subtilis*-Sporen.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit langsamen Protonen eine einfache biologische Substanz bestrahlt werden, um den Bestrahlungseffekt in Abhängigkeit von der Protonenenergie zu studieren. Ferner sollte geprüft werden, ob der Bestrahlungseffekt von äußeren Umständen, z. B. von der Temperatur, abhängt. Als eine relativ einfache biologische Substanz wurde ein Enzym, Milchsäure-Dehydro-

¹ E. POLLARD, W. F. POWELL u. H. REAUME, Proc. nat. Acad. Sci. USA 38, 173 [1952].

² R. SETLOW u. B. DOYLE, Arch. Biochem. Biophysics 46, 46 [1953].

³ R. SETLOW u. B. DOYLE, Arch. Biochem. Biophysics 46, 31 [1953].

⁴ Z. M. BACQ u. P. ALEXANDER, Fundamentals of Radiobiology, London 1955.

⁵ R. SETLOW, Arch. Biochem. Biophysics 36, 328 [1952].

⁶ M. BIER u. F. F. NORD, Arch. Biochem. Biophysics 35, 204 [1952].

⁷ H. PAULY u. B. RAJEWSKY, Progress in Radiobiology 1956.

⁸ E. C. POLLARD, W. R. GUILD, F. HUTCHINSON u. R. B. SETLOW, Progr. Biophys. and Biophys. Chem. 5, 72 [1955].

⁹ M. DAVIS, Physic. Rev. 94, 243 [1954].

¹⁰ M. DAVIS, Arch. Biochem. Biophysics 39, 417 [1954].

¹¹ M. DAVIS u. F. HUTCHINSON, Arch. Biochem. Biophysics 39, 459 [1952].

¹² M. DAVIS u. E. POLLARD, Radiation Res. 2, 47 [1955].

¹³ F. HUTCHINSON, Radiation Res. 1, 43 [1954].

¹⁴ S. R. PERSON, Dissertation, Yale University, 1956.

genase^{*,**}, gewählt, das sich durch große chemische Stabilität und hohe chemische Nachweisempfindlichkeit auszeichnet. Seine biochemische Bedeutung war diesen Gesichtspunkten untergeordnet.

Die Bestrahlungsapparatur und Durchführung der Messungen

Die Bestrahlung der Milchsäure-Dehydrogenase (LDH) mit Protonen niedriger Energie erforderte einerseits als Maß für die in der Substanz absorbierte Dosis eine möglichst genaue Messung des Teilchenflusses (Protonen/cm² sec) und auch Kontrolle desselben während eines Bestrahlungsvorganges, andererseits aber auch eine genaue Kenntnis der Strahlhomogenität im Hinblick auf die Teilchenenergie, auf den Protonenanteil im Strahl und auf die „Ausleuchtung“ der bestrahlten Fläche. Einleitend wollen wir kurz die wesentlichen Merkmale des Protonengenerators beschreiben (Abb. 1).

Die Protonen werden in einer Ionenquelle älterer Bauart¹⁵ erzeugt. M_1 ist der Elektronen-Führungsmagnet der Ionenquelle. Die Ionen treten durch die Blende B_1 (Durchmesser 1 cm) mit einer Anfangsgeschwindigkeit von 1 keV in ein 2-stufiges Beschleunigungssystem ein, wo sie die gewünschte Endenergie erhalten. Anschließend gelangen die Protonen in ein homogenes Magnetfeld M_2 , wo sie von den H_2 -Ionen, Fremdgasionen und im Strahl entstandenen neutralen Molekülen abgetrennt werden. Die Blenden B_2 und B_3 dienen zur Kollimation des Ionenstrahles. Ihre Durchmesser betragen im allgemeinen 1 cm. Die Blende B_4 sollte zur Strahlbegrenzung beitragen und vor allem an der Wand der magnetischen Ablenkammer entstandene Sekundärelektronen abfangen. In einem Auffänger kann die Messung der Protonen oder die Bestrahlung der LDH erfolgen (T). Die Blenden B_5 und B_6 dienen zu einer weiteren Strahlbegrenzung (Durchmesser 1 cm) und sind gegen Erde elektrisch isoliert.

Die Beschleunigungs-Spannungen bis maximal 80 kV Gleichspannung lieferte eine 1-stufige Kaskaden-Hochspannungsquelle (Verdopplungsschaltung nach Cockcroft und Walton). Die Hochspannung wurde über einen abgreifbaren Spannungsteiler aus Schichtwiderständen dem Beschleunigungs-System zugeführt. Ein elektrostatisches Voltmeter U_S wurde parallel zu einem Widerstand an der geerdeten Seite des Hochspannungsteilers geschaltet und gestattete es, die Hochspannung indirekt abzulesen und zu kontrollieren. Ferner wurde die so gemessene Hochspannung mit den Ergebnissen einer Kugelfunkenstrecken-Messung verglichen. Die Messung des Protonenstromes I_t erfolgte mit einem Galvanometer (Norma, max. Empfindlichkeit $4,07 \cdot 10^{-10}$ A/Skt.). Die Blenden B_5 und B_6 dienten gleichzeitig zur Monitormessung.

Der Monitorstrom I_{mon} ist allerdings druckabhängig, da er, wie aus der Abb. 1 hervorgeht, im wesentlichen aus den H_2 -Ionen und Restgasionen besteht. Die Monitoranzeige hängt außerdem noch von der Beschleunigungs-Spannung U_B ab, da die Fokussierungs-Bedingungen des Beschleunigungs-Systems bei verschiedenen Spannungen nicht konstant gehalten werden konnten.

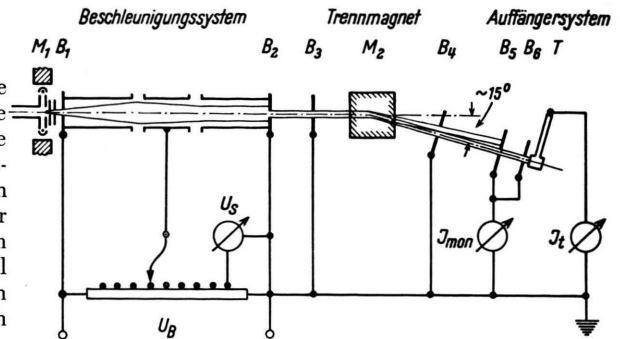


Abb. 1. Schema des Protonengenerators. (Erklärung im Text.)

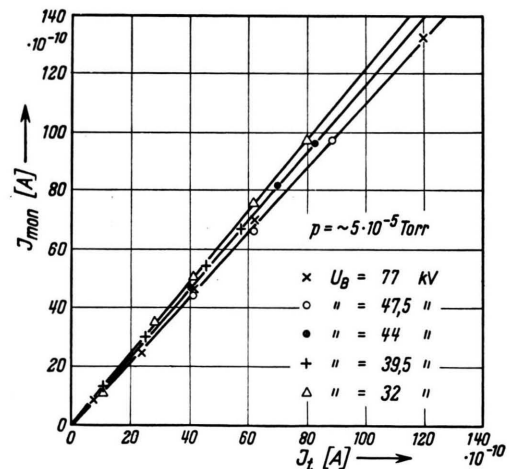


Abb. 2. Zusammenhang zwischen Monitorstrom I_{mon} und Auffängerstrom I_t bei konstantem Druck und verschiedenen Beschleunigungs-Spannungen.

Für konstante Energie und konstanten Druck läuft die Monitoranzeige linear mit dem Auffängerstrom, s. Abb. 2, so daß der Protonenstrom mit Hilfe der Blenden B_5 und B_6 auch ohne Strommessung am Auffänger, erforderlich bei der Bestrahlung der Enzymproben, kontrolliert und durch Änderung des Heizstromes der Ionenquellen-Heizung von Hand aus geregelt werden konnte.

Aus der Kenntnis des Targetstromes erhält man noch nicht den Protonenstrom, da der Targetstrom noch durch Sekundärelektronen, die beim Aufprallen der Protonen in dem Targetmaterial ausgelöst werden, verfälscht ist. Zur Messung des Sekundär-Elektronen-Anteiles wurde

* Herrn Priv.-Dozent Dr. H. PAULY danke ich für den Vorschlag, dieses Enzym für die Bestrahlungen zu benutzen.

** Die Reindarstellung der Milchsäure-Dehydrogenase aus Ratten-Skelettmuskel besorgte Herr Priv.-Dozent Dr. G.

PFLIEDERER aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Frankfurt, wofür ich herzlich danke.

¹⁵ M. v. ARDENNE, Physik. Z. 43, 91 [1942].

zwischen den Auffänger und die Blenden B_5 , B_6 eine Spannungsquelle zur Erzeugung einer Gegenspannung gelegt. Ferner wurde durch Verkleinern des Blendendurchmessers B_3 dafür gesorgt, daß der Protonenstrahl die Blenden B_5 und B_6 nicht berühren konnte. Die so gewonnenen Ergebnisse besagten, daß für die Beschleunigungs-Spannungen von 25 kV – 77,5 kV der Auffänger-

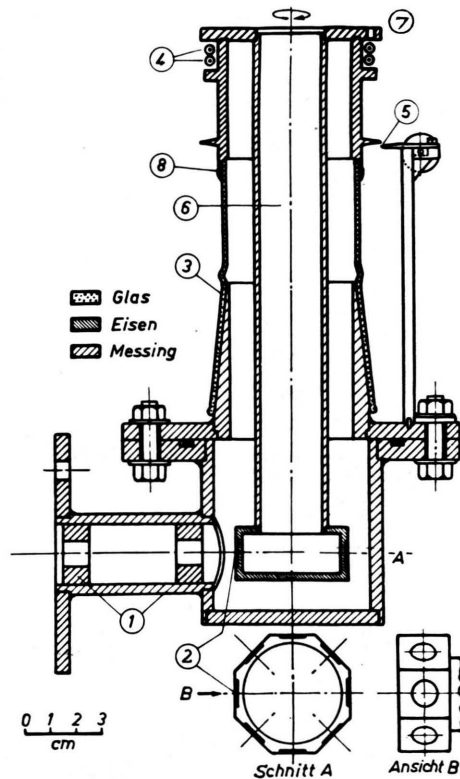


Abb. 3. Schema des Probenhalters. (Erklärung im Text.)

strom, um den Protonenstrom angeben zu können, um 40% korrigiert werden mußte. Aus den vorgegebenen Blendenöffnungen B_5 und B_6 kann dann bei gleichmäßiger Ausleuchtung der Blenden auf den Protonenfluß n (Protonen/cm² sec) geschlossen werden. Die Protonenverteilung des „Brennflckes“ auf dem Auffänger wurde mit photographischem Papier näher untersucht. Es ergab sich, daß die Protonenverteilung nicht ganz gleichmäßig war.

Um möglichst viele Proben in einem Arbeitsgang bestrahlen zu können, wurde ein Objekthalter konstruiert, der es gestattet, mehrere Proben nacheinander unter Vakuum zu bestrahlen. Entsprechend der Aufgabenstellung wurde der Objekthalter so ausgeführt, daß die Bestrahlungen bei verschiedenen Temperaturen erfolgen konnten. Die technischen Einzelheiten des Probenhalters können der Abb. 3 entnommen werden. Der Probenhalter 2 hängt an einem Glasschliff 3, um die Bestrahlungsfelder 2 in den Strahlengang drehen zu können. Der Strahlengang wird scharf begrenzt durch die

Blenden 1 (in der Abb. 1 mit B_5 und B_6 bezeichnet). Die richtige Stellung eines bestimmten Bestrahlungsfeldes kann an dem Zeigersystem 5 abgelesen werden. Der Probenhalter besitzt 8 Bestrahlungsfelder, von denen ein Feld zur Strahlungsmessung und die anderen Felder zur Aufnahme der Enzymproben dienen. Der Objekthalter konnte mit einer Heizspirale 4 elektrisch geheizt werden. Die vakuumdichte Kittung 8 zwischen Messung und Glas wurde mit trockenem Araldit durchgeführt. Bei 7 befand sich der elektrische Anschluß zur Strahlungsmessung. Die Öffnung 6 konnte je nach den Bedingungen mit flüssiger Luft, einer Kohlensäureschnee-Methylalkohol-Mischung bzw. mit Eiswasser gefüllt oder an einen Thermostaten angeschlossen werden. Der gesamte Probenhalter war über ein Isolierstück an das Vakuumssystem angeflanscht.

Zur Bestrahlung wurden 7 Enzymproben, die sich auf dünnen Aluminiumfolien befanden, mit Vakuumfett auf die entsprechenden Bestrahlungsfelder aufgeklebt, 3 weitere Enzymproben wurden auf der unteren Seite des Probenhalters als „Null-Proben“ angebracht. Die Einstellung des Protonenstromes wurde mit dem probenfreien Feld durchgeführt und gleichzeitig mit dem Monitorstrom verglichen. Nach Abschalten des Protonenstrahles (Ausschalten der Ionenquellen-Heizung) konnte die erste Enzymprobe in die Bestrahlungsstellung gebracht werden. Der Heizstrom wurde nun eingeschaltet und wenn nötig über einen Widerstand so lange nachgeregelt, bis der Monitorstrom seinen zuvor festgelegten Wert erreicht hat. Alle übrigen Betriebsbedingungen wurden nach Möglichkeit konstant gehalten. Die Dosisleistung blieb bei allen Bestrahlungsversuchen konstant und entsprach einem Protonenstrom von $4,07 \cdot 10^{-9}$ A.

Herstellung der Bestrahlungsschichten und Auswertung derselben

Die Reichweite von Protonen mit Energien bis 80 keV beträgt in Protein weniger als 1μ . Von den zu bestrahlenden Enzymproben mußten daher dünne Schichten hergestellt werden, die folgenden Anforderungen genügen sollten:

- Die Schichtdicke soll möglichst gleichmäßig sein, damit der Flächenbelag grob angegeben werden kann. Kleine Unebenheiten stören nicht, wenn diese statistisch verteilt sind und wenn die nachfolgende Bedingung b erfüllt bleibt.
- Die Schichtdicke soll einerseits überall größer sein als die Reichweite der Protonen, andererseits aber muß die Schichtdicke möglichst dünn sein, um nicht die Nachweisempfindlichkeit zur Feststellung der inaktivierten Enzymmenge herabzusetzen.
- Die Enzymschicht soll reproduzierbar sein im Hinblick auf ihre physikalischen und chemischen (Aktivität) Eigenschaften.

Zur Herstellung der Bestrahlungsschichten wurde reine und trockene Milchsäure-Dehydrogenase aus Rattenskelettmuskel benutzt. Diese LDH-Art ist gegen äußere Einflüsse sehr stabil und schien daher besonders

geeignet. Um brauchbare Schichten zu erhalten wurden die nachfolgenden 3 Methoden ausprobiert:

1. Das in dest. Wasser gelöste Enzym wurde mit einem Zerstäuber aufgesprüht und unter Vakuum getrocknet.
2. Das gelöste Enzym wurde aufpipettiert und bei 0 °C (ca.) unter Vakuum getrocknet.
3. Das gelöste Enzym wurde aufpipettiert, und dabei wurde die Lösung sofort gefroren und anschließend unter Vakuum bei Temperaturen unter 0 °C getrocknet.

Als Unterlage diente immer eine ausgestanzte dünne Aluminiumfolie. Die Verwendung von Aluminium als Unterlage erwies sich als sehr vorteilhaft und sollte eine Aufladung der Probe während der Bestrahlung verhindern. Alle 3 Methoden lieferten im Hinblick auf ihre Aktivität gut reproduzierbare Schichten. Die 3. Methode war aber deswegen vollkommen unbrauchbar, weil die aufgefrorene Schicht flockartige Gestalt annahm, sehr uneben war und sich sehr leicht von der Unterlage löste. Die 1. Methode war sehr langwierig und schwierig durchzuführen infolge der begrenzt zur Verfügung stehenden Enzymmengen, so daß ausschließlich die 2. Methode bei den späteren Versuchen herangezogen wurde. Die ausgestanzten Aluminiumunterlagen wurden in Alkohol und dest. Wasser gewaschen, unter Vakuum getrocknet, auf einer Mikrowaage gewogen (Herstellerfirma Hartmann & Braun) und kurz vor dem Aufpipettieren zwischen 2 Glasplatten und einem feinen Filterpapier plangedrückt, so daß eine kaum merkbare Musterung der Filterporen auf der einen Seite der Aluminiumfolien sichtbar wurde. Beim Aufpipettieren und beim Trocknen wurde darauf geachtet, daß die Proben genau waagrecht lagen. Anschließend wurden die Proben abermals gewogen und mit Vakuumpfet an den Probenhalter angebracht. Es wurden nur solche Proben benutzt, deren Enzymgewichte innerhalb von 4 µg konstant waren. Nach dem Bestrahlungsversuch wurden die Proben vom Auffänger gelöst und die restlichen Fettbestandteile mit Benzol, Alkohol und dest. Wasser abgewaschen. Die Proben wurden optisch bei einer Wellenlänge von 366 mµ durch Messung der zeitlichen Extinktionsänderung in einem Eppendorf-Photometer¹⁶ ausgewertet. Gemessen wurde in der üblichen Weise die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit der Brenztraubensäure-Hydrierung durch hydriertes Diphosphorpyridinnucleotid (DPN-H) und LDH. Die Reaktion kann durch folgende chemische Gleichung dargestellt werden.



Die Enzymproben wurden je nach Menge in 2–10 cm³ Triäthanolamin-Puffer (Boehringer) p_H 7,6 und 0 °C gelöst und davon 0,1 cm³ in ein Triäthanolamin-Puffer-Natriumpyruvat-DPN-H-Gemisch einpipettiert. Gemessen wurde die Extinktionsänderung in Zeitabständen von 30 Sekunden. Die Steigung des geradlinigen Kurvenverlaufs ist dann ein Maß für die relative Aktivität des Enzyms.

¹⁶ G. BEISENHERZ u. Mitarbb., Z. Naturforschg. **8b**, 555 [1953].

Bestrahlung von Milchsäure-Dehydrogenase mit Protonen verschiedener Energie

Zur Ermittlung einer Dosis-Effektkurve wurden 30–35 Enzymproben gleichzeitig angesetzt und im allgemeinen in 3 Arbeitsgänge geteilt. In einem Arbeitsgang wurden 7 Enzymproben bestrahlt, dazu gehörten immer 3 Nullproben. Sind bei den einzelnen Meßpunkten Fehlergrenzen eingezeichnet, so setzt sich der Meßwert aus 2–3 Messungen zusammen. In den Abb. 4–8 ist die Inaktivierung *A*

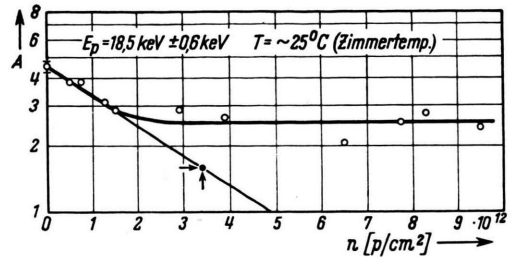


Abb. 4.

Abb. 4–8. LDH-Inaktivierung als Funktion der Dosis. (*A* Aktivität in relativen Einheiten, *n* Protonen/cm², *E_p* Protonenenergie, *T* Temperatur.)

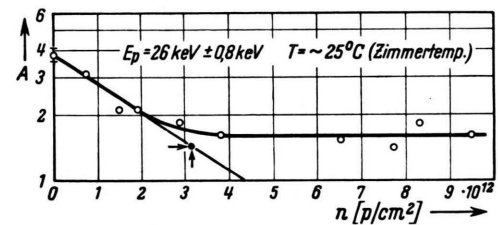


Abb. 5.

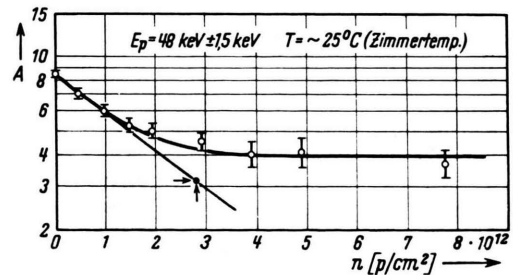


Abb. 6.

(relative Einheiten) als Funktion der „Protonendosis“ *n* (Protonen/cm²) wiedergegeben. Die aufgetragenen Enzymmengen wurden bei den einzelnen Primärenergien *E_p* der Protonen verschieden gewählt, um die Restaktivität gering zu halten. Die Messungen erfolgten bei Zimmertemperatur in einem Energiebereich von 18,5 keV–79 keV. Bestrahlungen unter 18 keV Protonenenergie wurden nicht durchgeführt, da hierzu die erforderlichen

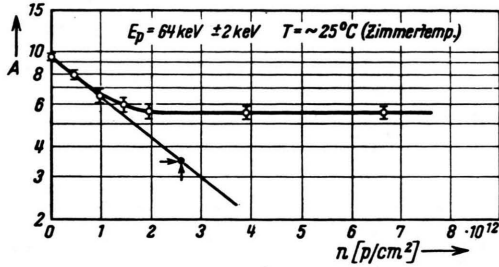


Abb. 7.

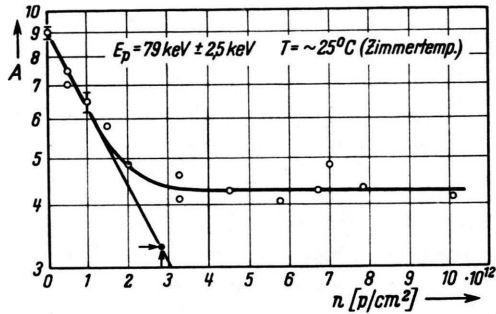


Abb. 8.

Enzymschichten außerordentlich dünn sein müßten. Aus der 37%-Dosis der Inaktivierungskurven wurde für die jeweilige Anfangsenergie E_p der Protonen der Wirkungsquerschnitt σ entnommen (Tab. 1). In dem untersuchten Energiebereich ist der Wirkungsquerschnitt konstant. Die scheinbare geringfügige Zunahme von σ mit der Energie liegt innerhalb der Fehlergrenzen.

Protonenenergie E_p [keV]	Inaktivierungs-Querschnitt σ [$\text{cm}^2 \cdot 10^{-12}$]
18,5	0,30
26	0,32
48	0,36
64	0,39
79	0,36

Tab. 1. Inaktivierungsquerschnitte bei verschiedenen Protonenenergien.

Die Inaktivierungskurven in den Abb. 4 – 8 verlaufen bei großen Protonendosen parallel zur Abszissenachse. Eine mögliche schwache Neigung ist bei den angewandten Dosen infolge der zu großen Streuung der Meßwerte nicht erkennbar.

Es gibt noch keine Theorie, die es gestattet, das Bremsvermögen langsamer Protonen befriedigend

zu berechnen. Infolge des Fehlens einer einheitlichen Theorie schätzt BOHR¹⁷ bei schweren Elementen das Bremsvermögen für niedrige Energien ab und findet, daß das Bremsvermögen proportional $Z^{1/3}$ (Z Ordnungszahl der bremsenden Materiatome) ist. Nach BETHE und ASHKIN¹⁸ ist für α -Teilchen $Z^{1/2}$ eine bessere Näherung.

FERMI und TELLER¹⁹ haben für die Wechselwirkung von Teilchen mit den Hüllenelektronen der Materie eine Beziehung unter der Annahme abgeleitet, daß sich das elektrische Teilchen durch ein Elektronengas bewegt. Diese Gleichung kann auf langsame Protonen angewandt werden, sie lautet:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4 m^2 e^4 E}{3 \pi M \hbar^3 v} \log(137 v_m/c), \quad (1)$$

wobei die „F e r m i - Geschwindigkeit“ v_m definiert wird durch

$$\frac{1}{2} m v_m^2 = \frac{\hbar^2}{2m} (3 \pi^2 N)^{2/3},$$

darin sind: m Elektronenmasse, e Elektronenladung, h P l a n c k s c h e s Wirkungsquant $\hbar = h/2 \pi$, c Lichtgeschwindigkeit, M Protonenmasse, E Protonenenergie, v Protonengeschwindigkeit, v_m F e r m i - Geschwindigkeit, N Anzahl der Atome/ cm^3 .

Die Gl. (1) gilt für $v < v_m$ und $m v_m/\hbar > 1/a$, wobei a der B o h r s c h e Atomradius ist. Die letzte Ungleichung ist im allgemeinen bei festem Bremsmedium mit nicht zu geringer Dichte erfüllt. Die Erfüllung der 1. Ungleichung hängt vom Bremsmaterial ab und ist mit Wasserstoff als Bremsmedium bei Protonenenergien unter 20 keV gewährleistet.

Die Wechselwirkung von Protonen mit den Atomkernen, darunter versteht man die sogenannten Kernstöße, läßt sich abschätzen und wird von BOHR¹⁷ nach Gl. (2) angegeben:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{\pi \hbar^4 N v^2}{m e^5 Z^{1/3}}. \quad (2)$$

Die Gl. (2) gilt in einem Geschwindigkeitsbereich $v \approx 1/10 v_0$, wobei $v_0 = e^2/\hbar$. Die Gültigkeit der Gl. (2) erstreckt sich demnach auf einen Energiebereich der Protonen von einigen keV-Energie. Aus der Gl. (1) erhalten wir für Protonen mit einer Energie von 10 keV eine lineare Energiegabe von ca. 600 eV/100 Å in dem Enzym. Nehmen wir eine mittlere Moleküldichte von 50 Å an, dann ergibt

¹⁷ N. BOHR, Kgl. danske Vidensk. Selsk. mat.-fysiske Medd. XVIII, 8, 4 [1947].

¹⁸ H. BETHE u. J. ASHKIN, in: Experimental Nuclear Physics, Vol. 1, New York 1953.

¹⁹ E. FERMI u. E. TELLER, Physic. Rev. 72, 399 [1947].

sich aus der Poisson-Verteilung für die Wahrscheinlichkeit, daß innerhalb des Moleküls gerade eine Energieaufnahme von 100 eV erfolgt, $P = 0,15$. (Eine Energieabgabe von 100 eV entspricht etwa einer Primärisonisation.) Hieraus kann man folgern, daß eine Energieabhängigkeit des Inaktivierungs-Querschnittes nicht zu erwarten ist.

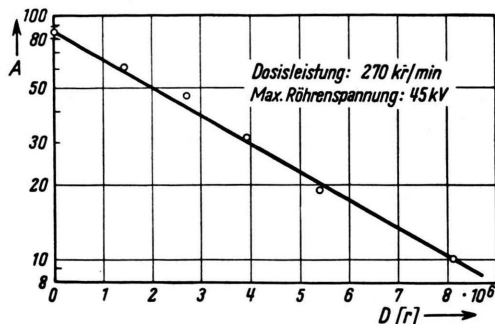


Abb. 9. Die Inaktivierung A (relative Einheiten) als Funktion der Röntgenstrahlendosis D (r). Die Bestrahlung erfolgte unter Vakuum.

Der Verlauf der Enzymaktivierung bei Röntgenbestrahlung wird in der Abb. 9 wiedergegeben. Eine Bestrahlung mit Röntgenstrahlen zeigte innerhalb der Fehlergrenzen keinen Unterschied. Auf eine etwas höhere Empfindlichkeit der Röntgenstrahlen wollen wir wegen der Fehlergrenzen der absoluten Dosisbestimmungen nicht schließen.

Über den Verlauf der Inaktivierungskurven bei energieabhängigem Wirkungsquerschnitt

Eine Energieabhängigkeit des Wirkungsquerschnittes ist dann zu erwarten, wenn die Wahrscheinlichkeit einer primären Energieaufnahme von der Energie abhängt.

Die Protonen werden in der Enzymschicht bei den hier in Frage kommenden Energien vollständig abgebremst, so daß am Reichweitenende mit einer Energieabhängigkeit des Wirkungsquerschnittes zu rechnen ist. In unseren Überlegungen nehmen wir an, daß der Wirkungsquerschnitt von der linearen Energieabgabe abhängt, wobei die lineare Energieabgabe vorgegeben wird. Von einer Energiestreuung wollen wir bei den folgenden Überlegungen absehen. Wir schließen uns den Überlegungen von BRIX²⁰ an und schreiben unter der Annahme einer

Eintreffer-Reaktion für die Abnahme der Enzymaktivität

$$dA = k dx \exp(-\sigma(x)n). \quad (3)$$

Wir bezeichnen: A Aktivität der Enzymschicht, A_0 Aktivität vor der Bestrahlung, d Schichtdicke des gesamten aufgetragenen Enzyms, k „Aktivitätsdichte“ mit $A_0 = kd$, n Anzahl der eingestrahnten Protonen/cm² (Dosis), x zurückgelegter mittlerer Protonenweg in der Enzymschicht, σ_0 geometrischer mittlerer Wirkungsquerschnitt, σ „wahrer“ Wirkungsquerschnitt, i Anzahl der primären Energieabgaben pro Wegelement mit $i = b dE/dx$, τ mittlere Moleküldicke, R Reichweite der Protonen.

Für die Abhängigkeit des Wirkungsquerschnittes von der linearen Energieabgabe können wir schreiben (s. l. c.⁸):

$$\sigma(x) = \sigma_0(1 - e^{-b\tau dE/dx}). \quad (4)$$

dE/dx ändert sich nun mit der Eindringtiefe der Protonen und wird am Reichweitenende 0. Aus Gl. (1) folgt $R \sim E^{1/2}$, GERTHSEN²¹ gibt für langsame Protonen die Beziehung $R \sim E^{3/4}$. Wir differenzieren und erhalten $dE/dR = \alpha R^s$, wir setzen diese Beziehung in (4) ein, wobei wir für R x geschrieben haben. Wir erhalten:

$$\int_0^A dA = k \int_0^R \exp\{-\sigma_0(1 - e^{-ab\tau x^s})n\} dx + \int_R^d k dx, \quad (5)$$

wobei eine Restaktivität berücksichtigt wurde. Die Gl. (5) wird angenähert durch

$$A = k \int_0^R e^{-\sigma_0 ab\tau x^s n} dx + kd - kR \quad (6)$$

mit $s = 1/3$ bzw. 1 [nach Gl. (1) ist $R \sim E^{1/2}$].

Beschränken wir uns bei der Lösung von (6) auf $s = 1$, dann können wir das Integral geschlossen lösen und erhalten

$$A_1 = \frac{k}{\sigma_0 \alpha b \tau n} (1 - e^{-\sigma_0 ab\tau R n}) + kd - kR. \quad (7)$$

In der Abb. 10 ist der Verlauf dieser Funktion für 2 verschiedene Reichweiten wiedergegeben. Es wurden folgende Daten benutzt: $\sigma_0 = 0,36 \cdot 10^{-12}$ cm², $\tau = 5 \cdot 10^{-7}$ cm, $b = 0,63 \cdot 10^{10}$ erg⁻¹, $\alpha = 30$ erg/cm², $d = 10^{-4}$ cm, für k wurde 10^6 gesetzt (relative Einheiten), so daß $kd = 100$ wird. Die Daten entsprechen etwa den aus der Gl. (1) gegebenen Verhältnissen. Aus der Abb. 10 entnehmen wir eine geringe Neigung der Inaktivierungskurve bei großem n . Die Restaktivität ist in der Abb. 10 gestrichelt angedeutet.

²⁰ P. BRIX, Z. Physik **126**, 35 [1949].

²¹ C. GERTHSEN, Ann. Physik **5**, 657 [1930].

Der Einfluß der LDH-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen während der Bestrahlung

Über biologische Medien, die als wasserfrei angesehen werden können, gibt es wenige Arbeiten, die einen „Temperatureffekt“ behandeln. Wenn wir unter direkter Trefferwirkung solche Strahlenwirkungen verstehen, die in trockenen oder annähernd trockenen Substanzen ausgelöst werden, so haben

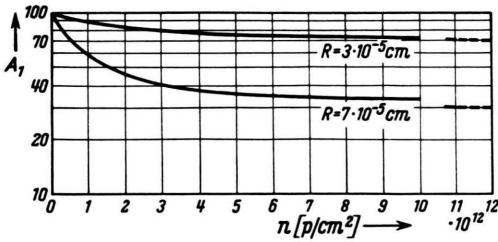


Abb. 10. Verlauf der Inaktivierungskurve (LDH) bei energieabhängigem Wirkungsquerschnitt. (Erklärung im Text.)

wir es bei Viren definitionsgemäß nur mit direkten Treffervorgängen zu tun, so daß hier eine Temperaturabhängigkeit der Strahlenwirkung bedeutungsvoll erscheint. Untersuchungen²²⁻²⁵ an feuchten und trockenen Phagen mit Röntgenstrahlen und Deuteronen zeigen eine eindeutige Temperaturabhängigkeit auch an trockenen Phagen. Da bei komplexen biologischen Medien ein Strahleneffekt wenigstens z. T. auf die Inaktivierung von Enzymen zurückgeführt werden kann, verdient die Temperaturabhängigkeit durch Strahleninaktivierung der Enzyme besondere Beachtung. Arbeiten^{1-3, 7, 8, 26}, die einen Temperatureffekt zeigen, wurden an trockener Katalase, Invertase, Desoxyribonuclease und an Arginin-Decarboxylase bei Bestrahlung mit UV, Elektronenstrahlen oder Deuteronenstrahlen durchgeführt. Zur Untersuchung eines Temperatureffektes an der LDH, wurden die Enzymproben, nachdem sie an dem Targethalter befestigt waren, auf die jeweilige Temperatur abgekühlt und mit Protonen, deren Energie 79 keV betrug, bestrahlt. Als Kühlmittel dienten Eiswasser, Kohlensäureschnee in Methylalkohol und flüssige Luft. Da sich infolge der Kühlung des Targethalters Öl aus dem Treibmittel der Diffusionspumpen auf den Enzymproben niederschlug, mußte vor dem Targethalter eine Kühlfalle angebracht

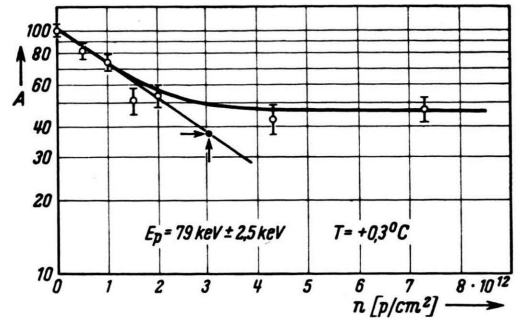


Abb. 11.

Abb. 11–13. LDH-Inaktivierung als Funktion der Dosis. (A Aktivität in relativen Einheiten, n Protonen/cm², E_p Protonenenergie, T Temperatur.)

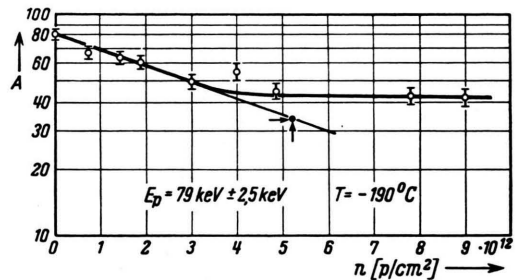


Abb. 12.

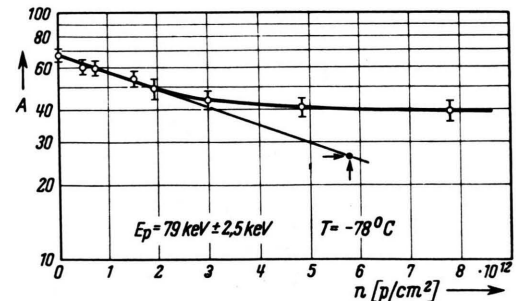


Abb. 13.

werden, die mit flüssiger Luft gefüllt wurde. Das Anbringen der Kühlfalle verhinderte aus Platzgründen eine Messung des Monitorstromes, so daß nach jeder Bestrahlung der Ionenstrom durch Drehen des Targethalters auf das enzymfreie Bestrahlungsfeld abgelesen werden mußte. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Abb. 11, 12, 13 wiedergegeben. Aus den Abb. 11, 12, 13 kann man die dazugehörigen Inaktivierungs-Querschnitte entnehmen. In der fol-

²² W. R. ADAMS u. E. POLLARD, Arch. Biochem. Biophysics **36**, 311 [1952].

²³ TH. WOOD, Nature [London] **173**, 41 [1954].

²⁴ C. BACHOFER u. Mitarbb., Bacteriol. Proc. N. S. A. **39** [1953].

²⁵ D. FLUKE, Radiation Res. **4**, 193 [1956].

²⁶ C. L. SMITH, Arch. Biochem. Biophysics **45**, 83 [1953].

genden Tab. 2 sind diese Wirkungsquerschnitte in Abhängigkeit von der Temperatur bei einer Protonenenergie von 79 keV zusammengestellt.

Temperatur [°C]	Inaktivierungs-Querschnitt σ [$\cdot 10^{-12} \text{cm}^2$]
+ 25	0,36
+ 0,3	0,32
- 78	0,17
- 190	0,18

Tab. 2. Inaktivierungs-Querschnitte bei verschiedenen Bestrahlungstemperaturen.

Die Größenordnung des Effektes stimmt mit den Ergebnissen, die an anderen Enzymen gewonnen wurden, überein. Eine Deutung dieser Temperaturabhängigkeit ist bisher noch in Ansätzen stecken geblieben.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. B. RAJEWSKY, danke ich herzlich für die mir gewährte Unterstützung und Beratung. Die Dissertationsarbeit wurde mit dem Preis der Vereinigung der Freunde und Förderer der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt 1959, ausgezeichnet.

Zur Biogenese der Isoflavone

II. Mitt.: Über den Mechanismus der Umlagerung

VON HANS GRISEBACH und NORBERT DOERR

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.

(Z. Naturforschg. 15 b, 284—286 [1960]; eingegangen am 3. April 1960)

With the aid of DL-phenylalanine-[2- ^{14}C] and DL-phenylalanine-[3- ^{14}C] it has now been proved that the biogenesis of 7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavone (formononetin) in red clover involves a phenyl migration. This is the first phenyl migration to be found in nature.

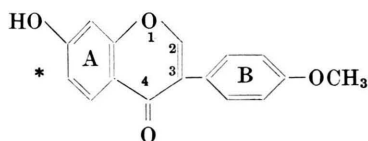
In der ersten Mitt.¹ konnte mit Hilfe von DL-Phenylalanin-[carboxyl- ^{14}C] gezeigt werden, daß im Laufe der Biogenese des Formononetins (7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavon) im Rotklee (*Trifolium pratense*) eine Umlagerung stattfindet. Die Lokalisation von 94% der Aktivität in der Carbonylgruppe (C₄) des Isoflavons* ließ sich durch die Wanderung einer Phenylgruppe, oder einer C₆-C₁-Einheit (z. B. Benzoyl) erklären. Eine Entscheidung zwischen beiden Mechanismen konnte nun durch den Einsatz von DL-Phenylalanin-[2- ^{14}C] und DL-Phenylalanin-[3- ^{14}C] erzielt werden.

Methode

Gewinnung von Isoflavon-[^{14}C]

Die Gabe der radioaktiven Verbindungen und die Isolierung des Isoflavons erfolgte in gleicher Weise wie in der ersten Mitteilung. 80 Kleeblätter erhielten je 0,1 mC

¹ H. GRISEBACH, Z. Naturforschg. 14 b, 802 [1959], wird als I. Mitt. bezeichnet.



DL-Phenylalanin-[2- ^{14}C] (spez. Aktivität 2,40 mC/mMol, Radiochemical Centre Amersham) und DL-Phenylalanin-[3- ^{14}C] (spez. Aktivität 1 mC/mMol, Volk Radio Chemical Co. Chicago).

Oxydation von 2,4-Dihydroxyphenyl-4'-methoxybenzylketon zu p-Methoxybenzoesäure

Zur Oxydation löste man 100 mg des Ketons in einer Lösung von 1,25 g KOH in 10 cm³ dest. Wasser und fügte die Lösung von 700 mg KMnO₄ in 5 cm³ dest. Wasser hinzu. Es wurde 6 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, vom Braunstein abgesaugt, der Rückstand mit wenig heißem Wasser gewaschen und das Filtrat mit etwas Aktivkohle aufgekocht. Nach der Filtration säuerte man mit Schwefelsäure an, wobei CO₂-Entwicklung auftrat. Die Lösung wurde dann mit NaCl annähernd gesättigt und die Säure im Eisschrank auskristallisieren gelassen. Ausbeute an p-Methoxybenzoesäure 41 mg (69,5% d. Th.), Schmp. 183—185°. Misch-Schmp. mit reiner Anissäure 183—185°. Die Säure wurde vor der Messung der Radioaktivität durch Vakuumsublimation im liegenden Rohr gereinigt.

Die anderen Abbaureaktionen wurden entsprechend den Angaben in der I. Mitt. ausgeführt.

Ergebnisse

Das nach Gabe von Phenylalanin-[2- ^{14}C] und Phenylalanin-[3- ^{14}C] erhaltene radioaktive Isoflavon wurde nach Verdünnung mit jeweils 300 mg in-