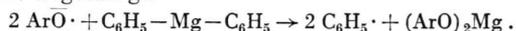


weitgehend übereinstimmt. Auf Grund des IR-Spektrums und der H-Bestimmung<sup>8</sup> müssen in dieses Polymere außerdem pro 10 Chlorphenoxyreste durchschnittlich 3 Phenylreste eingebaut worden sein (ber. C 36,5 H 0,58 Cl 56,66; gef. C 35,5 H 0,65 Cl 56,83). Die Anwesenheit von *para*-Diphenyläther-Verknüpfungen im Polymeren wird durch Aufspaltung zu Chloranil (30% d. Th.) mittels rauchender Salpetersäure bewiesen.

Die Entstehung der Reaktionsprodukte läßt sich befriedigend deuten, wenn man für die Dissoziation des Dimeren X a gekoppelte Gleichgewichtssysteme vorstehender Art annimmt, die sich normalerweise zugunsten des Monomeren X einstellen, wie aus der EPR-Messung hervorgeht.

Die im Gleichgewicht vorhandenen verschiedenen polymeren Radikale  $\text{ArO}\cdot$ , nach der Menge des isolierten Pentachlorphenols zu schließen insbesondere aber V,

vermögen nun dem Diphenylmagnesium ein Elektron zu entreißen und werden so zum entsprechenden Phenolat abgesättigt.



Die neu gebildeten Phenylradikale stabilisieren sich durch Dimerisierung zum Diphenyl bzw. durch Abstraktion von Wasserstoff aus dem Lösungsmittel (Äther) zu Benzol. Ein Teil der Phenylradikale wird in vorerst unbekannter Weise durch Reaktion mit den verschiedenen polymeren Aroxylen des Gleichgewichtssystems in den wachsenden Polydiphenyläther eingebaut.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für ihre Unterstützung.

<sup>8</sup> Die Durchführung der H-Bestimmung verdanken wir Herrn Dr. W. WALISCH, Saarbrücken.

## Elektronenresonanz-Untersuchungen von Nachreaktionen in einem röntgenbestrahlten Faserprotein<sup>1</sup>

Von B. RAJEWSKY und A. REDHARDT

Max Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.

(Z. Naturforschg. 17 b, 569—570 [1962]; eingegangen am 9. Mai 1962)

Nachdem in einer Reihe von Arbeiten<sup>1-5</sup> gezeigt wurde, daß die Wirkung von Röntgenstrahlen auf bestimmte feste Systeme von Milieubedingungen abhing, nahm die Bedeutung dieser Substanzen als Modelle für Strahlenreaktionen in Geweben und Organismen weiter zu. Der Einsatz der Elektronenresonanz als Meßmethode ist hier vorteilhaft, da feste Substanzen mit guter Genauigkeit zerstörungsfrei untersucht werden können und zudem unter bestimmten Bedingungen<sup>6</sup> Aussagen über Einzelprozesse<sup>7</sup> möglich sind.

Schwefelhaltige biologische Festkörper sind in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, da sie nach Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen ein auf ein schwefelhaltiges Radikal (vgl. jedoch unten) zurückgeführtes charakteristisches ESR Signal liefern (Abb. 1), und damit möglicherweise als Modelle für Schutzreaktionen in biologischen Systemen in Betracht kommen.

Es wurde hier das Zeitverhalten dieses Signals (A in Abb. 1) in Federkeratinen (Cystingehalt 6—8%<sup>8</sup>) untersucht, das eine Röntgenstrahlendosis von 2,8 Mrad

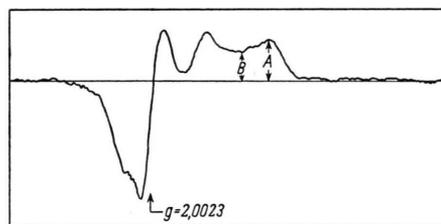


Abb. 1. Elektronenspinresonanz von röntgenbestrahlten Federkielen bei 9523 MHz, 13 Min. nach Bestrahlungsende. Die flüchtige Linie am Ort des freien Spins<sup>14</sup> ist noch nicht abgeklungen.

in 7 Min. erhalten hatte<sup>9</sup>. Die Strahlenqualität betrug hierbei 10 mm HWS Wasser.

Die Signale wurden mit einem selbstgebauten Gerät<sup>10</sup> im x-Band beobachtet, der Reflexionsresonator enthielt, wie bereits beschrieben<sup>11,12</sup>, stets einen passend orientierten  $\text{CuSO}_4$ -Einkristall als Intensitätsstandard.

Es ergab sich, daß die Amplitude  $A^x$  der Linie am niederfrequenten Ende des Keratinspektrums mit der

\* Gewidmet dem Max Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt, aus Anlaß seines 25-jährigen Bestehens.

<sup>1</sup> E. C. POLLARD, W. R. GUILD, F. HUTCHINSON u. R. B. SETLOW, Progr. Biophysics biophysic. Chem. 5, 72 [1955].

<sup>2</sup> C. S. BACKOFER, C. F. EHRET, F. MAYERS u. E. L. POWERS, Proc. Acad. Sci. USA 39, 744 [1953].

<sup>3</sup> P. ALEXANDER, R. M. BLACK u. A. CHARLESBY, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. A 232, 31 [1955].

<sup>4</sup> H. PAULY u. B. RAJEWSKY, Progress in Radiobiology, Oliver and Boyd, Edinburgh 1956; H. PAULY, Habilitationsschrift, Frankfurt/M. 1960.

<sup>5</sup> H. KÜHN, Z. Naturforschg. 15 b, 277 [1960].

<sup>6</sup> W. GORDY, W. B. ARD u. H. SHIELDS, Proc. nat. Acad. Sci. USA 41, 983 [1955].

<sup>7</sup> A. REDHARDT, Montreux-Symposium über Strahlenwirkung und Milieu. Strahlentherapie, Sonderband im Druck.

<sup>8</sup> D. W. WARD u. H. P. LUNGGREN, Adv. Prot. Chemistry, Bd. 9, 1954.

<sup>9</sup> O. HEUSE, Z. angew. Physik 7, 387 [1955].

<sup>10</sup> A. REDHARDT, Strahlentherapie 109, I, 133 [1959].

<sup>11</sup> H. POHLIT, B. RAJEWSKY u. A. REDHARDT, Free Radicals in Biol. Systems, Acad. Press 1961.

<sup>12</sup> B. RAJEWSKY u. A. REDHARDT, Nature [London] 193, 365 [1962].

Zeit nach Bestrahlungsende zunimmt und Sättigungswerte von 130–150% erreicht. Bedeutet  $A^x(t)_{\text{sat}}$  den Sättigungswert,  $A^x(t)$  den Momentanwert, so läßt sich die Zunahme in erster Näherung durch eine Beziehung

$$\ln(A^x_{\text{sat}} - A^x(t)) = a - b t \quad (1)$$

darstellen (Abb. 2). Für  $A^x_{\text{sat}}$  ergeben sich graphisch (Abb. 2 oben) sinnvolle Werte, jedoch reicht die Meßgenauigkeit noch nicht aus, um bimolekulare Anteile

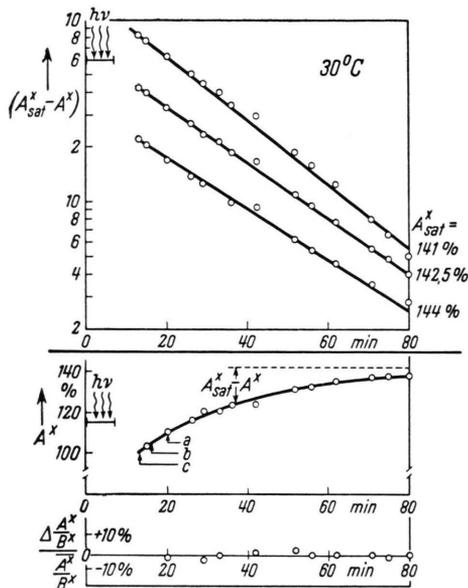


Abb. 2. Oben:  $A^x_{\text{sat}} - A^x$  in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  nach Bestrahlungsbeginn. Für  $A^x_{\text{sat}} = 142,5\%$  ist der lineare Zusammenhang Gl. (1) erfüllt. Mitte:  $A^x$  in Abhängigkeit von  $t$  (s. o.).  $A^x$  ist die normierte, auf die momentane Spektrometer-Empfindlichkeit bezogene Amplitude der Linie A (Abb. 1). Unten: Kurvenformparameter  $A^x/B^x$  in Abhängigkeit von  $t$ .

der Reaktion auszuschließen. Die Geschwindigkeitskonstante  $b$  hängt von der Meßtemperatur ab, sie ist in dieser Näherung

$$b = b_0 e^{-\frac{\Delta E}{2kT}}$$

Für  $\Delta E$  ergab sich graphisch aus Abb. 3 oben ein Wert von  $\Delta E = 0,64$  eVolt. Die Reaktionsgeschwindigkeit läßt sich ebenfalls aus der Neigung der Kurventangenten der Anstiegskurven Abb. 2 Mitte entnehmen. Diese Anstiege wurden für verschiedene Zeiten nach Bestrahlungsende ( $c = 13$  Min., 16 Min., 20 Min.) ermittelt und in Abb. 3 unten in Abhängigkeit von  $1/T$  dargestellt. Für  $c = 13$  Min., entsprechend dem Zeitpunkt, zu dem die Probe in den vorgeheizten Resonator eingesetzt wurde, ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen  $\log dA^x/dt$  und  $1/T$ . Die hieraus ermittelte Aktivierungsenergie beträgt  $\Delta E = 0,65$  eVolt.

Beide Verfahren zur Bestimmung von  $\Delta E$  sind für  $A^x_{\text{sat}} = \text{const}$  rechnerisch äquivalent, ergänzen sich jedoch experimentell, vgl. die eingezeichneten Fehlerbreiten.

Die Kurvenform im niederfrequenten Teil des Keratinspektrums (entsprechend dem Quotient  $A^x/B^x$  vgl. Abb. 1) blieb während des Intensitätsanstieges, nahezu konstant (vgl. Abb. 2 unten sowie Fehlerrechnung in l. c.<sup>13</sup>). Hieraus schließen wir, daß ein bestimmtes

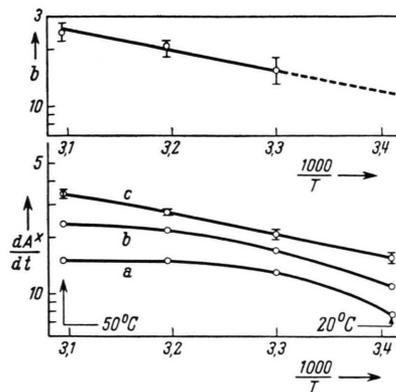


Abb. 3. Oben: Geschwindigkeitskonstante  $b$  in Abhängigkeit von der reziproken absoluten Temperatur  $T$ . Unten: Reaktionsgeschwindigkeit  $dA^x/dt$  in Abhängigkeit von  $1/T$  für drei verschiedene Zeitpunkte  $a, b, c$  (vgl. Text und Abb. 2).

Radikal noch nach Bestrahlungsende unter Mitwirkung von Diffusionsprozessen langsam gebildet wird. Hierbei kann der Ort des Radikalzustandes fest bleiben, so daß die Diffusion von eingeschlossenen Gasen oder Störstellen zu der ursprünglich gebildeten radikalischen Störung hin geschwindigkeitsbestimmend ist. Mit den Ergebnissen früherer Messungen an Federkeratin besser verträglich ist jedoch die Annahme einer langsamen Diffusion des Radikalzustandes zum Cystinteil des Keratins. Messungen im Hochvakuum sollen hier weitere Anhaltspunkte liefern.

Der beschriebene Effekt konnte in dieser Intensität nur an frischen Keratinen (Federkiele von Leghornhennen) beobachtet werden. Ebenso trat er nur auf, wenn die Keratine vor Bestrahlung und Messung intensiv getrocknet wurden (4 Tage über  $P_2O_5$  bei  $45^\circ$ , Wasserentzug von ca. 6%). Trotzdem also ein nahezu wasserfreies System vorliegt, ist hier jedoch von einem indirekten Treffmechanismus zu sprechen, da eine Änderung des primär gebildeten Radikalzustandes unter Mitwirkung von Diffusionsvorgängen vorliegt und der Temperaturkoeffizient der entsprechenden Reaktionsgeschwindigkeit bei Raumtemperatur meßbar ist. Möglicherweise spielen in den oben zitierten Arbeiten<sup>1-5</sup> ebenfalls Festkörperdiffusionen, also indirekte Mechanismen, eine Rolle. Die Versuche zur Aufklärung des Einflusses von gebundenem Wasser sowie Alter der Keratine werden fortgesetzt.

<sup>13</sup> B. RAJEWSKY u. A. REDHARDT, Z. Naturforschg., im Druck.

<sup>14</sup> B. RAJEWSKY, A. REDHARDT u. G. FROESE, Z. Naturforschg. **14b**, 740 [1959].

Abb. 1–3. Lebende Spermatiden von *Gryllus domesticus* in Carlsson-Ringer, 1600-fach. 1 a. Sehr junge Spermatidenzelle mit rundem Kern und Nebenkern (N), noch ohne Schwanzfaden. 1 b. Der Schwanzfaden ist ausgewachsen und hat einen Teil des Cytoplasmas mitgenommen. Der Kern hat sich gestreckt und beträchtlich an Volumen verloren. A: Akrosom. 1 c. Der Cytoplasmamantel des Kernes ist nahezu verschwunden. Sein Volumen hat weiter abgenommen. Der proximale Teil des Schwanzfadens ist durch die Mitochondrienschläuche verdickt. Spermatidkerne dieser Phase besitzen bereits eine deutlich doppelbrechende Peripherie. 1 d. Das restliche Cytoplasma wandert vom Kern in Richtung Schwanz (Pfeil). Der Kerndurchmesser hat sich weiter verringert. Kerne dieser Phase besitzen eine stark doppelbrechende Peripherie. 1 e. Reifes Spermium. A: Akrosom. Der Kern endet etwa an der mit einem Pfeil bezeichneten Stelle. Man erkennt durch einen Vergleich mit den Abb. 1 b–d, daß sich sein Volumen wohl ausschließlich auf Kosten seines Durchmessers verringert hat.

Abb. 2 a. Spermatidkern zwischen gekreuzten Polarisatoren, um etwa  $30^\circ$  gegen die OW-Achse geneigt. Hierbei löschen Quadrant 1 und 3 aus, 2 und 4 bleiben hell. Die geringen Resthelligkeiten beiderseits des dunklen Mittelstriches im Quadrant 3 beruhen auf Formdoppelbrechung an der Grenze zwischen dichtem und weniger dichtem Medium. 2 b und c. Spermatidkerne in OW-Stellung zwischen gekreuzten Polarisatoren. Man erkennt an der Kernperipherie 4 etwa gleichstark doppelbrechende Quadranten. Demnach müssen die doppelbrechenden Mizelle schräg zur Längsachse des Kernes liegen. Die Breite der doppelbrechenden Schicht bleibt auch bei Schrumpfung des Kerndurchmessers konstant. 2 d. Wird ein Spermatidkern oder, wie hier, Spermienkern um  $90^\circ$  um seine Längsachse gedreht, so erscheinen nur mehr zwei doppelbrechende Quadranten. Auch sie löschen in OW-Lage die Kernachse nicht aus.

Abb. 3 a–c. Dieselben Objekte wie in Abb. 2 a–c. Quadrant 2 und 4 wurden durch Tischdrehung um ca.  $-20^\circ$  in Auslöschlage, danach um  $+45^\circ$  in Diagonallage gebracht. Bei jeweils maximaler Kompensation steigt die Helligkeit des Untergrundes von a–c an. Sie ist ein Maß für die zunehmende Größe der Doppelbrechung. In allen 4 Bildern (Abb. 3 a–d) ist die Schwingrichtung der Polarisatoren ein wenig gegen die Bildkanten verdreht. Abb. 3 d. Wie Abb. 2 d, nur kompensiert, um zu zeigen, daß auch hier die doppelbrechenden Mizelle in den beiden Kernhälften einander nicht parallel liegen.

Abb. 4 und 5. Entwicklungsstadien des Spermatidkernes, dargestellt an mit Bouin-Allen fixierten in Paraffin geschnittenen ( $3\mu$ ), nach Feulgen gefärbten Präparaten.

Abb. 4 a. Runder, junger Kern, dessen Lumen, hier nicht sichtbar, von teilweise kondensierten Chromosomen durchzogen wird, die allem Anschein nach mit ihren beiden Polen an der Kernmembran haften. Abb. 4 b. Das Chromatin hat sich an der Kernperipherie angereichert. Der Kern ist in der Nähe des Schwanzfadenansatzes (Beschreibung im Text) tief eingedellt. Abb. 4 c. Der Kern beginnt, sich zu strecken. Das Chromatin liegt nun praktisch ganz an der Kernperipherie, spart jedoch (Pfeile) beiderseits eine dem Schwanzansatz benachbarte Zone aus. Abb. 4 d. Der Kern streckt sich weiter. Die dem Schwanzfaden benachbarte Kernperipherie, hier eine scheinbar ebene Fläche (Pfeil), bleibt chromatinfrei.

Abb. 5 a. Der Kern hat nun Lanzenspitzenform angenommen. In diesem Stadium ist seine Peripherie deutlich doppelbrechend. Abb. 5 b. Der Kerndurchmesser hat sich weiter verringert. Die Chromatinzone an seiner Peripherie ist gleichstark geblieben. Abb. 5 c. Ein Bündel reifer Spermien.

Abb. 6 a–d. Objekt und Technik wie Abb. 4 und 5. Querschnitte durch Spermatidkerne verschiedenen Alters. In allen diesen Phasen bleibt die periphere Chromatinzone gleich dick. Das Kerninnere ist ganz schwach feulgen-positiv! positiv!

Abb. 7. Junger runder Spermatidkern mit peripher liegender, etwa  $0,25\mu$  breiter Chromatinzone, deren Elemente (hier nicht zu erkennen) aufgeschraubt sind und noch ziemlich regellos durcheinanderliegen. Schon hier findet sich zwischen Chromatin, welches an einer Verdichtungszone haftet (vz) und Kernmembran ein lichter Spalt. An manchen Stellen (A) tritt die Verdichtungszone besonders deutlich hervor.

Abb. 8. Querschnitt durch jungen, lanzettförmigen Spermatidkern. a: Zellgrenzmembran. a: Verdichtungszone, von der aus zunächst radial, später wirt, einheitliche Chromatinfäden von etwa  $20m\mu$  Durchmesser abgehen. M: die beiden Mitochondrien, die zusammen mit dem Schwanzfaden (Schw) über eine lange Strecke in einer Rinne des schiffchenförmigen Kernes liegen.

Abb. 9. Längsschnitt durch ein älteres lanzettförmiges Spermium. Die noch in Abb. 8 einheitlich dicken Chromatinfäden beginnen, zu stärkeren Elementen zu kondensieren. Ein Teil von ihnen endet in etwa  $0,3\mu$  Abstand von der Kernmembran, ein anderer, der aus sich verjüngenden dicken Strängen hervorgeht (unbeschriftete Pfeile), zieht tiefer in das Kerninnere hinein. a: Zellgrenzmembran. b+c: Kernmembran. e: Struktur, an der die Chromatinfäden haften. m: Kernmitte. M: Mitochondrienpaar. Punktirtes Kreuz: Vorzugsrichtung der Mizelle in den vier Quadranten (vgl. Abb. 2 a).

Abb. 10. Schrägschnitt durch ein älteres Spermium mit stark kondensierter Chromatinzone, deren Breite unverändert etwa  $0,3\mu$  beträgt. Auch die Chromatinfäden des isotropen Kerninneren aggregieren nun zu dicken Fäden, von denen man Längs-, Quer- und Schrägschnitte erkennen kann. Diese isotrope Zone geht unmittelbar in die anisotrope Zone über, ohne daß an dieser Grenze etwa tangential verlaufende kurze Chromatinstränge oder Bögen vom Durchmesser der radial verlaufenden peripheren Stränge zu erkennen wären.

Abb. 11. Zwei Spermatidkerne vom gleichen Alter wie der in Abb. 8 dargestellte Kern. Man erkennt a: die Zellgrenzmembran, b: die äußere, c: die innere Kernmembran. Dann folgt ein heller Spalt und darauf eine der Kernmembran ringsum parallel verlaufende Verdichtungszone (vz), an die sich (Pfeile Chr) Chromatinfäden unmittelbar anheften. Gelegentlich (Pfeil rö) sieht diese Verdichtungszone aus, als wäre sie aus schräg getroffenen Röhren aufgebaut.

Abb. 12. Hier ist die Verdichtungszone bereits deutlich zu erkennen (Pfeil e). Sie ist doppelt konturiert. An ihr haften zahlreiche Chromatinfäden. Sie sind in ihrem Anfangsteil gestreckt (Zone st), später aufgelockert, offenbar aufgeschraubt (Mehrfachgabeln). In ihrem Anfangsteil scheinen sie gelegentlich aus zwei einander parallelen Fäden zusammengesetzt zu sein. a: Zellgrenzmembran, b: Derivat der äußeren Kernmembran mit Röhren (r), c: äußere Kernmembran selbst oder bereits innere Kernmembran, d: innere Kernmembran oder Zwischenschicht.

Abb. 13. Tangentialschnitt durch einen Spermatidkern vom Stadium der Abb. 8. Man erkennt zahlreiche gleichstarke quergeschnittene Fadenenden, Außendurchmesser etwa  $20m\mu$ , Wandstärke etwa  $7m\mu$ , innen hohl. Diese Fadenenden sollten den längsgetroffenen Fadenabschnitten der Abb. 12, Zone st, identisch sein.