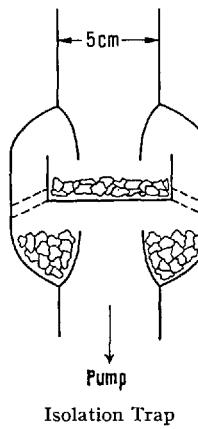


ances of our water baffle and isolation trap the pumping speed was very high. The level of impurities in our all-glass system was negligible.

Mercury diffusion pumps have been successfully used for obtaining ultra-high vacuum (10^{-9} to 10^{-10} mm Hg) by trapping the backflowing mercury vapors in liquid nitrogen-cooled isolation traps. Such pumping systems have previously been employed in investigations on the interaction of gases with metals (BECKER³, EISINGER⁴, KISLIUK⁵, HICKMOTT⁶, and EHRLICH⁷). In our studies gases were adsorbed on the surfaces of metal ribbons, and the pressure changes in the systems were monitored with ion gauges. The amounts of adsorbed gases were determined by flashheating the metal ribbons and recording the resulting desorption pressure peaks.

The use of a mercury diffusion pump always presents the danger of mercury contamination with the consequent difficulty of reconditioning the system. In studying the interaction of hydrogen and of nitrogen with molybdenum in the dynamic system, we used a three-stage glass oil diffusion pump. After some preliminary tests with a liquid nitrogen-cooled isolation trap for preventing oil vapors from entering the system, BIONDI's non-refrigerated high-speed isolation trap was brought to our attention. As it appeared to offer great advantages, we adapted his design to our system (Fig.); we used 8 mesh activated alumina beads (Alcoa, grade F-1) as the trapping material. In addition, a high conductance water baffle was inserted between the pump and the isolation trap. Pumping speeds were obtained, on the low pressure side of the trap, of $14-24$ l/sec for hydrogen in the pressure range of 1×10^{-8} to 5×10^{-6} mm Hg. This compares very well with the rated pumping speed of the oil diffusion pump which is quoted by the manufacturer as 25 l of air/s at the pump casing.



The working unit (total volume 3.3 l) as well as the isolation trap, could be baked at 450°C by swinging a hinged furnace over the system; the water baffle could be separately heated with electrical tape. In a first bakeout, for dehydrating the activated alumina beads, the temperature was slowly and stepwise increased to 450°C in two days, keeping the pressure below 1 μ in the glass system, and at about 10 μ in the foreline. Another two days of baking at 450°C reduced the pressure to below 0.2 μ and 1 μ , respectively, and the heating was discontinued. A base pressure of 5×10^{-10} mm Hg was measured at room temperature after degassing the gauges and rebaking the system at 450°C overnight. When a steady state hydrogen pressure was established in the adsorption cell, no significant amounts of impurities could be detected except after

adsorption times of several hours. A discussion of our studies has been submitted for publication elsewhere⁸.

We have operated our system continuously for a period of more than three months. Even after this interval the activated alumina bead material was still trapping oil vapors efficiently, as indicated by the low level of impurities in the system. However, a bakeout was necessitated by an inadvertent contamination of our unit with air. Ultra-high vacuum was again obtained after baking at 450°C overnight.

We would like to express our appreciation to Mr. N. MILLERON of the Lawrence Radiation Laboratory, Livermore, for this valuable advice and guidance in designing our system.

H. U. D. WIESENDANGER and R. A. PASTERNAK

Stanford Research Institute, Menlo Park (Calif.), May 2, 1960.

Zusammenfassung

Ultrahochvakuum mit Basisdruck von weniger als 5×10^{-10} mm Hg wird routinemässig erzeugt und für mehrere Monate mittels einer Öldiffusionspumpe aufrechterhalten. Eine mit aktivierter Alumina beschickte Isolationsfalle von grossem Querschnitt ist zwischen Pumpe und Glasystem eingesetzt; so wird ohne irgendwelche Kühlung das Zurückströmen von Öldämpfen in die Experimentierapparatur vollkommen verhindert.

³ J. A. BECKER, *Advances in Catalysis*, Vol. 7 (Academic Press 1955), p. 136.

⁴ J. EISINGER, *J. chem. Phys.* 29, 1154 (1958).

⁵ P. KISLIUK, *J. chem. Phys.* 30, 174 (1959).

⁶ T. W. HICKMOTT and G. EHRLICH, *J. Phys. Chem. Solids* 5, 47 (1958).

⁷ G. EHRLICH, *J. phys. Chem.* 60, 1388 (1956).

⁸ R. A. PASTERNAK and HANS U. D. WIESENDANGER, to be published.

COGITATIONES

Zur Rolle von Schwermetallionen im Wirkungsmechanismus von Strahlenschädigung und Strahlenschutz

Es ist – vor allem von BACQ *et al.*¹ – darauf hingewiesen worden, dass viele strahlenschutzwirksame Substanzen Komplexbildner sind bzw. im Organismus in solche übergeführt werden und dass auch für ausgesprochene Chelatbildner wie Komplexon oder Oxin Strahlenschutzwirkung festgestellt wurde. Dies kann als ein Hinweis dafür angesehen werden, dass an den für die Strahlenschädigung verantwortlichen Reaktionen Metallionen massgeblich beteiligt sind.

Es wird allgemein angenommen, dass diese Schädigungsreaktionen in einem Angriff von OH⁻ oder OOH⁻ Radikalen auf noch unbekannte biologische Funktionsträger bestehen und – zum Beispiel über Hydroperoxyde – zu funktionsunfähigen Folgeprodukten führen². Es ist

¹ Z. M. BACQ, A. HERVE und P. FISCHER, *Bull. Acad. Méd. Belg.* 18, 226 (1953). – P. ALEXANDER, Z. M. BACQ, S. F. COUSENS, M. FOX, A. HERVE und J. LAZAR, *Rad. Res.* 2, 392 (1955).

² S. z. B. Z. M. BACQ und P. ALEXANDER, *Grundlagen der Strahlenbiologie* (Stuttgart 1958), p. 73. – R. LATARJET, *Les Peroxydes Organiques en Radiobiologie* (Paris 1958).

weiterhin verschiedentlich dargelegt worden, dass zumindest ein Teil des auftretenden Strahlenschadens nicht von primär durch die Strahlung gebildeten Radikalen ausgelöst wird, sondern dass aus solchen Radikalen H_2O_2 entsteht, und dass dieses H_2O_2 das schädigende Agens darstellt³.

Für die Art der Beteiligung von Metallionen wie Fe^{3+} oder Cu^{2+} am Ablauf der Schädigungsreaktionen wäre demnach folgendes Bild zu diskutieren: Das durch die Strahlung gebildete H_2O_2 ist im Gegensatz zu den ebenfalls entstehenden Radikalen relativ langlebig. Es kann dadurch an beliebige Stellen der Zelle diffundieren und dort wieder in reaktive Radikale zerlegt werden, wenn an diesen Stellen Metallionen wie Fe^{3+} oder Cu^{2+} vorhanden sind, welche bekanntlich⁴ diesen Zerfall katalysieren.

Sind diese Metallionen nun koordinativ an Substanzen gebunden, die für das Funktionieren der Zelle wesentlich sind – wie zum Beispiel Nukleinsäuren⁵, die als «Informationsträger» für den Aufbau der Zellenzyme angesehen werden können⁶ – so ist anzunehmen, dass sie das in Form des H_2O_2 diffundierende «Radikal-Depot» räumlich gesehen gerade an solchen Stellen zu aktivieren vermögen, an denen Radikale besonders gefährliche Schädigungen hervorrufen müssen.

Zu prüfen ist demnach, ob und inwieweit Wirkungsmechanismen der genannten Art das Ausmass biologischer Strahlungsschäden bestimmen. Bei unseren Versuchen unternahmen wir zunächst, die Wirksamkeit solcher Mechanismen in einer Modellreaktion zu exemplifizieren, indem wir den Einfluss von Cu^{2+} -Ionen auf die Geschwindigkeit der Reaktionen zwischen H_2O_2 und verschiedenen Nukleotiden untersuchten.

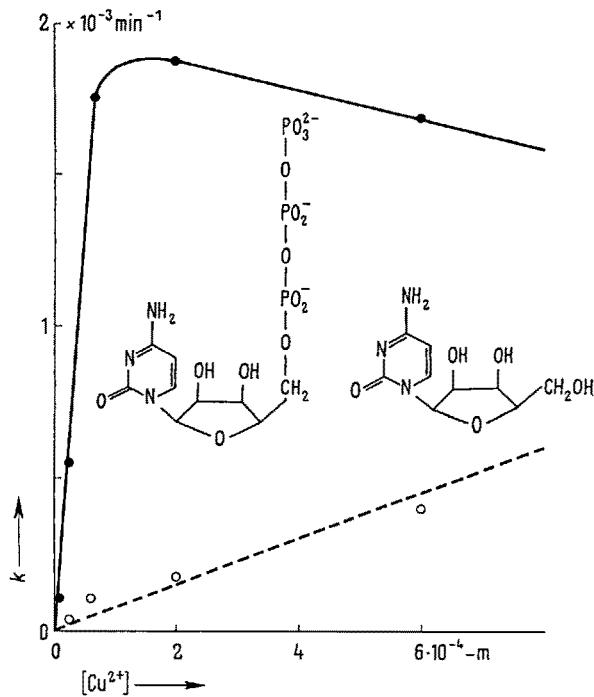
Pyrimidin-Basen wie zum Beispiel Cytidin reagieren nur sehr langsam mit H_2O_2 , die Reaktion wird jedoch durch Cu^{2+} -Ionen beschleunigt. Die Geschwindigkeit dieser Zersetzungreaktion des Cytidins, die sich durch das Verschwinden der Pyrimidin-Absorptionsbande bei ca. 270 m μ verfolgen lässt, wurde in Abhängigkeit von der Konzentration an zugesetztem Cu^{2+} gemessen. Um den Einfluss einer Komplexbildung zwischen Substrat und Metallion zu untersuchen, wurde einmal Cytidin – welches mit Cu^{2+} unter den Versuchsbedingungen keine Komplexe bildet – und zum anderen Cytidintriphosphat (CTP) als Substrat verwendet, welches mit Cu^{2+} einen 1:1-Komplex bildet, für dessen Dissoziationskonstante ein pK von ca. 5,5 angenommen werden kann⁷. Das Ergebnis einer solchen Versuchsreihe ist in der Figur dargestellt.

Es ist ersichtlich, dass im Falle des Cytidins die Zersetzungsgeschwindigkeit nur langsam und etwa linear mit steigender Cu^{2+} -Konzentration zunimmt, während für CTP schon bei sehr kleinen, zu [CTP] etwa äquivalenten Cu^{2+} -Konzentrationen ein Maximum der Zersetzungsgeschwindigkeit erreicht wird. Diese ist hier um einen Faktor von etwa 20 grösser als die Zersetzungsgeschwindigkeit des Cytidins bei der gleichen Cu^{2+} -Konzentration.

Die Erklärung dieser Befunde ist wohl darin zu sehen, dass die im Komplexverband Substrat-Metallion aus H_2O_2 gebildeten Radikale eine hohe statistische Trefferwahrscheinlichkeit für die Reaktion mit dem Substrat haben. Für die Radikale, die im Versuch mit dem kein Komplexe bildenden Cytidin in «freier Lösung» durch Reaktion zwischen Cu-Ionen und H_2O_2 entstanden sind, werden hingegen infolge des wesentlich grösseren Diffusionsweges Konkurrenzreaktionen, wie Radikalkombinationen und Reaktionen mit H_2O_2 vor der Reaktion mit dem Substrat bevorzugt sein.

Wenn diese Vorstellungen zutreffen, sind noch krassere Unterschiede zwischen Metallionen bindenden und nicht-bindenden Substraten hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit mit H_2O_2 dann zu erwarten, wenn die Versuchs-

bedingungen biologischen Verhältnissen dadurch angehert werden, dass der Lösung ausser dem Nukleotid noch andere organische Stoffe zugesetzt werden, die eine Radikal-abfängende Wirkung besitzen. Bei einer solchen, zu den Versuchen in der Abbildung analogen Versuchsreihe, bei welcher in der Lösung Diglycyl-Glycin ($10^{-4}m$) als Radikal abfangendes «Protein-Modell» vorhanden war, ergab sich tatsächlich, dass die Zerstörungsgeschwindigkeit des CTP nur wenig beeinflusst wurde, diejenige für Cytidin jedoch durchweg um einen Faktor von $1/10$ gegenüber den entsprechenden Versuchen ohne Peptid verringert war.



Geschwindigkeitskonstanten k für die Reaktion zwischen $10^{-3} \text{ M } H_2O_2$ und 10^{-4} M Cytidin (○) bzw. Cytidintriphosphat (●) in Gegenwart verschiedener Cu^{2+} -Konzentrationen. k ist berechnet als Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion pseudo-erster Ordnung in bezug auf das betreffende Nukleosid nach $d(E_{270})/dt = -k(E_{270})$.
 $pH = 5,1$ bis $5,2$, $T = 37^\circ\text{C}$.

³ S. z. B. L. R. BLINKS, J. cell. comp. Physiol. 39, 11 (1952). – G. ALPER, Disc. Farad. Soc. 12, 284 (1952); Nature 172, 957 (1953). – O. WARBURG, W. SCHRODER, H. GEWITZ und W. VOLKER, Naturwissenschaften 45, 192 (1958). – H. HOLZER und S. FRANK, Angew. Chem. 70, 570 (1958). – A. M. SHEFNER, Rad. Res. 12, 471 (1960).

⁴ S. z. B. H. BAXENDALE, Advanc. Catalys. 4, 31 (1952).

⁵ S. z. B. W. E. C. WACKER und B. L. VALLEE, J. biol. Chem. 234, 3257 (1959).

⁶ S. z. B. F. LEUTHARDT, Lehrbuch der physiologischen Chemie (Berlin 1959), p. 454. – A. M. KUZIN, Izvest. Akad. Nauk. S.S.R. Ser. Biol. 1957, 273.

⁷ Für Cu-ATP wurde $pK_1 = 5,50$ gemessen (H. BRINTZINGER und S. FALLAB, Helv. chim. Acta 43, 43 (1960)); ATP und CTP weisen nahezu identische Komplexbildungskonstanten mit den Metallionen Mg^{2+} , Mn^{2+} und Co^{2+} auf (E. WALAAS, Acta chem. Scand. 12, 528 (1958)), es ist also anzunehmen, dass eine solche Analogie auch für Cu^{2+} grösserordnungsmässig gilt.

⁸ S. z. B. J. S. WIBERG und W. F. NEUMANN, Arch. Biochem. Biophys. 72, 66 (1957). – E. FRIEDEN und J. ALLES, J. biol. Chem. 230, 797 (1958).

Die Ergebnisse der oben skizzierten Versuche zeigen also, dass in Gegenwart von Liganden durch H_2O_2 ausgelöste Zerstörungsreaktionen von Cu-Ionen dorthin gelenkt werden, wo diese koordinativ gebunden sind. In weiteren Versuchen wurde noch für eine Reihe anderer biologisch bedeutsamer Metallionen untersucht, mit welcher Geschwindigkeit CTP in Form des entsprechenden Metallion-CTP-Komplexes durch H_2O_2 zerstört wird. Die ermittelten relativen Geschwindigkeitskonstanten k_{M-CTP} bezogen auf $k_{Cu-CTP} = 1$ sind in der Tabelle aufgeführt. Wie zu erwarten, sind nur Redox-wirksame Metallionen katalytisch aktiv, da die Katalyse der H_2O_2 -Zerlegung Redoxschritte des Metallions involviert⁴. Die relativen Wirkungsmaßen der aktiven Metallionen Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} und Co^{2+} sind im übrigen untereinander auffallend wenig verschieden.

Relative Geschwindigkeit der Zerstörung verschiedener Metallion-CTP-Komplexe durch 10^{-3} m H_2O_2

k_{Cu-CTP}	k_{Mn-CTP}	k_{Co-CTP}	$k_{Fe^{III}-CTP}$	k_{Zn-CTP}
1,00	0,54	0,63	1,22	0,03

Die strahlenbiologische Relevanz unserer Beobachtungen ist darin zu sehen, dass das Ausmass zumindest der auf das – durch die Strahlung gebildete – H_2O_2 zurückgehenden Strahlungsschäden zum Beispiel an Nukleinsäuren mit Sicherheit von Metallionen-Gleichgewichten abhängig sein muss. Da nun Komplexbildner in die Lage solcher Gleichgewichte im Sinne eines Metallionen-Entzugs eingreifen, ist zu verstehen, dass sie eine Prophylaxe des Strahlenschadens bewirken können.

Die Lage der für das Auftreten der Strahlungsschäden wichtigen Verteilungsgleichgewichte von Metallionen wie Cu^{2+} oder Fe^{3+} zwischen Nukleinsäuren, anderen im biologischen Medium vorhandenen Ligandsystemen und den Strahlenschutzsubstanzen ist naturgemäß in unserem Modellversuch nicht untersuchbar. Für die hochgeladenen Nukleinsäure-Anionen ist jedoch eine hohe Metallionen-Bindungstendenz zu erwarten⁸.

Wir glauben, hiermit gezeigt zu haben, dass für eine genaue Kenntnis des Zustandekommens von Strahlungsschäden noch erhebliche Informationen über die Bindungsverhältnisse katalytisch aktiver Metallionen in den biologischen Systemen notwendig sind, und dass bei *in vitro*-Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit biologischer Materialien, wie zum Beispiel Nukleinsäuren, auf definierte Verhältnisse hinsichtlich des Metallionen-Gehaltes geachtet werden muss.

Herrn Professor Dr. S. FALLAB danken wir für die Diskussion verschiedener Probleme, Fräulein HEDY KULL für die Ausführung experimenteller Untersuchungen und dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Kommission für Atomwissenschaften, für die gewährte Unterstützung.

H. BRINTZINGER, B. PRIJS und H. ERLENMEYER

Anstalt für Anorganische Chemie, Basel, 6. Juli 1960.

Summary

The catalysis of the reaction between H_2O_2 and nucleotides by biologically important metal ions has been studied spectrophotometrically, the importance of complex-formation equilibria for this catalysis was demonstrated. Radiobiological implications are discussed.

COGITATIONES

Temperature and Salinity Relationships in Marine Bottom Invertebrates¹

By C. SCHLIEPER, H. FLÜGEL, and J. RUDOLF²

In recent times, the biological significance of temperature and salinity in sea water has been thoroughly discussed by GUNTER³ and PEARSE and GUNTER⁴. A number of other excellent reviews touch on various aspects of the effect of temperature and salinity on marine organisms⁵⁻⁸. Here we should like to restrict ourselves to a few significant observations:

In order to study the influence of temperature and salinity on the viability and the metabolisms and thus on the distribution of marine species, it is not necessary to examine intact animals. In most cases, an analysis of surviving tissue pieces is sufficient, because thermal and osmotic resistance are largely based on local qualities in the cells. In order to prove this, we have compared the cellular thermal and osmotic resistance of some bivalves from the French Mediterranean coast taken out of different depths of water.

The temperature of sea water at 0–1 m depth on the French Mediterranean coast changes in the course of the year on an average of approximately from 13° to 23°C. The species which live in this area therefore are used to a yearly temperature variation of at least 10°C. The temperature changes rapidly with increasing depth. Already at 100 m depth, there occur only slight variations between 13° and 15°C. It is therefore to be expected that the species, living in these depths, are relatively stenothermic: that means that they can only sustain slight temperature changes.

The salinity of the sea water on the French Mediterranean coast changes very little, between 37 and 38‰. In the 'Etangs', however, it is different. In these lagoons, separated from the open sea, salinities from 37 to 15‰ and less do occur.

Seven species of bivalves were examined. The shore water forms, *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes decussatus*, and *Cardium edule*, were easily obtained. *Mytilus galloprovincialis* and *Cardium edule* were obtained from the free sea shore as well as from the 'Etangs'. For purposes of comparison, *Mytilus edulis* and *Cardium edule* from the Baltic Sea were used later on. *Pinna nobilis* were obtained from medium depths by diving. *Pinna pectinata* and *Avicula hirundo* were finally dredged out of 100 m depth.

At first the cellular thermal resistance was measured on small surviving gill pieces in sea water at a temperature of 35°C and higher. The temperature was increased by 1°C every 15 min. At equal time intervals, the ciliary activity of the tissue was examined under the microscope. Typical and reproducible differences appeared. The gill cells of *Tapes decussatus* from the sand of the sea shore showed

¹ Presented at the Internat. Oceanographic Congress, New York 1959.

² Institut für Meereskunde der Universität Kiel (Germany) and Laboratoire ARAGO, Banyuls-sur-Mer (France).

³ G. GUNTER, Geol. Soc. Amer., Memoir 67, 1, 159 (1957).

⁴ A. S. PEARSE and G. GUNTER, Geol. Soc. Amer., Memoir 67, 1, 129 (1957).

⁵ O. KINNE, Ann. Biol. 33, 87 (1957).

⁶ F. E. J. FRY, Ann. Biol. 33, 205 (1957); Ann. Rev. Physiol. 20, 207 (1958).

⁷ A. REMANE and C. SCHLIEPER, *Die Biologie des Brackwassers* (Stuttgart 1958), p. 348.

⁸ J. VERWEY, Ann. Biol. 33, 129 (1957).