

KFK-372

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM  
KARLSRUHE**

August 1965

Gesellschaft für Kernforschung m. B. H.  
Verwaltung KFK 372

Institut für Strahlenbiologie

Zur biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße  
I. Inaktivierung von Ribonuclease durch langsame Protonen

H. Jung



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.  
KARLSRUHE

## Zur biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße

I. Inaktivierung von Ribonuclease durch langsame Protonen

H. JUNG

# Zur biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße

## I. Inaktivierung von Ribonuclease durch langsame Protonen

H. JUNG

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforschg. 20 b, 764—772 [1965]; eingegangen am 24. Februar 1965)

Extremely thin layers of ribonuclease were irradiated with slow protons and the differential inactivation cross section determined for various proton energies in the range from 0.8 to 60 keV. At higher proton energies the inactivation cross section is not strongly dependent on energy but with decreasing proton energy it decreases rapidly, reaches a sharp minimum at 1.2 keV and increases again at still smaller energies. By comparing the experimentally determined inactivation cross sections with the cross sections for energy loss in elastic nuclear collisions and in ionizations, respectively, elastic collisions were demonstrated to destroy, in fact, the enzymatic activity of ribonuclease. The energy required for an inactivation by nuclear collision is only one fourth of the energy necessary for an inactivation by ionization.

Die Energie schneller geladener Teilchen wird beim Durchgang durch Materie zum größten Teil durch Anregung und Ionisation von Atomen und Molekülen aufgebraucht. Daneben wird ein kleiner Teil der Energie in direktem Impuls vom einfallenden Teilchen an ganze Atome übertragen. Die Wechselwirkung erfolgt bei diesem Mechanismus der Energieübertragung zwischen dem (abgeschirmten) Coulombfeld des einfallenden Teilchens und dem (abgeschirmten) Coulombfeld des Kerns des beim Stoß beteiligten Atoms. Aus diesem Grunde wird der angeführte Prozeß im allgemeinen als „Kernstoß“ bezeichnet. Gelegentlich findet man auch die Bezeichnung „elastischer Stoß“. Die Grundlagen für das theoretische Verständnis des Beitrags, den Kernstöße bei der Absorption schneller geladener Teilchen in Materie leisten, wurden von BOHR<sup>1-3</sup> erarbeitet. In jüngster Zeit wurden seine Ideen von LINDHARD, SCHARFF und Mitarbb.<sup>4-6</sup> weiterentwickelt und verfeinert. Aus den angeführten Arbeiten lassen sich die Wirkungsquerschnitte für elastische Stöße zwischen zwei Teilchen aus deren Ladung, Masse und Geschwindigkeit berechnen; dabei zeigt es sich, daß mit abnehmender Teilchengeschwindigkeit der Wirkungsquerschnitt für Energieverluste durch Kernstöße sehr stark ansteigt (ungefähr mit  $\beta^{-2}$ ;  $\beta = v/c$ ). Da die Ionisierungs-Wahrscheinlich-

keit im betrachteten Energiebereich gleichzeitig abnimmt, gibt es für jede Teilchenart und jedes Medium eine bestimmte Energie, unterhalb der das betrachtete Teilchen durch Kernstöße mehr Energie verliert als durch Wechselwirkung mit den Atom-  
elektronen. Wie aus Berechnungen von SNYDER und NEUFELD<sup>7,8</sup> hervorgeht, ist bei der Abbremsung von Protonen in biologischem Material unterhalb von 1,5 keV der Prozeß der Kernstöße der dominierende Mechanismus der Energieübertragung.

Ein Atom, das einen elastischen Stoß erfährt, kann aus seiner ursprünglichen Position in einem Molekül herausgeschlagen werden. Wenn es dabei genügend kinetische Energie erhält, so kann es einen Teil davon über Anregungen und Ionisationen abgeben; der Rest wird in weiteren Kernstößen aufgebraucht. Ein großer Teil der Energie, die über diesen Mechanismus übertragen wird, geht in Anregung von Molekülschwingungen und schließlich in Wärme über; ein anderer Teil der ursprünglich übertragenen Energie bleibt als erhöhte potentielle Energie des Mediums erhalten, die von der veränderten Anordnung der Atome herrührt. Diese veränderte Anordnung der Atome stellt eine chemische Umwandlung dar, die in biologischen Strukturen eine permanente Schädigung zur Folge haben kann. Im Verlauf der letzten 15 Jahre war im Rah-

<sup>1</sup> N. BOHR, *Physic. Rev.* **58**, 654 [1940].

<sup>2</sup> N. BOHR, *Physic. Rev.* **59**, 271 [1941].

<sup>3</sup> N. BOHR, *Mat. Fys. Medd. Dan. Vid. Selsk.* **18**, No. 8 [1948].

<sup>4</sup> J. LINDHARD u. M. SCHARFF, *Physic. Rev.* **124**, 128 [1961].  
*Dan. Vid. Selsk.* **33**, No. 14 [1963].

<sup>5</sup> J. LINDHARD, M. SCHARFF u. H. E. SCHIÖTT, *Mat. Fys. Medd.*

<sup>6</sup> J. LINDHARD, V. NIELSEN, M. SCHARFF u. P. V. THOMSEN, *Mat. Fys. Medd. Dan. Vid. Selsk.* **33**, No. 10 [1963].

<sup>7</sup> W. S. SNYDER u. J. NEUFELD, *Radiat. Res.* **6**, 67 [1957].

<sup>8</sup> J. NEUFELD u. W. S. SNYDER, in: „Selected Topics in Radiation Dosimetry“, S. 35. *Internat. Atomic Energy Agency, Vienna 1961.*

men theoretischer Überlegungen wiederholt darauf hingewiesen worden, daß durch Kernstöße möglicherweise auch chemische und biologische Veränderungen ausgelöst werden könnten<sup>9-14</sup>. Wie in diesem Zusammenhang von ZIMMER<sup>12</sup> betont wurde, ist dieser Primärprozeß außerdem für die Dosimetrie epithermischer Neutronen und darüber hinaus für die Festlegung der Toleranzdosen für epithermische Neutronen von Bedeutung.

Trotzdem war das Problem mit Ausnahme von wenigen Ansätzen<sup>15-17</sup> bisher noch nicht experimentell bearbeitet worden; der Grund dafür dürfte in versuchs-technischen Schwierigkeiten zu suchen sein. Bei Verwendung von schnellen geladenen Teilchen sind angeregte und ionisierte Moleküle viel zahlreicher als Kernstoßprozesse, und es ist kein chemisches oder biologisches System bekannt geworden, das auf Ionisationen nicht oder nur äußerst schwach anspricht. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Anwendung von Neutronen, die praktisch ihre gesamte kinetische Energie über elastische Stöße mit Atomkernen an das bestrahlte Medium abgeben. Allerdings werden die biologischen Konsequenzen der Kernstöße bei Verwendung von schnellen Neutronen durch die Ionisationswirkung der von diesen Neutronen ausgelösten Rückstoßprotonen überdeckt und damit dem direkten Nachweis entzogen; und strahlenbiologische Experimente mit epithermischen Neutronen, die diese Schwierigkeit z. T. umgehen könnten, sind bis jetzt noch nicht bekannt geworden. Außerdem treten beim Bestrahlen mit langsamen Neutronen Kernreaktionen auf, so daß man in solchen Experimenten stets die Summe der Wirkungen der von den Neutronen erzeugten Rückstoßprotonen und der bei Kernreaktionen entstehenden Strahlungen erfaßt.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde von der Tatsache ausgegangen, daß für Protonen im Energiebereich zwischen 0 und 60 keV sowohl die Ionisierungs-Wahrscheinlichkeit als auch der Wirkungsquerschnitt für Kernstöße stark energieabhän-

gig sind. Es wurde versucht, die differentielle biologische Wirksamkeit der Protonen möglichst genau in Abhängigkeit von ihrer Energie zu messen. Zu diesem Zweck muß das biologische Indikatorsystem in seinen Abmessungen klein sein gegen die Reichweite der Protonen. Da die Eindringtiefe eines Protons von 1 keV in biologischem Material größenordnungsmäßig etwa 100 Å beträgt<sup>18, 19</sup>, ist mit diesem Wert die Größenordnung der für die Experimente in Frage kommenden Objekte festgelegt. Der Verlauf der bei verschiedenen Protonenenergien ermittelten Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit sollte Aufschluß darüber geben, ob durch Kernstöße biologische Schädigungen ausgelöst werden können und welche Bedeutung diesem Primärmechanismus zukommt.

### 1. Protonenbeschleuniger

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein Beschleuniger konstruiert, dessen wesentliche Merkmale in Abb. 1 schematisch dargestellt sind. Die Beschleunigungsspannung ( $U$ ) wurde im Bereich zwischen 500 und 5000 V von einem Hochspannungs-Netzgerät (Nu-

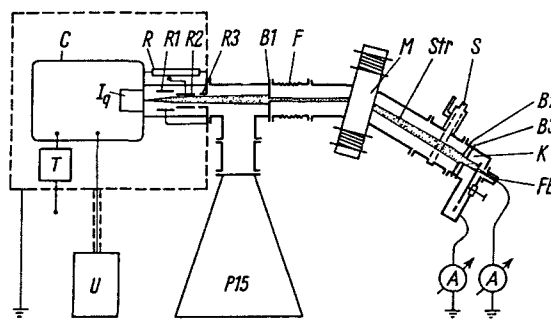


Abb. 1. Aufbau des Protonenbeschleunigers (halbschematisch).  $U$  = Beschleunigungsspannung,  $T$  = Trenntransformator,  $C$  = Coronaschutz,  $I_q$  = Ionenquelle,  $R$  = Reihenwiderstand,  $R_1, R_2, R_3$  = Beschleunigungsrohre,  $B_1, B_2, B_3$  = Blenden,  $F$  = Federbalg,  $M$  = Trennmagnet,  $Str$  = Protonenstrahl,  $S$  = Schieberventil,  $K$  = Bestrahlungskammer,  $FB$  = Faraday-Becher,  $A$  = Nanoampèremeter,  $P15$  = Vakuumpumpstand.

<sup>9</sup> R. L. PLATZMAN, in: „Symposium on Radiobiology“ (ed. NICKSON), S. 97. John Wiley & Sons, New York 1952.  
<sup>10</sup> U. FANO, in: „Radiation Biology“ I, 1 (ed. HOLLAENDER), S. 1. McGraw-Hill, New York 1954.  
<sup>11</sup> J. FRANCK u. R. L. PLATZMAN, in: „Radiation Biology“ I, 1 (ed. HOLLAENDER), S. 191. McGraw-Hill, New York 1954.  
<sup>12</sup> K. G. ZIMMER, Strahlentherapie 101, 143 [1956].  
<sup>13</sup> N. RIEHL, Atomkernenergie 1, 297 [1956].  
<sup>14</sup> E. J. HART u. R. L. PLATZMAN, in: „Mechanisms in Radiobiology“ I (eds. ERRERA u. FORSSBERG), S. 93. Academic Press, New York 1961.

<sup>15</sup> G. AHNSTRÖM, L. EHRENBORG u. K. G. ZIMMER, Report to statens råd för atomforskning, Stockholm 1960.  
<sup>16</sup> H. KÜHN, Z. Naturforsch. 15b, 277 [1960].  
<sup>17</sup> G. AHNSTRÖM u. L. EHRENBORG, in: „Selected Topics in Radiation Dosimetry“, S. 603. Internat. Atomic Energy Agency, Vienna 1961.  
<sup>18</sup> S. PERSON, Dissertation, Yale University 1956.  
<sup>19</sup> S. PERSON, F. HUTCHINSON u. D. MARVIN, Radiat. Res. 18, 397 [1963].

cletron, Type 2 x NU-1250) mit einer Konstanz von  $5 \cdot 10^{-5}$  und einer Einstellgenauigkeit von 0,1 V liefert. Für höhere Beschleunigungsspannungen stand eine Greinacher-Kaskade (AEG-Zeiss, Type HA 60) zur Verfügung, die positive Spannungen zwischen 5 und 60 kV liefert. Die Spannungsanzeige erfolgt über ein Mikroampèremeter, das mit mehreren geeichten hochohmigen Widerständen in Reihe geschaltet ist. Die Genauigkeit der Spannungsanzeige beträgt  $\pm 5$  Prozent. Die in einer Penning-Ionenquelle<sup>20</sup> (Iq) bei einer Entladungsspannung von 800 V erzeugten Ionen diffundieren durch eine Öffnung von 1,5 mm Durchmesser in die Beschleunigungsstrecke. Der benötigte Wasserstoff wird der Quelle über ein geheiztes Palladium-Leck (High Voltage Engineering) zugeführt. Die Stromversorgung des Palladium-Lecks und des Netzgerätes für die Entladungsspannung, die sich beide auf dem Potential der Beschleunigungsspannung  $U$  befinden, erfolgt über einen Trenntransformator T (Zeiss, Type 60/100). Die Beschleunigungsstrecke besteht aus drei zylindrischen Messingröhren, die den Zweck haben, den Ionenstrahl aufzufächern, um so eine homogene „Ausleuchtung“ der bestrahlten Fläche zu erreichen. Röhre R 1 ist gewöhnlich geerdet. Bei Beschleunigungsspannungen von weniger als 4 kV würde durch unvollständige Extraktion der Ionen die Strahlintensität stark abnehmen. Deshalb wird in diesem Falle an Röhre R 1 eine Zugspannung von  $-3$  kV gelegt, mit deren Hilfe sich selbst bei den kleinsten Beschleunigungsspannungen die erforderliche Strahlintensität aufrechterhalten läßt. Die für Röhre R 2 benötigten Spannungen werden an einer hochohmigen Widerstandskette R abgegriffen, an der die gesamte Beschleunigungsspannung abfällt. Röhre R 3 ist geerdet und bildet das Ende der Beschleunigungsstrecke.

Kurz hinter der Beschleunigungsstrecke passiert der Ionenstrahl eine Blende mit einer Öffnung von 15 mm Durchmesser (B 1). Diese verhindert, daß der Strahl beim starken Auffächern so breit wird, daß die magnetische Auftrennung in seine verschiedenen Komponenten versagt. Ein Federbalg F ermöglicht eine genaue Justierung des Magneten und der Bestrahlungskammer. Anschließend durchläuft der Ionenstrahl ein homogenes Magnetfeld M, wo er in seine verschiedenen Komponenten aufgespalten wird. Die Ablenkung erfolgt um  $30^\circ$  in horizontaler Richtung. Das hat den Vorteil, daß der Aufbau des Magneten sich sehr vereinfacht, da der Kern aus magnetisch weichem Eisen (Krupp, Hyperm O) nicht verschraubt werden muß. Der Abstand der Polschuhe beträgt 24 mm. Ein Schieberventil S von 50 mm lichter Weite (Vacuum Research Company, Type 2TN8) gestattet, die daran anschließende Bestrahlungskammer K vom übrigen Vakuumsystem abzutrennen und für sich zu belüften. Der Aufbau der Bestrahlungskammer geht aus Abb. 2 hervor. Vor der Kammer befindet sich eine Blende mit 15 mm lichter Weite (B 2). Sie wird auf  $-300$  V gehalten und verwehrt somit den von den Protonen ausgelösten Sekundärelektronen den Austritt aus der Bestrahlungskammer. Eine weitere Blende (B 3), deren Öffnung einen Durchmesser von 16 mm hat und die um 50 V positiver als Blende 2 ist, hat den Zweck, die im Rand von Blende 2 ausgelösten Sekundärelektronen aufzufangen<sup>21</sup>. Die Bestrahlungskammer ist isoliert aufgehängt, so daß die Strahlintensität durch Messung des Ionenstroms mit einem Nanoampèremeter (Knick, Type H 21) oder einem Stromintegrator (Elcor, Type A 309 B) bestimmt werden kann. Die Kammerrückwand enthält eine Drehdurchführung (D), deren Achse eine Stahlscheibe von 150 mm Durchmesser, die „Bestrahlungsplatte“ (BP), trägt. Auf dieser Scheibe sind auf einem Radius von 60 mm 12 Einfräsungen (HP) für die zu bestrahlenden Proben angebracht; weiter innen gibt es 8 entsprechende Vertiefungen (HK) für die unbestrahlten Kontrollproben. Um eine größere Fläche homogen bestrahlen zu können, muß die Teilchenflußdichte im Protonenstrahl über die gesamte bestrahlte Fläche konstant sein. Durch Einbringen von unterschiedlich weiten Blenden in den Strahlengang lassen sich Teile des Protonenstrahls ausblenden. Diese werden mit einem Faraday-Becher (FB), der an der Kammerrückwand angebracht ist, aufgefangen und mit einem Nanoampèremeter gemessen. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, steigt selbst bei sehr niedrigen Beschleunigungsspannungen der Protonenstrom linear mit der Fläche der Blendenöffnung an. Die gesamte Apparatur wird mit Hilfe eines Vakuum-Pumpstandes (Leybold, P 15) bei einem Druck unter  $10^{-5}$  Torr gehalten. Durch die Verwendung von Quecksilber-Treibmittelpumpen läßt sich die Möglichkeit ausschließen, daß durch den Ionenstrahl Ölmoleküle aufgespalten werden und die dabei

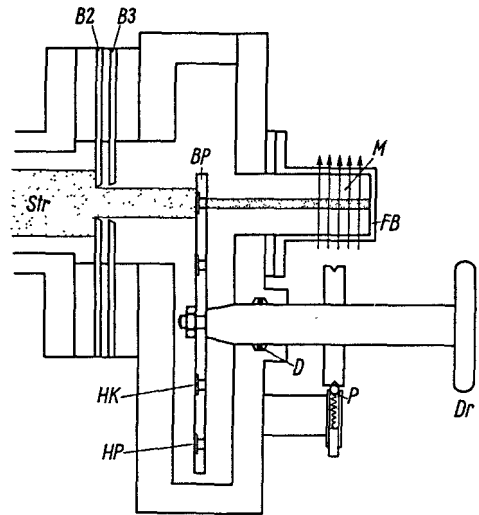


Abb. 2. Bestrahlungskammer (halbschematisch). B2, B3 = Blenden, FB = Faraday-Becher, M = Magnetfeld, D = Drehdurchführung, P = Positionsanzeige, Dr = Drehknopf, BP = Bestrahlungsplatte, HP = Halterung für die zu bestrahlenden Proben, HK = Halterung für die Kontrollproben, Str = Protonenstrahl.

kammer. Eine weitere Blende (B 3), deren Öffnung einen Durchmesser von 16 mm hat und die um 50 V positiver als Blende 2 ist, hat den Zweck, die im Rand von Blende 2 ausgelösten Sekundärelektronen aufzufangen<sup>21</sup>. Die Bestrahlungskammer ist isoliert aufgehängt, so daß die Strahlintensität durch Messung des Ionenstroms mit einem Nanoampèremeter (Knick, Type H 21) oder einem Stromintegrator (Elcor, Type A 309 B) bestimmt werden kann. Die Kammerrückwand enthält eine Drehdurchführung (D), deren Achse eine Stahlscheibe von 150 mm Durchmesser, die „Bestrahlungsplatte“ (BP), trägt. Auf dieser Scheibe sind auf einem Radius von 60 mm 12 Einfräsungen (HP) für die zu bestrahlenden Proben angebracht; weiter innen gibt es 8 entsprechende Vertiefungen (HK) für die unbestrahlten Kontrollproben. Um eine größere Fläche homogen bestrahlen zu können, muß die Teilchenflußdichte im Protonenstrahl über die gesamte bestrahlte Fläche konstant sein. Durch Einbringen von unterschiedlich weiten Blenden in den Strahlengang lassen sich Teile des Protonenstrahls ausblenden. Diese werden mit einem Faraday-Becher (FB), der an der Kammerrückwand angebracht ist, aufgefangen und mit einem Nanoampèremeter gemessen. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, steigt selbst bei sehr niedrigen Beschleunigungsspannungen der Protonenstrom linear mit der Fläche der Blendenöffnung an. Die gesamte Apparatur wird mit Hilfe eines Vakuum-Pumpstandes (Leybold, P 15) bei einem Druck unter  $10^{-5}$  Torr gehalten. Durch die Verwendung von Quecksilber-Treibmittelpumpen läßt sich die Möglichkeit ausschließen, daß durch den Ionenstrahl Ölmoleküle aufgespalten werden und die dabei

<sup>20</sup> R. KELLER, Helv. physica Acta 22, 78 [1949].

<sup>21</sup> J. P. KEENE, Philosoph. Mag. 40, 369 [1949].

gebildeten organischen Radikale mit den zu bestrahlenden biologischen Makromolekülen unter Modifizierung der direkten Strahlenwirkung reagieren.

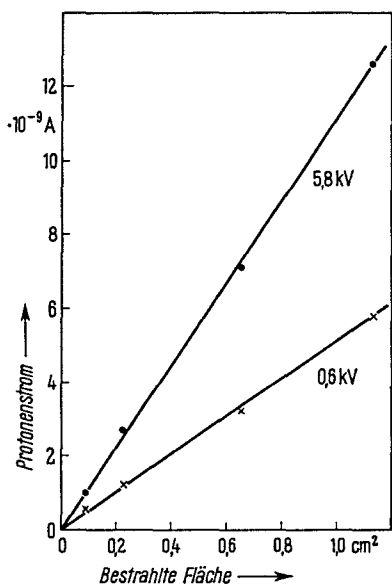


Abb. 3. „Ausleuchtung“ der bestrahlten Fläche bei Beschleunigungsspannungen von 0,6 und 5,8 kV.

## 2. Methodik

### 2.1 Enzymbestimmung

Für die Untersuchungen wurde käufliche Ribonuclease (RNase) von Sigma Chemical Company, St. Louis, USA, ohne weitere Reinigung verwendet. Diese RNase wird aus Rinder-Pankreas gewonnen, ist fünfmal umkristallisiert und frei von Salzen und Protease. Ihre enzymatische Aktivität wurde nach einer Modifikation der Methode von KALNITSKY et al.<sup>22</sup> bestimmt: Die zu bestimmende Probe wurde in 1 ml Acetatpuffer ( $pH$  5,0, 0,1-molar) gelöst und durch Zugabe von 1 ml RNS-Substratlösung, deren Zubereitung noch beschrieben wird, die Reaktion zwischen Enzym und Substrat eingeleitet. Dabei befand sich die Reaktionsmischung im Wasserbad bei einer konstanten Temperatur von 30,0 °C. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. wurde die unverbrauchte RNS durch Zugabe von 1 ml einer 0,75-proz. Lösung von Uranylacetat in 25-proz. Perchlorsäure ausgefällt, das Gemisch sofort im Eisbad auf 0 °C abgekühlt und der Niederschlag nach weiteren 20 Min. bei 6000 UpM abzentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde mit dest. Wasser 1 : 3 verdünnt und die Absorption dieser Lösung bei 260  $m\mu$  in einem Spektralphotometer (Zeiss, Type PMQ II) gegen eine entsprechend behandelte Kontrolle ohne Enzym bestimmt.

<sup>22</sup> G. KALNITSKY, J. P. HUMMEL, H. RESNICK, J. R. CARTER, L. B. BARNETT u. C. DIERKS, Ann. New York Acad. Sci. 81, 542 [1959].

Käufliche Ribonucleinsäure (RNS) hat normalerweise einen hohen Gehalt an Oligonucleotiden, was sich durch eine starke Eigenabsorption bei 260  $m\mu$  bemerkbar macht. Um die Aktivitätsbestimmungen sehr kleiner RNase-Mengen zu ermöglichen, wurden 100 ml einer 1-proz. Lösung käuflicher RNS aus Hefe (Merck, Darmstadt) in 0,1-m. Acetatpuffer ( $pH$  5,0) gegen 1 l 0,01-m. Acetatpuffer ( $pH$  5,0) bei ca. 5 °C 5–7 Tage lang dialysiert. Durch Zugabe von etwas Thymol läßt sich die Zerstörung der RNS durch Bakterien verhindern.

### 2.2 Kalibrierung

Zur Kalibrierung der Nachweismethode für Ribonuclease wurde die Reaktionszeit zwischen jeweils 1  $\mu g$  RNase und 1 ml Substrat zwischen 5 und 30 Min. variiert. Im untersuchten Bereich nahm die Extinktion bei 260  $m\mu$  linear mit der Inkubationszeit zu (Abb. 4); das zeigt, daß bis zu Reaktionszeiten von 30 Min. noch keine Verarmung an spaltbarer RNS auftritt. In einem

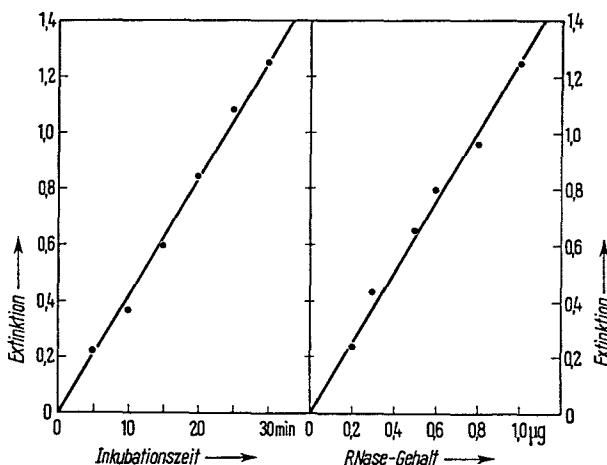


Abb. 4. Links: Extinktion bei 260  $m\mu$  in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zwischen 1  $\mu g$  Ribonuclease und 1 ml RNS-Substratlösung. Rechts: Extinktion bei 260  $m\mu$  in Abhängigkeit von der verwendeten Ribonuclease-Menge bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten.

entsprechenden Versuch wurde bei einer Inkubationszeit von 30 Min. die verwendete Ribonuclease-Menge zwischen 0,2 und 1,0  $\mu g$  variiert. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, ist die bei 260  $m\mu$  gemessene Extinktionsänderung proportional zur verwendeten Enzymmenge. Bei diesen Kalibrierungs-Versuchen war besondere Vorsicht geboten; denn Ribonuclease adsorbiert sich leicht an Glas<sup>23, 24</sup>, wodurch beim Benutzen von Pipetten und Glasgefäßen zum Verdünnen der Enzymlösungen auf die gewünschten Konzentrationen leicht erhebliche Fehler entstehen können, besonders in den Fällen, wo mit geringen Enzymkonzentrationen gearbeitet wird.

<sup>23</sup> R. SHAPIRA, Biochem. biophysic. Res. Comm. 1, 236 [1959].

<sup>24</sup> R. A. DEERING, Arch. Mat. Nat. [Oslo] 55, No. 6 [1960].

### 2.3 Bereitung der Proben

Für Bestrahlungsversuche mit langsamen Protonen sind folgende Anforderungen an die zu bestrahlenden Proben zu stellen:

1. Die Ribonuclease muß in einer Schicht vorliegen, deren Dicke klein ist gegen die Reichweite der Protonen.
2. Die das Enzym tragende Unterlage muß metallisch sein, um ein elektrostatisches Aufladen derselben während der Bestrahlung zu vermeiden.
3. Die Unterlage muß möglichst glatt sein, damit sich keine Enzym-Moleküle in Rissen und Poren auf ihrer Oberfläche festsetzen können.
4. Das Material der Unterlage darf keine große chemische Affinität gegen Sauerstoff besitzen, um eine Modifikation der Strahlenschädigung der Enzym-Moleküle durch Sauerstoff auszuschließen.

Aus den angeführten Gründen wurden Ronden aus glanzgewalztem Feingoldblech (10 mm Durchmesser, 1,5 mm stark) für diese Experimente ausgewählt. Zum Reinigen wurden die Goldplättchen 1 Stde. einer Waschlösung aus 120 g NaOH, 120 ml Wasser und 760 ml Äthanol ausgesetzt. Anschließend verblieben sie mehrere Stdn. in fließendem Leitungswasser und wurden darauf mit dest. Wasser und schließlich mit doppelt-quarzdest. Wasser abgespült. Ribonuclease adsorbiert sich zwar an Glas in monomolekularer Schicht<sup>24</sup>, aber nicht an Gold. Deshalb wurde die RNase in doppelt-quarzdest. Wasser in Konzentrationen von 0,05, 0,1 bzw. 0,4 mg/ml gelöst und jeweils 0,01 ml der für den betreffenden Versuch verwendeten Lösung mit Hilfe einer Vorrichtung zum Arbeiten mit 0,1-ml-Pipetten mit einer Genauigkeit von  $\pm 4,5\%$  auf die gereinigten Goldplättchen aufpipettiert und über die gesamte Oberfläche der einen Seite verteilt. Die Plättchen wurden dann auf einen Messingblock gesetzt, der zuvor mit einer Kältemischung aus Kohlensäureschnee und Aceton auf  $-78^\circ\text{C}$  abgekühlt worden war. Durch das plötzliche Einfrieren der Lösung ergaben sich nach dem Gefriertrocknen wesentlich homogenere Enzymschichten als durch Eintrocknen der aufpipettierten Lösung im Exsikkator, wie durch Bestrahlung mit langsamen Protonen gezeigt werden konnte.

### 2.4 Bestrahlung

Zum Bestrahlen mit langsamen Protonen wurden jeweils 11 Proben auf dem äußeren Kreis der Bestrahlungsplatte befestigt; je 3 Proben, die als Kontrollen dienten, befanden sich auf dem inneren Kreis. Jeder Versuch bestand aus zwei Bestrahlungsreihen, so daß zur Bestimmung einer Dosis-Effekt-Kurve 22 bestrahlte Proben, 6 unbestrahlte Kontrollen und 4 Nullkontrollen (ohne Enzym) herangezogen wurden. Nach Ende der Bestrahlung wurde die Ribonuclease in Zentrifugengläsern mit 1 ml Acetatpuffer ( $\text{pH } 5,0$ , 0,1-molar) von den Goldplättchen abgelöst. Der Grad der Ablösung wurde nicht bestimmt; denn die Goldplättchen verblieben während des gesamten Verlaufs der Enzymbestimmung in den Gläsern und wurden erst unmittel-

bar vor dem Abzentrifugieren der ausgefällten RNS daraus entfernt. Damit konnte auch der Anteil der RNase zur Reaktion beitragen, der unvollständig von den Goldplättchen abgelöst oder an die Wand der Zentrifugengläser adsorbiert war.

## 3. Ergebnisse

Die Inaktivierung von Enzymen durch ionisierende Strahlen folgt einer exponentiellen Funktion der applizierten Dosis und kann durch den Ausdruck  $N/N_0 = \exp(-DS)$  beschrieben werden.  $N/N_0$  ist der Bruchteil der Enzym-Moleküle, der nach der Bestrahlung mit der Dosis  $D$  noch funktionsfähig ist;  $S$  ist der Inaktivierungs-Querschnitt. Er hängt von den Eigenschaften des bestrahlten Enzym-Moleküls und der verwendeten Strahlenart ab. Bei Verwendung von ionisierender Partikelstrahlung ist es vorteilhaft, die Strahlendosis  $D$  in Teilchen pro Quadratcentimeter anzugeben. Für den Fall  $N/N_0 = 0,37 = e^{-1}$  ergibt sich aus der 37%-Dosis ( $D_{37}$ ) der Inaktivierungs-Querschnitt zu  $S = 1/D_{37}$  unmittelbar in Quadratcentimetern.

Um den Verlauf des Wirkungsquerschnitts für die Inaktivierung der Ribonuclease durch Protonen verschiedener Energie zu ermitteln, wurden zunächst die 37%-Dosen bei verschiedenen Bestrahlungsenergien bestimmt. Die Minimalenergie der Protonen betrug bei den hier beschriebenen Experimenten 0,8 keV. Für diese Energie ist in Abb. 5 (unten) der Verlauf der Aktivitätsabnahme von 0,5  $\mu\text{g}$  Ribonuclease

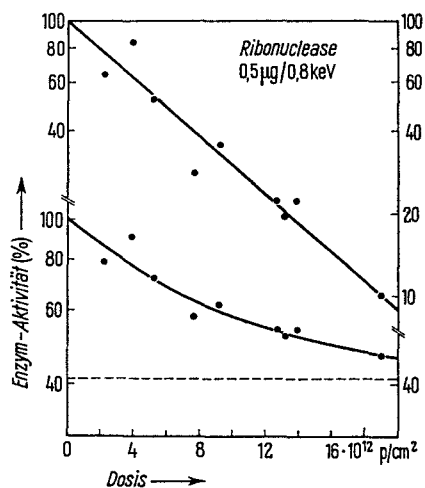


Abb. 5. Untere Kurve: Inaktivierung von 0,5  $\mu\text{g}$  Ribonuclease durch 0,8-keV-Protonen. Obere Kurve: Verlauf der Inaktivierungskurve nach Abzug des konstanten „unzerstörbaren“ Anteils (---).

nuclease über der Protonendosis aufgetragen. Die Enzymaktivität strebt mit zunehmender Dosis einem konstanten Wert zu, da offenbar an einigen Stellen die Dicke der bestrahlten RNase-Schicht die Reichweite der Protonen übersteigt. Nach Subtrahieren dieses konstanten Anteils verläuft die Abnahme der RNase-Aktivität mit der Dosis nach einer Eintreffer-Kurve (Abb. 5, oben). Daraus kann die  $D_{37}$  für die Inaktivierung von RNase durch Protonen zwischen 0 und 0,8 keV Energie entnommen werden. Sie beträgt  $(8,2 \pm 1,7) \cdot 10^{12} \text{ p/cm}^2$ . Allerdings lassen sich aus dem Verhältnis zwischen der Gesamtaktivität und dem abzuziehenden „unzerstörbaren“ Anteil der RNase keine Rückschlüsse auf die Reichweite der 0,8-keV-Protonen ziehen, da in diesem Fall sichergestellt sein muß, daß die Schichtdicke an jeder Stelle der bestrahlten Fläche größer als die Reichweite der Protonen ist. Diese Forderung ist in dem untersuchten Energiebereich, wo die Reichweite der Protonen vergleichbar mit dem Moleküldurchmesser wird, und bei Verwendung solch geringer Enzymmengen nicht mehr erfüllt. Zu entsprechenden Resultaten führten die Bestrahlungen mit 1-keV-Protonen bei Schichtdicken von  $1,3 \mu\text{g/cm}^2$  und mit 1,2-keV-Protonen bei Schichtdicken von  $5 \mu\text{g/cm}^2$ . In beiden Fällen übersteigt die Dicke der Enzymschicht die Reichweite der Protonen. Die bei diesen Experimenten nach Abzug eines konstanten „unzerstörbaren“ Anteils ermittelten 37%-Werte von  $(7,8 \pm 1,3) \cdot 10^{12} \text{ p/cm}^2$ , bzw.  $(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^{13} \text{ p/cm}^2$  sind somit ebenfalls als integrale Werte für das Energieintervall zwischen 0 und 1 keV, bzw. zwischen 0 und 1,2 keV zu betrachten.

Beim Bestrahlen von jeweils  $1 \mu\text{g}$  RNase mit 1,2-keV-Protonen bleibt bei hohen Dosen kein „unzerstörbarer“ Anteil übrig (Abb. 6). Dies zeigt, daß 1,2-keV-Protonen eine RNase-Schicht von  $1,3 \mu\text{g/cm}^2$  ganz durchdringen können. Da der Wert für die  $D_{37}$  mit  $(1,9 \pm 0,15) \cdot 10^{13} \text{ p/cm}^2$  innerhalb der Meßgenauigkeit mit dem bei großer Schichtdicke gemessenen übereinstimmt, so scheint die Schicht bei  $1 \mu\text{g}$  nicht wesentlich kleiner als die Reichweite der 1,2-keV-Protonen zu sein. Damit ist auch die hier ermittelte  $D_{37}$  praktisch als Integralwert für das Energieintervall zwischen 0 und 1,2 keV anzusehen. Bei Verwendung von  $0,5 \mu\text{g}$  RNase pro Goldplättchen ist die Schichtdicke nur etwa halb so groß wie die Reichweite der 1,2-keV-Protonen. Die aus Abb. 6 entnommene  $D_{37}$  liegt mit  $(3,4 \pm 0,3) \cdot 10^{13} \text{ p/cm}^2$  wesentlich über dem für das gesamte Intervall zwi-

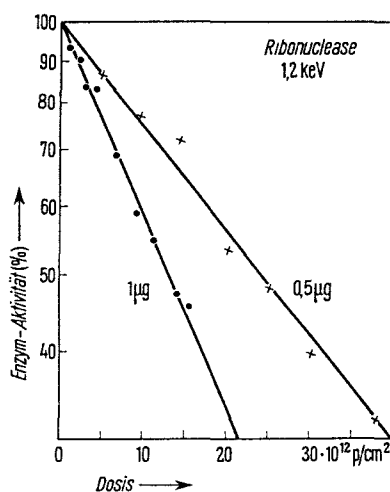


Abb. 6. Inaktivierung von Ribonuclease mit 1,2-keV-Protonen bei Verwendung von  $0,5 \mu\text{g}$  bzw.  $1 \mu\text{g}$  RNase (Schichtdicke  $0,65$  bzw.  $1,3 \mu\text{g/cm}^2$ ).

schen 0 und 1,2 keV ermittelten Integralwert, was deutlich zeigt, daß in dem genannten Energieintervall der Wert für die  $D_{37}$  außerordentlich stark energieabhängig ist. Steigert man die Protonenenergie auf 1,4 keV, so ergibt sich aus der für  $0,5 \mu\text{g}$  RNase gemessenen Inaktivierungskurve (Abb. 7) eine weitere Erhöhung der  $D_{37}$  auf  $(4,25 \pm 0,4) \cdot 10^{13} \text{ p/cm}^2$ .

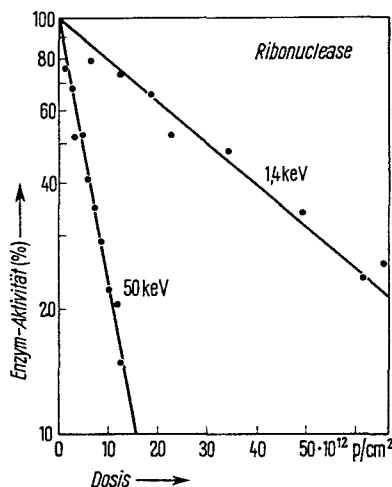


Abb. 7. Inaktivierung von jeweils  $0,5 \mu\text{g}$  Ribonuclease mit Protonen von 1,4 keV bzw. 50 keV Energie bei einer Schichtdicke von  $0,65 \mu\text{g/cm}^2$ .

In entsprechender Weise wurden mit Protonen verschiedener Energie dünne Schichten von Ribonuclease bestrahlt und aus den Inaktivierungskur-



ven die 37%-Dosen auf graphischem Wege ermittelt. Pro Goldplättchen wurden dabei jeweils 0,5 bzw. 1,0  $\mu\text{g}$  RNase verwendet, die Maximalenergie der verwendeten Protonen betrug 60 keV. Als Beispiel für die Inaktivierung bei höheren Protonenenergien ist in Abb. 7 die mit 50-keV-Protonen und 0,5  $\mu\text{g}$  RNase erhaltene Dosis-Effekt-Kurve angegebene. In Abb. 8 ist der Verlauf der  $D_{37}$  in Abhängig-

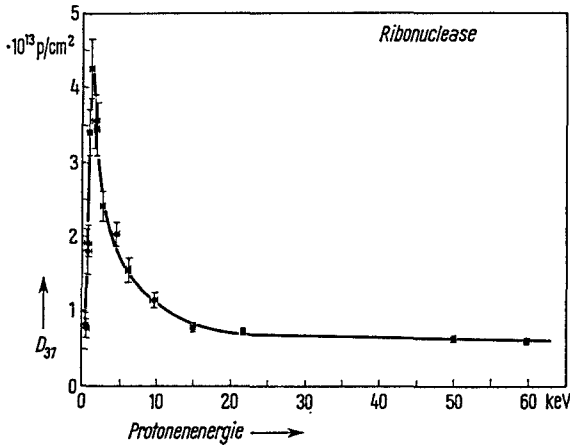


Abb. 8. Verlauf der 37%-Dosis ( $D_{37}$ ) für die Inaktivierung von Ribonuclease in Abhängigkeit von der Energie der eingestrahlten Protonen.

keit von der Protonenenergie aufgetragen. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen dem einfachen mittleren Fehler bei der Bestimmung der  $D_{37}$ , bzw. dem Energieverlust der Protonen in der Enzymschicht. Bei der Bestimmung der von den Protonen in der RNase-Schicht abgegebenen Energie wurde ein Energieverlust von 1 keV/100 Å angenommen. Dieser Energieverlust ergibt sich als Mittelwert aus der Energie-Reichweite-Kurve von PERSON<sup>18, 19</sup> für langsame Protonen in Protein. Die Unsicherheit in der Bestimmung der Protonenenergie ist bei kleinen Protonenenergien gegenüber dem Energieverlust in der RNase-Schicht zu vernachlässigen und fällt bei höheren Energien infolge der geringen Änderung der  $D_{37}$  mit der Protonenenergie so wenig ins Gewicht, daß auf ihre Berücksichtigung verzichtet werden konnte. Aus Abb. 8 geht hervor, daß bei höheren Protonenenergien die 37%-Dosis nur wenig energieabhängig ist. Nach kleineren Energien hin nimmt sie stetig zu und erreicht bei etwa 1,2 keV ein ausgeprägtes Maximum. Besonders zu erwähnen ist die Tatsache, daß unterhalb

von 1,2 keV die  $D_{37}$  steil abfällt, was nichts anderes heißt, als daß die Wirksamkeit der Protonen zur Inaktivierung von Ribonuclease in diesem Energieintervall mit abnehmender Protonenenergie stark zunimmt. Deutlicher geht dieser Befund aus Abb. 9 hervor, in welcher der Wirkungsquerschnitt für die

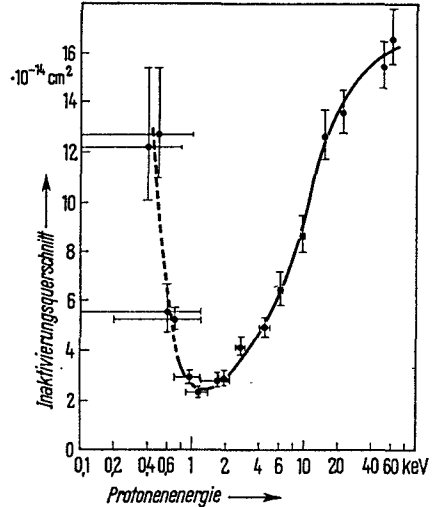


Abb. 9. Verlauf des Wirkungsquerschnitts für die Inaktivierung von Ribonuclease in Abhängigkeit von der Energie der eingestrahlten Protonen.

Inaktivierung von Ribonuclease durch Protonen verschiedener Energie („Inaktivierungs-Querschnitt“) über der Protonenenergie aufgetragen ist. Die Inaktivierungs-Querschnitte wurden durch Bildung des Inversen aus den 37%-Dosen erhalten. Zur deutlicheren Darstellung des niederenergetischen Bereichs ist die Protonenenergie in logarithmischer Skala aufgeführt. Die angegebenen Fehler bezeichnen den einfachen mittleren Fehler bei der Bestimmung der Wirkungs-Querschnitte, bzw. den Energieverlust der Protonen in der Enzymschicht. Unterhalb von 0,9 keV sind diese Energieverluste vergleichbar mit der Bestrahlungsenergie; es ist somit schwierig, in diesem Bereich die Inaktivierungs-Querschnitte ihren entsprechenden Protonenenergien zuzuordnen (Abb. 9, gestrichelter Teil der Kurve). Dennoch geht aus der Abbildung deutlich hervor, daß unterhalb von 1,3 keV die Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit mit abnehmender Protonenenergie stark ansteigt. Auch nach größeren Protonenenergien hin nimmt der Inaktivierungs-Querschnitt zu; bei 50 bis 60 keV scheint er einem Sättigungswert zuzustreben.

4. Diskussion

Der Verlauf des Inaktivierungs-Querschnitts auf Abb. 9 läßt sich im Bereich höherer Protonenenergien ohne weiteres durch die Tatsache erklären, daß die Ionisierungs-Wahrscheinlichkeit der Protonen unterhalb von 60 keV mit abnehmender Protonenenergie geringer wird und deshalb die Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit in entsprechender Weise abnimmt. Das starke Ansteigen bei Energien unterhalb von 1 keV beweist, daß bei kleinen Protonenenergien ein Mechanismus der Energieübertragung einsetzt, der mit abnehmender Protonenenergie stark anwächst. Als Inaktivierungs-Mechanismus kommt in diesem Energiebereich praktisch nur die Schädigung der RNase-Moleküle durch elastische Stöße der einfallenden langsamen Protonen mit den in der Ribonuclease enthaltenen Atomen in Frage.

Einen quantitativen Vergleich ermöglicht eine Arbeit von NEUFELD und SNYDER<sup>8</sup> über den Energieverlust von Protonen verschiedener Energie in Gewebe. In dieser Arbeit wurde der Energieanteil, der in elastischen Stößen mit Atomkernen übertragen wird, nach einer von BOHR<sup>2</sup> angegebenen Formel aus Ladung, Masse und Geschwindigkeit des einfallenden und des gestoßenen Teilchens berechnet. Der Verlauf dieses Wirkungsquerschnitts ist aus Abb. 10 (Kurve  $\sigma_n$ , rechter Ordinatenmaßstab) ersichtlich. Die Energieverluste, die auf Wechselwirkung mit den Atomelektronen zurückzuführen sind, wurden nach KNIPP und TELLER<sup>25</sup> und NEUFELD<sup>26</sup> bestimmt; sie sind in Abb. 10 (Kurve  $\sigma_e$ , rechter Ordinatenmaßstab) über der Protonengeschwindigkeit in Vielfachen der Bohrschen Geschwindigkeit ( $v_0 = c/137 = e^2/\hbar = 2,183 \times 10^8$  cm/sec) aufgetragen. Auf der oberen Skala ist zur besseren Übersicht die Protonenenergie angegeben. Bei den Berechnungen wurde vorausgesetzt, daß das molekulare Bremsvermögen von Gewebe sich additiv aus den atomaren Bremsvermögen von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff zusammensetzt (Braggsches Gesetz) und vom Kondensationszustand des Mediums unabhängig ist. Wenn den Berechnungen nicht die atomare Zusammensetzung von Gewebe<sup>7</sup>, sondern die von Ribonuclease<sup>27</sup> zugrunde gelegt wird, so zeigt sich, daß trotz der unterschiedlichen Zusammensetzung der beiden Stoffe die für Ribonuclease

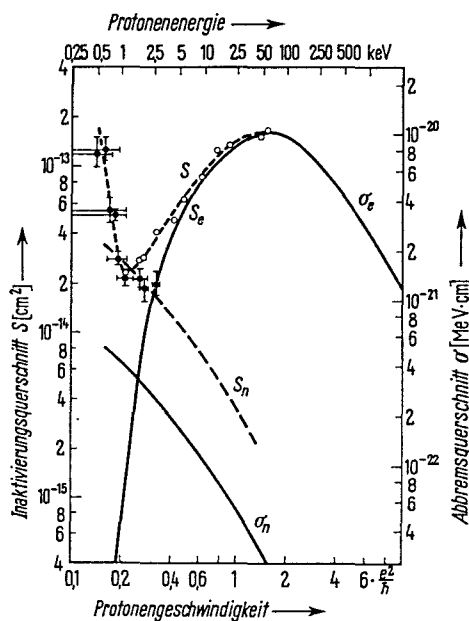


Abb. 10. Vergleich der experimentell bestimmten Inaktivierungs-Querschnitte (O) mit dem Verlauf der von NEUFELD und SNYDER<sup>8</sup> berechneten Wirkungsquerschnitte für den Energieverlust von Protonen durch Elektronen-Wechselwirkung ( $\sigma_e$ ) bzw. durch Kernstöße ( $\sigma_n$ ). Die Differenz zwischen den Meßpunkten (O) und der Kurve  $S_e$  wird durch die schwarzen Punkte (●) wiedergegeben. Die durch diese Punkte gelegte Kurve  $S_n$  gibt den Verlauf des Wirkungsquerschnitts für die Inaktivierung von Ribonuclease durch Kernstöße in Abhängigkeit von der Protonenenergie an.

ermittelten Abbremsquerschnitte mit den für Gewebe angegeben innerhalb der Genauigkeit der Berechnungen<sup>7</sup> übereinstimmen. Somit können die von NEUFELD und SNYDER<sup>8</sup> für Gewebe berechneten Kurven direkt für einen Vergleich mit den an RNase experimentell ermittelten Inaktivierungs-Querschnitten herangezogen werden. Zu diesem Zweck sind in Abb. 10 die experimentell ermittelten Inaktivierungs-Querschnitte (weiße Kreise, gestrichelte Kurve S, linker Ordinatenmaßstab) eingetragen. Um der Übersichtlichkeit der Abbildung willen sind keine Fehlergrenzen angegeben; diese sind jedoch aus Abb. 9 ersichtlich. Im betrachteten Energiebereich zwischen 0 und 60 keV kommen Anregungen, Ionisationen und Kernstöße als Primärmechanismen der Energieübertragung in Betracht. Da Anregungen zur Inaktivierung von biologischen Makromolekülen nur eine sehr geringe Wirkungs-Wahrscheinlichkeit

<sup>25</sup> J. KNIPP u. E. TELLER, Physic. Rev. 59, 661 [1949].  
<sup>26</sup> J. NEUFELD, Proc. physic. Soc. 66, 590 [1953].

<sup>27</sup> C. H. W. HIRS, S. MOORE u. W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 219, 623 [1956].

haben<sup>28-30</sup>, werden sie hier nicht weiter diskutiert. Die experimentell ermittelte Kurve  $S$  ist somit als Summe der biologischen Wirkungen von Ionisationen und Kernstößen aufzufassen ( $S = S_e + S_n$ ).

Bei einer Protonenenergie von 60 keV ist der Wirkungsquerschnitt für Kernstöße  $\sigma_n$  um einen Faktor von etwa 500 kleiner als der Energieverlust durch Wechselwirkung mit den Atomelektronen  $\sigma_e$ . Man kann folglich davon ausgehen, daß bei dieser Protonenenergie der Mechanismus der Kernstöße gegenüber den wesentlich häufigeren Ionisationen zu vernachlässigen ist (60 keV:  $S_n = 0$ ,  $S = S_e$ ). Deshalb sind auf Abb. 10 die beiden verschiedenen Skalen für die Inaktivierungs-Querschnitte  $S$  und die Abbremsquerschnitte  $\sigma$  so gegeneinander angeordnet, daß bei 60 keV, wo praktisch ausschließlich Elektronen-Wechselwirkung vorliegt, die Kurven  $S$  und  $S_e$  zusammenfallen. Wenn im gesamten untersuchten Energiebereich keine Inaktivierung von RNase durch Kernstöße auftritt ( $S_n = 0$ ), dann sollte man erwarten, daß nach kleinen Protonenenergien hin die Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit  $S$  in gleichem Maße abnimmt wie die Ionisierungs-Wahrscheinlichkeit  $\sigma_e$ . (Dabei ist allerdings vorausgesetzt, daß in einem RNase-Molekül beim Durchgang eines Protons nur in relativ seltenen Fällen mehrere inaktivierende Ereignisse ausgelöst werden. Die Schwierigkeiten, diese Analyse mit den Hilfsmitteln der Treffbereichstheorie durchzuführen, sind an anderer Stelle erörtert worden<sup>31</sup>.) Wie aus Abb. 10 ersichtlich, fällt  $S$  nicht mit  $S_e$  zusammen,  $S_n$  ist also von Null verschieden. Um die Wirkung der Kernstöße von der Wirkung der Ionisationen zu trennen, ist in Abb. 10 die Differenz zwischen den

experimentellen Werten und der Kurve  $S_e$  aufgetragen (schwarze Punkte, Kurve  $S_n$ ). Wenn für eine Inaktivierung eines RNase-Moleküls durch Kernstöße die gleiche Energie notwendig ist wie für eine Inaktivierung durch Ionisationen, dann sollten die Kurven  $S_n$  und  $\sigma_n$  zusammenfallen. Die Kurve  $S_n$  liegt aber um einen Faktor von etwa 4 über der Kurve  $\sigma_n$ . Daraus geht hervor, daß der Energieaufwand zur Inaktivierung eines RNase-Moleküls durch Kernstöße nur etwa 25% der Energie beträgt, die bei einer Inaktivierung durch Ionisationen aufgewendet werden muß. Ob dieser Faktor von 4 dadurch zu erklären ist, daß der mittlere Energieaufwand für eine Inaktivierung durch Kernstoß kleiner ist als der für eine Primäriionisation, oder ob ein Kernstoß ein RNase-Molekül mit größerer Wahrscheinlichkeit inaktiviert als eine Primäriionisation, läßt sich aus den vorliegenden Experimenten nicht entnehmen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mit der vorliegenden Arbeit der experimentelle Nachweis geführt wurde, daß elastische Stöße in der Lage sind, die enzymatische Aktivität von Ribonuclease zu zerstören. Bei einer Inaktivierung durch Kernstöße ist ein wesentlich geringerer Energiebetrag aufzuwenden als bei einer Inaktivierung durch Ionisationen. Die vorliegenden Experimente weisen auf die Möglichkeit hin, daß der betrachtete Primärmechanismus der Kernstöße auch in anderen chemischen und biologischen Systemen mit hoher Wirksamkeit Veränderungen hervorruft.

Herrn Professor Dr. K. G. ZIMMER danke ich für zahlreiche anregende Diskussionen bei der Durchführung dieser Arbeit.

<sup>28</sup> F. HUTCHINSON, Radiat. Res. 1, 43 [1954].

<sup>29</sup> F. HUTCHINSON, Radiat. Res. Suppl. 2, 49 [1960].

<sup>30</sup> R. B. SETLOW, Radiat. Res. Suppl. 2, 276 [1960].

<sup>31</sup> H. JUNG u. K. G. ZIMMER, in: „Current Topics in Radiation Research“ II (eds. EBERT u. HOWARD), im Druck.