

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

Dezember 1968/März 1969

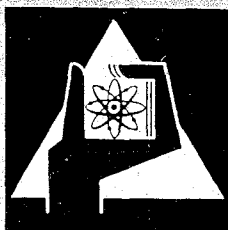
KFK 970

Institut für Strahlenbiologie

Zur biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße
III. Einwirkung von langsamen Protonen auf infektiöse DNS des
Bakteriophagen ϕ X174

Action of Elastic Nuclear Collisions on Infectious DNA of
Bacteriophage ϕ X174

H. Jung, K. Kürzinger



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE

Zur biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße

**III. Einwirkung von langsamen Protonen auf infektiöse DNS
des Bakteriophagen Φ X174^{1,2}**

HORST JUNG und KLAUS KÜRZINGER

Zur biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße

III. Einwirkung von langsamen Protonen auf infektiöse DNS des Bakteriophagen Φ X174^{1, 2}

HORST JUNG und KLAUS KÜRZINGER

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforschg. 24 b, 328—332 [1969]; eingegangen am 5. August 1968)

Dry infectious DNA of bacteriophage Φ X174 was irradiated in extremely thin layers with slow protons and the differential inactivation cross section determined for various proton energies in the range from 0.8 to 50 keV. Above 5 keV the inactivation cross section is independent of proton energy, it reaches a shallow minimum between 1 and 1.5 keV, and increases slightly 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 the ability of Φ X-DNA to give rise to intact bacteriophage in spheroplasts of *E. coli* K12.

Die seit 1950 diskutierte Frage nach der biologischen Wirksamkeit elastischer Kernstöße³⁻⁸ konnte vor einigen Jahren für das Enzym Ribonuclease (RNase) beantwortet werden¹. Dabei ergab sich der Befund, daß Kernstöße zur Inaktivierung von RNase fähig sind, und daß ihre Wirksamkeit pro Energieaufwand etwa viermal größer ist als bei Inaktivierung durch Ionisationen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß der Wirkungs-Mechanismus der Kernstöße von dem der Ionisationen verschieden ist; denn während die Wirkungen der Ionisationen auf Ribonuclease durch Zugabe von Cystamin oder durch Bestrahlung bei tiefen Temperaturen herabgesetzt werden können, ist die Größe eines durch Kernstöße hervorgerufenen Strahlenschadens weder durch Schutzstoffzugabe noch durch tiefe Temperaturen zu modifizieren². Da viele experimentelle Befunde darauf hinweisen, daß bei der Inaktivierung biologischer Objekte die Desoxyribonucleinsäure (DNS) das strahlenempfindliche Target darstellt, erschien es uns interessant, die früher an RNase unternommenen Experimente auf DNS aus-

zudehnen⁹, um mit größerer Sicherheit aussagen zu können, daß elastische Kernstöße biologische Wirkungen auslösen.

Wie bereits ausführlich diskutiert^{10, 11}, halten wir die Verwendung niederenergetischer geladener Teilchen für die am besten geeignete Methode zur Untersuchung der Wirkungen elastischer Kernstöße. Das Prinzip auch der vorliegenden Experimente bestand wie schon bei den früheren Untersuchungen darin, mit äußerst dünnen Schichten aus biologischem Material den differentiellen Inaktivierungsquerschnitt in Abhängigkeit von der Protonenenergie zu messen. Abb. 1 zeigt die Wirkungsquerschnitte für den Energieverlust durch Wechselwirkung mit Elektronen (σ_e) bzw. durch elastische Kernstöße (σ_n), die von NEUFELD und SNYDER¹² für die Abbremsung von Protonen in Gewebe berechnet wurden. Wenn nur Ionisationen zum beobachteten Inaktivierungsprozeß beitragen, dann sollte die experimentell bestimmte Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit wie die Kurve σ_e verlaufen. Wenn dagegen neben den Ionisationen auch die Kernstöße einen Beitrag zur beob-

¹ I. Mitt.: H. JUNG, Z. Naturforschg. 20 b, 764 [1965].

² II. Mitt.: H. JUNG, Z. Naturforschg. 21 b, 1165 [1966].

³ R. L. PLATZMAN, in: „Symposium on Radiobiology“ (ed. NICKSON), S. 97. John Wiley & Sons, New York 1952.

⁴ U. FANO, in: „Radiation Biology“ I, 1 (ed. HOLLAENDER), S. 1. McGraw-Hill, New York 1954.

⁵ J. FRANCK u. R. L. PLATZMAN, in: „Radiation Biology“ I, 1 (ed. Hollaender), S. 191. McGraw-Hill, New York 1954.

⁶ K. G. ZIMMER, Strahlentherapie 101, 143 [1956].

⁷ N. RIEHL, Atomkernenergie 1, 297 [1956].

⁸ E. J. HART u. R. L. PLATZMAN, in: „Mechanisms in Radiobiology“ I (eds. ERRERA u. FORSSBERG), S. 93. Academic Press, New York 1961.

⁹ K. KÜRZINGER u. H. JUNG, Int. J. Radiat. Biol. 14, 493 [1968].

¹⁰ H. JUNG u. K. G. ZIMMER, in: „Current Topics in Radiation Research“ II (eds. EBERT u. HOWARD), S. 69. North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1966.

¹¹ H. JUNG, in: „Radiation Research“ (ed. SILINI), S. 410. North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1967.

¹² J. NEUFELD u. W. S. SNYDER, in: „Selected Topics in Radiation Dosimetry“, S. 35. Internat. Atomic Energy Agency, Vienna 1961.

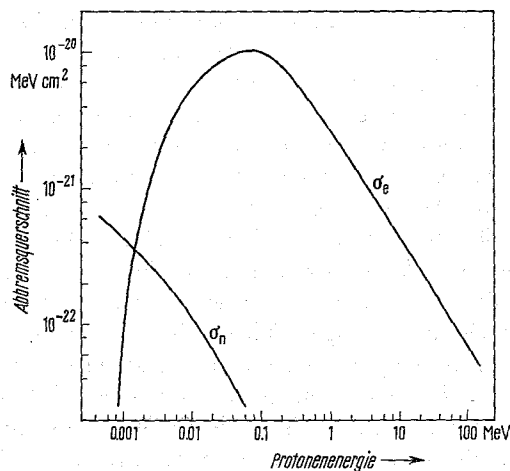


Abb. 1. Wirkungsquerschnitte für Elektronen-Wechselwirkung (σ_e) bzw. für elastische Kernstöße (σ_n) für Protonen in Gewebe (NEUFELD u. SNYDER¹³).

achten Wirkung leisten, dann ist unterhalb von 60 keV mit abnehmender Protonenenergie zunächst eine Abnahme des Inaktivierungsquerschnitts zu erwarten; bei kleinen Energien, wenn sich der Einfluß der Kernstöße bemerkbar macht, ist mit einem Wieder-Ansteigen der Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit zu rechnen.

Methodik

Infektiöse DNS: Als Untersuchungsobjekt wählten wir die infektiöse DNS des Bakteriophagen $\Phi X174$. Diese einzelsträngige DNS besitzt mit $1,7 \cdot 10^6$ Dalton¹³ ein relativ kleines Mol.-Gew., was bei dem hier angewandten Meßprinzip von besonderer Bedeutung ist¹⁰. Den Ausschlag bei dieser Wahl gab jedoch die Tatsache, daß für diese ΦX -DNS eine Methode bekannt ist, mit deren Hilfe die Unversehrtheit der genetischen Information nachgewiesen werden kann¹⁴. Die $\Phi X174$ -Bakteriophagen wurden nach einem von SINSHEIMER¹⁵ angegebenen Verfahren gewonnen und durch Ausfällen mit Ammoniumphosphat, mehrfaches Zentrifugieren und Dialysieren gereinigt. Die DNS wurde durch dreimalige Extraktion mit heißem Puffer-gesättigtem Phenol nach GUTHRIE und SINSHEIMER¹⁴ isoliert, das Phenol mit Äther entfernt und schließlich der Äther durch Stickstoff ausgetrieben. Nach der Extraktion wurde die Boratlösung gegen NCE-Puffer dialysiert.

Probenherstellung und Bestrahlung: Für die Versuche wurde die DNS 1 : 1000 mit doppelt-quarzdest. Wasser verdünnt, dessen pH-Wert mit Ammoniak auf

pH 7,6 eingestellt worden war. Jeweils 0,01 ml dieser DNS-Lösung wurden auf gereinigte Goldplättchen¹ aufpipettiert und über die gesamte Oberfläche der einen Seite verteilt. Die Proben wurden auf -78°C abgekühlt und bei 10^{-2} Torr gefriergetrocknet, wobei die Temperatur der Unterlage und der die Proben umgebenden Flächen langsam anstieg. Die Überlebensrate der ΦX -DNS bei der Gefrierdrying lag bei etwa 50 Prozent. Für die Bestrahlungen stand ein Beschleuniger zur Verfügung, der Protonen mit Energien zwischen 0,8 und 60 keV liefert. Einzelheiten seiner Konstruktion, die Strahlhomogenität, die Methoden der Dosimetrie sowie der Aufbau der Bestrahlungskammer sind bereits beschrieben worden¹.

Sphäroplasten und DNS-Nachweis: Zur Herstellung der Sphäroplasten benutzten wir einen Stamm von *E. coli* K12, den Dr. G. HOTZ 1962 von Dr. P. STARLINGER, Köln, erhalten hat. Unser Herstellungsverfahren ist eine Modifizierung der Methode von GUTHRIE und SINSHEIMER¹⁴: Die Bakterien wurden bei 37°C in einem 3XD-Medium nach FRAZER und JERREL¹⁶ bis zu einer Konzentration von ca. 10^9 Zellen/ml vermehrt. Jeweils 80 ml Zell-Suspension wurden 15 Min. bei 5000 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1,4 ml 1,5-m. Sucrose aufgenommen und zusammen mit 0,68 ml Rinder-Serum-Albumin (30%), 0,08 ml Lysozym (2 mg/ml in 0,25-m. Tris-Puffer, pH 8,1), 0,16 ml ADTA (4%) und 10 ml PA-Medium¹⁴ 15 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert und schließlich die Lysozym-Reaktion durch Zugabe von 0,8 ml MgSO_4 (10%) abgebrochen. Diese Sphäroplasten-Suspension kann ohne weitere Behandlung direkt für die Infektion benutzt werden; sie bleibt bei Aufbewahrung im Kühlschrank über mehrere Wochen hinweg verwendbar. Das hier beschriebene Verfahren besitzt gegenüber der Originalmethode den entscheidenden Vorteil, daß auf die langwierige Reinigung der Sphäroplasten durch Sedimentation in eine Säule aus mehreren Lösungen unterschiedlicher Dichte verzichtet werden kann, wodurch sich die für eine DNS-Bestimmung benötigte Zeit ohne Empfindlichkeitseinbuße auf einen Bruchteil verringern läßt. Zum Nachweis der Infektiosität wurde die DNS mit 0,5 ml Tris-Puffer (0,05-m., pH 8,1) von den Trägerplättchen abgelöst und bei 37°C zunächst 20 Min. lang mit 0,5 ml Sphäroplasten-Suspension und nach Zugabe von 1 ml auf 37°C vorgewärmtem PAM-Medium¹⁴ weitere 100 Min. inkubiert. Nach entsprechender Verdünnung mit Borat-Puffer plattierten wir jeweils 0,1 ml zusammen mit der entsprechenden Menge einer Übernachtskultur von *E. coli* C auf einem Indikator-Nährboden¹⁷. Abb. 2 zeigt eine Kalibrierungskurve für unsere Nachweismethode. Die nach Dialysieren gegen NCE-Puffer erhaltene DNS-Lösung wurde 1 : 10^3 bis 1 : 10^9 mit Tris-Puffer verdünnt und jeweils 0,5 ml davon für die Infektion benutzt. Wie aus der Abbil-

¹³ R. L. SINSHEIMER, J. molecular Biol. 1, 43 [1959].

¹⁴ G. D. GUTHRIE u. R. L. SINSHEIMER, Biochim. biophysica Acta 72, 290 [1963].

¹⁵ R. L. SINSHEIMER, J. molecular Biol. 1, 37 [1959].

¹⁶ D. FRASER u. E. A. JERREL, J. biol. Chemistry 205, 291 [1953].

¹⁷ C. BRESCH, Zbl. Bakteriol. 159, 47 [1952].

dung hervorgeht, ergibt sich über mindestens 6 Dekaden hinweg ein linearer Zusammenhang zwischen DNS-Konzentration und der Zahl der erhaltenen Plaques.

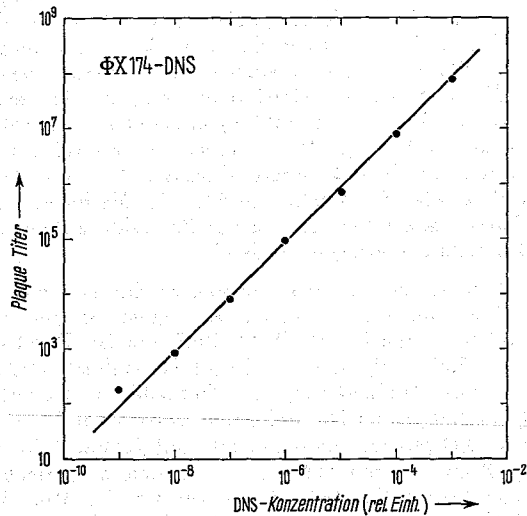


Abb. 2. Kalibrierungskurve für den Nachweis infektiöser $\Phi X174$ -DNS. Die Zahl der infektiösen Zentren pro ml zu Ende der Infektionsperiode (Plaque-Titer) ist aufgetragen als Funktion der relativen DNS-Konzentration.

Ergebnisse

Bei Bestrahlung von infektiöser $\Phi X174$ -DNS mit niederenergetischen Protonen nimmt die Überlebensrate mit zunehmender Dosis ab und strebt im Bereich hoher Dosen einem konstanten Wert zu (Abb. 3), da offenbar an einigen Stellen die Dicke der bestrahlten Schicht die Reichweite der Protonen

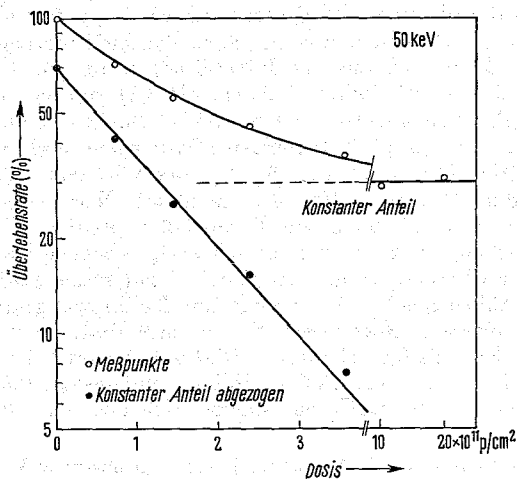


Abb. 3. Inaktivierung von infektiöser $\Phi X174$ -DNS durch 50 keV-Protonen.

übersteigt. Die Größe dieses konstanten Anteils, die von der Art der Probenherstellung abhängt, wurde für jede Versuchsreihe durch Bestrahlung von 10 bis 15 Proben mit besonders guter Statistik bestimmt. Er lag im gesamten Energiebereich von 0,8 bis 50 keV zwischen 20 und 40 Prozent und zeigte keine Abhängigkeit von der Protonenenergie. Folglich liegen 60–80 Prozent der DNS in einer Schicht vor, deren Dicke klein ist gegen die Reichweite der eingestrahnten Protonen; der verbleibende Rest ist offensichtlich in winzige Salzkriställchen eingebettet, welche die langsamen Protonen nicht durchdringen können. Die Anwesenheit von minimalen Salzmenge ist jedoch nicht als schwerwiegende Einschränkung dieser Untersuchungsmethode anzusehen; denn subtrahiert man den konstanten Anteil von den einzelnen Meßpunkten, dann liegen die daraus resultierenden Werte bei halblogarithmischer Auftragung auf einer Geraden (vgl. Abb. 3), aus deren Neigung die 37%-Dosis (D_{37}) bestimmt werden kann. Wie Abb. 4 zeigt, weisen die bei Protonenenergien von 0,8, 1,2 und 35 keV nach Abzug des konstanten Anteils ermittelten Dosis-Effekt-Kurven nur geringfügige Unterschiede in ihrer Neigung auf; d. h. die Wirksamkeit der langsamen Protonen zur Inaktivierung von ΦX -DNS hängt nur schwach von ihrer kinetischen Energie ab.

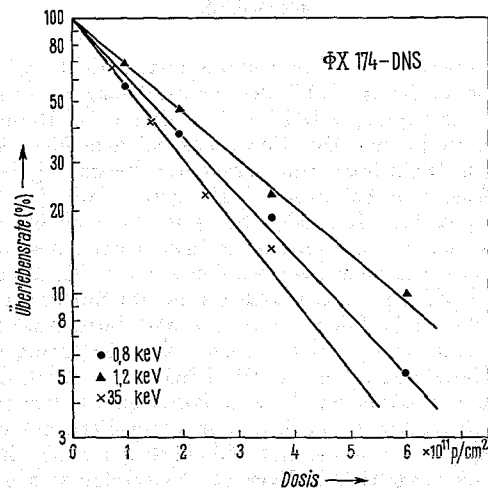


Abb. 4. Dosis-Wirkungskurven für die Inaktivierung von infektiöser $\Phi X174$ -DNS durch Protonen von 0,8, 1,2 und 35 keV Energie nach Subtraktion des konstanten Anteils.

Dieser Befund geht deutlicher aus Abb. 5 hervor, auf der die experimentell ermittelten Inaktivierungsquerschnitte ($S = 1/D_{37}$) über der Energie der eingestrahnten Protonen aufgetragen sind. Der Wir-

kungsquerschnitt ist bei höheren Energien praktisch konstant, erreicht zwischen 1 und 1,5 keV ein flaches Minimum und steigt unterhalb dieser Energie wieder geringfügig an. Im Gegensatz dazu zeigt die früher¹ mit Ribonuclease aufgenommene analoge Kurve ein stark ausgeprägtes Minimum zwischen 1 und 1,5 keV, während nach kleineren und größeren Protonenenergien hin der Wirkungsquerschnitt um etwa das Fünffache ansteigt.

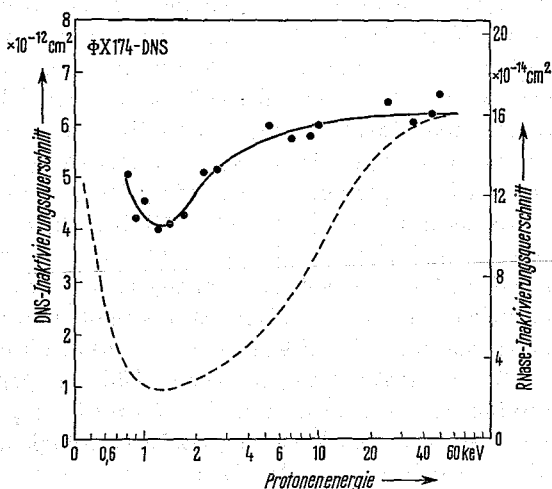


Abb. 5. Verlauf des Wirkungsquerschnitts für die Inaktivierung von infektiöser ΦX174-DNS in Abhängigkeit von der Energie der eingestrahelten Protonen. — — — Verlauf des Inaktivierungsquerschnitts von Ribonuclease¹.

Diskussion

Die geringe Variation der Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit von ΦX-DNS mit der Protonenenergie weist darauf hin, daß unabhängig von seiner Energie beinahe jedes Proton, das ein DNS-Molekül durchquert, in diesem mindestens ein inaktivierendes Ereignis auslöst. Diese Interpretation kann mit Hilfe der Treffbereichstheorie folgendermaßen gestützt werden: Nach FANO¹⁸ und ZIMMER¹⁹ läßt sich der Verlauf des Inaktivierungsquerschnitts *S* in Abhängigkeit von der Ionisierungsdichte der einfallenden Partikelstrahlung durch die Beziehung

$$S = S_0 (1 - e^{-id}). \tag{1}$$

beschreiben. Dabei bedeutet *S*₀ den geometrischen Querschnitt und *d* die mittlere Dicke des bestrahlten

Moleküls. In der bisher benutzten Form von Gl. (1) bedeutet *i* die mittlere Zahl der Primärionisationen pro Zentimeter. Da wir aber nicht nur Ionisationen, sondern auch elastische Kernstöße bezüglich ihrer biologischen Wirksamkeit diskutieren wollen, bezeichnet *i* hier die mittlere Anzahl der inaktivierenden Ereignisse (Primärionisationen + Kernstöße), die von einem Proton pro Zentimeter Wegstrecke ausgelöst werden. Gemäß Gl. (1) wächst der Inaktivierungsquerschnitt *S* mit zunehmender räumlicher Dichte der inaktivierenden Ereignisse an und nähert sich bei hohen Werten von *i* an den geometrischen Querschnitt *S*₀ an. Da nicht genau bekannt ist, welche Form die DNS-Moleküle nach der Gefrier-trocknung aufweisen, wird *S*₀ aus Abb. 5 entnommen: Oberhalb von 5 keV ist der Inaktivierungsquerschnitt nur noch wenig energieabhängig und strebt einem Sättigungswert von *S*₀ = 6,2 · 10⁻¹² cm² zu. Aus diesem Wert und dem Mol.-Gew. von 1,7 · 10⁶ (SINSHEIMER¹³) errechnet sich für das DNS-Molekül eine mittlere Flächenbelegung von 4,6 · 10⁻⁷ g/cm², was bei einer Dichte von 1,7 g/cm³ und dichtester Packung einer mittleren Schichtdicke von 27 Å entsprechen würde.

Um *i* als Funktion der Protonenenergie zu berechnen, können die auf Abb. 1 angegebenen Wirkungsquerschnitte *σ*_e und *σ*_n herangezogen werden. Um aus diesen Werten, die in MeV · cm²/Atom angegeben sind, die Energieabgabe pro Wegstrecke zu bestimmen, benötigt man die Zahl der Atome pro Kubikzentimeter. Dieser Wert beträgt 1,05 · 10²³ Atome/cm³; er wurde mit Hilfe der von SINSHEIMER¹³ mitgeteilten molaren Häufigkeiten der verschiedenen DNS-Basen (Adenin : Thymin : Guanin : Cytosin = 1,0 : 1,31 : 1,02 : 0,79) und natürlich unter anteiliger Berücksichtigung von Desoxyribose und Phosphat für eine Dichte von 1,7 g/cm³ errechnet. Aus der Energieabgabe pro Längeneinheit kann unter Verwendung eines mittleren Energieaufwands von 60 eV pro Primärionisation der Wert von *i* als Funktion der Protonenenergie angegeben werden. Benutzt man nur den Wirkungsquerschnitt für Elektronenwechselwirkung *σ*_e, so erhält man daraus den zu erwartenden Verlauf des Inaktivierungsquerschnitts für den Fall, daß ausschließlich Ionisationen zur Inaktivierung der DNS befähigt sind (Abb. 6, Kurve A). Wenn Ionisationen und

¹⁸ U. FANO, Unveröffentlichtes Manuskript 1938. Zitiert bei K. G. ZIMMER, Studies on Quantitative Radiation Biology. Oliver & Boyd, Edinburgh/London 1961.

¹⁹ K. G. ZIMMER, Physik. Z. 44, 233 [1943].

Kernstöße mit gleicher Energieausbeute an der insgesamt beobachteten Wirkung beteiligt sind, also auch pro Kernstoß eine Energieübertragung von 60 eV angenommen wird, sollte der Inaktivierungsquerschnitt wie Kurve B (Abb. 6) von der Protonenenergie abhängen. Kurve C wurde unter der Voraussetzung errechnet, daß der Energieaufwand für einen inaktivierenden Kernstoß nur 15 eV beträgt; das ist gleichbedeutend mit der Annahme, daß Kern-

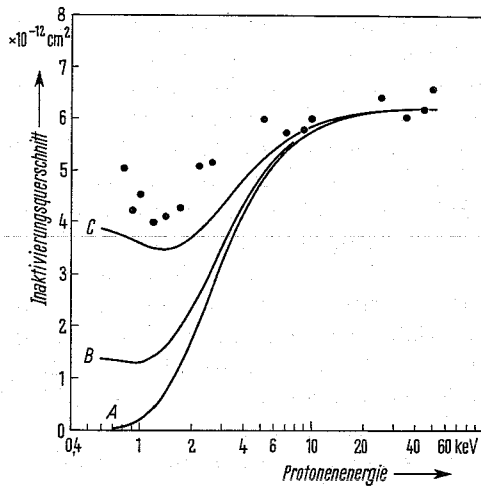


Abb. 6. Vergleich der experimentell bestimmten Wirkungsquerschnitte für die Inaktivierung von infektiöser Φ X174-DNS (●) mit dem nach der Treffbereichstheorie unter verschiedenen Voraussetzungen zu erwartenden Kurvenverlauf (weitere Erläuterungen im Text).

stöße (wie für RNase nachgewiesen wurde¹) eine viermal höhere Wirksamkeit zur Inaktivierung von DNS besitzen als Ionisationen. Aus dem Vergleich der experimentell ermittelten Inaktivierungsquerschnitte mit den nach Gl. (1) berechneten Kurven geht eindeutig hervor, daß elastische Kernstöße zur Inaktivierung von DNS fähig sind; andernfalls müßte die Inaktivierungs-Wahrscheinlichkeit den gleichen Verlauf wie Kurve A aufweisen und mit abnehmender Protonenenergie gegen Null gehen. Allerdings kann über die Energieausbeute der Kernstöße keine Aussage gemacht werden. Abb. 6 weist zwar darauf hin, daß Kernstöße zur Inaktivierung von DNS evtl. wirksamer sind als Ionisationen, was für Ribonuclease gefunden wurde¹; doch ist dieser

Schluß hier nicht zwingend, da der Verlauf der berechneten Kurve stark davon abhängt, welche Molekülform der Rechnung zugrundegelegt wird.

Zur Diskussion der Frage, welche relative biologische Effektivität (*RBE*) für elastische Kernstöße anzusetzen ist, können folgende Gesichtspunkte angeführt werden: Es ist bekannt, daß die Strahlenschädigung der verschiedensten Organismen zum überwiegenden Teil über eine Veränderung ihrer DNS verläuft. Außerdem ist bekannt, daß die Strahlenempfindlichkeit pro Nucleotid für verschiedene Gruppen von Organismen große Unterschiede aufweist. Nach KAPLAN und MOSES²⁰ beträgt die Zahl der für eine Inaktivierung notwendigen Primärisolationen etwa 1 für Viren mit einzelsträngiger DNS und RNS, größenordnungsmäßig 10 für Viren mit doppelsträngiger DNS, 50–100 für haploide Bakterien und Hefen und etwa 1000 für diploide Bakterien-, Hefe-, Vogel- und Säugetierzellen. Diese Unterschiede in der relativen Strahlenempfindlichkeit dürften im wesentlichen darauf zurückzuführen sein, daß ein großer Teil der Primärschäden in doppelsträngiger Virus-DNS von der Wirtszelle repariert wird, bzw. daß höher organisierte biologische Objekte sehr wirkungsvolle Systeme zur Reparatur strahleninduzierter (und anderer) DNS-Schäden besitzen. Falls es sich erweisen sollte, daß bei Einwirkung elastischer Kernstöße nur ein geringer Teil der primär erzeugten Schäden restituiert werden kann, was nach den Experimenten zum Schutz- und Temperatureffekt an Proteinen² nicht ausgeschlossen erscheint, dann ist mit einer hohen *RBE* der elastischen Kernstöße zu rechnen. Es dürfte aus diesem Grund von besonderem Interesse sein, die Einwirkung von langsamen Protonen auf infektiöse Doppelstrang-DNS von T1-Bakteriophagen zu untersuchen und die Wirksamkeit mit der ionisierenden Strahlen zu vergleichen.

Herrn Professor Dr. K. G. ZIMMER danken wir für zahlreiche anregende Diskussionen, Herrn Priv.-Doz. Dr. G. HOTZ für viele nützliche Ratschläge bezüglich der mikrobiologischen Technik und Fräulein I. MAIWALD für sorgfältige technische Assistenz bei den Experimenten.

²⁰ H. S. KAPLAN u. L. E. MOSES, Science [Washington] 145, 21 [1964].

CORRESPONDENCE

Action of elastic nuclear collisions on infectious DNA of bacteriophage ϕ X 174

K. KÜRZINGER and H. JUNG

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, Germany

(Received 17 September 1968)

Part of the energy of fast charged particles traversing matter is dissipated in direct impact with atomic nuclei. This process is generally called elastic nuclear collisions. Depending on the momentum and charge of the incident particle, on the charge and mass of the nucleus encountered, and on the impact parameter, the energy transferred may be sufficient to eject nuclei from their original position in a macromolecule, carrying with them a complete set of electrons. This derangement of atoms represents a chemical change which in biological structures may cause severe and permanent damage.

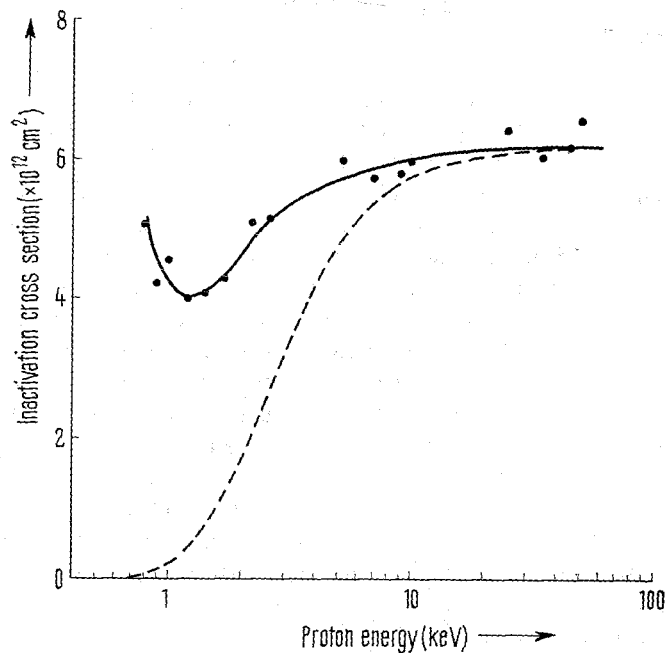
To investigate the biological effects of elastic nuclear collisions, the use of low-energy charged particles appears to be the best of a number of methods available (Jung and Zimmer 1966). For protons below 60 keV, the probability for ionization diminishes with decreasing proton energy, whereas the cross-section for elastic nuclear collisions increases steadily. Below 1.5 keV, the energy loss in nuclear collisions surpasses the loss in ionizations and excitations (Neufeld and Snyder 1961). On account of the very short penetration depth of slow protons, we used extremely thin layers of biological material and measured the differential inactivation cross-section for various proton energies. If the inactivation of biomolecules were due to ionizations only, the inactivation probability would be expected to show an energy dependence similar to that of the ionization probability. If nuclear collisions do contribute to the observed effect, the inactivation cross-section should decrease in the high-energy region with diminishing proton energy; but for slow protons one would expect the inactivation cross-section to increase again.

By using the method of slow-proton irradiation of thin layers of ribonuclease (RNase), it was possible to show that nuclear collisions are capable of destroying the enzymatic activity of RNase (Jung 1965, 1967). Furthermore, it was shown that the action of elastic collisions cannot be modified either by addition of the radioprotector cystamine, or by irradiating at low temperatures (Jung 1966). These findings demonstrate clearly that the mode of action of nuclear collisions is different from that of ionizations. As it is generally accepted that in many biological objects the deoxyribonucleic acid (DNA) represents an important radiation-sensitive target, we extended our investigations to isolated DNA in order to estimate the possible importance of elastic nuclear collisions for producing genetic damage.

Infectious DNA of bacteriophage ϕ X 174 was prepared as described by Sinsheimer (Sinsheimer 1959, Guthrie and Sinsheimer 1963), freeze-dried from

highly-diluted aqueous solutions on small polished gold-discs, and irradiated with monoenergetic protons in the energy range from 0.8 to 50 keV (Jung 1965, Jung and Zimmer 1966). The surviving fraction of infectious DNA was determined according to a modified version (Jung and Kürzinger 1968) of the method of Guthrie and Sinsheimer (1963).

With increasing proton dose (measured in particles per unit area), the surviving fraction of DNA decreases and approaches a constant level at high doses, indicating that about 30 per cent of the DNA is included in minute salt crystals which cannot be penetrated by the low-energy protons. To allow for this indestructible fraction, one has to subtract this constant value determined in each experiment with good statistics by long-time irradiation of numerous samples. After doing so, the data fall on a straight line in a semi-log plot. From the slope of these inactivation curves, the 37 per cent dose (D_{37}) and the inactivation cross-section ($S=1/D_{37}$) were determined.



Cross-section for the inactivation of dry infectious DNA of bacteriophage ϕ X 174 by slow protons of various energies. Broken curve: cross-section calculated under the assumption that inactivation is caused by ionization only.

The figure shows the experimentally determined cross-section for the inactivation of infectious ϕ X 174-DNA versus energy of the incident proton. Above 5 keV the inactivation cross-section is largely constant, it reaches a shallow minimum between 1 and 1.5 keV, and increases slightly at still smaller energies. On the basis of the cross-section for electronic energy losses of protons in biological material (Neufeld and Snyder 1961), we calculated the inactivation cross-sections expected if this mode of energy loss (electronic ionization and excitation) alone were capable of inactivating ϕ X-DNA (figure, broken curve).

From the deviation of the calculated curve from the experimental points in the low-energy range, it is obvious that below 10 keV a mechanism of inactivation additional to electronic ionization and excitation contributes to the observed effect, the effectiveness of which increases with decreasing proton energy. There is but one process to be considered in this energy region: damage to DNA by elastic nuclear collisions between the incident protons and atoms forming the DNA molecule. A more detailed description and discussion of the experiments will be given elsewhere (Jung and Kürzinger 1969).

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Professor K. G. Zimmer for stimulating discussions and for continued support and encouragement.

REFERENCES

- GUTHRIE, G. D., and SINSHEIMER, R. L., 1963, *Biochim. biophys. Acta*, **72**, 290.
JUNG, H., 1965, *Z. Naturf. B*, **20**, 764; 1966, *Ibid.*, **21**, 1165; 1967, *Radiat. Res.*, Suppl. **7**, 64.
JUNG, H., KÜRZINGER, K., 1968, *Radiat. Res.*, **36** (in the press); 1969, *Z. Naturf. B*, **24** (in the press).
JUNG, H., and ZIMMER, K. G., 1966, *Current Topics in Radiation Research*, edited by M. Ebert and A. Howard (Amsterdam: North-Holland Publishing Company), p. 69.
NEUFELD, J., and SNYDER, W. S., 1961, *Selected Topics in Radiation Dosimetry* (Vienna: International Atomic Energy Agency), p. 35.
SINSHEIMER, R. L., 1959, *J. molec. Biol.*, **1**, 37.