

Aminosäureveränderungen in Rinderinsulin durch UV-Bestrahlung

W. SIEBERT, C. FIORE und K. DOSE

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

(Z. Naturforschg. 20 b, 957—959 [1965]; eingegangen am 17. Mai 1965)

Bei der UV-Bestrahlung (2537 Å) des Zn-Insulins beobachtet man für kleinere Dosen (bis 10 Einstein/Mol) eine direkte Korrelation zwischen der Inaktivierung und der Photoreduktion einer der drei Disulfidbrücken. Mit steigender Dosis wird die Quantenausbeute für die Reduktion der Disulfidbrücken (Bildung von SH-Gruppen) sehr klein, dagegen führen dann andere Prozesse zunehmend zur photochemischen Zerstörung der Disulfidbrücken. Für größere Strahlendosen (über 100 Einstein/Mol) ergibt die Extrapolation, daß für die völlige Inaktivierung des Insulins sämtliche drei Cystinreste zerstört werden müssen. Von den übrigen Aminosäuren wird durch Dosen um 100 Einstein/Mol nur der Tyrosin-Anteil signifikant vermindert. Mit steigender Strahlendosis ändert sich — wahrscheinlich infolge von Konformationsänderungen der Polypeptidketten — die Photosensibilität der Aminosäuren.

Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 2537 Å zerstört in Proteinen mit großer Selektivität Cystinreste (Quantenausbeute für die Zerstörung $\Phi \sim 2 \cdot 10^{-1}$), wenn in schwach saurer Lösung bestrahlt wird. Die übrigen bei dieser Wellenlänge absorbierenden Aminosäurereste (Tryptophan, Tyrosin, Histidin und Phenylalanin) zeigen unter diesen Bedingungen eine um mindestens eine Zehnerpotenz kleinere Photosensibilität.

Wegen der besonderen Bedeutung des Cystins für die Erhaltung einer bestimmten Konformation der Polypeptidketten (tertiären Struktur), die für die biologische Aktivität des Proteins essentiell ist, wurde die Beziehung zwischen der Photo-Inaktivierung eines Proteins und dessen Cystin-Verlust bei folgenden (cystein-freien) Proteinen untersucht: Trypsin¹, Chymotrypsin², Ribonuclease^{2, 4} und Lysozym³. Wir haben diese Untersuchungen auch auf Insulin ausgedehnt^{3, 5}, a) weil dessen primäre Struktur einschließlich der Lokalisation der Disulfidbrücken bekannt ist^{6, 7}, b) weil es außer Cystein auch kein Methionin und Tryptophan enthält, c) weil es in sehr reiner Form erhalten werden kann *

und d) weil es neuerdings möglich ist, dessen biologische Aktivität in einem übersichtlicherem in-vitro-Test⁸ zu bestimmen.

Methodik

Die 0,1-proz. Insulin-Lösungen wurden bei p_H 3,0 und 20 °C in 1-cm-Quarzküvetten mit der 2537 Å-Linie eines Hg-Niederdruckbrenners bestrahlt. Die Lichtintensität an der Oberfläche der Küvetten betrug 0,4 μ Mol Quanten (μ Einstein)/min \cdot cm². Die Proben wurden anschließend 18 Stdn. im Vakuum bei 110 °C mit 6-n. HCl hydrolysiert⁹. Die Aminosäuren wurden in einem automatischen Analysator (Bender & Hobein, München) in Anlehnung an eine bekannte Routine-methode analysiert¹⁰. Ein Teil der Disulfidbrücken wird unter den erwähnten Bestrahlungsbedingungen reaktiv gespalten^{11–14}. Die gebildeten SH-Gruppen wurden mit *p*-Chloromercuribenzoessäure nach BOYER¹⁵ bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Bei Bestrahlung mit kleineren Dosen (bis etwa 10 Einstein/Mol) ist die vorherrschende Photoreak-

* Wir danken den Farbwerken Hoechst AG für die Überlassung von kristallisiertem Zn-Insulin.

¹ L. G. AUGENSTEIN u. C. A. GHIRON, Proc. nat. Acad. Sci. [USA] 47, 1530 [1961].

² R. A. LUSE u. A. D. McLAREN, Photochem. Photobiol. 2, 343 [1963].

³ K. DOSE, Biophysik 1, 316 [1964]; Physical Processes in Radiation Biology, Academic Press, New York 1964.

⁴ L. AUGENSTEIN u. P. RILEY, Photochem. Photobiol. 2 [1964].

⁵ C. FIORE u. K. DOSE, in Vorbereitung.

⁶ F. SANGER u. E. O. P. THOMPSON, Biochem. J. 53, 306, 353 [1953].

⁷ A. P. RYLE, F. SANGER, L. F. SMITH u. R. KITAL, Biochem. J. 60, 541 [1955].

⁸ G. VALLANCE-OWEN, Lancet 68, 246 [1954].

⁹ A. M. CRESTFIELD, S. MOORE u. W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 238, 622 [1962].

¹⁰ S. MOORE, D. H. SPACKMAN u. W. H. STEIN, Analytic. Chem. 30, 1185, 1190 [1958].

¹¹ W. E. LYONS, Nature [London] 162, 1004 [1948].

¹² E. SCHOCKEN, Science [Washington] 116, 544 [1952].

¹³ K. DOSE u. B. RAJEWSKY, Photochem. Photobiol. 2, 181 [1962].

¹⁴ R. A. LUSE, Thesis, Univers. of California, Berkeley 1961.

¹⁵ P. BOYER, J. Amer. chem. Soc. 76, 4331 [1954].

tion eine reduktive Spaltung der Disulfidbindung. Für jeden zerstörten Cystin-Rest können unter diesen Bedingungen etwa 1,5 Cystein-Reste gebildet werden^{2, 4, 13}. Im vorliegenden Fall wird offenbar einer der drei Cystinreste mit großer Selektivität reduziert. Für kleinere Dosen (bis 10 Einstein/Mol) ergibt sich dabei rein rechnerisch eine direkte Korrelation zwischen der Reduktion eines Disulfidrestes und der Inaktivierung des Insulins. Diese Ergebnisse können mit der Reduktion des Insulins durch chemische Agenzien¹⁶ oder durch elektrolytische Methoden¹⁷ verglichen werden. Es ist aber noch unbekannt, ob das Innerketten-Disulfid der A-Kette oder eines der zwei Zwischenketten-Disulfide bevorzugt gespalten werden.

Es ist anzunehmen, daß außerdem unter den Bedingungen der photochemischen Reduktion ein intensiver Disulfidaustausch gestartet wird. Der thermische Disulfidaustausch ist bei schwach saurer Lösung zwar minimal¹⁸, es konnte aber nachgewiesen werden, daß in einer Lösung von Cystein und oxyd. Glutathion bei gleichem p_{H} -Wert die photochemische Bildung des gemischten Disulfids mit einer Quantenausbeute (2537 Å) von 10^{-1} erfolgt¹⁹. Die Bedeutung dieser Prozesse für die UV-Inaktivierung von Proteinen muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

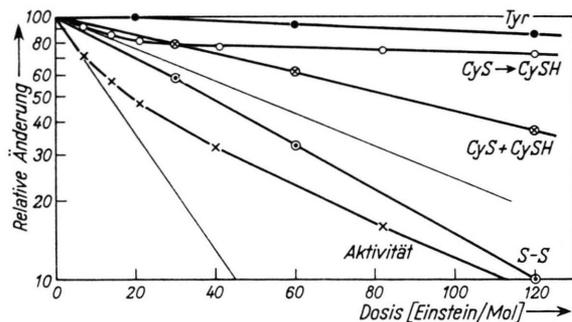


Abb. 1. Dosis-Abhängigkeit des Gehalts an Cys, CySH, Tyrosin und der Aktivität des Insulins. Erklärung der Symbolik: Tyr = Abnahme des Tyrosin-Gehalts; Cys \rightarrow CySH = Verlust an Cystin durch reduktive Spaltung der S-S-Bindungen (PCMB-Titrationen); CyS + CySH = Abnahme an Cystein/Cystin des Hydrolysats (bestimmt im automat. Aminosäure-Analysator); S-S = Abnahme der Zahl der Disulfidbrücken im bestrahlten Insulin; mittlerer Fehler für die Aminosäure-Bestimmungen 3–5%, für die Aktivitätsmessungen 7,5 Prozent.

¹⁶ H. LINDLEY, J. Amer. chem. Soc. **77**, 4927 [1955].

¹⁷ G. MARKUS, J. biol. Chemistry **239**, 4136 [1964].

Im Gegensatz zur Reduktion der S-S-Brücken ist der übrige photochemische Abbau der Cystinreste (meist ausgehend von Spaltungen der C-S-Bindungen) weniger verhängnisvoll für die Aktivität des Insulins.

Abb. 1 zeigt, daß die Aktivität und der Anteil der unversehrten Cystinreste für größere Dosen sogar etwa im gleichen Verhältnis abnehmen. Die weitere Extrapolation zeigt, daß erst ein völlig cystin-freies Insulin inaktiv ist. Es ist dabei nicht ausgeschlossen, daß die konformations-stabilisierende Funktion der Disulfidbrücken durch andere, photochemisch gebildete Querverbindungen übernommen wird. Es ist noch unklar, ob zwischen der Zerstörung der Tyrosin-Reste (Abb. 1), die erst bei Dosen um 100 Einstein/Mol meßbar wird, und der Reduktion bzw. Zerstörung der Disulfidgruppen ein Zusammenhang besteht. Die Veränderungen aller übrigen Aminosäuren der Hydrolysate des bestrahlten Insulins sind kleiner als 3–5% und lassen sich nicht als signifikant ansehen.

Nach Bestrahlung mit 40 Einstein/Mol hat ein großer Teil des bestrahlten Insulins ein anderes elektrophoretisches Verhalten als die unbestrahlte Kontrolle⁵. Es kann daraus geschlossen werden, daß bei höheren Dosen Konformationsänderungen der Polypeptidketten eine Veränderung im photochemischen Verhalten der Cystin- und Tyrosin-Reste verursachen.

	Inaktivierung		SH-Bildung	CyS-Verlust
D-37%-Dosis (Einst./Mol)	19 *	30	69 *	52
$\Phi \sim 1/D$ -37%-Dosis	$5,2 \cdot 10^{-2}$	$3,3 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$1,9 \cdot 10^{-2}$

Tab. 1. D-37%-Dosen und Quantausbeuten für die Inaktivierung des Insulins, die Produktion von SH-Gruppen und die Zerstörung von Cystin. * Gültig für Dosen unter 10 Einst./Mol (Werte sind extrapoliert). Die D-37% für die als selektiv angenommene Spaltung des ersten Disulfidrestes ist etwa 20 Einstein/Mol.

Tab. 1 gibt die D-37%-Dosen wieder, die entweder direkt oder durch Extrapolation den Kurven der Abb. 1 entnommen wurden. Als Dosis wird die Zahl der pro Insulin-Molekül ($MG = 5750$) absorbierten Quanten angegeben. Wenn (vereinfachend) angenommen werden darf, daß die fraglichen Kurven

¹⁸ I. K. KLOTZ, J. AYERS, J. HO, M. HOROWITZ u. R. HEINEY, J. Amer. chem. Soc. **80**, 2132 [1958].

¹⁹ K. DOSE, unveröffentlicht.

teile als „Eintreffer-Kurven“ oder die Geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionen als Reaktionen erster Ordnung angesehen werden dürfen, dann ergibt sich für die entsprechende Quantenausbeute $\Phi = 1/D \cdot 37$ Prozent. Macht man die wenigstens formell berechnete Annahme, daß nur Quanten, die im Cystin selbst absorbiert werden, dort auch wirksam werden können, dann erhöhen sich die Quantenausbeuten für die Veränderung des Cystins etwa um den Faktor $\varepsilon_{254}(\text{Insulin})/3 \cdot \varepsilon_{254}(\text{Cystin}) = 6000/3 \cdot 276 = 1/0,14$, wenn als $\varepsilon_{254}(\text{Cystin})$ der Wert für freies Cystin benutzt werden darf.

Die so erhaltenen Quantenausbeuten ($\Phi = 1$ bis $1,5 \cdot 10^{-1}$) sind größer als die entsprechenden Werte

für freies Cystin oder oxyd. Glutathion. Über ähnliche Ergebnisse wurde schon in einigen anderen Arbeiten berichtet und ihre mögliche Bedeutung diskutiert^{1, 3, 4}. In weiteren Arbeiten soll daher auch geklärt werden, ob und in welchem Umfang bestimmte Energie-Übertragungsmechanismen die größere Photoempfindlichkeit von proteingebundenem Cystin verursachen.

Die Autoren möchten auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. B. RAJEWSKY für seine vielen Anregungen und seine mannigfaltige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeiten danken. Zwei der Autoren (W. S. und C. F.) sind ihm außerdem wegen der erwiesenen Gastfreundschaft während ihres Aufenthalts am Max-Planck-Institut für Biophysik sehr verpflichtet.

Untersuchungen über das Myeloblastose-Virus des Huhnes (BAI Stamm A)

I. Nachweis und Vermehrungskinetik des Virus in Hühnerfibroblasten-Kulturen

HEINZ BAUER, HANS BAHNEMANN und WERNER SCHÄFER

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

(Z. Naturforschg. 20 b, 959—965 [1965]; eingegangen am 2. Juni 1965)

Es werden Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Myeloblastose-Virus und zur Auswahl der dafür geeigneten Zellen beschrieben. Die im Zusammenhang damit durchgeführten vergleichenden Untersuchungen mit anderen Viren der Hühner-Leukose-Gruppe ergaben, daß die verwendeten Hühnerfibroblasten eine wahrscheinlich genetisch bedingte Resistenz gegen die Leukose-Viren besitzen können. Diese Resistenz ist relativ spezifisch und macht es notwendig, jedes Zellmaterial vor Verwendung im Versuch zunächst auf Empfänglichkeit gegenüber dem *speziellen* Leukose-Virus-Typ zu prüfen. Mit den neu entwickelten Testen wurde die Bildung von infektiösen Einheiten und Antigen des Myeloblastose-Virus in Hühnerfibroblasten-Kulturen verfolgt.

Eine eingehendere Untersuchung von Virus-Zell-Wechselwirkungen ist erst dann möglich, wenn geeignete Methoden für den qualitativen und vor allem für den quantitativen Nachweis der verschiedenen Aktivitäten des in Frage stehenden Erregers verfügbar sind.

Bei den Geflügeltumoviren stieß man in dieser Hinsicht auf große Schwierigkeiten. Die besten Voraussetzungen bestanden beim Rous-Sarkom-Virus (RSV), seitdem TEMIN und RUBIN¹, aufbauend auf den Beobachtungen von LOH und Mitarbb.² bzw. von MANAKER und GROUPÉ³, den mit Hilfe von Hühnerfibroblasten-Kulturen durchführbaren Focus-Test

entwickelten. Unter Verwendung dieser Methode wurde später ein Interferenz-Test ausgearbeitet, mit dem man weitere Tumoviren des Geflügels — wenn auch nur auf indirektem Wege — in der Gewebekultur nachweisen und annähernd quantitativ bestimmen konnte⁴⁻⁶.

Für die quantitative Erfassung der infektiösen Einheiten des von uns bearbeiteten Myeloblastose-Virus des Huhnes (AMV) standen bisher, wenn man von den aufwendigen und langwierigen Versuchen mit Hühnern absieht, vor allem der vorher erwähnte Interferenz-Test und der von VOGT und RUBIN⁷ entwickelte Plaquetest zur Verfügung, bei

¹ H. M. TEMIN u. H. RUBIN, *Virology* 6, 669 [1958].

² W. H. G. LOH, G. O. GEY u. P. SHARPES, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 97, 248 [1955].

³ R. A. MANAKER u. W. GROUPÉ, *Virology* 2, 838 [1956].

⁴ H. RUBIN, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 46, 1105 [1960].

⁵ H. RUBIN u. P. K. VOGT, *Virology* 17, 184 [1962].

⁶ H. RUBIN, A. CORNELIUS u. L. FANSKIER, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 47, 1058 [1961].