

Digitonin oder Zugabe von CMU¹. In allen diesen Fällen kann der Reaktionscyclus von Chl-a₁ durch Ankopplung künstlicher Elektronendonatoren reaktiviert werden. Geeignet zur Ankopplung eines Elektronendonators wie Ascorbat sind die Stoffe PMS und DPIP. Im Falle von PMS reagiert die reduzierte Form PMSH[⊖] direkt mit Chl-a₁[⊖]¹. Unter den zuletzt genannten Umständen ist ein Teilcyclus (I) von dem Elektronentransport der Photosynthese isoliert worden. Dieser Teilcyclus ist sehr wahrscheinlich verantwortlich für die von VERNON und ZAUGG beobachtete Photoreduktion von TPN an gealterten Chloroplasten mit Zusatz von DPIP und Ascorbat im

Überschuß¹¹. Bisher ermittelte Eigenschaften des Reaktionszyklus von Chl-a₁ sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Über den Ausbau des hier wiedergegebenen Reaktionsschemas zu einem vollständigen Schema für den Elektronentransport beim Prozeß der Wasserspaltung bei der Photosynthese wird in den nachfolgenden 4 Arbeiten berichtet.

Herrn Prof. H. T. WITT danke ich für sein förderndes Interesse und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung. Herrn B. SKERRA danke ich für die Ausführung der Messungen in Abb. 6 und Abb. 10.

Modellversuche zur chemischen Carcinogenese und zum photodynamischen Effekt von 3.4-Benzopyren und UV-Licht in wäßrigen Proteinlösungen mit verschiedener SH-Gruppenreaktivität*

VON GÜNTER RESKE UND JOACHIM STAUFF

Aus dem Institut für physikalische Biochemie und Kolloidchemie im Institut für physikalische Chemie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. 19 b, 716—726 [1964]; eingegangen am 22. April 1964)

The carcinogenic hydrocarbon 3.4-benzopyrene is soluble in aqueous solutions of different proteins. The solubilities are easily determined by the fluorimetric method. The fluorescence of the hydrocarbon in the protein solutions is not quenched by molecular oxygen. Nevertheless only in presence of air (oxygen) an irreversible decrease of the fluorescence intensity occurs under irradiation with UV-light of wavelength 366 m μ , which is considerably faster than under nitrogen or in solutions of the hydrocarbon in ethanol or aqueous caffeine.

In the systems investigated, a correlation was found between the half-life period of the reaction and the SH-group activities. The participation of protein-SH-Groups in the 3.4-benzopyrene photoreaction is demonstrated by ampèrometric Ag[⊖]-titrations.

The influence of protein denaturation and inhibiting additives on the photoreaction are investigated by the fluorimetric method.

Irradiation- and oxygen-dependence of the reaction are analogous to the observations of photodynamic action and skin cancer induction by 3.4-benzopyrene.

By 366 m μ irradiation of β -lactoglobuline solutions containing 3.4-benzopyrene the heat-denaturation characteristics of the protein are changed. The same changes are produced without 3.4-benzopyrene by UV-light of the wavelength 280 m μ . Treatment of the β -lactoglobuline solutions with an amount of cigarette smoke, which certainly does not contain 3.4-benzopyrene in sufficient concentration, acts in the same direction.

Along with the changes in the protein properties the typical fluorescence of 3.4-benzopyrene vanishes. The hydrocarbon does not act as a catalyst in photodynamic action, but is chemically altered as well as the protein, at least in the system under investigation.

Die Fluoreszenz der Lösungen von 3.4-Benzopyren in wäßrigen Lösungen von β -Lactoglobulin^{1, 2} verschwindet, wenn bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff Licht der Wellenlänge 366 m μ eingestrahlt wird³. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zur bisher nicht bestrittenen Deutung des photodynamischen Effektes als sensibilisierte Photooxydation, bei der der Sensibilisator in der Bilanz unverändert aus

der Reaktion hervorgehen soll (vgl. z. B. GRAFFI et al. und SANTAMARIA^{4, 5}).

Der Katalysatormechanismus könnte nur noch durch zwei Annahmen aufrechterhalten werden. Einmal bestünde die Möglichkeit, daß in dem speziellen System 3.4-Benzopyren – β -Lactoglobulin kein photodynamischer Effekt stattfindet, sondern das Protein nur als Katalysator der Photooxydation des Kohlenwasserstoffs wirkt, selbst aber nicht verändert wird. Die andere Möglichkeit wäre, daß erst nach einer Reihe von Sensibilisatorcyclen eine Nebenreaktion

* Ein Teil dieser Arbeit wurde unter dem Titel „Photoreaktion von 3.4-Benzopyren mit Proteinen“ auf der Bunsenagung im Mai 1964 in Berlin vorgetragen.

auftritt, durch die der Sensibilisator zerstört wird. Durch quantitative Bestimmung des durch die 3.4-Benzpyrenreaktion veränderten Aggregationsverlaufs von β -Lactoglobulin bei seiner Hitzedenaturierung läßt sich zeigen, daß der Sensibilisator nach höchstens zwei Reaktionscyclen zerstört wird. Da bei fortgesetzter Zufuhr von unverbrauchtem Kohlenwasserstoff während der UV-Bestrahlung die Proteinschädigung mit der Zeit zunimmt, bleibt als einzig mögliche Deutung der Resultate, daß der photodynamische Effekt im System β -Lactoglobulin – 3.4-Benzpyren eine Photooxydation ist, bei der das Protein und der Kohlenwasserstoff chemisch verändert werden. MORIMURA, FALK und KOTIN⁶ haben bei der Untersuchung des phototoxischen Effekts von 3.4-Benzpyren auf lebende Zellen in vitro (HeLa, M₅ und menschliche Amnionzellen) beobachtet, daß die Fluoreszenz des Kohlenwasserstoffs im Cytoplasma bei Bestrahlung mit UV-Licht in Anwesenheit von Sauerstoff verschwindet. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die von uns für das System β -Lactoglobulin – 3.4-Benzpyren nachgewiesene „stöchiometrische“ Photoreaktion KW-Stoff-Protein auch beim photodynamischen Effekt im biologischen System stattfindet.

Ferner wird gezeigt, daß zwischen der Intensitätsabnahme der Benzpyrenfluoreszenz bei Einstrahlung von langwelligem UV-Licht und der Reaktivität der SH-Gruppen der beteiligten Proteine ein gesetzmäßiger Zusammenhang besteht. Mit dem nicht carcinogenen 1.2-Benzpyren wurden unter gleichen Versuchsbedingungen keine vergleichbaren Effekte beobachtet. Die Hemmung der Reaktion durch Hitzedenaturierung, Harnstoff, Cystein oder Dihydro- α -liponsäure ergab Hinweise über den Einfluß der Proteinkonfiguration auf die beteiligten Protein-SH-Gruppen.

Experimentelle Einzelheiten

Zur Herstellung der 3.4-Benzpyren-Proteinlösungen wurden Suspensionen des Kohlenwasserstoffs in Wasser (bidest.) benutzt, die durch Eingießen einer 1-proz. acetonischen 3.4-Benzpyrenlösung (100 ml) in 1 l Wasser und anschließendes Verkochen des Acetons gewonnen worden waren. Unterschiede zwischen diesen und den früher (vgl. STAUFF und RESKE¹) nach einem anderen Verfahren bereiteten Suspensionen wurden nicht

beobachtet. Beim Arbeiten mit Phosphatpuffer p_H 7 (Zusammensetzung: 4,59 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ + 2,76 g KH_2PO_4 im l) wurde die entsprechende Menge feste Puffersubstanz in der wäßrigen KW-Stoffsuspension und das Protein in der gewünschten Konzentration in der gepufferten Suspension gelöst. Für die Versuche in Trispuffer p_H 7–7,2 wurde zum festen Protein pro 10 mg je 1 ml 1-m. Trispuffer, mit 1-m. HNO_3 auf p_H 7 bis 7,2 eingestellt, zugesetzt und anschließend mit der wäßrigen 3.4-Benzpyrensuspension auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Nach mehrstündigem Stehen im Dunkeln unter häufigem Rühren wurden nach restloser Entfernung der überschüssigen Suspension durch Zentrifugation in Glas- oder Metallbechern die Konzentrationen des molekulardispers verteilten Kohlenwasserstoffs wie früher beschrieben (STAUFF und RESKE¹, RESKE und STAUFF²) fluoreszenzspektrographisch bestimmt.

Für alle Zentrifugationen (15 000 Touren) wurde eine Phywe-Zentrifuge, Typ Pirouette, verwendet. Zur Vorbereitung für die Lichtstreuungsmessungen wurden die Lösungen viermal nacheinander mindestens 20 min zentrifugiert, dekantiert und gegebenenfalls zur Entfernung von manchmal auf der Flüssigkeitsoberfläche schwimmenden Kohlenwasserstoffpartikeln pipettiert.

Nach dem gleichen Verfahren wurden die Lösungen für die SH-Titrationen und die Untersuchungen der Kinetik der Photoreaktion von überschüssiger Kohlenwasserstoff-Suspension befreit.

Bei den Versuchen zur Bestimmung des Einflusses von 3.4-Benzpyren und UV-Licht (366 $m\mu$) auf die Hitzeaggregations-Eigenschaften und die SH-Werte von β -Lactoglobulin und Serumalbumin wurden die Lösungen im Zeiss-Fluoreszenzzusatz ZFM 4 (Quarzbrenner St 41, Interferenzfilter 366 $m\mu$, 10 $m\mu$ Bandbreite) bestrahlt. Die dort erzielte Intensität ist höher als bei der früher (RESKE und STAUFF³) beschriebenen Versuchsanordnung, die bei allen anderen Versuchen verwendet wurde.

Die untersuchten Protein-Kohlenwasserstoff-Assoziate sind sehr labil. So können bereits bei einständigem Zentrifugieren der Lösungen in Kunststoffbechern (Ultramid S) mehr als 90% des gelösten Kohlenwasserstoffs vom Kunststoff adsorbiert werden. Bei Zentrifugation in Glas- oder Metallbechern wird der Effekt nicht beobachtet. Es stellt sich offenbar ein Lösungsgleichgewicht des Kohlenwasserstoffs zwischen Proteinlösung und Kunststoff ein, denn durch reine β -Lactoglobulinlösungen läßt sich der Kohlenwasserstoff wieder aus dem Kunststoff eluieren. In Tab. 1 sind die Ergebnisse einer fluoreszenzspektrographischen Versuchsserie zusammengefaßt, wo jeweils nacheinander in Glasgefäßen 3.4-Benzpyren-gesättigte und reine β -Lactoglobulinlösungen in den gleichen Kunststoffbechern zentrifugiert wurden. Die Becher waren nach jeder Zentrifuga-

¹ J. STAUFF u. G. RESKE, Z. Naturforschg. **15 b**, 578 [1960].

² G. RESKE u. J. STAUFF, Z. Naturforschg. **18 b**, 773 [1963].

³ G. RESKE u. J. STAUFF, Z. Naturforschg. **18 b**, 774 [1963].

⁴ A. GRAFFI, E. J. SCHNEIDER, H. KRIEGLER u. G. SYDOW, Naturwissenschaften **40**, 415 [1953].

⁵ L. SANTAMARIA, Unio. int. Cancrum, Acta [Louvain] **19**, 591 [1963].

⁶ Y. MORIMURA, H. L. FALK u. P. KOTIN, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. **4**, 45 [1963].

| Reihenfolge der Zentrifugationen | Behandlung | angesetzte Lösungen | |
|----------------------------------|--|---|--|
| | | 0,2% β -Lactogl. rein <i>I</i> | 0,2% β -Lactogl. + 3,4- Benzpyren <i>I</i> |
| 1 | 4 · 15–20 min in Kunststoff- bechern zentr. | 0,1* | |
| 2 | | | 0,5 |
| 3 | | 0,4 | |
| 4 | | | 1,5 |
| 5 | | 1,0 | |
| 6 | | | 2,0 |
| 7 | 2 · 15 min in Kunststoff-, 2 · 15 min in V2a-Bechern zentrifugiert | 1,6 | |
| 8 | | | 5,8 |
| — | Nur in V2a- Stahl-Bechern zentrifugiert | 0,2 | 26 |

Tab. 1. Relative Intensitäten *I* des Fluoreszenzlichts von 410 $m\mu$, Anregung 366 $m\mu$, nach Zentrifugation der Lösungen in Kunststoffbechern. * Nach Subtraktion des Blindwertes 0,1–0,2 sind die relativen Fluoreszenzlicht-Intensitäten proportional den jeweiligen Konzentrationen an 3,4-Benzpyren (*I* = 100 entspricht $2,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l 3,4-Benzpyren).

tion mit Seifenlösung ausgebürstet und mit dest. Wasser und Azeton nachgespült worden.

Wie Tab. 1 zeigt, steigt mit zunehmender Kontamination der Kunststoffbecher die in die reinen Proteinlösungen eingeschleppte Kohlenwasserstoffmenge und die in den 3,4-Benzpyren-Protein-Lösungen zurückbleibende Restkonzentration.

Über die Eluierung von 3,4-Benzpyren aus Rußteilchen durch menschliches Plasma und aus Wachs durch

Milch ist von FALK, MILLER und KOTIN^{7,8} berichtet worden.

Von WILK⁹ wurde auf Grund anderer Untersuchungen auf eine entsprechende Labilität des auch von uns (STAUFF und RESKE¹) beobachteten Assoziats 3,4-Benzpyren-Lactatdehydrogenase hingewiesen.

Bei der Bestimmung der Löslichkeiten von 1,2-Benzpyren in β -Lactoglobulin-Lösungen wurde nach der gleichen Methode verfahren wie bei 3,4-Benzpyren.

Zur Anregung der Fluoreszenz wurde das durch ein Interferenzfilter der Wellenlänge 325,5 $m\mu$ (10 $m\mu$ Bandbreite) gefilterte Licht der Quecksilberhochdruckdampfampe ST 41 (Zeiss-Spektralphotometer PMQ II mit Fluoreszenzzusatz ZFM 4) verwendet. In diesem Bereich ist die Intensität wesentlich geringer als bei 366 $m\mu$. Die Ausbeute an Fluoreszenzlicht ist dementsprechend geringer als bei den Versuchen mit 3,4-Benzpyren und liegt in der Größenordnung des durch Streulicht bedingten Nulleffekts.

Methoden und Ergebnisse

I. Löslichkeiten

In Tab. 2 sind die Ergebnisse zahlreicher fluorimetrischer Bestimmungen der Löslichkeit von 3,4- und 1,2-Benzpyren in verschiedenen Präparaten von β -Lactoglobulin, Rinderserumalbumin und γ -Globulin (Rind) zusammengefaßt. Für die Berechnung der Molverhältnisse wurden die Molgewichte 35 500 für β -Lactoglobulin, 68 000 für Rinderserumalbumin und 143 000 (nach JAENICKE und GEHATIA¹⁰) für γ -Globulin eingesetzt. Die beobachtete wesentlich geringere Löslichkeit von 3,4-Benzpyren in γ -Globulin

| Protein | Puffer | Mol/l 3,4-Bp in 0,2-proz. Protein- lösung [$\cdot 10^{-6}$] | Mol 3,4-Bp pro Mol Protein | Mol 1,2-Bp pro Mol Protein |
|---|---|--|-------------------------------|-------------------------------|
| β -Lactoglobulin (Carl Roth Karlsruhe) | Tris 0,2- <i>m</i> . p_H 7–7,2 | 1,3 | 0,023 | — |
| β -Lactoglobulin (Pentex, Inc. Kankakee, Ill. USA) | Tris 0,2- <i>m</i> . p_H 7–7,2 | 1,7 bis 2,7 | 0,03 bis 0,05 | — |
| β -Lactoglobulin (Pentex, Inc. Kankakee, Ill. USA) | Phosphat p_H 7 Zus.: s. Exp. Einzelheiten | 0,7 bis 1,3 | 0,012 bis 0,023 | 0,002 bis 0,0035 |
| Rinderserumalbumin Op.Nr. 127, Behringwerke Marburg/Lahn | Tris 0,2- <i>m</i> . p_H 7–7,2 | 0,9 bis 1,1 | 0,03 bis 0,037 | — |
| γ -Globulin vom Rind Op.Nr. 251 158, Behringwerke Marburg/Lahn | Tris 0,2- <i>m</i> . p_H 7–7,2 | 0,06 | 0,0043 | — |

Tab. 2. Löslichkeiten von 1,2- und 3,4-Benzpyren in wäßrigen Proteinlösungen.

⁷ H. L. FALK, P. KOTIN u. A. MILLER, Nature [London] **183**, 1184 [1959].

⁸ H. L. FALK, A. MILLER u. P. KOTIN, Science [Washington] **127**, 474 [1958].

⁹ M. WILK, Biochem. Z. **333**, 166 [1960].

¹⁰ R. JAENICKE u. M. GEHATIA, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **45**, 217 [1960].

verglichen mit Rinderserumalbumin und β -Lactoglobulin steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SANTAMARIA⁵ bei menschlichem α -, β - und γ -Serumglobulin.

Ein ebenso signifikanter Unterschied der Löslichkeiten ergibt sich beim Vergleich der Gleichgewichtskonzentrationen des nichtcarcinogenen 1.2-Benzpyrens und von 3.4-Benzpyren in β -Lactoglobulin-Lösungen. In allen Proteinlösungen wird keine reversible Sauerstofflöschung der Kohlenwasserstoff-Fluoreszenz beobachtet.

Die Fluoreszenzmaxima der Vergleichslösungen von 1.2-Benzpyren in Äthanol liegen bei 390, 400 und 410 m μ . In Coffeinlösungen sind die Maxima nicht deutlich voneinander getrennt. Eine Verschiebung gegen die Maxima der alkoholischen Lösung konnte deshalb nicht sicher beobachtet werden (vgl. für 3.4-Benzpyren: RESKE und STAUFF²). Aus diesem Grund und wegen der geringen Fluoreszenzlicht-Ausbeute in der Proteinlösung ist eine Zuordnung des 1.2-Benzpyrenfluoreszenz-Spektrums in der Proteinlösung zu dem in Äthanol oder in Coffeinlösung nicht möglich.

Die beobachteten Schwankungen der Gleichgewichtskonzentrationen bei verschiedenen Ansätzen sind bedingt durch die schlechte Reproduzierbarkeit der Suspensions-Eigenschaften und durch Temperaturschwankungen. Die lineare Abhängigkeit der Benzpyren-Gleichgewichtskonzentrationen von den Proteinkonzentrationen im Bereich zwischen 0 und 0,2% Protein (STAUFF und RESKE¹) gilt deshalb nur für unter gleichen Bedingungen mit dem gleichen Proteinpräparat und der gleichen Suspension angesetzte Lösungen.

Die Unterschiede der Gleichgewichtskonzentrationen stören die unten beschriebenen photodynamischen Untersuchungen nicht, weil die Kinetik der Photooxydation unabhängig von der KW-Stoff-Anfangskonzentration ist.

II. Kinetik der Hitzeaggregation von β -Lactoglobulin nach Behandlung mit UV-Licht und 3.4-Benzpyren

a) Methodik

Im p_H -Bereich oberhalb des isoelektrischen Punktes verläuft die Hitzeaggregation von β -Lactoglobulin nach einem Zeitgesetz von angenähert zweiter

Ordnung. (STAUFF und ÜHLEIN¹¹, STAUFF, BARTHEL, JAENICKE, KREKEL und ÜHLEIN¹².)

Die Aggregation der Proteinmoleküle verursacht eine Vergrößerung der mittleren Teilchengröße. Der mittleren Teilchengröße proportional ist die Intensität des von der Lösung gestreuten Lichts, zu deren Messung die nach STAUFF und Mitarb.¹² modifizierte, von ÜHLEIN und STAUFF¹³ in ihren wesentlichen Teilen beschriebene Apparatur benutzt wurde.

Für alle Untersuchungen der Kinetik der Hitzedenaturierung wurden verschiedene β -Lactoglobulinpräparate der Firma Pentex Inc., Kankakee, Illinois, USA, verwendet, die in ihren hier wesentlichen Eigenschaften übereinstimmen. In allen Fällen wurde bei 80 °C mit 0,2-proz. Proteinlösungen in Phosphatpuffer p_H 7 (Zusammensetzung s. Experimentelle Einzelheiten) gearbeitet.

Unter diesen Bedingungen nimmt die Aggregations-Geschwindigkeit des Proteins und die zu ihr proportionale Zunahme dS/dt der Streulichtintensität S mit der Zeit t nach Ablauf einer Induktionsperiode in guter Näherung mit dem Quadrat der Proteinkonzentration zu. Folglich erhält man für zwei verschiedene Proteinkonzentrationen c_0 und c_1 mit den entsprechenden Streulichtintensitäten $S_0 = S_0(t)$ und $S_1 = S_1(t)$

$$c_1/c_0 = dS_1/dt/dS_0/dt. \quad (1)$$

Falls nun zwei β -Lactoglobulin-Lösungen der gleichen Konzentration c_0 der Hitzedenaturierung unterworfen werden, von denen eine einer Vorbehandlung ausgesetzt war, die die Aggregationsfähigkeit des Proteins vermindert hat, so erhält man für die vorbehandelte Lösung eine Streulichtkurve $S_1 = S_1(t)$ mit einer Steigung dS_1/dt , die kleiner ist als die Steigung dS_0/dt der mit der nicht vorbehandelten Lösung gewonnenen Streulichtkurve. Daraus erhält man nach Gl. (1) eine scheinbare Ausgangskonzentration $c_1 < c_0$ für die vorbehandelte Lösung. Das Verhältnis c_1/c_0 ist der scheinbare Bruchteil der eingesetzten Proteinmenge, der von der Vorbehandlung nicht verändert wurde. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob sich die daraus berechnete prozentuale Schädigung des Proteins

$$F [\%] = 100 \cdot (1 - c_1/c_0) [\%] \quad (2)$$

gleichmäßig auf alle Proteinmoleküle erstreckt, d. h. jedes einzelne Molekül F % seiner Aggregationsfähigkeit verloren hat, oder ob F % der eingesetzten

¹¹ J. STAUFF u. E. ÜHLEIN, Kolloid-Z. **143**, 1 [1955].

¹² J. STAUFF, H. BARTHEL, R. JAENICKE, R. KREKEL u. E. ÜHLEIN, Kolloid-Z. **178**, 128 [1961].

¹³ E. ÜHLEIN u. J. STAUFF, Kolloid-Z. **142**, 150 [1955].

Proteinmoleküle vollständig inaktiviert wurden, während $(100-F)\%$ unverändert geblieben sind.

F ist demnach zu definieren als über alle Proteinmoleküle gemittelte, prozentuale Schädigung von β -Lactoglobulin, soweit sie sich in den Hitzeaggregations-Eigenschaften des Proteins bemerkbar macht.

b) Effekt von UV-Licht, 280 $m\mu$

Bei Einstrahlung von UV-Licht in die Absorptionsbanden (Max. 280 $m\mu$) der aromatischen Aminosäuren des Proteins (s. Abb. 3) mit verschiedenen Bestrahlungsdauern beobachtet man eine lineare Abhängigkeit der Proteinschädigung F von der Bestrahlungsdauer (s. Tab. 3 und Abb. 2). Den Verlauf der Streulichtintensitäts-Kurven bei der Hitze-

| Bestrahlungsdauer [min] | dS/dt , relative Werte | c_1 | F (%) (s. Abb. 2) |
|-------------------------|--------------------------|-------------|---------------------|
| 0* | 5,3 | $(c_0 = 1)$ | 0 |
| 7* | 4,5 | 0,92 | 8 |
| 14* | 2,7 | 0,71 | 29 |
| 21* | 2,0 | 0,61 | 39 |
| 0 | 4,9 | $(c_0 = 1)$ | 0 |
| 30 | 1,1 | 0,47 | 53 |
| 0 | 5,3 | $(c_0 = 1)$ | 0 |
| 5 | 4,3 | 0,90 | 10 |
| 10 | 3,6 | 0,82 | 18 |

Tab. 3. Einfluß vorangegangener UV-Bestrahlung in der langwelligeren 280 $m\mu$ -UV-Absorptionsbande von β -Lactoglobulin auf die Aggregation der Proteinmoleküle bei der Hitze-denaturierung. * Versuch in Abb. 1 dargestellt.

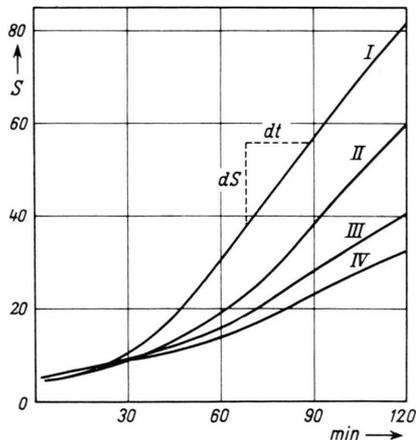


Abb. 1. Relativer Aggregationsverlauf von β -Lactoglobulin-Lösungen, p_H 7, bei 80 °C nach UV-Bestrahlung ($\lambda > 265 m\mu$). S: 90°-Streulichtintensität. min: Dauer der Erhitzung auf 80 °C in Minuten. Kurve I: 0,2-proz. β -Lactoglobulin in Phosphatpuffer p_H 7, nativ. Kurve II: Wie I mit 7 min UV-Bestrahlung. Kurve III: Wie I mit 14 min UV-Bestrahlung. Kurve IV: Wie I mit 21 min UV-Bestrahlung.

denaturierung verschieden lang bestrahlter β -Lactoglobulinlösungen zeigt die Abb. 1.

Die Lösungen wurden bei diesen Versuchen in Glasküvetten (Opt. Spezialglas OS, Hellma GmbH & Co., Müllheim/Baden) der Wandstärke 1 mm mit

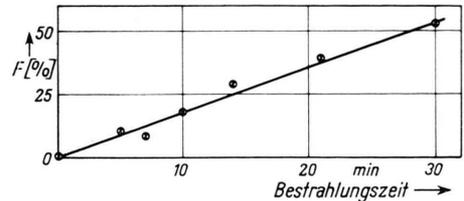


Abb. 2. Proteinschädigung F [nach Gl. (2)] von β -Lactoglobulin-Lösungen, p_H 7, 0,2-proz., in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer ($\lambda > 265 m\mu$), Werte aus Tab. 3.

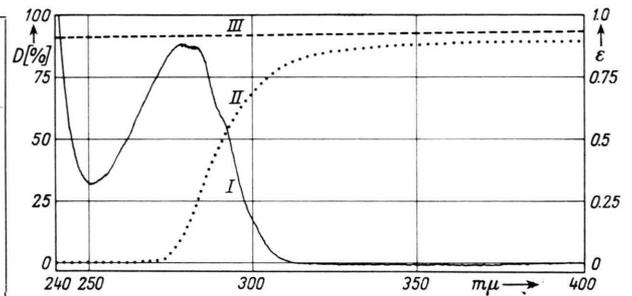


Abb. 3. UV-Absorptionsspektrum von β -Lactoglobulin und Durchlässigkeiten verschiedener Küvettenfenster. Kurve I: Extinktion ϵ von 0,1-proz. β -Lactoglobulin in Phosphatpuffer, p_H 7, 1 cm Schichtdicke gegen Phosphatpuffer p_H 7 gemessen, Aufnahme des Cary 14. Kurve II: Durchlässigkeit D von Spezialglas OS, Hellma, 1 mm Schichtdicke, Kurve III: Durchlässigkeit D von Suprasil, Heraeus, 1 mm Schichtdicke.

Licht einer Quecksilber-Hochdruckdampfampe bestrahlt. Wie die Abb. 3 zeigt, ist OS-Glas dieser Schichtdicke nur für UV-Licht mit Wellenlängen größer als 260 $m\mu$ durchlässig. Führt man den Versuch in Quarzküvetten (Suprasil, Heraeus Quarzschmelze GmbH, Hanau) durch, die schon für UV-Licht der Wellenlängen größer als 170 $m\mu$ durchlässig sind (Abb. 3), so wird dem Effekt der Bestrahlung in der langwelligeren UV-Absorptionsbande des β -Lactoglobulins ein Effekt überlagert, der sich durch einen stärkeren Anstieg der Streulichtintensität in den ersten 15 Min. nach dem Aufheizen der Lösungen bemerkbar macht. Darauf soll im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden.

c) Effekt von UV-Licht, 366 $m\mu$, und 3,4-Benzpyren

Wie aus der Abb. 3 zu entnehmen ist, absorbiert β -Lactoglobulin in wäßriger Lösung kein UV-Licht der Wellenlängen größer als 315 $m\mu$. Dementsprechend wird auch nach bis zu 15-stgd. Bestrahlung

der Lösungen mit Licht der Wellenlänge $366\text{ m}\mu$ in zu den Bestrahlungsdosen der Versuche in Tab. 3 vergleichbarer Intensität keine Veränderung der Streulichtintensitäts-Kurve bei der Hitzedenaturierung des Proteins (Kurve I, Abb. 1) beobachtet.

Auch bei Gegenwart von 3.4-Benzpyren in einer Konzentration von ca. 2 Mol-%, bezogen auf β -Lactoglobulin (s. Tab. 2), wird der Streulichtintensitäts-Verlauf bei der Hitzedenaturierung des Proteins nach längerer $366\text{ m}\mu$ -Bestrahlung (bis zum praktisch vollständigen Verschwinden der 3.4-Benzpyrenfluoreszenz, s. Kap. III) im Rahmen der Meßgenauigkeit, die in F (s. Gl. 2) 3 bis 5% beträgt, nicht beeinflusst, wenn die Lösungen vor der Bestrahlung sorgfältig durch Zentrifugation von überschüssigen suspendierten Kohlenwasserstoffpartikeln befreit worden sind.

Ein 3.4-Benzpyrenmolekül kann also vor seinem Verschwinden nur mit einem oder höchstens zwei β -Lactoglobulinmolekülen reagiert haben, wenn überhaupt eine Reaktion mit dem Protein stattfindet

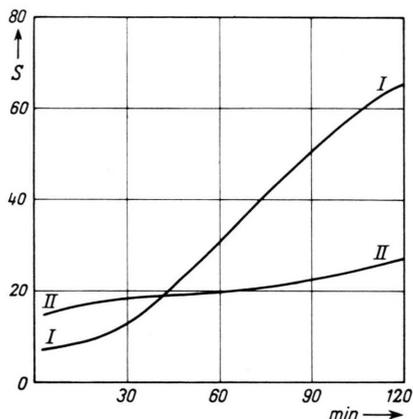


Abb. 4. Änderung des Aggregationsverlaufs von β -Lactoglobulin-Lösungen, pH 7, bei 80°C nach Behandlung mit 3.4-Benzpyren und UV-Licht der Wellenlänge $366\text{ m}\mu$. S: 90° -Streulichtintensität. min: Dauer der Erhitzung auf 80°C in Minuten. Kurve I: 0,2-proz. β -Lactoglobulin in Phosphatpuffer pH 7, nativ. Kurve II: Wie I mit Suspension von 3.4-Benzpyren 7 Stdn. mit Licht der Wellenlänge $366\text{ m}\mu$ (im Fluoreszenzzusatz ZFM 4, Zeiss) bestrahlt und anschließend bis zur vollständigen Entfernung der überschüssigen Kohlenwasserstoffsuspension abwechselnd zentrifugiert (15 000 Touren) und dekantiert.

¹⁴ G. RESKE, Arzneimittel-Forsch. **13**, 913 [1963].

* Anm. b. d. Korr.: Die für den gleichen Effekt ausreichende Menge 3.4-Benzpyren wird erst bei etwa 20-facher Gleichgewichtskonzentration in phosphatgepufferten 0,2-proz. β -Lactoglobulin-Lösungen (s. Tab. 2), das sind ca. $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, erreicht. Zigarettenrauch ist also ungefähr 2000-mal wirksamer als die darin enthaltene Menge 3.4-Benzpyren.

und die Reaktion auch nach diesem Verfahren beobachtet werden kann. Daß beides der Fall ist, zeigt der folgende Versuch: Bestrahlt man nämlich vor dem Entfernen der überschüssigen Suspension längere Zeit (etwa 7 Stdn.) mit der gleichen Intensität unter häufigem Umschütteln, so daß sich das Lösungsgleichgewicht des Kohlenwasserstoffs gleichzeitig mit seiner Zerstörung bei der Photoreaktion ständig durch Solubilisation aus den suspendierten Partikeln neu einstellen kann, dann erhält man bei der Denaturierung des Proteins Streulichtintensitäts-Verläufe nach Art der Kurve 2 in Abb. 4 mit Proteinschädigungen F zwischen 30 und 50 Prozent. Die Werte schwanken in einem relativ großen Bereich wegen der schlecht reproduzierbaren Suspensions-eigenschaften.

Durch Schütteln mit 3.4-Benzpyrensuspension ohne gleichzeitige Bestrahlung wird dieser Effekt nicht hervorgerufen.

Wie an anderer Stelle¹⁴ berichtet wurde, ist die gleiche Veränderung des Aggregationsverlaufs nach Behandlung von β -Lactoglobulin-Lösungen mit Zigarettenrauch zu beobachten. Diese Wirkung ist sicher nicht auf das im Tabakrauchkondensat enthaltene 1 ppm-3.4-Benzpyren zurückzuführen. Denn eine Proteinschädigung F in der Größenordnung 50% wird bereits bei einer Rauchdosierung erreicht, bei der die dadurch in die Lösung eingebrachte Menge 3.4-Benzpyren die Konzentration $1 \cdot 10^{-8}$ Mol/l nicht übersteigt*.

Wegen der Ähnlichkeit der Effekte von UV-Licht der $280\text{ m}\mu$ -Bande allein und des nur bei Gegenwart von 3.4-Benzpyren beobachteten Effektes von UV-Licht der Wellenlänge $366\text{ m}\mu$ ist wahrscheinlich, daß das 3.4-Benzpyren die Rolle der aromatischen Aminosäuren des Proteins bei der Primärabsorption des UV-Lichts übernimmt.

III. SH-Titrationen

Von verschiedenen Autoren (s. z. B.: STAUFF und ÜHLEIN¹¹, STAUFF, BARTHEL, JAENICKE, KREKEL und ÜHLEIN¹²) wird die Beteiligung eines SH-Mechanismus nach der Gleichung



DRUCKREY und SCHILDBACH haben durch vergleichende Tier-versuchsserien gezeigt, daß der Anteil von 3.4-Benzpyren an der carcinogenen Wirkung von Tabakrauchkondensat kleiner als ein Prozent ist. Das β -Lactoglobulin-Modell scheint demnach auch im Falle des Zigarettenrauchs die Reaktionen in vivo gut zu repräsentieren.

³⁷ H. DRUCKREY u. A. SCHILDBACH, Z. Krebsforsch. **65**, 465 [1963].

an der Hitzeaggregation von β -Lactoglobulin im p_{H} -Bereich oberhalb des isoelektrischen Punktes diskutiert.

Deshalb erschien es zweckmäßig, den durch die Ergebnisse der β -Lactoglobulin-Hitzeaggregations-Versuche gegebenen, indirekten Hinweis auf einen Umsatz der Protein-SH-Gruppen bei der 3.4-Benzpyren-Lichtreaktion durch vergleichende SH-Bestimmungen behandelter und unbehandelter Proteinlösungen zu überprüfen.

Der SH-Gehalt der Proteinlösungen — neben β -Lactoglobulin wurde auch Rinderserumalbumin untersucht — wurde mit Silbernitrat in Tris-Puffer p_{H} 7 wie in einer Arbeit von STAUFF, JAENICKE und WOLF¹⁵ nach der Methode von BENESCH, LARDY und BENESCH¹⁶ amperometrisch mit Hilfe einer rotierenden Pt-Elektrode bestimmt. Die Strom-Zeit-Kurven wurden von einem Nanoamperemeter (KNICK) verstärkt und von einem Kompensationsschreiber (SARGENT) direkt aufgezeichnet, so daß aus dem Diagramm nach Eichung mit SH-Glutathion der Gehalt an titrierbaren SH-Gruppen direkt abgelesen werden konnte.

Die für β -Lactoglobulin in einer Literatur angegebenen Werte schwanken zwischen 4 SH-Gruppen pro Molekül (Mol.-Gew. 35 500) nach der Bausteinanalyse von BRAND et al.¹⁷ und zwei SH-Gruppen pro Molekül auf Grund titrimetrischer Bestimmungen des denaturierten Proteins. So erhielten z. B. KLOTZ et al.¹⁸ durch amperometrische Titration mit Ag^{\oplus} in Gegenwart von 8-*m*. Harnstoff etwas mehr

als 2 SH-Gruppen pro Molekül. Übereinstimmend wird von allen Autoren angegeben, daß im nativen Protein die SH-Gruppen maskiert sind.

Wegen der nicht übereinstimmenden Ergebnisse der Titrations und der Bausteinanalyse wurden von uns Titrations nicht nur nach Harnstoff- und Hitze-denaturierung (5 Stdn. bei 80 °C unter N_2 -Atmosphäre), sondern auch nach 44-stdg. Hydrolyse des Proteins bei 90 °C unter N_2 -Atmosphäre in 5-*n*. NaOH durchgeführt.

Für das native Protein erhielten auch wir nicht mehr als 0,1 SH-Gruppen pro Molekül.

Die SH-Titrationsergebnisse in Abhängigkeit von der 3.4-Benzpyren-Licht-Wirkung sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Wie die Werte in Spalte 3 zeigen, nimmt die Zahl der im hitzedenaturierten Zustand titrierbaren SH-Gruppen von β -Lactoglobulin bei 7-stdg. Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 366 $m\mu$ in Kontakt mit festem 3.4-Benzpyren

um 30 bis 50% ab.

Dieses Ergebnis steht in quantitativer Übereinstimmung mit der Proteinschädigung

F von 30 bis 50% [s. Gl. (2)],

die nach der gleichen Vorbehandlung im Hitzeaggregations-Verhalten von β -Lactoglobulin beobachtet wird (s. o.).

Die Abnahme der Zahl der im nativen Zustand titrierbaren SH-Gruppen von Rinderserumalbumin ist bei gleicher Dosierung von Kohlenwasserstoff-

| Protein | Zustand bei der Titration | Mole SH-Gruppen pro Mol Protein | | |
|---|---------------------------|---------------------------------|--|--|
| | | nativ | hydrolysiert 5- <i>n</i> .NaOH, 90°C, 44 Stdn. unter N_2 -Atmosphäre | denaturiert 80°C, 5 Stdn. unter N_2 -Atmosphäre |
| β -Lactoglobulin (Pentex) | | 0,1 | 2,7 bis 3,1 | 1,4 bis 1,5 |
| β -Lactoglobulin (Pentex), 7 Stdn. bestrahlt, 366 $m\mu$, mit 3.4-Benzpyrensuspension unter häufigem Umschütteln | | — | — | 0,8 bis 1,0 (Denaturierung nach Bestrahlung) |
| Rinderserumalbumin (Behringwerke) | | 0,78 | — | — |
| Rinderserumalbumin (Behringwerke) 7 Stdn. bestrahlt, 366 $m\mu$ mit 3.4-Benzpyrensuspension unter häufigem Umschütteln | | 0,3—0,35 | — | — |

Tab. 4. Ergebnisse der SH-Titrations.

¹⁵ J. STAUFF, R. JAENICKE u. H. WOLF, Z. Naturforschg. **18b**, 618 [1963].

¹⁶ R. E. BENESCH, H. A. LARDY u. R. BENESCH, J. biol. Chemistry **216**, 663 [1955].

¹⁷ E. BRAND, L. J. SAIDEL, W. H. GOLDWATER, B. KASSELL u. F. J. RYAN, J. Amer. chem. Soc. **67**, 1524 [1945].

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

Suspension und Belichtung mit
60%

von der gleichen Größenordnung (Tab. 4, Spalte 1).

Durch 7-stdg. Bestrahlung der Proteinlösungen mit Licht der Wellenlänge $366\text{ m}\mu$ ohne 3.4-Benzpyren werden die SH-Werte – in Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei der Hitzedenaturierung von β -Lactoglobulin-Lösungen (s. Kap. II c) – nicht beeinflusst.

Wenn nach der 3.4-Benzpyren-Lichtbehandlung die β -Lactoglobulin-Lösungen in 5,6-m. Harnstoff gebracht und anschließend titriert werden, so unterscheiden sich die titrierten Werte nicht signifikant von denen, die in unbehandelten Lösungen in 5,6-m. Harnstoff bestimmt werden. Wahrscheinlich reagiert das Photoreaktionsprodukt des Kohlenwasserstoffs selbst mit Ag^\oplus , wodurch die Verminderung der Zahl der SH-Gruppen im Ergebnis der Titration kompensiert wird. Diese Erklärung ist naheliegend, weil das 3.4-Benzpyren-Photoaddukt ebenso wie der Kohlenwasserstoff (s. Kap. IV b) bei der Harnstoffdenaturierung aus seinem Solvationszustand freigesetzt werden dürfte und dann für Ag^\oplus reaktionsfähig sein kann. Da bei der Hitzedenaturierung des Proteins die Solvation des Kohlenwasserstoffs nur geringfügig vermindert wird (s. Kap. IV a) und auch hier das gleiche für das Photoaddukt gelten dürfte, ist es folgerichtig, daß nach Hitzedenaturierung die SH-Titration durch das Photoprodukt des Kohlenwasserstoffs nicht gestört wird.

Die Ergebnisse der SH-Titrationen von hydrolysiertem β -Lactoglobulin schwanken wegen der dort schlecht ausgeprägten Knickpunkte der Titrationskurven wesentlich stärker als die des denaturierten Proteins. Daß diese Einschränkungen die Ergebnisse offenbar nicht wertlos machen, zeigen die anschließend beschriebenen kinetischen Untersuchungen der Photoreaktion selbst. Nur muß wegen der möglichen Zweifel an der SH-Spezifität der Ag^\oplus -Titration auch noch mit der Beteiligung anderer reduzierend wirkender Gruppen des Proteins an der 3.4-Benzpyren-Photoreaktion gerechnet werden.

IV. Kinetische Untersuchung der 3.4-Benzpyren-Lichtreaktion

a) Einfluß des Proteins und seines Zustandes

Der spektrale Verlauf des Fluoreszenzlichts und halbquantitative Beobachtungen der Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit von 3.4-Benzpyren in β -Lactoglobulin-Lösungen deuten darauf hin, daß

die Löslichkeit des Kohlenwasserstoffs in den Proteinlösungen durch hydrophobe Bereiche im Proteinmolekül verursacht wird (vgl. RESKE und STAUFF²). Zwischen SH-Gehalt und 3.4-Benzpyrenlöslichkeit besteht hingegen keine Korrelation, wie ein Vergleich der molaren Löslichkeiten von 3.4-Benzpyren in β -Lactoglobulin und Rinderserumalbumin (s. Tab. 1) mit den SH-Titrationsergebnissen in Tab. 4 zeigt.

Es ist möglich, daß die durch die Hitzeaggregationsversuche und die SH-Titration nachgewiesene Beteiligung von Protein-SH-Gruppen an der Photoreaktion mit 3.4-Benzpyren sekundär ist. Es muß aber in Betracht gezogen werden, daß, wie nun gezeigt werden soll, eine einfache Beziehung zwischen dem SH-Gehalt der beteiligten Proteine und der Geschwindigkeit der 3.4-Benzpyren-Photoreaktion besteht.

Wie früher mitgeteilt wurde (RESKE und STAUFF³), nimmt bei Bestrahlung wäßriger 3.4-Benzpyren- β -Lactoglobulin-Lösungen mit Licht der Wellenlänge $366\text{ m}\mu$ nur in Anwesenheit von (Luft-)Sauerstoff die Fluoreszenz des Kohlenwasserstoffs nach einem Zeitgesetz der ersten Ordnung mit der Bestrahlungsdauer ab. Diese Beobachtung liefert wegen der leichten Ausführung von Fluoreszenzmessungen die Grundlage für eine bequeme Methode zum Studium des Einflusses der Proteineigenschaften auf die 3.4-Benzpyren-Photoreaktion.

In Tab. 5 sind die Ergebnisse einiger Versuche mit nativem und denaturiertem β -Lactoglobulin und Rinderserumalbumin zusammengestellt. Die Hitzedenaturierungen wurden jeweils nach der Solvation des Kohlenwasserstoffs und vollständiger Entfernung der überschüssigen Suspension durch Zentrifugation vorgenommen. Die sonstigen Versuchsbedingungen und die verwendeten Geräte wurden früher (RESKE und STAUFF³) beschrieben.

Die relativen Anfangsintensitäten I der Fluoreszenz bei $410\text{ m}\mu$ schwankten bei den hier zusammengestellten Versuchen mit nativem β -Lactoglobulin in Phosphat- oder Trispuffer, $p_{\text{H}} 7$, zwischen 28 und 110 ($I = 100$ entspricht $2,5 \cdot 10^{-6}$ Mol 3.4-Benzpyren/l, s. Tab. 2). In diesem Bereich wurde kein Gang der Halbwertszeit-Schwankungen mit der Anfangsintensität beobachtet.

Nach der Hitzedenaturierung wurde im allgemeinen eine Abnahme der Anfangsintensität von nicht mehr als 15% beobachtet. Wesentlich verschieden sind die Verhältnisse in Harnstoffdenaturierten

| 3.4-Benzopyren solubilisiert in (Tris- und Phosphatpuffer, pH 7) | Halbwertszeit t_h * [min] | Gesamt-SH-Gehalt Z_0 (SH-Gruppen pro Molekül) | davon „konfiguratativ nativ“ Z_m SH-Gruppen | $Z_m \cdot t_h$ |
|--|--------------------------------|--|--|-----------------|
| β -Lactoglobulin nativ 0,2% | 36 | 3,1 | 3,1 | 112 |
| β -Lactoglobulin 0,2% 5 Stdn. bei 80 °C denaturiert unter Stickstoff | 75 60** 90*** | 3,1 | 1,6 | 120 |
| Rinderserumalbumin, nativ 0,2% | 162 | 0,78 | 0,78 | 126 |

Tab. 5. Halbwertszeiten der Abnahme der Fluoreszenzlicht-Intensität von 3.4-Benzopyren in wäßrigen Proteinlösungen bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 366 $m\mu$, bei Luftzutritt (unter Stickstoff erhält man in Proteinlösungen ebenso wie auch unter Luftzutritt in Lösungen des Kohlenwasserstoffs in Äthanol oder in Coffeinlösungen durch Extrapolation von über 90 min erstreckten Beobachtungen Halbwertszeiten zwischen 600 und 1400 Minuten). * Fehlergrenzen der Bestimmung: 10 bis 15 Prozent. ** 3 Stdn. bei 80 °C unter Stickstoff denaturiert. *** 5 Stdn. bei 80 °C mit Luftzutritt denaturiert; die SH-Titration dieser Proben ergab wegen Autoxydation nur 0,4 statt 1,5 SH-Gruppen pro Molekül (s. Tab. 4). Der höhere t_h -Wert ist wahrscheinlich durch teilweise Autoxydation auch maskierter SH-Gruppen bedingt.

β -Lactoglobulin-Lösungen hinsichtlich der Anfangsintensitäten und der Halbwertszeiten (s. Kap. IV b; s. auch Kap. III).

Für die Lösungen von 1.2-Benzopyren in β -Lactoglobulin-Lösungen und von 3.4-Benzopyren in γ -Globulin-Lösungen können keine exakten quantitativen Aussagen über das Verschwinden der Kohlenwasserstoff-Fluoreszenz bei Bestrahlung gemacht werden, weil in beiden Systemen die Fluoreszenzlicht-Ausbeuten so gering sind, daß sie bereits in der Größenordnung der Meßfehlerschwankungen liegen.

Wie Tab. 5, letzte Spalte, zeigt, ist die Halbwertszeit der Abnahme der 3.4-Benzopyrenfluoreszenz bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 366 $m\mu$ in den untersuchten Proteinlösungen mit überraschender Genauigkeit reziprok proportional zur Zahl der SH-Gruppen der beteiligten Proteine bei intakter Konfiguration. Dabei ist für der Gesamt-SH-Gehalt von β -Lactoglobulin der höchste Wert der SH-Titrationen hydrolysierten Proben eingesetzt. Unter der Annahme, daß die bei der Hitzedenaturierung nicht titrierbar gewordenen SH-Gruppen von β -Lactoglobulin, d. h. die Differenz der Zahl der SH-Gruppen hydrolysierten und hitzedenaturierter Lösungen, sich noch in einem, dem nativen mindestens ähnlichen, konformativen Verband befinden, gilt die Gesetzmäßigkeit mit der gleichen Genauigkeit auch für hitzedenaturiertes β -Lactoglobulin.

b) Einfluß von Zusätzen

1. Harnstoff

Von STAUFF und Mitarb.¹² wurde gezeigt, daß bei β -Lactoglobulin die nicht sehr signifikanten Änderungen des Helixanteils, soweit sie durch Bestimmung der Konstanten der Rotationsdispersion erfaßt

werden, bei Hitze- und Harnstoffdenaturierung nicht wesentlich voneinander verschieden sind. Da auch bei beiden Denaturierungs-Verfahren etwa die gleiche Zahl von SH-Gruppen freigesetzt wird, wurde zum Vergleich die 3.4-Benzopyren-Lichtreaktion mit β -Lactoglobulin auch in 5,6-m. Harnstofflösungen untersucht. Wie die Ergebnisse in Tab. 6 zeigen, herrschen in den konzentrierten Harnstofflösungen andere Verhältnisse. Je nach dem Zeitpunkt der Harnstoffzugabe beobachtet man eine Verminderung der Löslichkeit des Kohlenwasserstoffs um 60 bis 80 Prozent. Die vergleichsweise großen Halbwertszeiten der Photoreaktion sind nicht unabhängig von den Anfangsintensitäten.

| Reihenfolge der Operationen * | Anfangsintensität I (rel.)** | Halbwertszeit t_h [min] |
|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 1; 2 | 43 | 35 |
| 1; 2; 3 | 17 | 200 |
| 1; 3; 2 | 11 | 230 |
| 3; 1; 2 | 8 | 300 |

Tab. 6. Anfangsintensitäten und Halbwertszeiten der Fluoreszenz von 3.4-Benzopyren in Lösungen von β -Lactoglobulin, 0,2%, Trispuffer pH 7, 0,2-m., mit 5,6-m. Harnstoff bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 366 $m\mu$. * 1: Zugabe der Suspension von 3.4-Benzopyren zur Proteinlösung und Stehenlassen im Dunkeln mit häufigem Umschütteln (etwa alle 10 bis 15 min). 2. Zentrifugation in Stahlbechern bei 15 000 Touren bis zur vollständigen Entfernung der überschüssigen Suspension (etwa 4·20 min). 3: Zugabe von Harnstoff (3,4 g auf 10 ml Lösung). ** $I = 100$ entspricht $2,5 \cdot 10^{-6}$ Mol 3.4-Benzopyren/Liter.

Kürzlich wurde auf Grund von Modellversuchen von WETLAUFER, MALIK, STOLLER und COFFIN¹⁹ auf

¹⁹ D. B. WETLAUFER, S. K. MALIK, L. STOLLER u. R. L. COFFIN, J. Amer. chem. Soc. **86**, 508 [1964].

die Beteiligung nichtpolarer Gruppen (Aufhebung hydrophober Bindungen) an der Proteindenaturierung mit Harnstoff hingewiesen.

2. Cystein und Dihydro- α -Lipo(i)nsäure (Reduzierte Thioctsäure)

Wegen der beobachteten Beteiligung von Protein-SH-Gruppen an der 3.4-Benzpyren-Protein-Photoreaktion erschien es interessant, den Einfluß von SH-Substanzen wie Cystein und Dihydro- α -Liponsäure in verschiedenen Konzentrationen auf die Kinetik der Photoreaktion zu untersuchen.

Zur Darstellung der reduzierten α -Liponsäure (DL-Verbindung) wurde die Disulfidverbindung (DL- α -Liponsäure der Fa. Carl Roth, Karlsruhe) in einer 4-proz. Lösung der gleichen Gewichtsmenge Natriumborhydrid in Wasser aufgelöst und die Lösung zur Zerstörung des überschüssigen NaBH_4 mit 2-n. HNO_3 und Trispuffer auf p_{H} 7 eingestellt. Die amperometrische Ag^{\ominus} -Kontrolltitration ergab dann stöchiometrische SH-Werte. In Abb. 5 ist eine Versuchsserie mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Cystein und Dihydro- α -Liponsäure dargestellt. Dort wurden jeweils 4 ml einer bis zur restlosen Entfernung überschüssiger Suspension zentrifugierten Lösung von 3.4-Benzpyren in 0,2-proz. Lösung von β -Lactoglobulin, p_{H} 7, mit je 1 ml Lösung von Dihydro- α -Liponsäure oder Cystein der entsprechenden Konzentration, p_{H} 7, zusammengegeben und die Mischungen anschließend bestrahlt. Wie aus Abb. 5, Kurven IV und V, zu entnehmen ist, gleicht in Lösungen von $1,5$ bis $2 \cdot 10^{-6}$ -m. solubilisiertem 3.4-Benzpyren in $4,5 \cdot 10^{-5}$ -m. β -Lactoglobulin (Trispuffer, p_{H} 7), denen $1,9 \cdot 10^{-2}$ -m. Dihydro- α -Liponsäure oder $3,3 \cdot 10^{-2}$ -m. Cystein zugesetzt ist, der Verlauf der Intensität des 3.4-Benzpyren-Fluoreszenzlichts dem, wie er bei völligem Sauerstoffausschluß beobachtet wird. (Die O_2 -Konzentration in luftgesättigtem Wasser ist etwa $3 \cdot 10^{-4}$ -m. O_2 , umgerechnet nach Tabellenangabe, z. B. Landolt-Börnstein.)

Die Kurven IV und V in Abb. 5 zeigen ferner, daß die Anfangsintensität der 3.4-Benzpyrenfluoreszenz durch Dihydro- α -Liponsäure wesentlich stärker herabgesetzt wird als durch Cystein. Der vergleichsweise schwache Effekt von Cystein ist überdies im Gegensatz zum Effekt der Dihydro- α -Liponsäure nicht einwandfrei reproduzierbar. Andere Versuche ergaben bei gleichen Konzentrationen für Cystein keinen Unterschied zur Blindlösung, während für

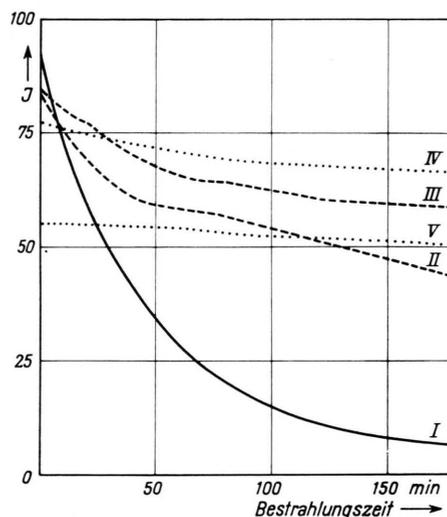


Abb. 5. Fluoreszenzverlauf bestrahlter 3.4-Benzpyren- β -Lactoglobulin-Lösungen mit verschiedenen Zusätzen von SH-Verbindungen. Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $366 \text{ m}\mu$, Versuchsanordnung nach RESKE und STAUFF³. J: Intensität des Fluoreszenzlichts der Wellenlänge $410 \text{ m}\mu$, $J = 100$ entspricht $2,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l 3.4-Benzpyren. Kurve I: 0,16-proz. β -Lactoglobulin ($4,5 \cdot 10^{-3}$ -m.) in Trispuffer p_{H} 7, 0,2-molar. Kurve II: Wie I + 0,08-proz. Cystein ($6,6 \cdot 10^{-3}$ -m.). Kurve III: Wie I + 0,08-proz. Dihydro- α -Liponsäure ($3,8 \cdot 10^{-3}$ -m.). Kurve IV: Wie I + 0,4-proz. Cystein ($3,3 \cdot 10^{-2}$ -m.). Kurve V: Wie I + 0,4-proz. Dihydro- α -Liponsäure ($1,9 \cdot 10^{-2}$ -m.).

Dihydro- α -Liponsäure übereinstimmend 30 bis 40% Abnahme gefunden wurde. Dieser Unterschied dürfte durch die, verglichen mit der hydrophilen Aminosäure Cystein, partiell hydrophoben Eigenschaften der Dihydro- α -Liponsäure begründet sein. Während die Abnahme der Löslichkeit von 3.4-Benzpyren in β -Lactoglobulin-Lösungen bei Zusatz von Harnstoff wahrscheinlich durch die Zerstörung der solvatisierenden Bereiche des Proteins bei der Harnstoffdenaturierung verursacht wird, wird die gleiche Wirkung der Dihydro- α -Liponsäure eher durch eine Konkurrenz mit dem Kohlenwasserstoff um diese Bereiche zu erklären sein.

Diskussion der Ergebnisse

Nach verschiedenen Verfahren ist gezeigt worden, daß in Lösungen von 3.4-Benzpyren in wäßrigen β -Lactoglobulin- und Rinderserumalbumin-Lösungen durch Bestrahlung im Absorptions-Maximum des Kohlenwasserstoffs bei $366 \text{ m}\mu$ nur bei Anwesenheit von Sauerstoff (trotz fehlender O_2 -Löschung der Kohlenwasserstoff-Fluoreszenz) gleichzeitig der Kohlenwasserstoff zerstört und die Proteine angegriffen werden.

Die durch Lichtstreuungs-Messungen beobachteten Veränderungen der Eigenschaften von β -Lactoglobulin nach der 3.4-Benzpyren-Photoreaktion sind die gleichen wie bei Bestrahlung des Proteins im Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren (280 m μ) oder bei Behandlung mit Zigarettenrauch (RESKE¹⁴), dessen Wirkung jedoch nicht auf die geringe darin enthaltene Menge 3.4-Benzpyren zurückzuführen ist.

Die Beobachtung, daß Protein-SH-Gruppen nur bei Erfüllung bestimmter konfigurativer Nebenbedingungen, über die noch keine Aussage gemacht werden kann, an der photodynamischen Reaktion von 3.4-Benzpyren beteiligt sind, ist möglicherweise geeignet, sowohl die nicht vollständige Übereinstimmung von photodynamischer und carcinogener Wirkung bei verschiedenen Agentien (vgl. SANTAMARIA⁵) als auch die Widersprüche der von vielen Autoren (vgl. RONDONI²⁰, CRABTREE^{21, 22}, CALCUTT^{23, 24}, GRAFFI und HEINE²⁵, MILLS und WOOD²⁶, WOOD und KRAYNAK²⁷, SCHULTZE²⁸, SCHOENTAL²⁹, BOYLAND, NERY, PEGGIE und WILLIAMS³⁰) diskutierten SH-Theorie der Carcinogenese zu erklären. Es genügt dann die Annahme, daß nur ein Teil aller möglichen photodynamischen oder SH-Reaktionen schließlich zur Krebsentstehung führen.

Die fehlende carcinogene Aktivität typischer SH-Blocker, wie z. B. Jodacetamid, wird dadurch ebenso zwanglos erklärt wie die negativen Resultate — soweit sie durch das Ausbleiben einer SH-Konkurrenzreaktion bedingt sind —, die GRAFFI und HEINE²⁵ bei der tierexperimentellen Untersuchung des Antagonismus zwischen carcinogenen Kohlenwasserstoffen und Cystein und Penicillamin erhielten.

Durch Sauerstoffausschluß mit Inertgas (N₂) (RESKE und STAUFF³) oder Zusatz von Cystein oder Dihydro- α -Liponsäure in ca. hundertfacher Molarität des gelösten Sauerstoffs wird die 3.4-Benzpyren-Protein-Lichtreaktion unterbunden.

Durch Dihydro- α -Liponsäure, nicht durch Cystein, wird neben der „virtuellen Anoxie“ eine Eliminierung des Kohlenwasserstoffs aus seinem Proteinsolvat verursacht.

Die Hemmung des photodynamischen Effekts durch SH-Substanzen oder andere reduzierende Stoffe, wie z. B. Ascorbinsäure, ist demnach — ebenso wie wahrscheinlich ein wesentlicher Teil der Strahlenschutzwirkung solcher Agentien — auf eine „virtuelle Anoxie“, d. h., eine Konkurrenzreaktion mit dem etwa via 3.4-Benzpyren angeregten Sauerstoff zurückzuführen und nicht auf einen kompetitiven Effekt mit den an der Reaktion beteiligten Protein-SH-Gruppen, da im letzteren Falle die Kohlenwasserstoff-Fluoreszenz rascher abnehmen müßte als in reinen Proteinlösungen. Der „Anoxie“-Mechanismus erklärt auch, daß der photodynamische Effekt auf Mitochondrien (SANTAMARIA⁵) oder die 3.4-Benzpyrencarcinogenese in der Mäusehaut (GRAFFI und HEINE²⁵) durch Cystein nicht gehemmt werden, da bei intakten Membranen der Zellen oder Zellorganellen natürlich ganz andere Verteilungsgewichte herrschen als in homogenen Lösungen.

Nach verschiedenen Autoren (MILLER et al.^{31, 32}, HEIDELBERGER et al.^{33, 34}, GREEN³⁵) unterscheidet sich die durch verschiedene carcinogene Stoffe induzierte Krebszelle von der normalen Zelle durch das Fehlen bestimmter spezifischer Proteine, der gleichen Proteine, an denen ein Angriff der eingesetzten carcinogenen Agentien in vivo beobachtet wird.

Auch im Lichte der Warburg'schen Arbeiten³⁶ erscheint es nicht unwahrscheinlich, daß alle Krebszellen durch einen spezifischen Proteinfekt oder mindestens ähnliche Proteinfekte charakterisiert sind.

Frl. KARIN HEIN und Frl. CHARLOTTE LANGER danken wir für technische Assistenz bei einem Teil der Arbeiten. Für einen Teil der für diese Arbeit benötigten Mittel danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

²⁰ P. RONDONI, Schweiz. med. Wschr. **78**, 419 [1948].

²¹ H. G. CRABTREE, Cancer Res. **4**, 688 [1944].

²² H. G. CRABTREE, Brit. J. Cancer **2**, 281 [1948].

²³ G. CALCUTT, Brit. J. Cancer **3**, 306 [1949].

²⁴ G. CALCUTT, Brit. J. Cancer **15**, 673 [1961].

²⁵ A. GRAFFI u. U. HEINE, Arch. Geschwulstforsch. **6**, 83 [1953].

²⁶ G. C. MILLS u. J. L. WOOD, Cancer Res. **13**, 69 [1953].

²⁷ J. L. WOOD u. M. E. KRAYNAK, Cancer Res. **13**, 358 [1953].

²⁸ G. SCHULTZE, Z. ges. exp. Med. **133**, 194 [1960].

²⁹ R. SCHOENTAL, Nature [London] **192**, 670 [1961].

³⁰ E. BOYLAND, R. NERY, K. S. PEGGIE u. K. WILLIAMS, Biochem. J. **89**, 113 P [1963]; E. BOYLAND, Z. Krebsforsch. **65**, 378 [1963].

³¹ E. C. MILLER u. J. A. MILLER, Cancer Res. **7**, 468 [1947].

³² E. C. MILLER, J. A. MILLER, R. W. SAPP u. G. M. WEBER, Cancer Res. **9**, 336 [1949].

³³ C. HEIDELBERGER, in: Ciba Foundation Symposium Carcinogenesis: Mechanisms of Action. Verlag Churchill, London 1959, S. 179.

³⁴ G. R. DAVENPORT, C. W. ABELL u. C. HEIDELBERGER, Cancer Res. **21**, 599 [1961].

³⁵ H. N. GREEN, Unio. int. Cancrum, Acta [Louvain] **17**, 215 [1961].

³⁶ O. WARBURG, Naturwissenschaften **42**, 401 [1955]; Science [Washington] **123**, 309 [1956].