

Über die Einwirkung von freien Sauerstoffradikalen auf Rinderserumalbumin in Lösung

Von J. STAUFF, R. JAENICKE und H. WOLF

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

(Z. Naturforschg. **18 b**, 618—630 [1963]; eingegangen am 28. März 1963)

In order to determine the influence of OH and O₂H-radicals on proteins, bovine serum albumin (BSA) in aqueous solution was treated with Fenton's reagent [Fe(II)SO₄+EDTA+H₂O₂] and with ultraviolet light ($\lambda > 2800 \text{ \AA}$) in the presence of H₂O₂. The action of free radicals produced in this way did not change the properties of the native protein with respect to the sedimentation in the ultracentrifuge or optical rotatory dispersion and electrophoresis under normal conditions. Ampèrometric titration indicated partial oxidation of SH-groups and of 3–5 SS-groups which are not reducible by NaBH₄.

Heat aggregation investigated by means of light-scattering was suppressed at p_{H} 7.5 and strongly accelerated at p_{H} 4.6 (range of coagulation), the latter being a result of increased entropy of activation of coagulation velocity.

The difference spectrum against native BSA had positive values of $\Delta\epsilon$ and two maxima at 2480 and 2950 Å.

Ultracentrifugation at room temperature in phosphate buffer (p_{H} 7.3, $\mu=0.18$) furnishes a molecular weight of 63 300. In a solution of 8 M urea and borate buffer (p_{H} 9, $\mu=0.05$) fragments with molecular weights between 25 000 and 37 000 were observed while in phosphate buffer (p_{H} 7.3, without urea) at temperatures higher than 46 °C an anomalous behaviour of the concentration gradient indicated an effect which possibly depends on a dissociation equilibrium.

As a consequence oxygen radicals seem to attack not only SH- and SS-groups but at least one covalent bond of the peptide chain. Some experiments of heat aggregation with BSA treated with γ -rays (⁶⁰Co) gave the same results as BSA treated with Fenton's reagent or UV-light+H₂O₂.

Die Reaktion von sauerstoffhaltigen Radikalen mit biologischen Substanzen wie Proteinen und Nucleinsäuren verdient nicht nur wegen der indirekten Wirkung ionisierender Strahlen auf lebende Organismen Beachtung, sondern auch wegen der Beobachtung (STAUFF und SCHMIDKUNZ¹), daß derartige Radikale im normalen Zellstoffwechsel in nicht zu vernachlässigenden Konzentrationen vorhanden sind. OH- und O₂H-Radikale erzeugen bei ihrer Rekombination in Lösung angeregte Zustände des Sauerstoffs, die sich in einer Chemilumineszenz äußert und mit empfindlichen Photomultipliern gut nachweisbar ist (STAUFF und Mitarb.^{2, 3, 4}). Solche Lichtemission läßt sich nicht nur in tierischen Organextrakten¹ oder bei einzelnen Enzymreaktionen (Xanthinoxidase⁵), sondern auch bei intakten Hefezellen nachweisen, die in einer Nährlösung aufgeschwemmt mit Sauerstoff behandelt werden⁶.

Wenn vielleicht auch in der Zelle gewisse Radikalkonzentrationen als normal angesehen werden können, ist nach den bisher gemachten Beobachtungen bei der Einwirkung ionisierender Strahlen ein Überangebot von Sauerstoffradikalen sicherlich destruktiv. Bei solchen Versuchen mag wohl nur ein Teil auf der Wirkung von Sauerstoffradikalen beruhen, ein anderer Teil kann auf direkte Trefferwirkungen zurückgeführt werden. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß die Radiolyse des Wassers zu H-Atomen und OH-Radikalen führt und je nach Vorhandensein gelöster Elektrolyte eine Reihe von Nebenreaktionen ausgelöst werden kann. Im Hinblick auf anomale Zustände der Zelle ist es von besonderem Interesse, das Verhalten von Proteinen gegenüber der Einwirkung sauerstoffhaltiger Radikale zu prüfen. Wenngleich Untersuchungen mit ionisierenden Strahlen schon in größerer Zahl gemacht worden

¹ J. STAUFF u. H. SCHMIDKUNZ, Z. phys. Chem. N. F. **33**, 273 [1962].

² J. STAUFF u. G. RÜMLER, Z. phys. Chem. N. F. **34**, 67 [1962].

³ J. STAUFF u. H. SCHMIDKUNZ, Z. phys. Chem. N. F. **35**, 295 [1962].

⁴ J. STAUFF u. H. SCHMIDKUNZ, Z. phys. Chem. N. F. **36**, 61 [1963].

⁵ J. STAUFF u. H. SCHMIDKUNZ, Nature [London] **198**, 281 [1963].

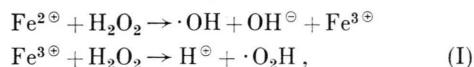
⁶ J. STAUFF u. G. RESKE, in Vorbereitung.

sind⁷, scheinen Ergebnisse zu fehlen, die an einem Modellprotein und einer anderen Quelle sauerstoffhaltiger Radikale erhalten worden sind. Aus diesem Grunde wurden Rinderserumalbumin (RSA) und in einigen Fällen Ribonuclease als Modelle gewählt, deren Veränderungen nach Behandlung mit sauerstoffhaltigen Radikalen untersucht wurden.

Methodik

Eine gewisse Schwierigkeit bereitet die Erzeugung der OH- und O₂H-Radikale ohne dabei das Protein anderweitig anzugreifen. Am bequemsten ist die photochemische Zersetzung von H₂O₂, da keine Nebenprodukte auftreten, doch überschneiden sich die Absorptionsbanden von H₂O₂ und Protein derart, daß fast immer – wie im Verlauf der Arbeit noch festgestellt werden konnte – eine Störung der Reaktionen auftritt, die sich an die Proteinabsorption anschließen. Günstiger schien es zu sein, auf die bekannte Methode der Erzeugung mit F e n t o n s chem Reagenz zurückzugreifen, das in der Form der Komplexverbindung mit Äthylendiamintetraacetat (EDTA) nach N O F R E und C I E R⁸ die beste Wirkung entfalten soll. Leider ist dieses System keine Quelle

einheitlicher Radikale. Es entwickelt sowohl OH als auch O₂H nach den Gleichungen



wobei die beiden Reaktionen mit verschiedenen Geschwindigkeiten ablaufen und auch zu verschiedenen Zeiten verschiedene Anteile an beiden Radikalarten produzieren. Abb. 1, die die Intensität der Chemilumineszenz der Reaktion I in Abhängigkeit von der Zeit darstellt, läßt den komplizierten Charakter der Reaktion erkennen. (Die Intensität der Lumineszenz ist dem Quadrat der Radikalkonzentration proportional³.)

Die Reaktionsfähigkeit der Radikale mit Protein läßt sich leicht mit der Chemilumineszenz-Methode prüfen. Die in Abb. 1 dargestellte Kurve entstand durch Zugabe einer geringen Menge gelösten RSA zu F e n t o n s Reagens an der mit dem Pfeil bezeichneten Stelle. Das sofortige Absinken der Intensität deutet auf eine sehr schnelle Reaktion der Radikale mit dem Protein hin.

Die nachfolgend beschriebenen Versuche hatten zunächst das Ziel festzustellen, welche bleibenden Veränderungen am Protein durch die Radikaleinwirkungen hervorgerufen werden.

Zum Nachweis geringfügiger Veränderungen bei Proteinmolekülen eignet sich die Bestimmung der Aggregations-Geschwindigkeit des Proteins beim Erwärmen, die sich durch fortlaufende zeitliche Registrierung ihrer Lichtstreuung in einer von uns entwickelten Apparatur⁹ leicht bestimmen ließ. Im Bereich großer Nettoladung (z. B. RSA bei p_H 7,5) aggregieren Proteine nur infolge einer zwischen freien SH- und SS-Gruppen zweier Moleküle stattfindenden Reaktion (vgl. dazu S T A U F F und Mitarb.¹⁰).

Die Aggregations-Geschwindigkeit wird ausschließlich durch die Zahl der vorhandenen freien SH-Gruppen bestimmt, geringfügige Abnahme der SH-Gruppen-Konzentration, die durch deren Oxydation, Blockierung und andere chemische Umwandlungen eingetreten sein können, werden sofort durch eine Abnahme der Aggregations-Geschwindigkeit

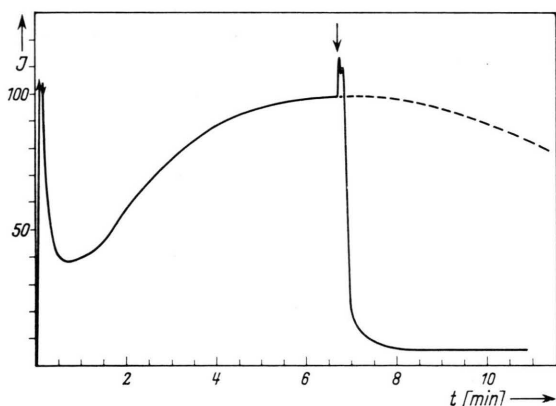


Abb. 1. Lumineszenz von F e n t o n s Reagens Fe(II)SO₄ + EDTA + H₂O₂ (15 ml), beim Pfeil = Zugabe von 3 ml RSA 0,33-prozentig.

⁷ Cystein: E. S. G. BARRON, Sympos. on Radiobiology, New York 1952, S. 216 ff.; W. W. DALE u. J. W. DAVIES, Biochem. J. 48, 129 [1951]; A. J. SWALLOW, J. chem. Soc. [London] 1952, 1334; E. S. G. BARRON u. P. JOHNSON, Arch. Biochem. Biophysics 48, 149 [1954]; L. ELDJARN, R. LANGE u. A. PIHL, Int. Rad. Biol. 1, 73 [1959]. — Cystin: A. KOCH, Symp. Information Theory London [1958] S. 283 ff. — Ribonuclease: E. COLLINSON, E. S. DAINTON u. B. HOLMES,

Nature [London] 165, 267 [1950]. — Globulin: E. A. PHELPS, K. E. NEET, L. T. LYNN u. F. W. PUTNAM, J. biol. Chemistry 236, 96 [1961]. — Fibrinogen: O. V. KIRSENKO, Ukrainian. Biochemical Journal 30, 103 [1958].

⁸ C. N O F R E u. A. C I E R, Bull. Soc. Chim. biol. 1959, 1523.

⁹ E. Ü H L E I N u. J. S T A U F F, Kolloid-Z. 142, 150 [1955].

¹⁰ J. S T A U F F, H. B A R T H E L, R. J A E N I C K E, R. K R E K E L u. E. Ü H L E I N, Kolloid-Z. 178, 128 [1961].

angezeigt (diese ist dem Quadrat der Zahl der vorhandenen SH-Gruppen proportional). Bei einer Reaktion der SH-Gruppen mit freien Sauerstoffradikalen sollte sich daher deren Veränderung durch Verminderung bzw. Ausbleiben der typischen SH- und SS-Aggregation bemerkbar machen.

Unspezifische Veränderungen, insbesondere solche der Tertiärstruktur können durch Bestimmung der Koagulations-Geschwindigkeit (bzw. der Koagulations-Temperatur) im isoelektrischen Bereich des Proteins erkannt werden. RSA wird zwischen p_H 4,3 und 5,8 bei Erhöhung der Temperatur auf etwa 47° instabil und beginnt langsam zu koagulieren. Die Lichtstreuungsmethode mißt nun bei einer Koagulation, die der 2. Reaktionsordnung gehorcht, die Änderung des Gewichtsmittelwertes des Partikelgewichts \bar{M}_w mit der Zeit. Theoretisch nimmt bei ungestörter Koagulation \bar{M}_w linear mit der Zeit zu (vgl. STAUFF¹¹); beim RSA wird diese Gesetzmäßigkeit tatsächlich beobachtet (vgl. Abb. 4). Es gilt:

$$\frac{1}{i_0 m_0} \frac{di}{dt} = \frac{1}{Z_0 M_0} \frac{d\bar{M}_w}{dt} = k_k \quad (1)$$

(i = Streuintensität, M_0 = Molgewicht des nativen RSA, Z_0 = Zahl der Partikeln vor Beginn der Koagulation, i_0 = Streuwert der nativen RSA-Lösung, m_0 = Molarität der RSA-Lösung, k_k = Geschwindigkeitskonstante der Koagulation). Da die Koagulations-Geschwindigkeit temperaturabhängig ist, kann k_k durch einen Ausdruck $k_k = A e^{-q/RT}$ (q = Aktivierungsenergie) ersetzt werden. Durch Veränderungen des Proteinmoleküls wird k_k beeinflusst. Bei Änderung der Nettoladung, etwa durch partielle Blockierung der NH_2 -Gruppen wird k_k erniedrigt, während eine Sprengung der SS-Gruppen k_k stark erhöht (vgl. JAENICKE und STAUFF¹²)*.

Im ersten Fall wird die Aktivierungsenergie q verändert, im zweiten die Größe A , welche nach der Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeit durch eine Aktivierungsentropie ausgedrückt werden kann. Letztere sollte also Aufschluß über etwaige Veränderungen der Tertiärstruktur des Moleküls soweit sie mit einer Entropieänderung einhergeht

(Aufspaltung, Auflockerung, Zunahme der Freiheitsgrade) geben können.

Die Methoden der Aggregations- und Koagulations-Geschwindigkeit sind dazu geeignet, schnell Aufschluß über Veränderungen von Proteinmolekülen zu erhalten, haben aber trotz großer Empfindlichkeit nur allgemeinen Aussagewert. Andere Methoden müssen herangezogen werden, um genaueres über spezielle Veränderungen durch die Radikaleinwirkung festzustellen. So wurden die Zahl der SH- und SS-Gruppen amperometrisch bestimmt (BENESCH, LARDY und BENESCH¹³, STAUFF und DUDEN¹⁴).

Messungen der Rotationsdispersionen sollten über mögliche Veränderungen der Helix-Struktur des Proteins Auskunft geben. Bestimmungen der Sedimentations-Konstante und des Diffusions-Koeffizienten unter normalen Bedingungen sollten Veränderungen des Mol.-Gew. oder der Proteingestalt feststellen. Die gleichen Versuche bei höherer Temperatur und nach Harnstoff-Denaturierung sollten Aussagen über die Primärstruktur d. h. etwaige Aufspaltungen covalenter Bindungen liefern. Schließlich wurde noch versucht, Änderungen der Ladungsdichte der Moleküle durch Hochspannungs-Elektrophorese zu bestimmen.

Um einen Vergleich zwischen den Modellversuchen am RSA und der Einwirkung ionisierender Strahlen zu erhalten, wurden auch die Aggregationsgeschwindigkeiten mit γ -Strahlen behandelte Proteinlösungen (⁶⁰Co) bestimmt.

Experimenteller Teil

Substanzen: Das verwendete Rinderserumalbumin, trocken, reinst, Operationsnummer 55, wurde von der Firma Behringwerke, Marburg, bezogen. RSA-Konzentrations-Bestimmungen wurden, soweit es nötig war, nach der Biuretmethode durchgeführt. Die anderen verwendeten Chemikalien waren PA-Qualitäten der Firma Merck, Darmstadt.

Lösungen: Die H_2O_2 -Lösungen wurden durch Verdünnung von Perhydrollösung (30-proz. H_2O_2) hergestellt.

Das Fenton-Reagens wurde folgendermaßen hergestellt: In wenig Phosphatpuffer p_H 7,5, $u=0,18$ wurde Dinatriumäthylendiamintetraacetat (EDTA) auf-

¹¹ J. STAUFF, Kolloidchemie, Berlin - Göttingen - Heidelberg 1960, S. 468 ff.

¹² R. JAENICKE u. J. STAUFF, Kolloid-Z. **178**, 143 [1961].

* Bei p_H 5 koaguliert natives RSA bei 50° mit noch meßbarer Geschwindigkeit, während oxydiertes RSA, das keine SS- und SH-Gruppen enthält und das die Struktur eines

statistischen Knäuels besitzt unter gleichen Bedingungen unmeßbar schnell ausfällt.

¹³ R. E. BENESCH, H. A. LARDY u. R. BENESCH, J. biol. Chemistry **216**, 663 [1955].

¹⁴ J. STAUFF u. R. DUDEN, Biochem. Z. **331**, 10 [1958].

gelöst, dann die berechnete Eisensalzmenge in Form von $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ zugegeben und mit Pufferlösung auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Die Pufferlösung war vorher durch Kochen unter Reinststickstoff bzw. durch zweistündiges Durchleiten eines Reinststickstoffstromes, der zur Entfernung der letzten Sauerstoffreste einen Meyer-Ronge-Turm passiert hatte, sauerstofffrei gemacht worden. Auch während des Ansetzens der Lösungen wurde dieser Reinststickstoff durchgeleitet. Die Lösungen wurden vor den Versuchen jeweils frisch angesetzt, da sie leicht oxydabel waren. In gleicher Weise wurden die in einigen Versuchen verwendeten Eisensalzlösungen mit Pyrophosphat und α, α' -Dipyridyl bzw. *o*-Phenantrolin hergestellt.

Die Proteinlösungen wurden durch Einwaage des RSA in Phosphatpuffer p_{H} 7,5 hergestellt.

Ausführung der Reaktion: Zur Reaktion wurde zunächst die RSA und die Eisen-Komplexlösung zusammengegeben. Die Proteinkonzentration betrug 0,25 bis 1%, die Eisensalzkonzentration $5 \cdot 10^{-5}$ – $7,5 \cdot 10^{-3} m$; die EDTA-Konzentration betrug das $1\frac{1}{2}$ - bis zweifache der Eisensalzkonzentration. Zu dieser Lösung wurde H_2O_2 in zwei- bis sechsfacher Menge der Eisensalzkonzentration zugegeben und 30 Min. bei Zimmertemperatur (teilweise bei 35°C) stehengelassen. Nach beendeter Reaktion wurde (wenn nicht besonders vermerkt) über 48 Stdn. erschöpfend gegen dest. Wasser oder Pufferlösung dialysiert.

UV-Photolyse von H_2O_2 : Die verschiedene Mengen H_2O_2 enthaltenden Proteinlösungen wurden in Glasküvetten (Carl Zeiss, Oberkochen) von 1 mm Wandstärke, die für Licht mit Wellenlängen unterhalb 280 nm völlig undurchlässig waren, mit dem ungefilterten Licht eines Quecksilberhochdruckbrenners (Typ St 75, Quarzlampengesellschaft Hanau) bestrahlt. Da H_2O_2 oberhalb von 320 nm nicht mehr absorbiert, war der photolytische Wirkungsbereich der Strahlung zwischen 280 und 320 nm anzusetzen. Die Küvetten befanden sich in einem auf $25 \pm 0,02$ temperierbaren Gestell.

Die Lösungen waren im allgemeinen mit Phosphat auf p_{H} 7,5 oder mit Acetat auf p_{H} 4,6 gepuffert; nur bei Versuchen für die SH- und SS-Bestimmung wurden ungepufferte Lösungen verwendet.

Bestimmung der SH-Gruppen: Der SH-Gehalt der nativen bestrahlten bzw. radikalbehandelten Proben wurde mit Silbernitrat in Tris-Puffer p_{H} 7,0 nach der Methode von BENESCH, LARDY und BENESCH¹³ ampèrometrisch mit Hilfe einer rotierenden Pt-Elektrode bestimmt. Die Strom-Zeit-Kurven wurden von einem Nanoampèremeter (Knick) verstärkt und von einem Kompensationsschreiber (Sargent) direkt aufgezeichnet, so daß aus dem Diagramm nach Eichung mit SH-Glutathion der Gehalt der Probe an titrierbaren SH-Gruppen direkt abgelesen werden konnte.

Bestimmung der SS-Gruppen: Die Zahl der Disulfidgruppen der Proben wurde nach der Methode von STAUFF und DUDEN¹⁴ durch Reduktion mit Natriumborhydrid und ampèrometrischer SH-Bestimmung nach dem erwähnten Verfahren bestimmt. Die Reduktions-

dauer betrug 45 Min., die Reduktionstemperaturen sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

Rotationsdispersion: Die Rotationsdispersion wurde mit dem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter (Anzeigenauigkeit $0,005^\circ$, Hersteller Carl Zeiss, Oberkochen) bestimmt. Die benutzten Wellenlängen 578, 546, 436, 404 und 365 nm.

Elektrophorese: Zur Untersuchung der Elektrophorese wurde ein Hochspannungs-Elektrophoresegerät (Typ Pherograph – Original – Frankfurt, Hersteller Hormuth und Vetter, Heidelberg) verwendet. Als Elektrophoresepapier wurde Typ 2214 (Hersteller Macherey, Nagel und Co., Düren) benutzt. Trägerpuffer: Phosphatpuffer p_{H} 7, $u=0,18$. Die Versuche liefen etwa 1,5–3 Stdn. bei 1150 V und 85 mA. Temperatur: -1°C . Entwickelt wurde mit einer konzentrierten Amidoschwarzlösung mit anschließender Eisessig/Methanol-Waschung (Verhältnis 1:9).

Lichtstreuung: Der Aggregations- bzw. Koagulationsverlauf der erwärmten RSA-Lösungen wurde durch die Registrierung ihrer Streulichtintensität ($\vartheta=90^\circ$) in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Normalerweise wurde die Messung in einer von ÜHLEIN und STAUFF⁹ beschriebenen, inzwischen modifizierten Apparatur ausgeführt. Sechs rechteckige Glasküvetten konnten gleichzeitig in einer heizbaren zylindrischen Metalltrommel auf 20 – 90° erhitzt werden. Durch eine Programmsteuerung wurde jede Küvette jeweils 1 Min. in den Strahlengang des Primärstrahls und in die damit gekuppelte Auffangoptik eines Photomultipliers (Typ EMI 6255 B) gebracht. Die 90° -Streulichtintensitäten wurden von einem Kompensationsschreiber (Hersteller Philips, Typ PR 2000 M/01) automatisch registriert. Die Lampe: St 75 (Hersteller Quarzlampengesellschaft Hanau), Lichtwellenlänge: 546 nm. Die Proben wurden bei etwa 15 000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge: Typ Pirouette, Hersteller Phywe).

Zur Untersuchung des Fe^{II} /EDTA-Einflusses bei Abwesenheit von H_2O_2 auf die Aggregation von erwärmten RSA-Lösungen mußte bei einigen Versuchen unter völligem Sauerstoffausschluß gearbeitet werden. Die Ausgangslösungen wurden in diesen Fällen unter Reinststickstoff angesetzt und in luftdicht verschlossenen Stahlbechern staubfrei zentrifugiert (Zentrifuge Supragyro, Hersteller Escher-Wyss). Die RSA- und Eisenlösungen wurden jeweils in einen Schenkel eines unter Reinststickstoff stehenden Zwei-Schenkel-Gefäßes in Form eines umgekehrten V gefüllt und unter völligem Luftausschluß gemischt. Sie wurden dann in eine luftdicht abgeschlossene Rundküvette gefüllt, die sich in einem temperierbaren zylindrischen Gefäß befand und in einer Lichtstreuungsapparatur (beschrieben bei JAENICKE und STAUFF¹²) eingesetzt werden konnte.

Ultrazentrifuge: Die Sedimentations- und Diffusionskonstanten wurden in einer Ultrazentrifuge vom Typ Spinco E bestimmt. Die Proben wurden zunächst gegen dest. H_2O (0°C), dann gegen Pufferlösung oder pufferhaltige Harnstofflösung (20°C) bis zur Gleichgewichtseinstellung (48 Stdn.) dialysiert. In allen Fällen wurde eine Übersichtungszelle (Kef F 3^o

Kapillar-Typ) benutzt. Zur Untersuchung in der Ultrazentrifuge bei höheren Temperaturen wurde die Zelle und der Rotor einige Std. im Wärmeschrank auf 2–4° oberhalb der eigentlichen Meßtemperatur vorgewärmt, ehe sie in die Ultrazentrifuge eingesetzt wurden. Die Meßtemperaturen stellten sich durch Abkühlen in der evakuierten Kammer der Ultrazentrifuge ein und wurden dann mit der Temperaturregelung (RTIC) auf der gewünschten Temperatur gehalten.

Die Sedimentationskonstanten wurden nach der Svedberg-Methode ($\log r$ vs. t) bestimmt und auf Wasser von 20° korrigiert. Die Diffusionskonstanten wurden nach der Maximalgradienten-Methode und der Flächenmethode aus den Überschichtungsdiagrammen ermittelt. Viskositäten und Dichten wurden experimentell gesondert bestimmt.

Ergebnisse

Wärmeaggregation

Bevor der eigentliche Radikaleinfluß auf das Aggregationsverhalten des RSA in der Wärme untersucht werden konnte, war es notwendig, den Einfluß der einzelnen Komponenten der Radikalquellen auf die Aggregation nachzuprüfen.

H₂O₂ allein mit RSA erwärmt verursachte bei p_H 7,5 und 4,6 eine Erhöhung der Aggregations-Geschwindigkeit im Verhältnis zum nativen Protein. Ebenso resultiert bei einer 20-minütigen UV-Bestrahlung ohne H₂O₂ einer RSA-Lösung (0,17-proz. bei p_H 4,6) eine Zunahme der Koagulations-Geschwindigkeit und bei p_H 7,5 eine schwache Erniedrigung der Aggregations-Geschwindigkeit.

Fe^{II}/EDTA mit RSA in 0,2-proz. Lösung beeinflusst unter völligem Sauerstoffausschluß bei p_H 7,5 und 70°C die Aggregations-Geschwindigkeit überhaupt nicht. Das komplex gebundene Eisen scheint somit nicht mit dem Protein zu reagieren*.

Aggregationsverlauf bei p_H 7,5 (SH-SS-Reaktion)

Die Erzeugung von sauerstoffhaltigen Radikalen sowohl durch UV-Photolyse des H₂O₂ als auch durch Zersetzung des H₂O₂ mit Eisenkomplexsalzen verursachte in jedem Fall eine Erniedrigung der Aggregations-Geschwindigkeit des RSA bei p_H 7,5 und 70°C. Aus den Abb. 2 und 3 ist zu ersehen, daß der Effekt von der Bestrahlungsdosis bzw. der verwendeten Eisenkomplexsalz-Konzentration abhängig ist,

somit auf die Einwirkung der erzeugten Radikale zurückgeführt werden kann.

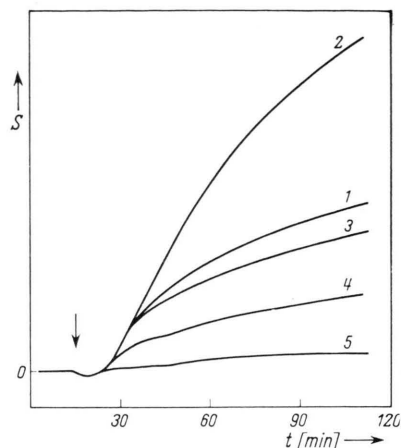


Abb. 2. Aggregationsverlauf nativer und uv-bestrahlter RSA-Lösungen bei p_H 7,5. S: Intensität der Lichtstreuung (Beobachtungswinkel: 90°) in willkürlichem Maßstab. Bei 0 Streuintensität der Lösungen bei 20°C. Pfeil: Erwärmen der Lösungen auf 70°C. Konz. d. RSA: 0,25%, Puffer: Phosphat p_H 7,5, $\mu=0,18$. Kurven 1: Natives RSA, 2: Zusatz von H₂O₂ (0,01-m.), 3: 15 min UV-Bestrahlung, 4: 15 min UV in Gegenwart von H₂O₂ (0,01-m.), 5: desgl. mit H₂O₂ (0,22-m.).

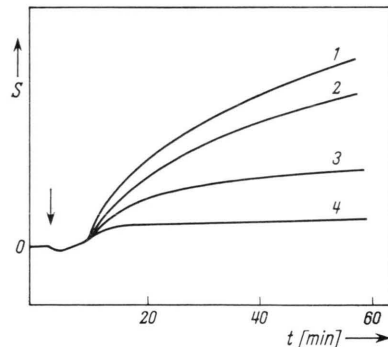


Abb. 3. Aggregationsverlauf nativer und mit Fentons Reagens behandelter RSA-Lösungen bei p_H 7,5. S: Intensität der Lichtstreuung, 0: Streuintensität bei 20°C, Pfeil: Erwärmen auf 70°C. Konz. d. RSA: 0,20%, Phosphatpuffer 7,5, $\mu=0,18$. Kurven 1: natives RSA in Gegenwart von Luft, 2: natives RSA in Gegenwart von Stickstoff, 3: 30 min Behandlung mit Fentons Reagens, Fe²⁺-Konz.: 0,001-m., H₂O₂: 0,005-m., 4: desgl., Fe²⁺-Konz.: $8 \cdot 10^{-5}$ -m., H₂O₂: $2 \cdot 10^{-4}$ -molar.

Im Sinne des zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus einer SH-SS-Reaktion bei der Aggregation bedeuten diese Ergebnisse, daß die SH-Gruppe des

* Da sich in der Fe²⁺-Lösung bei der Einwirkung von Luft-sauerstoff bei höherer Temperatur durch fuchsinschweflige Säure nachweisbare Mengen von Acetaldehyd bilden,

wurde befürchtet, dieser könnte mit dem Protein reagieren. Gesonderte Versuche mit Acetaldehyd zeigten jedoch, daß dies nicht der Fall war.

RSA durch die entwickelten OH- bzw. O₂H-Radikale oxydiert sein sollte, was auch durch die nachfolgend mitgeteilten Ergebnisse der SH-Titration bestätigt werden konnte.

Koagulations-Geschwindigkeit (p_H 4,6)

Abb. 4 zeigt die unterschiedlichen Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des H₂O₂ bei gleicher RSA-Konzentration (0,17%) und gleicher UV-Dosis (20 min) auf die Koagulations-Geschwindigkeit des Proteins bei verschiedenen Temperaturen (Einzelheiten s. Bildunterschrift). Bei mit Fenton-Reagens behandelten RSA-Proben setzte die Koagulation meistens bei 45° mit großer Geschwindigkeit ein; 2 Beispiele sind in Abb. 4 mit eingezeichnet.

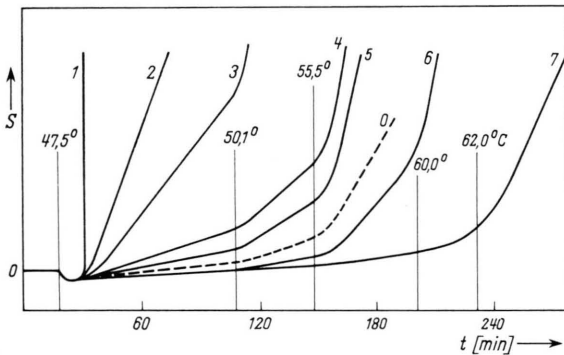


Abb. 4. Koagulationsverlauf von nativem und behandeltem RSA bei p_H 4,7 und bei verschiedenen Temperaturen. S: Streuintensität, O: Streuwert bei 20°C. Die Lösungen wurden an den Stellen senkrechter Linien auf die angesprochenen Temperaturen erwärmt.

Daß die Koagulations-Geschwindigkeit im isoelektrischen Bereich der RSA einer Gesetzmäßigkeit von der Form der Gl. (1) gehorcht, ist aus der Linearität der gewonnenen Werte zu erkennen. Aus der Neigung der Intensitäts-vs. Zeit-Geraden lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten k_k für verschiedene Temperaturen angeben. Nach der Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeiten (Transition State Theory, vgl. z. B. GLASSTONE, LAIDLER, EYRING¹⁵) lassen sich hieraus die Aktivierungsenthalpien ΔS^* nach der Gleichung

$$k_k = \frac{kT}{h} e^{\Delta S^*/R} e^{-\Delta H^*/RT} \quad (2)$$

berechnen. Aus den in der Tab. 1 zusammengestellten Ergebnissen ist zu ersehen, daß ΔH^* bei der Schädigung des Proteinmoleküls durch die Radikalreaktionen überhaupt nicht beeinflusst wird und etwa den gleichen Wert wie das native Protein besitzt. Hingegen steigt ΔS^* mit zunehmender Radikaleinwirkung deutlich an und ist formell für die erhebliche Zunahme der Koagulations-Geschwindigkeit des geschädigten Proteins gegenüber dem nativen verantwortlich.

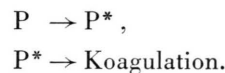
Versuch	Kurve Nr. auf Abb.	ΔH^*	ΔS^*	$\Delta(\Delta S^*)$	ΔF^*
RSA nativ	7	Kcal	122,5	—	Kcal*
RSA + UV (20 min)	6	64,2	125,5	3,0	26,8
RSA + UV + H ₂ O ₂	5	65,3	128,0	5,5	26,0
RSA + UV + H ₂ O ₂	4	62,5	129,0	6,5	25,8
RSA + UV + H ₂ O ₂	3	—	130,5	8,0	25,3
RSA + Fenton	2	—	—	9,2	—
RSA + Fenton	1	—	—	(> 20)	—
RSA + Fenton	0	—	—	3,4	—

* Mittelwert von ΔH^* aus insgesamt 10 Messungen einschließlich der in Tab. 1 angegebenen: 67,2 Kcal. Hieraus wurde ΔF^* berechnet.

Tab. 1. Enthalpie, Entropie und freie Energie der Aktivierung der Koagulations-Geschwindigkeit von behandeltem und unbehandeltem RSA.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse liegt im folgenden: Die Koagulation des Proteins im isoelektrischen Bereich ist eine Wirkung von zur Wasserstoffbrücken-Bildung fähigen Seitenketten des Peptids (JAENICKE und STAUFF¹²), die bei der Wärmedenaturierung des Proteins von ihrer gegenseitigen intramolekularen Bindung frei werden (vgl. dazu SCHERAGA¹⁶).

Die Reaktion läuft in 2 Stufen ab:



Im Zustand P sind die Wasserstoffbrücken-Bildner (Seitenketten) noch intramolekular abgesättigt, durch Denaturierung gelangen sie in den aktivierten

¹⁵ S. GLASSTONE, K. S. LAIDLER u. H. EYRING, The Theors of Rate Processes, New York 1941.

¹⁶ H. A. SCHERAGA, Protein Structure, New York, 1961.

Zustand P*, bei dem die bindungsfähigen Stellen zur Reaktion mit gleichartigen Stellen eines zweiten Proteinmoleküls freigeworden sind. Die eigentliche Koagulation besteht dann in der bimolekularen Weiterreaktion der „aktiven“ Proteinmoleküle.

Nach dem Modell von SCHERAGA¹⁶ bestimmt die Auflösung einer bestimmten Zahl von H-Brücken den Wert von ΔH^* und ΔS^* der Denaturierungsgeschwindigkeit. Wenn ΔH^* bei der Radikaleinwirkung unverändert bleibt, so wäre auch die Zahl der beim Erwärmen innerlich lösbaren Wasserstoffbrücken unverändert geblieben. Die Zunahme von ΔS^* mit stärker werdender Radikalschädigung kann dann nur bedeuten, daß ihnen mehr Anordnungsmöglichkeiten, d. h. größere Beweglichkeit zur Verfügung stehen muß als bei der Denaturierung des nativen Proteins. Es wäre daraus zu schließen, daß covalente Bindungen gelöst oder die Sekundärstruktur verändert worden sein sollten.

Zur Prüfung dieser Verhältnisse dienen die folgenden Untersuchungen:

Da das Verhalten von SH- und SS-Gruppen gegenüber OH- bzw. O₂H-Radikalen unter den beim RSA angewandten Bedingungen nicht bekannt war, wurden einige Modellversuche mit UV-Bestrahlung und H₂O₂ des SH- und SS-Glutathions gemacht. Insbesondere sollte ermittelt werden, ob die Gruppen zu SO₃H-Gruppen oxidiert werden oder nicht. Durch die Reaktion mit NaBH₄ kann das entschieden werden, da dieses alle oxidierten Stufen des Schwefels außer der Sulfonsäure reduziert¹³.

Es zeigte sich, daß SH-Glutathion durch UV-Bestrahlung (280–320 nm) angegriffen wurde, die Zahl der ampèrometrisch titrierbaren SH-Gruppen sank auf 70% der vorhandenen, nach Reduktion mit NaBH₄ stieg diese jedoch wieder auf 100 Prozent. In Gegenwart von H₂O₂ (10⁻²-m.) ergab sich nach Bestrahlung 28% und nach Reduktion 52%, woraus zu schließen ist, daß sich etwa 48% SO₃H-Gruppen gebildet haben. Aus SS-Glutathion entstanden nach 30 min UV-Bestrahlung SH-Gruppen in einer Menge von 13% des vorhandenen Schwefels. In Gegenwart von 10⁻²-m. H₂O₂ wurden unter gleichen Bedingungen keine SH-Gruppen beobachtet, doch fiel die Zahl der durch NaBH₄ reduzierbaren und als SH titrierbaren SS-Gruppen auf 36% entsprechend 64% SO₃H, letztere stieg bei 10⁻¹-m. H₂O₂ auf 89% und bei 1-m. H₂O₂ auf praktisch 100% an.

Damit ist erwiesen, daß die bei der UV-Photolyse des H₂O₂ entstehenden Radikale SH- und SS-Gruppen zu SO₃H-Gruppen zu oxydieren in der Lage sind.

SH-Gruppen Titration: Bei der Bestimmung des RSA (Probe: 0,4 g) wurde der zu erwartende Wert von 0,67 SH-Gruppen pro RSA-Molekül erhalten. Wurde die gleiche Probe 30 min der UV-

Bestrahlung ausgesetzt, erhöhte sich diese Zahl auf 1,42 SH-Gruppen pro Molekül. Die Bestrahlung der RSA-Lösung in Gegenwart von H₂O₂ ergab einen Wert von 0,13 SH-Gruppen pro Molekül.

Bei der Einwirkung von Fentons Reagens auf RSA wurde mit steigender Konzentration von H₂O₂ und Eisensalz eine allmähliche Abnahme der titrierbaren SH-Gruppen beobachtet; bei einer Konzentration des RSA von 0,4%, 4 mMol FeSO₄, 6 mMol EDTA und 8 mMol H₂O₂ waren keine SH-Gruppen mehr titrierbar.

SS-Gruppen-Bestimmung: Die Ergebnisse der SS-Gruppen-Bestimmung sind in Tab. 2 zusammengestellt. Als Reduktionsmittel dient in allen Versuchen NaBH₄.

Behandlung	Reaktionstemperatur [°C]	Reduktionstemperatur (NaBH ₄) [°C]	Zahl der reduzierbaren SS-Gruppen pro Molekül
—	—	25	2,2 ± 0,2
—	—	57	9,2 ± 0,6
UV (280 mm)	20	28	3,3 ± 0,2
UV + H ₂ O ₂	20	28	3,0 ± 0,2
UV	20	57	15,2 ± 0,7
UV + H ₂ O ₂	20	57	12,0 ± 0,6
Fenton-Rg.	35	57	12,5 ± 0,6

Tab. 2. Zahl der reduzierbaren Disulfid-Gruppen des RSA bei verschiedener Behandlung.

Von den im RSA vorhandenen 17 SS-Gruppen sind bei 25° nur wenige reduzierbar, da sie für BH₄-Ionen nicht zugänglich sind. Erst bei höherer Temperatur (57°) wird infolge Aufweitung der Struktur eine größere Zahl gefunden. UV-Bestrahlung und H₂O₂-Photolyse erhöhen auch die Zahl nicht wesentlich, wenn bei 28° reduziert wird. Anders bei 57°; UV-Bestrahlung allein bewirkt eine Zunahme von 9,2 auf 15,2. Dieses Ergebnis ist an sich überraschend, bedeutet es doch, daß die Absorption des Lichts von Wellenlängen >280 nm eine zunächst nicht erklärliche Veränderung des RSA-Moleküls hervorgerufen haben muß, die sich in einer größeren Quellbarkeit oder Entfaltbarkeit ändert; es können nun fast alle — bis auf zwei — SS-Gruppen durch BH₄[⊖] angegriffen werden.

Ob diese zwei letzten SS-Gruppen durch BH₄[⊖] nicht angreifbar sind, bei der UV-Absorption zerstört werden oder bei der Analysenmethode durch Nebenreaktion verloren gehen, ist zunächst nicht einwandfrei zu entscheiden. Nach ZAHN¹⁷ bildet sich bei Wollkeratin in

¹⁷ H. ZAHN, *Chimia* [Zürich] **15**, 378 [1961].

alkalischem Milieu mit SS-Gruppen spaltenden Reagenzien leicht Lanthionin unter gleichzeitiger Abspaltung von bis zu 4 Mol-% H_2O . Dabei tritt eine Bildung neuer Thioätherbrücken ein, die die Struktur verändert (Verfilzung). Es besteht somit die Möglichkeit, daß auch bei der Behandlung mit dem alkalischen $NaBH_4$ auch beim RSA zu einem Teil Thioäther gebildet werden. Hierauf weist vor allem der beim Ansäuern der alkalischen $RSA-NaBH_4$ -Lösung deutlich wahrnehmbare Geruch nach Schwefelwasserstoff hin.

Trotz dieser Möglichkeiten ist es vor allem nach den Beobachtungen von ENGELHARD und FROBEN¹⁸ am wahrscheinlichsten, daß zumindest eine SS-Gruppe bei der UV-Absorption zerstört und eine neue SH-Gruppe gebildet wird, die sich bei der SH-Bestimmung (s. oben) nachweisen läßt.

Eine signifikante Verminderung der maximal titrierbaren SS-Gruppenzahl von 15 um etwa 3 wie die letzten beiden Zeilen der Tab. 2 zeigen, verursacht die Behandlung des Proteins mit OH- bzw. O_2H -Radikalen.

Rotationsdispersion: Bei der Messung der Rotationsdispersion von nativem RSA wurde der zu erwartende Wert $\lambda_c = 267 \pm 1$ nm gefunden. 0,25-proz. RSA-Lösungen 30 min mit UV-Licht bei 20 °C bestrahlt, ergab einen Wert von 263 ± 1 nm, bei Gegenwart von H_2O_2 ergab sich unter den gleichen Bedingungen ein Wert von 257 ± 1 nm. Eine 0,5-proz. Lösung von RSA mit Fenton-Reagens nach der bereits beschriebenen Prozedur behandelt, lieferte einen Wert von 268 ± 1 nm. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Sekundärstruktur des RSA, soweit sie durch die Rotationsdispersion angezeigt wird, durch den Radikalangriff nur unwesentlich verändert worden sein kann.

Elektrophorese: Folgende Lösungen in Phosphatpuffer p_H 7,5, $\mu = 0,18$ wurden untersucht:

1. Natives RSA 0,5 Prozent.
2. RSA (1%) + $FeSO_4/EDTA + H_2O_2$ (2:1:1).
3. RSA (1%) + Puffer + H_2O_2 (2:1:1).
4. Natives RSA 0,5%, 2 Stdn. erwärmt auf 70 °C.
5. RSA (1%) + $FeSO_4/EDTA + H_2O_2$ (2:1:1), 2 Stdn. erwärmt auf 70 °C.
6. RSA (1%) + Puffer + H_2O_2 (2:1:1), 2 Stdn. erwärmt auf 70 °C.

Die Auswertung der entwickelten Pherogramme ergab, daß die Wanderungs-Geschwindigkeiten in den Versuchen 2, 3 und 5 die gleichen waren wie im

Versuch 1. Im Versuch 4 wurden entsprechend dem aggregierten Anteil des Proteins 2 andere Flecke erhalten. Das gleiche ergab sich beim Versuch 6. Bei Versuch 5, der ebenfalls erwärmt wurde, aber vorher einer Radikalbehandlung ausgesetzt worden war, zeigte sich der zweite Fleck nicht, was mit Aggregationsversuchen in der Lichtstreuungsapparatur übereinstimmt.

Ultrazentrifugation: Die Sedimentations-Analyse des mit Radikalen behandelten RSA bei Zimmertemperatur ergab eine starke Konzentrations-Abhängigkeit des Sedimentations-Koeffizienten, während sich der Diffusions-Koeffizient praktisch nicht in der Konzentration änderte. Der Sedimentations-Koeffizient $S_{20,w}$ gehorcht der Gleichung

$$S_{20,w} = S_{20,w}^0 (1 + K c_g)$$

mit den Werten $S_{20,w}^0 = 4,16$ Svedberg, $K = -0,687$, (c_g in g/100 ml).

Aus $S_{20,w}^0$ errechnete sich unter Verwendung eines Wertes von 0,734 (natives RSA) für das partielle spezifische Volumen ein Mol.-Gew. von $63\,300 \pm 2200$, das wahrscheinlich dem des nativen RSA (65400 ± 1000 STAUFF und JAENICKE¹⁹) entspricht.

Nach diesen Ergebnissen bleibt das Gewicht der Proteinpartikel nach der Radikaleinwirkung praktisch unverändert, ebenso kann sich die Gestalt nicht wesentlich geändert haben, da die Unterschiede zwischen dem Diffusionskoeffizienten des nativen Proteins ($6,29 \cdot 10^{-7}$)¹⁹ und dem behandelten ($6,13 \cdot 10^{-7}$) nur gering sind.

Eine Veränderung der Bindungsverhältnisse, insbesondere der covalenten Bindungen läßt sich hieraus nicht erkennen, da die räumliche Anordnung der Peptidkette durch Wasserstoffbrücken und hydrophobe Bindungen aufrechterhalten wird. Erst bei Aufhebung dieser Bindungen durch denaturierende Einflüsse wie Harnstoff oder Wärme sollte sich zeigen, ob die Reaktion der Sauerstoffradikale auch zur Bildung von Bruchstücken des Proteins geführt hat. Aus diesem Grunde wurden Sedimentations-Analysen des behandelten RSA in Gegenwart von 8-m. Harnstoff und bei Temperaturen zwischen 44 und 52 °C vorgenommen.

Lösungen des RSA wurden wie oben beschrieben in Gegenwart und in Abwesenheit von H_2O_2 mit UV bestrahlt und mit Fenton-schem Reagens behandelt. Nach Dialyse der Lösungen gegen reines

¹⁸ H. ENGELHARD u. F. W. FROBEN, Naturwissenschaften **48**, 668 [1961].

¹⁹ J. STAUFF u. R. JAENICKE, Kolloid-Z. **175**, 1 [1961].

Wasser wurde ein Teil von ihnen gegen 8-m. Harnstoff bis zur Gleichgewichtseinstellung dialysiert und in der Ultrazentrifuge bei Zimmertemperatur untersucht.

Dabei wurde folgendes gefunden

1. RSA, 40 min mit UV bestrahlt (kein H_2O_2), Harnstoff 8-m. Konz.: 0,342%. $p_H = 9,0$. Ionenstärke: 0,05 (Borat).

$$S_{20,w} = 2,13 \pm 0,02 \text{ S (44 770 UpM)}.$$

$$D_{20,w} = 3,76 \pm 0,018 \cdot 10^{-7} \text{ (Flächen-Methode)}.$$

Bei Annahme von $V_{sp} = 0,70$ wird ein scheinbares Mol.-Gew. M' von 62 500 gefunden. (Dies entspricht nicht dem wahren Mol.-Gew., da nicht auf Konzentration Null extrapoliert wurde.)

2. RSA, 40 min mit UV behandelt in Gegenwart von H_2O_2 (Harnstoff und Puffer wie unter 1). Konz.: 0,390 Prozent.

$$S_{20,w} = 1,25 \pm 0,02 \text{ S (44 770 UpM)}, D_{20,w} = 3,75 \cdot 10^{-7} \text{ (Flächen-Methode)}.$$

Mit $V_{sp} = 0,70$ ist $M' = 25 900$.

3. RSA, mit Fentons Reagens behandelt (Harnstoff und Puffer wie unter 1). Konz.: 0,423 Prozent.

$$S_{20,w} = 1,85 \pm 0,02 \text{ S. } D_{20,w} = 5,54 \pm 0,08 \cdot 10^{-7} \text{ (Flächen-Methode)}.$$

Mit $V_{sp} = 0,70$ ist $M' = 36 900$.

Wenn man Ungewißheiten von 20–30% wegen der möglichen Fehler bei D und V_{sp} und der Konzentrations-Abhängigkeit von S in Rechnung stellt, so ist doch nicht daran zu zweifeln, daß die Reaktion mit Radikalen (Fall 2 und 3) nicht aber die UV-Bestrahlung allein (Fall 1) zu Bruchstücken des nativen Proteins führt.

Die Bestimmung von D nach 2 verschiedenen Methoden (Maximalgradienten-Methode und Flächenmethode) führte zu verschiedenen Werten, ebenso wurde teilweise (Fall 3) eine Zeitabhängigkeit von D beobachtet. Dies kann an einer noch nicht vollständigen Gleichgewichtseinstellung mit der Harnstofflösung liegen (Polydispersität ist wegen des gut verifizierten Gaussschen Charakters der Gradientenkurven unwahrscheinlich). Die Wahl von V_{sp} ist unsicher, da V_{sp} in der konz. Harnstofflösung nicht ohne weiteres bestimmbar ist. Da das denaturierte Protein als statistischer Knäuel vorliegt, seine SS- bzw. SH-Gruppen zu SO_3 -Gruppen oxidiert sein dürften, wurde der Wert von 0,70 für mit Perameisensäure oxidiertes RSA (STAUFF und JAENICKE¹⁹) eingesetzt. Diese Substanz ist als ungeordneter Knäuel mit oxidiertem Schwefelgruppe dem radikal-

behandelten Protein in Harnstofflösung am ähnlichsten.

Eine Ultrazentrifugation in der Wärme konnte mit dem radikalbehandelten Protein bei p_H -Werten von 7,5 leicht ausgeführt werden, da nach parallel dazu vorgenommenen Lichtstreuungsversuchen eine Aggregation bis 55° nicht eintritt (Oxydation der SH-Gruppe).

Bei Temperaturen oberhalb $46^\circ C$ wird das Verhalten des mit Sauerstoffradikalen behandelten RSA ungewöhnlich. Das zunächst vorhandene einfache Gradientenmaximum des Philpot-Svensson-Diagramms spaltet nach kurzer Sedimentationszeit in 3 sich gegenseitig überlagernde Maxima auf, die aber nicht ohne weiteres 3 unabhängigen Komponenten zuzuordnen sind, denn bei Erhöhung der Zentrifugalbeschleunigung wandern diese nicht mit größer werdenden Abständen, sondern vereinigen sich zu einem einzigen sehr flachen Maximum. Wegen der möglicherweise grundsätzlichen Bedeutung dieser Erscheinungen ist der Verlauf der Sedimentation im Original in Abb. 5 dargestellt.

Obwohl eine Theorie dieser Erscheinung z. Z. noch nicht existiert, ist stark zu vermuten, daß es sich dabei um die Auswirkung eines Dissoziations-Assoziations-Gleichgewichts handelt, dessen Einstellungsgeschwindigkeit von der Größenordnung der Sedimentations- und Diffusions-Geschwindigkeit ist. Eine Stütze für diese Anschauung ist das Sedimentations-Verhalten von Seifenlösungen höherer Konzentration bei etwa der gleichen Temperatur (45°), wie die zum Vergleich in Abb. 5 im Original dargestellte Aufnahme von Na-Tetradecylsulfatlösung zeigt. Bei diesen ist aber das Vorhandensein von Dissoziations-Assoziations-Gleichgewichten bekannt.

Eine Überschichtungsaufnahme in der Ultrazentrifuge, die durch Abkühlen einer behandelten RSA-Lösung von 47° auf 44° gewonnen worden war, zeigte nur ein einziges Gradientenmaximum, dessen Wanderungsgeschwindigkeit etwa dem nativen RSA entspricht. Kontrollversuche mit nativem RSA bei $46^\circ C$ ließen ebenfalls nur ein einziges Maximum des Konzentrationsgradienten erkennen.

Differenzspektrum: Abb. 6 zeigt das Differenzspektrum von behandeltem RSA gegen unbehandeltes.

Versuche mit Ribonuclease: Zur Prüfung der Frage, ob ein Protein ohne SH-Gruppen ebenfalls durch OH bzw. O_2H verändert wird, wurde Ribonuclease (abgekürzt RBN) untersucht, die nach

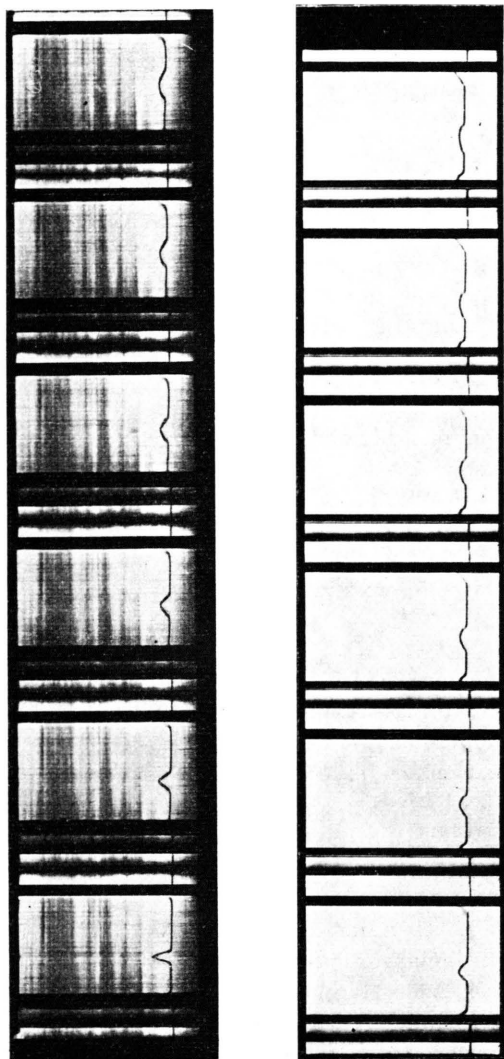


Abb. 5 a.

Abb. 5 b.

Abb. 5. Originalphotogramme der Sedimentation. a) RSA (UV, H_2O_2 -behandelt), Konz. 0,3%, Temp. $51^\circ C$, UpM: 29 500. 1. Aufnahme: 8 min und Überschichtung, Intervall 8 Minuten. b) Na-Tetradecylsulfat (0,393 Mol über 0,343 Mol geschichtet), Temp.: $46^\circ C$, UpM: 35 600, 1 Aufnahme: 5,5 min und Überschichtung, Intervall 2 Minuten. Zelle: Kel F 3° Kapillartyp, Philpotwinkel = 80° .

HIRS, STEIN und MOORE²⁰ keine Sulfhydrylgruppen, aber 4 Disulfidgruppen besitzt und von der eigene Versuche gezeigt hatten, daß sie im neutralen p_H -Bereich eine gut reproduzierbare Koagulations-Geschwindigkeit besitzt. Während eine native 0,5-proz. RBN-Lösung von p_H 7,5 bei 70° koaguliert, setzt

die Koagulation einer mit Fenton-Reagens ($10^{-3}m.$) behandelten RBN-Probe bereits bei 65° mit der gleichen Geschwindigkeit ein. Diese Erniedrigung zeigt ebenfalls eine Änderung der Aktivierungsentropie an, deren Ursache in einer veränderten Tertiärstruktur liegen mag.

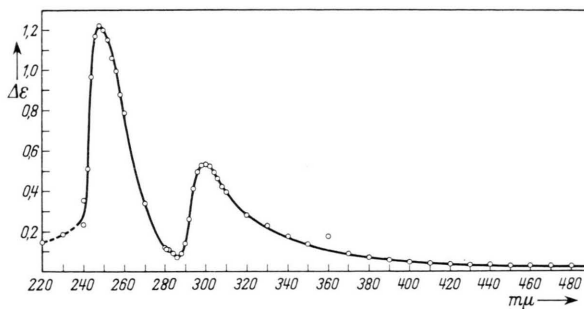


Abb. 6. Differenzspektrum der behandelten RSA-Lösung, UV, H_2O_2 gegen natives RSA, Konz. 0,434 Prozent. 42 Stdn. gemeinsame Gleichgewichtsdialyse.

Versuche mit γ -Strahlen: Jeweils zwei 1-proz. RSA-Lösungen, von denen eine in Phosphatpuffer p_H 7,62, die andere in Acetatpuffer p_H 4,62 gelöst waren, wurden in Ampullen verschlossen und der γ -Strahlung einer ^{60}Co -Quelle (etwa 800 Curie) ausgesetzt.

Die Dosis der γ -Bestrahlung wurde in 4 Versuchen von 1000 bis zu $1,5 \cdot 10^6$ r variiert. Die Strahlungsdosis bei den einzelnen Versuchen wurde mit einem Fricke-Dosimeter bestimmt.

Nach der Bestrahlung wurde die Rotationsdispersion der Lösungen und der Aggregations-Geschwindigkeit der dialysierten Lösungen bestimmt. Mit den der höchsten Strahlungsdosis ausgesetzten Proben war dies nicht möglich, da das RSA im Acetatpuffer quantitativ koaguliert und im Phosphatpuffer stark aggregiert war, woran auch 1-stdg. Zentrifugieren bei 15 000 U/min nichts änderte.

Überraschenderweise ergab die Bestimmung der Rotationsdispersion für alle Proben in den Fehlergrenzen einen λ_c -Wert von 265 – 267 nm, der dem Wert des nativen RSA entspricht. Somit hat unter den gegebenen Bedingungen die γ -Bestrahlung bis zu einer Dosis von 10^5 rad keinen Einfluß auf die Sekundärstruktur des RSA. Es wird also auch hier das gleiche gefunden wie bei der Behandlung mit Fenton-Reagens oder der UV-Photolyse.

Die Wärmeaggregation der bestrahlten, gepufferten RSA-Lösungen wurden nach erschöpfender Dialyse wie oben beschrieben untersucht. Bei p_H 7,5

²⁰ C. H. HIRS, W. H. STEIN u. ST. MOORE, Sympos. Protein Structure, Vol. XIV, London 1958.

vermindert sich die Aggregations-Geschwindigkeit mit zunehmender Strahlungsdosis, was wiederum auf eine Störung der SH-SS-Redoxreaktion zurückzuführen ist und sicherlich auf einer Verminderung der Zahl der freien SH-Gruppen beruht (vgl. Abb. 7).

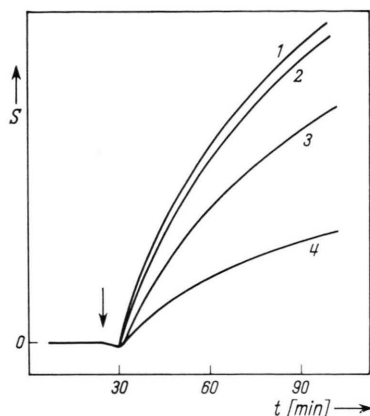


Abb. 7. Aggregationsverlauf bei p_H 7,6 von RSA-Lösungen nach γ -Bestrahlung. S: Streuintensität, O: Streuwert bei 20 °C. Kurven 1: natives RSA, 2: γ -Bestrahlung, Dosis 10^5 r, 3: desgl. 10^4 r, 4: desgl. 10^3 r.

Werden bei der Wärmeokoagulation bei p_H 4,6 der bestrahlten RSA-Lösungen diejenigen Temperaturen verglichen, bei denen die gleiche Koagulations-Geschwindigkeit erreicht wird, so ergeben sich die in Tab. 3 zusammengestellten Werte.

RSA [%]	γ -Dosis [r]	γ -Be-strahlung bei p_H	Koag. Temp. t_2 [°C]	$\Delta(\Delta S^*)$	Bemerkung
0,33	10^5	7,62	48	8,8	umdialysiert
0,33	10^5	4,62	50	7,5	
0,33	10^4	7,62	55	4,3	umdialysiert
0,33	10^4	4,62	55	4,3	
0,33	10^3	4,62	62	0	nat. RSA (p_H 4,62)
0,33	10^3	4,62	62	0	
0,33	—	—	$62 = t_1$	0	

Tab. 3. Änderung der Aktivierungsentropie der Koagulations-Geschwindigkeit des RSA nach Einwirkung von γ -Strahlen.

Zur Erläuterung: Wenn Gl. (2) in logarithmischer Form geschrieben wird, ergibt sich

$$R \ln(k_{ki} h/kT) = \Delta S_i^* - \Delta H_i^*/T_i.$$

Werden bei verschiedenen Temperaturen T_1 und T_2 gleiche Geschwindigkeiten gemessen, so bedeutet das

eine Gleichheit von k_{k1} und k_{k2} . Daraus folgt

$$\Delta S_1^* - \Delta H_1^*/T_1 = \Delta S_2^* - \Delta H_2^*/T_2.$$

Da weiterhin $\Delta H_1^* = \Delta H_2^*$ (vgl. Tab. 1) ist, ergibt sich

$$\Delta(\Delta S^*) \equiv \Delta S_1^* - \Delta S_2^* = \frac{\Delta H^*}{T_1 T_2} (T_2 - T_1).$$

Die Temperaturdifferenz ist somit der Änderung der Aktivierungsentropie $\Delta(\Delta S^*)$ proportional. Mit $\Delta H^* = 67\,300$ und $T_1 T_2 = 1,1 \cdot 10^5$ ist

$$\Delta(\Delta S^*) = 0,61 (T_2 - T_1).$$

Im Prinzip liefern somit die Versuche mit γ -Strahlung die gleichen Ergebnisse wie die oben beschriebenen Versuche mit Radikale erzeugenden Reaktionen, so daß sicherlich Parallelen zwischen der indirekten Wirkung von γ -Strahlen und der Einwirkung von OH- bzw. O_2H -Radikalen auf RSA bestehen.

Diskussion

Von den bleibenden Veränderungen des RSA, die durch die Einwirkung von OH- bzw. O_2H -Radikalen hervorgerufen werden, ist die Oxydation der SH-Gruppe am einfachsten und mit großer Sicherheit festzustellen. Dieses Ergebnis war allerdings nach den vielfach angestellten Versuchen anderer Autoren zu erwarten.

Was die Untersuchungsmethode betrifft, so ist hervorzuheben, daß die Messung der Aggregations-Geschwindigkeit der erwärmten Proteinlösungen bei p_H 7,5 in der Lichtstreuungs-Apparatur sehr empfindlich auf die Veränderung der SH-Gruppenzahl reagiert und sich zur schnellen Prüfung vor allem mit kleinen Substanzmengen (10 mg Protein) eignet. Das gleiche gilt für die unspezifischen Strukturänderungen der Proteine, die durch die Koagulations-Geschwindigkeit angezeigt wird.

Außer der Oxydation der SH-Gruppe ist bei Zimmertemperatur nur noch die Erhöhung der Zahl der reduzierbaren Disulfidgruppen um eins feststellbar, sehr deutlich machen sich aber Veränderungen des Proteins im Differenzspektrum (Abb. 6) bemerkbar. Rotationsdispersion, elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit und Mol.-Gew. bleiben praktisch unverändert.

Wenn es sich nun darum handelt, etwaige Auflösungen covalenter Bindungen festzustellen, die für die Primärstruktur des Proteins verantwortlich sind (d. h. nicht die Abspaltung von Seitenketten der

Aminosäurereste), so ist zu beachten, daß solche Veränderungen sich wegen konfigurationsstabilisierender Wasserstoffbrücken nicht ohne weiteres bemerkbar zu machen brauchen. Macht man für die Erhaltung der Helixkonfiguration die Wasserstoffbrücken zwischen Peptid-NH und -CO verantwortlich und für die Stabilisierung der tertiären Faltung neben Disulfidgruppen und hydrophoben Bindungen die Wasserstoffbrücken zwischen Seitenketten der Aminosäurereste, so ist die räumliche Konfiguration der Peptidkette so weitgehend durch zahlreiche Nebenvalenzbrücken verstrebt, verkettet und abgestützt, daß die eine oder andere Covalenzbindung aufgelöst werden kann, ohne gleich einen Zusammensturz des komplizierten Gebäudes oder eine Dissoziation in Bruchstücke zu verursachen. Die verletzte Partikel bliebe in einem solchen Fall erhalten und würde sich, äußeren Kräften wie dem Zentrifugalfeld unterworfen, kaum anders verhalten als ein unverletztes Molekül. Auch böte jene gegenüber reaktionsfähigen Molekülen oder Ionen (z. B. BH_4^{\ominus}) einen etwa gleichen Widerstand wie dieses, wenn z. B. im Innern verborgene Disulfidgruppen zur Reaktion kommen sollen.

Anders wird das Bild, wenn die strukturerhaltenden nebenvalenten Bindungen, die für die Existenz einer verletzten Partikel nicht aber für eine unverletzte essentiell sind, irgendwie gelöst oder unwirksam gemacht werden. Beim nativen Proteinmolekül führt diese Denaturierung zu einem ungeordneten Fadenmolekül, welches an seiner völligen Entfaltung nur durch verschiedene Stellen verbindende Disulfidgruppen gehindert wird. Werden diese durch die Radikaleinwirkung gesprengt und oxydiert, steht einer weitergehenden Entfaltung und Unordnung nichts mehr im Wege. Werden außer den Disulfidgruppen noch eine oder mehrere Bindungen der eigentlichen Aminosäurekette gelöst, so müssen nach der Denaturierung Bruchstücke mit kleinerem Mol.-Gew. entstehen.

Je nach der Denaturierungs-Methode werden nun verschiedene Zustände auftreten: Bei Einwirkung von Harnstoff (Guanidinhydrochlorid u. ä.) werden die H-Brücken der Seitenketten und der Peptidbindungen dadurch zerstört, daß Harnstoff an die Stelle

eines Partners der H-Brücke tritt *; das entstandene Protein-Harnstoff-Assoziat ist bindungsmäßig indifferent. Bei einer Unterbrechung der Peptidkette und gleichzeitiger Zerstörung der Disulfidgruppen können sich kleinere voneinander unabhängige Partikeln bilden und bei der Ultrazentrifugation als solche erkannt werden, wie es auch bei den experimentellen Untersuchungen des radikalbehandelten RSA geschehen ist.

Beim Erwärmen sind die Verhältnisse insofern anders als hier auch zunächst die intramolekularen H-Brücken der Seitenketten ** durch ihre Temperaturbewegung gelöst werden; die entstehenden Gebilde sind aber nicht indifferent in bezug auf die Bildung neuer H-Brücken. Neben inneren H-Brückenkombinationen bestehen nun Möglichkeiten zur Bildung von H-Brücken zwischen verschiedenen Molekülen, wozu die mit der Auflösung der inneren Bindungen einhergehende Entfaltung des Proteinmoleküls die räumlichen Voraussetzungen schafft. Das Ausmaß der intermolekularen Reaktion hängt von den besonderen Verhältnissen ab, z. B. wird sie durch eine hohe Nettoladung der Partikel verhindert. Im isoelektrischen Bereich führt sie jedoch zur Koagulation des Proteins, wenn eine gewisse Temperatur ($44 - 45^{\circ}$ beim RSA) überschritten wird; die Geschwindigkeit der Koagulation gehorcht dabei den bereits oben beschriebenen Gesetzmäßigkeiten.

Störungen der Struktur des Proteins durch Verletzung covalenter Verknüpfungsstellen werden sich durch leichtere Beweglichkeit der Molekülteile nach der Lösung der inneren H-Brücken bemerkbar machen, die beobachtete Erhöhung der Aktivierungsentropie der Koagulations-Geschwindigkeit ist ein deutlicher Hinweis hierauf, dessen Gewicht durch den Befund einer verminderten SS-Gruppen-Zahl beim radikalbehandelten RSA verstärkt wird.

Nach den Erfahrungen, die mit völlig entfalteten und disulfidbrückenfreien Proteinen in früheren Untersuchungen (JAENICKE und STAUFF¹²) gemacht worden sind, äußert sich ein Wegfall der SS-Brücken in einer erhöhten Aggregationsbereitschaft, Heraufsetzung der Aktivierungsentropie und damit verbundene Herabsetzung der Koagulationstemperatur

* Die Harnstoffbindung kann durch Lichtstreuungsmessungen nachgewiesen werden, Dissertation KÜBELE, Frankfurt/Main, 1962.

** Da die Rotationsdispersion des erwärmten RSA bis zu 65°C praktisch unverändert bleibt, ist zu schließen, daß sich auch die Sekundärstruktur bis dahin nicht verändert — vorausgesetzt, daß die Folgerungen aus den Messungen der Rotationsdispersion stichhaltig sind.

im isoelektrischen Gebiet, z. B. koagulierte RSA, dessen SS-Brücken vollständig oxidiert worden sind, bei p_{H} 4,7 schon bei Zimmertemperatur.

Das eigenartige Verhalten des radikalbehandelten RSA bei 46° im Zentrifugalfeld ist nach dem Vorangegangenen verständlich. Bei p_{H} 7,5 tritt bei dieser Temperatur noch keine Koagulation auf, eine vollständige Dissoziation in indifferente Bruchstücke wie bei der Harnstoffdenaturierung ist aber wegen der noch reaktionsfähigen H-Bindungspartner nicht ohne weiteres möglich, so daß sich zwischen deren Affinität und dem Verdünnungsbestreben der Bruchstücke ein Gleichgewicht einstellen kann, das sich bei der Sedimentation als Störung bemerkbar macht.

Außer der Sedimentation und Koagulation werden auch bei der SS-Gruppenbestimmung erst nach der Denaturierung durch Wärme charakteristische Ergebnisse erhalten.

Die starke Erhöhung der bei 57° reduzierbaren Disulfidgruppen des RSA von 9 auf 15, wenn die Lösung vorher einer UV-Bestrahlung ausgesetzt wurde, läßt kaum einen anderen Schluß zu, als daß bei der UV-Absorption entweder eine oder zwei der insgesamt 17 SS-Gruppen gesprengt worden sind, die *nicht* von BH_4^{\ominus} -Ionen angegriffen werden. Dasselbe könnte einer oder mehreren anderen für die Tertiärstruktur essentiellen Gruppen geschehen sein, deren Natur bisher noch nicht bekannt ist. Für die erstere Annahme spricht die Beobachtung der Erhöhung der Zahl der SH-Gruppen von 0,66 auf 1,42 bei UV-Bestrahlung allein, die möglicherweise durch Einwirkung einer bei der Bestrahlung angeregten aromatischen Gruppe auf eine benachbarte SS-Gruppe erklärt werden könnte. Diese eine Schlüsselfunktion besitzenden Gruppen müssen aber auch bei Einwirkung von OH- bzw. O_2H -Radikalen angegriffen werden. Andererseits müssen aber auch weitere 3–5 SS-Gruppen bei der Radikalbehandlung oxidiert worden sein, die ebenfalls für die Originalstruktur essentiell sind, denn die Zahl der titrierbaren SS-Gruppen ist kleiner als bei der UV-Bestrahlung allein. Aus alledem geht hervor, daß außer SH-Gruppen sicher noch SS-Gruppen durch die Radikaleinwirkung oxidiert worden sind.

Dieser Befund war zwar nicht ohne weiteres zu erwarten, ist aber zumindest nicht sehr über-

raschend. Merkwürdig ist hingegen die Beobachtung des Auftretens von Bruchstücken des radikalbehandelten RSA nach der Denaturierung. Das native RSA läßt sich weder durch Harnstoff noch durch Wärme, auch nicht durch Oxydation mit Perameisensäure¹⁹ (bei der sämtliche SS- und SH-Gruppen zu SO_3H -Gruppen oxidiert werden) in Bruchstücke aufspalten. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist auch UV-Bestrahlung allein dazu nicht in der Lage. Beim augenblicklichen Stand der Untersuchung ist es zwar noch nicht möglich zu sagen, ob etwa Bruchstücke von genau der Hälfte oder einem Drittel des ursprünglichen Moleküls entstehen, die G a u s s'sche Verteilung der Gradientenkurven des Versuchs 2 und 3 (vgl. oben) läßt aber eine Poly- oder Paucidispersität als unwahrscheinlich erscheinen. Es besteht daher durchaus die Möglichkeit, daß die Sauerstoffradikale mit einer bestimmten durch die Nachbarschaft besonderer Atomgruppen ausgezeichneten Peptidbindung reagieren, oder daß die Aminosäure an einer Stelle eine nicht peptidische Bindung enthält, die für Sauerstoffradikale empfindlich ist. (Keinesfalls kann dies eine SS-Bindung sein [vgl. oben].) Die Verletzung der Primärstruktur durch OH- bzw. O_2H -Radikale muß für funktionelle Proteine natürlich schwerwiegende Folgen haben, da ihre Aktivität in den meisten Fällen weitgehend an eine intakte Struktur gebunden ist und insbesondere SH- und SS-Gruppen vielfach essentiell sind.

Die weitgehende Analogie der Einwirkung von chemisch bzw. photochemisch erzeugten Radikalen und von γ -Strahlen auf gelöstes RSA läßt den Schluß zu, daß auch bei diesen zumindest ein großer Teil der Wirkung auf der Reaktion sauerstoffhaltiger Radikale beruht. Wie weit direkte Trefferwirkung, H-Atome und andere Reaktionsprodukte der γ -Strahlen eine Veränderung bewirken, kann nur durch weitere vergleichende Untersuchungen geklärt werden, für die die vorliegenden einen ersten Anhalt geben sollen.

Die Arbeit wurde aus Mitteln des Bundesministeriums für wissenschaftliche Forschung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt, für die wir bestens danken möchten.