

# Die indirekte Wirkung von Röntgenstrahlen auf Aminosäuren

## II. Bestrahlung von Tryptophan

Von G. PETER und B. RAJEWSKY

Aus dem Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M. \*  
(Z. Naturforschg. **18 b**, 110—114 [1963]; eingegangen am 12. Juli 1962)

Die indirekte Wirkung von Röntgenstrahlen einer Dosis von 0,08 bis 7,5 Millionen r auf eine  $2 \cdot 10^{-2} m$ . wäßrige Tryptophanlösung wurde mit Hilfe chemischer und physikalisch-chemischer Arbeitsmethoden (Hochspannungs-Elektrophorese) untersucht.

Der Einfluß der Dosis, Dosisleistung, Temperatur und die durch oxydierend wirkende Radikale ( $HO_2$ ) ausgelösten Reaktionsschritte bei Bestrahlung in Sauerstoffatmosphäre wurden in qualitativer Hinsicht geprüft.

Aus der Vielzahl der strahlenchemisch gebildeten Abbauprodukte konnten mit Sicherheit nachgewiesen werden: Glycin,  $\alpha$ -Alanin, Asparaginsäure, Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, 3-Oxy-anthranilsäure und Tryptamin.

Schließlich wurde versucht, die experimentell gewonnenen Ergebnisse mit Hilfe von Radikalwirkungen, die sich auf

- a) Decarboxylierungen
- b) und Veränderungen des Kohlenstoff-Gerüsts

beziehen, zu deuten.

Ein sehr bedeutendes Problem für die Strahlenbiologie ist die Untersuchung und Deutung der Grundvorgänge der Wirkung von ionisierenden Strahlen auf die biologischen Grundbausteine. Direkte Strahlenwirkungen im Sinne der klassischen Treffertheorie wurden von verschiedenen Autoren oft zum Gegenstand der Untersuchungen am biologischen Material gemacht. Auch Arbeiten, bei denen die Wirkungen von Röntgenstrahlen auf in Wasser gelöste Substanzen analysiert wurden, sind bereits seit mehr als 40 Jahren wiederholt unternommen worden.

Schon 1931 unterschied RAJEWSKY<sup>1</sup> zwischen den rein physikalischen oder direkten Treffern und den indirekten „chemischen“ Treffern, die beide zu den primären Ereignissen der Strahlenwirkung gezählt werden, während als Sekundärreaktion jede chemische Reaktion anzusehen ist, die als unmittelbare Folge der Überführung eines Moleküls in einen reaktionsbereiten Zustand (Radikal, angeregtes Molekül) nach der Absorption der vollen oder eines Teiles der Energie eines Quants abläuft.

Eine indirekte Strahlenwirkung liegt vor, wenn die Veränderung der molekularen Struktur dadurch zustande kommt, daß durch Energie-Depots in der Umgebung des umzuwandelnden Elementarkörpers Moleküle aktiviert werden, welche an den Grund-

körper herandiffundieren und an ihn ihre Energie abgeben oder mit ihm reagieren können. Exakter ausgedrückt bedeutet dies, daß eine Wirkung als indirekt angesehen werden kann, zu der eine Energieabsorption beiträgt, die primär in größerer Entfernung als etwa 100 Å von der betrachteten Struktureinheit erfolgt und durch Sekundäreffekte (Diffusion, Energieleitung) wirksam wird.

Das Verständnis der Elementarprozesse, d. h. die klare experimentelle Unterscheidbarkeit zwischen strahlenchemischen Primär- und Sekundärprozessen ist durch das komplexe Erscheinungsbild sehr erschwert, nicht zuletzt wegen der Überlagerung der Wirkungen von indirekten und direkten Reaktionsmechanismen.

Aus diesen Tatsachen kann gefolgert werden, daß die Frage nach einem generell gültigen Mechanismus der Strahlenwirkung unberechtigt ist. Daher sind fast alle Versuche gescheitert, in denen bewiesen werden sollte, daß alle Strahlenwirkungen *nur* durch die bei Bestrahlung in Wasser gebildeten Radikale hervorgerufen werden. Die Schwierigkeiten des gesamten Problems liegen in der Hauptsache in der physikalisch-chemischen Interpretation der Folgereaktionen.

Vor einiger Zeit gelang es, einige Fortschritte in der Frage der Deutung der Grundvorgänge bei der

\* Anlässlich des 25-jährigen Bestehens des „Max-Planck-Instituts für Biophysik“.

<sup>1</sup> B. RAJEWSKY, 10 Jahre Forschung phys. med. Grenzgebiete, Leipzig 1931.

chemischen Strahlenwirkung zu erzielen und die Kenntnisse über den Mechanismus der indirekten Wirkung von Röntgenstrahlen zu erweitern<sup>2,3</sup>.

In dieser Arbeit wird der Versuch unternommen, eine vorläufige Übersicht zu geben über die als sicher zu betrachtenden strahlenchemischen Veränderungen, die bei Bestrahlung einer 0,02-m. wäßrigen Lösung von DL-Tryptophan zu beobachten sind.

### Material und Arbeitsmethoden

Je 1 cm<sup>3</sup> einer Tryptophan-Stammlösung wurde in ein V4A-Schälchen abpipettiert, in ein Bestrahlungsgefäß aus Kupfer gesetzt, das seinerseits auf einem Kupferblock ruhte, und anschließend bestrahlt. Das Bestrahlungsgefäß war mit einer Hostaphanfolie von 15  $\mu$  überspannt, um die Schwächung der Röntgenstrahlen gering zu halten. Die bestrahlten Lösungen wurden gesammelt, im Vakuum zur Trockne gebracht und mit 1 cm<sup>3</sup> 6-fach dest. Wasser aufgenommen.

Zur Auftrennung der Bestrahlungsprodukte mittels der Hochspannungs-Elektrophorese<sup>4</sup> wurden folgende Pufferlösungen verwendet:

- a) Pyridin-Eisessig-Puffer: 100 cm<sup>3</sup> Pyridin + 10 cm<sup>3</sup> Eisessig mit Wasser auf 1000 cm<sup>3</sup> auffüllen ( $p_H$  6,0),
- b) Eisessig-Ameisensäure-Puffer: 150 cm<sup>3</sup> Eisessig + 50 cm<sup>3</sup> Ameisensäure mit Wasser auf 1000 cm<sup>3</sup> auffüllen ( $p_H$  1,9).

Bei der papierchromatographischen Trennung gelangten folgende Fließmittel zur Anwendung:

- a) Fließmittel für freie Aminosäuren  
Phenol : Wasser = 100 : 20,  
n-Butanol : Eisessig : Wasser = 250 : 60 : 250,  
n-Butanol : Ameisensäure : Wasser = 600 : 50 : 50,  
2,6-Lutidin : Collidin : Wasser = 1 : 1 : 1.
- b) Fließmittel für Indolkörper  
n-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5  
(Partridge-Mischung),  
n-Butanol : Eisessig : Wasser = 80 : 20 : 20,  
n-Propanol : Wasser = 5 : 1,  
8-proz. wäßrige Natriumchloridlösung + 1 cm<sup>3</sup> Eisessig.
- c) Fließmittel für DNP-Aminosäuren<sup>5</sup>.

Die zum Vergleich erforderlichen DNP-Aminosäuren wurden nach GLICK<sup>6</sup> und RAO und SOBER<sup>7</sup> hergestellt. Die Ketoverbindungen wurden durch Überführung in 2,4-Dinitrophenylhydrazon<sup>8</sup> und durch Besprühen mit o-Phenylendiamin<sup>9</sup> nachgewiesen.

Für die Identifizierung der einzelnen Verbindungen wurden folgende Reagenzien benutzt:

Aminocarbonsäuren	2% Ninhydrin in n-Butanol,
Ketoverbindungen	1% 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2-n. HCl,
Indolkörper	1% Zimtaldehyd in Methanol, nach dem Besprühen einhängen in gesättigte HCl-Atmosphäre, 1,5% Ce <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> -Lösung in 2-n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , p-Dimethylaminobenzaldehyd (0,5 g Reagens + 1 cm <sup>3</sup> konz. HCl in 100 ml abs. Äthanol lösen), 0,1-proz. Lösung von Kaliumdichromat in Wasser : 37% Formaldehyd = 9 : 1 v/v.

Die Bestrahlungen wurden mit der Dermopan-Anlage von Siemens und einer Hochleistungs-Röntgenröhre durchgeführt. Daten der Apparaturen unter Versuchsbedingungen: a) 45 kV, 25 mA; Eigenfilterung: 1 mm Be; Dosisleistung in Luft und Sauerstoffatmosphäre: 83 kr/min; Dosisleistung in Argonatmosphäre: 58 kr/min; b) 56 kV, 80 mA; Filterung: 0,5 mm Al + 2 mm Wasser, Dosisleistung: 5,5 · 10<sup>5</sup> r/Minute.

### Ergebnisse

#### 1. Dosisabhängigkeit der Reaktion

Die Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen zugeführter Strahlenenergie und dadurch bedingter chemischer Veränderung einer 0,02-m. wäßrigen Tryptophanlösung wurde in analoger Weise wie beim Lysin<sup>10</sup> durchgeführt. Während beim Lysin bis zu einer Dosis von 1,1 · 10<sup>6</sup> r, entsprechend einer Bestrahlungsdauer von etwa 13 Min., keine signifikante Veränderungen erkennbar waren, traten beim Tryptophan schon nach Einstrahlung von 8,3 · 10<sup>4</sup> r, entsprechend einer Bestrahlungsdauer von 1 Min., deutlich sichtbare Abbaureaktionen auf. Mit Hilfe der Hochspannungs-Elektrophorese und Papierchromatographie konnten einige der strahlenchemisch gebildeten ninhydrinpositiven Verbindungen, bei gleichzeitiger Anwendung eines Testgemisches, eindeutig festgestellt werden. Es handelt sich im einzelnen um folgende Substanzen: Glycin,  $\alpha$ -Alanin und Asparaginsäure, deren Bildung durch oxydative Abspaltung des am Indolring  $\beta$ -ständigen

<sup>2</sup> G. PETER, Z. Naturforschg. **14 b**, 135 [1959].

<sup>3</sup> G. PETER, Z. Naturforschg. **16 b**, 198 [1961].

<sup>4</sup> TH. WIELAND u. Mitarbb., Angew. Chem. **67**, 257 [1955].

<sup>5</sup> D. GLICK, Methods of biochemical Analysis, Vol. II, Interscience Publishers, Inc., New York, p. 360–382.

<sup>6</sup> *ibid.*

<sup>7</sup> K. R. RAO u. H. A. SOBER, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1328 [1954].

<sup>8</sup> F. A. ISHERWOOD u. D. H. CRUICKSHANK, Nature [London] **173**, 121 [1954].

<sup>9</sup> TH. WIELAND u. E. FISCHER, Naturwissenschaften **36**, 219 [1949].

<sup>10</sup> G. PETER, Z. Naturforschg. **16 b**, 198 [1961].

Alanylrestes erklärt werden kann. Die ermittelten  $R_f$ -Werte für die freien Aminosäuren sind in nachstehender Tabelle zusammengestellt.

Substanz	Fließmittel			
	I	II	III	IV
Glycin	0,36	0,32	0,45	0,22
$\alpha$ -Alanin	0,58	0,38	0,60	0,26
Asparaginsäure	0,17	—	—	0,20

Tab. 1.  $R_f$ -Werte der freien Aminosäuren; Papier S. & S. 2043 b, absteigend; Entwickler: Ninhydrin; Laufmittel: I Phenol : Wasser = 100 : 20, II n-Butanol : Eisessig : Wasser = 250 : 60 : 250, III n-Butanol : Ameisensäure : Wasser = 600 : 50 : 50, IV 2.6-Lutidin : Collidin : Wasser = 1 : 1 : 1.

Die nach der angegebenen Methode hergestellten DNP-Aminosäuren ergaben folgende  $R_f$ -Werte:

Substanz	Fließmittel				
	I	II	III	IV	V
DNP-Glycin	0,29	0,43	0,25	0,09	0,33
DNP- $\alpha$ -Alanin	0,38	0,54	0,35	0,14	0,42
DNP-Asparaginsäure	0,08	0,04	0,03	0,02	0,05

Tab. 2.  $R_f$ -Werte der DNP-Aminosäuren; Papier: S. & S. 2043 b, absteigend; Laufmittel: I Toluol : Äthylchlorhydrin Pyridin : 0,8 n. Ammoniak = 5 : 3 : 1 : 3, II Pyridin : Isoamylalkohol : 1-n. Ammoniak = 6 : 14 : 20, III Benzylalkohol + 10% Propanol, IV Cyclohexan + 30% Propanol, V Phenol : Isoamylalkohol : Wasser = 1 : 1 : 1.

Im Gegensatz zu den beim Lysin erzielten Resultaten treten bei Bestrahlung einer gleich molaren wäßrigen Tryptophanlösung mit zunehmender applizierter Strahlendosis die basischen Verbindungen in den Hintergrund, während die Bildung saurer Komponenten bevorzugt in Erscheinung tritt. Ihrer chemischen Natur nach handelt es sich vorwiegend um Indolkörper und Tryptophan-Derivate. Unter den mit Hilfe der Papierchromatographie charakterisierten Verbindungen sind zu nennen: Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, Tryptamin und 3-Oxyanthranilsäure. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 aufgeführt.

Eine zusätzlich zur Papierchromatographie und Hochspannungs-Elektrophorese durchgeführte Charakterisierung von Kynurenin und 3-Oxyanthranilsäure erfolgte durch Messung der UV-Absorption, deren Ergebnis in Abb. 1 dargestellt ist.

	Fließmittel				
	I	II	III	IV	V
Kynurenin	0,48	0,78	0,54	0,67	0,75
3-Hydroxykynurenin	0,62	0,60	0,64	—	—
3-Oxyanthranilsäure	0,83	—	—	0,27	—
Tryptamin	—	—	—	0,55	0,71

Tab. 3.  $R_f$ -Werte der Abbauprodukte des Tryptophans; Papier: S. & S. 2043 b und 598 L, absteigend; Entwickler: *p*-Dimethylaminobenzaldehyd; Laufmittel: I n-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5, II Phenol : Wasser = 8 : 2 + 1 cm<sup>3</sup> konz. Ammoniak, III 2.6-Lutidin : Collidin : Wasser = 1 : 1 : 1, IV 8% Natriumchloridlösung + 1 cm<sup>3</sup> Essigsäure, V n-Butanol : Eisessig : Wasser = 80 : 20 : 20.

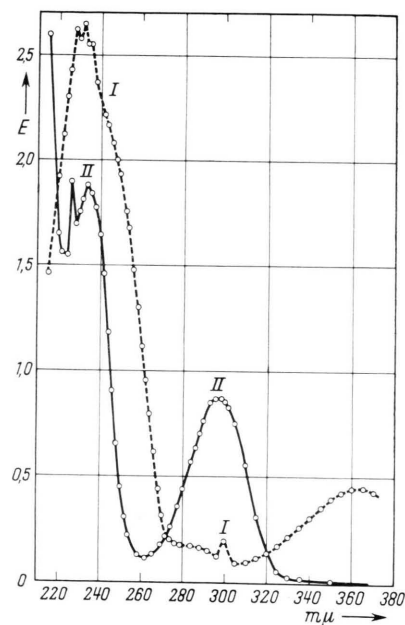


Abb. 1. UV-Spektrum von Kynurenin und 3-Oxyanthranilsäure.

Sehr auffallend war die mit zunehmender applizierter Strahlendosis stärker werdende rötlich-braune Verfärbung der Lösung, die auf Entstehung von Pigmenten zurückgeführt werden kann. Der Bildungsmechanismus der Pigmente kann im derzeitigen Stadium der Untersuchungen noch nicht überblickt werden. Die bisherigen Ergebnisse legen jedoch nahe, daß chinoide Zwischenprodukte und Verbindungen vom Dihydroxyindol-Typ daran beteiligt sind.

## 2. Einfluß der Strahlen-Dosisleistung

Analog den Untersuchungen beim Lysin konnte auch bei der wäßrigen Tryptophanlösung kein Einfluß der Strahlungsintensität beobachtet werden. Die mit der Hochleistungsröhre in wesentlich kürzerem Zeitraum eingestrahlte Energie führte zu Verbindungen, die mit den in Tab. 1 und 3 aufgeführten Bestrahlungsprodukten in guter Übereinstimmung stehen.

## 3. Einfluß der Temperatur

Wie beim Lysin wurden auch hier Bestrahlungen auch bei tiefen Temperaturen durchgeführt, da diese Versuche gut geeignet sind, zwischen direkten und indirekten Strahlenwirkungen unterscheiden zu können. Die Ergebnisse lassen deutlich erkennen, daß die Bestrahlung in eingefrorenem Zustand zu keiner strahlenchemischen Veränderung des Tryptophanmoleküls führt. Dies ist auch nicht weiter verwunderlich, denn generell wird die eingefrorene und bestrahlte Substanz erst dann untersucht, wenn sie wieder aufgetaut ist. Es ist daher unwahrscheinlich, daß freie Radikale, die im gefrorenen Zustand gebildet worden sind, noch zu einer Reaktion nach dem Schmelzvorgang zur Verfügung stehen.

Auf Grund dieser Beobachtungen, die zwar keinen absoluten Beweis darstellen, jedoch nützliche Hinweise liefern, hat RAJEWSKY<sup>11</sup> schon 1931 die Möglichkeit der indirekten Wirkung formuliert und immer wieder in den Vordergrund gestellt<sup>12</sup>.

## 4. Reaktionen in belüfteter $2 \cdot 10^{-2} m$ wäßriger Tryptophanlösung

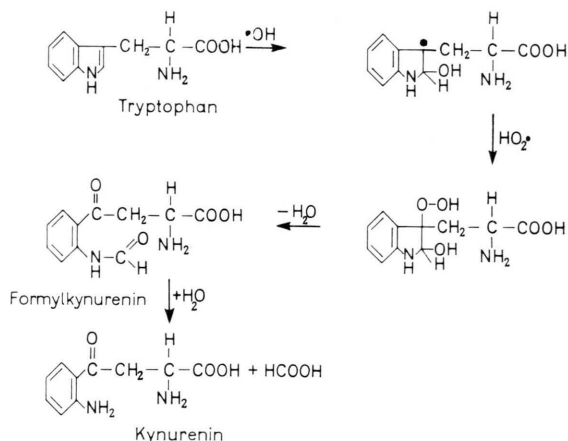
Die bei Anwesenheit von gelöstem  $O_2$  durchgeführten Versuche zeigten in qualitativer Hinsicht ein dem Lysin ähnliches Verhalten. Auch hierbei konnte festgestellt werden, daß der Sauerstoff während der Bestrahlung vorhanden sein muß, hingegen die Einwirkung von  $O_2$  vor oder nach der Bestrahlung die Vorgänge nicht beeinflußt. Es wurde daher ein hochgereinigter Sauerstoffstrom während der Bestrahlung durch das Bestrahlungsgefäß geleitet. Die elektrophoretische und papierchromatographische Untersuchung der Bestrahlungsprodukte zeigte

eine weitgehende Übereinstimmung mit den in Luft erhaltenen Verbindungen, sofern man die als sicher nachweisbaren Produkte bei der Betrachtung zugrunde legt. Infolge der in  $O_2$ -Atmosphäre verstärkten oxydativen Wirkung der  $HO_2$ -Radikale treten noch eine Reihe von Ketosäuren und Oxy-amino-carbonsäuren auf, deren chemische Natur noch nicht eindeutig charakterisiert werden konnte.

## 5. Reaktionsmechanismen

Für die Entstehung der gefundenen Abbauprodukte bei Bestrahlung von Tryptophan in Luft und in belüfteter wäßriger Lösung gibt es sicherlich mehrere Erklärungen, nach denen ein primärer Angriff von  $OH$ - und  $HO_2$ -Radikalen auf den Indolkern und die  $\beta$ -ständige  $\alpha$ -Alanyl-Seitenkette anzunehmen ist. Obwohl derartige Formulierungen mehr oder weniger spekulativen Charakter besitzen, seien trotzdem einige mögliche Reaktionsmechanismen skizziert.

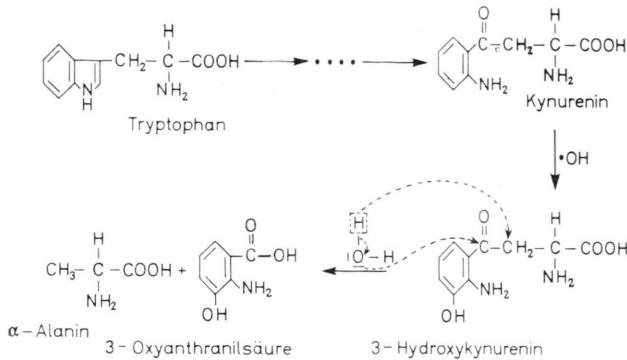
### a) Bildung von Kynurenin



Den entwickelten Reaktionsmechanismen liegt die Annahme zugrunde, daß jedes der gebildeten Bestrahlungsprodukte direkt durch Spaltung des Tryptophanmoleküls entsteht. Obwohl diese Effekte durchaus möglich sind und in energetischer Hinsicht infolge der geringen benötigten Aktivierungsenergie eintreten können, kommt den sekundären Anlagerungsreaktionen von Radikalbruchstücken eine wesentliche größere Bedeutung zu.

<sup>11</sup> B. RAJEWSKY, Zehn Jahre Forschung phys. med. Grenzgebiete, Leipzig 1951.

<sup>12</sup> B. RAJEWSKY, Brit. J. Radiol. **25**, 550 [1952].

b) Bildung von 3-Oxyanthranilsäure und  $\alpha$ -Alanin

Zur Deutung der Vorgänge können im Prinzip 3 Grundvorgänge herangezogen werden:

- a) Die einfache Radikalreaktion, die in einer Assoziation zweier freier Atome bzw. Radikale unter Ausbildung einer neuen  $\sigma$ -Elektronenbindung besteht; da die in unserem Fall interessierenden Radikalstrukturen durch keine Mesomerie-Effekte

stabilisiert sind, gehen die Reaktionen ohne erkennbare Aktivierungswärme rasch vor sich infolge Fehlens energiereicher Zwischenstufen, die durchlaufen werden müssen.

- b) Umsetzung eines freien Radikals mit den Bindungspartnern einer einfachen Bindung, bei der stets eine neue  $\sigma$ -Elektronenbindung und ein neues freies Radikal gebildet wird.
- c) Die Krypto-Radikalreaktionen, bei denen Umgruppierung der Atome bereits im Stadium der Pradissoziation erfolgt. Sie erfordern naturgemäß eine wesentlich geringere Aktivierungsenergie als die über die freien Radikale verlaufenden Reaktionen.

Die Möglichkeiten, daß nach dem Radikalmechanismus formulierte Reaktionen sich als Ionenreaktionen erweisen, wurde berücksichtigt.

Herrn Prof. Dr. TH. WIELAND sei an dieser Stelle für seine Ratschläge herzlichst gedankt.

## The effect of ether on Newcastle disease virus: a morphological study of eight strains

By A. P. WATERSON and J. G. CRUICKSHANK

Virus Laboratory, Department of Pathology, Tennis Court Road, Cambridge, England  
(Z. Naturforsch. **18 b**, 114—118 [1963]; eingegangen am 15. Juli 1962)

Eight strains of Newcastle disease virus (NDV) have been examined using the technique of negative contrast electron microscopy, before and after treatment with ether. There is considerable variation in the shape and size of particles in any one strain, and the degree of this pleomorphism varies from strain to strain. The two common features of all the strains are the internal ribonucleoprotein and the rosette-like haemagglutinin formed by disruption of the coat with ether. The effect of ether is to disrupt the particles, but the ease of disruption varies from strain to strain. The products of ether treatment are the internal ribonucleoprotein and the haemagglutinin, which consists of portions of the outer coat. Besides these, the coat itself may in some strains appear almost intact, but stripped of its projections, after ether treatment. With the strains whose pathogenicity was known it has not proved possible to relate structure to degree of pathogenicity.

Newcastle disease virus (NDV) consists of particles of irregular appearance in the electron microscope<sup>1</sup>. More recently high resolution electron microscopy has revealed an inner component with helically arranged subunits, or capsomeres<sup>2,3</sup>. This

inner component is a ribonucleoprotein<sup>4</sup>. It is seen in particles whose coat has ruptured spontaneously, but it is released in greater quantity from particles treated with ether. The outer layer of the particle is presumed to contain lipid. The outside of the par-

<sup>1</sup> W. SCHÄFER, G. SCHRAMM and E. TRAUB, Z. Naturforsch. **4b**, 157 [1949].

<sup>2</sup> R. W. HORNE and A. P. WATERSON, J. molecular Biol. **2**, 75 [1960].

<sup>3</sup> R. W. HORNE, A. P. WATERSON, P. WILDY and A. E. FARNHAM, Virology **11**, 79 [1960].

<sup>4</sup> W. SCHÄFER and R. ROTT, Z. Naturforsch. **14b**, 629 [1959].