

Über die direkte Wirkung von Röntgenstrahlen auf Proteine, Peptide und Aminosäuren

I. Untersuchungen an Proteinen: Bestrahlung von Lysozym

Von ANTONIO CAPUTO* und KLAUS DOSE

Aus dem Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt-Main
(Z. Naturforschg. **12 b**, 172—180 [1957]; eingegangen am 3. September 1956)

Die Primärwirkung von Röntgenstrahlung einer Dosis von 2—30 Millionen r auf kristallisiertes Lysozym wurde mit Hilfe physikalisch-chemischer (Elektrophorese, Ultrazentrifuge), chemischer, biochemischer und biologischer Arbeitsmethoden untersucht. Es wurde gefunden, daß durch Bestrahlung eine Reihe nah verwandter, jedoch weniger basischer Proteine verschiedenen Mol.-Gew. entsteht, deren Aminosäure-Bausteine als Folge der Bestrahlung teilweise in andere Verbindungen umgewandelt wurden. Bei der Untersuchung der amino- und carboxyl-endständigen Aminosäuren des bestrahlten Proteins wurden Unterschiede gegenüber Lysozym nur bei den carboxyl-terminalen Gruppen festgestellt. Die biologische Aktivität des Proteins blieb auch nach Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Millionen r praktisch unverändert.

Ein sehr bedeutendes Problem für die Radiobiologie und Radiochemie ist das Studium der Wirkung von Röntgenstrahlen auf Proteine und verwandte Verbindungen. Erste Arbeiten, bei denen die Wirkung von Röntgenstrahlen auf wäßrige Lösungen von Proteinen untersucht wurde, sind schon vor mehr als 30 Jahren durchgeführt worden. So fanden schon 1915 FERNAU und PAULI¹ nach Bestrahlung wäßriger Gelatinelösungen eine Abnahme der Viskosität. 1923 beobachtete WELS² nach der Bestrahlung von Globulinlösungen neben einer teilweisen Ausflockung ebenfalls eine Zunahme der Viskosität der Lösung sowie eine Abnahme der Oberflächenspannung. Eine Inaktivierung von Pepsin fanden HUSSEY und THOMPSON³ bereits 1924, wenn sie Lösungen dieses Enzyms mit Röntgen-, β - und γ -Strahlen bestrahlten. Die Abnahme der Löslichkeit von Albumin sowie die hiermit verbundene Trübung der Lösungen in Abhängigkeit von der Strahlendosis wurden in der Folgezeit von RAJEWSKY^{4, 5} näher untersucht. Diese radioinduzierte Denaturierung der gelösten Proteine scheint hiernach in zwei Schritten zu verlaufen, von denen jedoch nur der erste (Latenzperiode) temperaturunabhängig ist.

Weiter untersuchten RAJEWSKY und Mitarbb.⁶ einige chemische Veränderungen unter thermischen und Strahlungseinwirkungen. Veränderungen im UV-Absorptionsspektrum bestrahlter Proteinlösungen wurden 1927 von SPIEGEL-ADOLF und KRUMPEL⁷ gefunden. Auch in den letzten Jahren wurde eine große Zahl von Arbeiten über die Bestrahlung von Proteinlösungen publiziert. In ihnen ist vor allem die Änderung physikalisch-chemischer und biologischer Eigenschaften Gegenstand eingehender Untersuchungen. SVEDBERG und BROHULT⁸ fanden z. B. bei der Untersuchung makromolekularer Verbindungen wie z. B. Hämocyanin aus *Helix pomatia* in der Ultrazentrifuge nach Bestrahlung mindestens eine neue Komponente. BARRON und FINCKELSTEIN⁹ stellten nach Röntgenbestrahlung von Albumin- und Globulinlösungen ebenfalls in der Ultrazentrifuge Komponenten mit höherem Mol.-Gew. fest. Fast ähnliche Veränderungen wurden auch von SHERAGA und NIMS¹⁰ nach Bestrahlung von Fibrinogen gefunden. Veränderungen in der optischen Aktivität, UV-Absorption, Brechungsindex, Oberflächenspannung, elektr. Leitfähigkeit und Viskosität fand ARNON^{11, 12} nach Bestrahlung wäßriger Eieralbumin-Lösungen.

* Stipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung 1955/56. Gegenwärtige Adresse: Istituto Regina Elena per lo studio e la cura dei tumori, Roma.

¹ A. FERNAU u. W. PAULI, Kolloid. Z. **30**, 6 [1915].

² P. WELS, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere **199**, 226 [1923].

³ R. G. HUSSEY u. W. R. THOMPSON, J. gen. Physiol. **6**, 1 [1924].

⁴ B. RAJEWSKY, Strahlentherapie **34**, 582 [1929].

⁵ B. RAJEWSKY, Biochem. Z. **227**, 272 [1930].

⁶ B. RAJEWSKY, W. V. GENTER u. K. SCHWERIN, Biochem. Z. **227**, 285 [1930].

⁷ M. SPIEGEL-ADOLF u. O. KRUMPEL, Biochem. Z. **190**, 28 [1927].

⁸ T. SVEDBERG u. S. BROHULT, Nature [London] **143**, 938 [1939].

⁹ E. S. GUZMAN BARRON u. P. FINCKELSTEIN, Arch. Biochem. Biophysics **41**, 212 [1952].

¹⁰ H. A. SHERAGA u. L. F. NIMS, Arch. Biochem. Biophysics **36**, 336 [1952].

¹¹ L. E. ARNON, Physiol. Rev. **16**, 671 [1936].

¹² L. E. ARNON, J. biol. Chemistry **110**, 43 [1935].

Die Aminosäuren des Hydrolysates von in Lösung bestrahltem Rinder-Serumalbumin untersuchte GUZMAN BARRON¹³. Nach der Entdeckung der Schutzwirkung biologisch inaktiver Proteine auf Enzyme bei Bestrahlung in wäßriger Lösung durch DALE¹⁴ sind sehr viele Arbeiten erschienen, die sich mit der Inaktivierung von Enzymsystemen durch Röntgenstrahlen befassen (s. u. a. ein Übersichtsreferat von BARRON¹⁵). Eine genaue Untersuchung der Veränderungen, die diese Systeme durch Röntgenstrahlen erfahren, bereitet jedoch wegen der Überlagerung der indirekten durch die direkte Strahlenwirkung ganz erhebliche Schwierigkeiten. (Hierzu s. auch die Zusammenfassung von DALE¹⁶.) Schon 1931 unterschied RAJEWSKY¹⁷ zwischen den rein „physikalischen Treffern“ im Sinne der klassischen Treffertheorie und den sog. indirekten, darunter auch „chemischen Treffern“, die beide zu den primären Ereignissen der biologischen Strahlenwirkung führen können. Vom Standpunkt der Chemie und Biologie her ist diese Unterscheidung zu treffen in dem Sinne, daß die strahlenchemische Primärreaktion die spontan nach der Absorption des Strahlungsquantums auftretende Veränderung der Konstitution des Mol. beschreibt (ähnlich dem direkten Treffer der Strahlenbiologie), während als strahlenchemische Sekundärreaktion jede chemische Reaktion anzusehen ist, die als mittelbare Folge der Überführung eines Mol. in einen reaktionsfähigen Zustand (angeregtes Mol., Radikal usw.) nach der Absorption eines Strahlungsquantums abläuft (ähnlich dem indirekten Treffer der Strahlenbiologie). In einigen Arbeiten konnte auch in diesem Institut gezeigt werden, daß die durch Absorption von Quanten auftretenden angeregten Moleküle und Radikale trotz ihrer meist äußerst kurzen Lebenszeit den Gesetzen der klassischen Molekular-Kinetik unterworfen sind^{18, 19}.

Bei den bisher hier untersuchten Systemen handelte es sich ausschließlich um biologische, bei denen also das in diesen stets überwiegend vorhandene Wasser an den „indirekten“ Treffern fast ausschließ-

lich beteiligt ist²⁰. In Anbetracht der biologischen Bedeutung, die Proteinen und verwandten Verbindungen zukommt, ist eine klare experimentelle Unterscheidbarkeit zwischen strahlenchemischen Primär- und Sekundärreaktionen von großem Interesse. Unter der bei Proteinen wohl weitgehend erfüllten Voraussetzung, daß bei Bestrahlung reiner einheitlicher Verbindungen, die an dieser zu beobachtenden strahlenchemischen Reaktion weitgehend primärer Natur sind, hat man schon früher u. a. die Wirkung von Röntgenstrahlen auf trockene Proteine untersucht, aber Ziel dieser Arbeiten war es hauptsächlich, von der Physik her die Inaktivierung der Enzyme durch Bestrahlung zu verstehen (POLLARD²¹; POLLARD und Mitarbb.²² und HUTCHINSON²³). Auch SETLOW²⁴ untersuchte die Strahlenempfindlichkeit der Katalase in Abhängigkeit von der Temperatur und fand für beide Größen einen relativ komplizierten Zusammenhang. Nach dem Stand der gegenwärtigen Untersuchungen erschien uns vor allem eine Erweiterung unserer Kenntnisse über den Mechanismus der direkten Wirkung von Röntgenstrahlen erforderlich. Als kleinen Beitrag hierzu untersuchen wir in diesem Institut gegenwärtig die Veränderungen der physiko-chemischen, chemischen, biochemischen und biologischen Eigenschaften der Proteine und verwandter Verbindungen durch Röntgenbestrahlung ihrer reinen, möglichst kristallisierten Trockensubstanz.

Material und Arbeitsmethoden

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir folgende Proteine:

Menschen-Serumalbumin, kristallisiert nach COHN u. Mitarbeiter²⁵.

Rinder-Serumalbumin und -Globulin (beide Behringwerke, Marburg).

Kristallisiertes Menschen-Hämoglobin.

Clupein (Bios Lab., New York).

Protamin (Hoffman-LaRoche).

Lysozym (Armour) kristallisiert nach ALDERTON und FEVOLD²⁶.

¹³ E. S. GUZMAN BARRON, *Annual. N. Y. Sci.* **59**, 574 [1954].

¹⁴ W. M. DALE, *Biochem. J.* **46**, 80 [1942].

¹⁵ E. S. GUZMAN BARRON in A. HOLLAENDER, „*Radiation Biology*“ vol. I, part. 1, 283 [1954].

¹⁶ W. M. DALE in A. HOLLAENDER, „*Radiation Biology*“ vol. I, 255 [1954].

¹⁷ B. RAJEWSKY, *Zehn Jahre Forschung physik. med. Grenzgebiet*, Leipzig 1931.

¹⁸ B. RAJEWSKY, *Strahlentherapie* **112**, [1956], im Druck.

¹⁹ H. PAULY u. B. RAJEWSKY, *Strahlentherapie, Sonderband* **35**, [1956].

²⁰ E. REINHOLZ, *Strahlentherapie* **95**, 131 [1954].

²¹ E. G. POLLARD, *Symposia Radiobiol. V.*, Liège 1954.

²² E. G. POLLARD, W. R. GUILD, F. HUTCHINSON u. R. B. SETLOW, *Progr. Biophys.* **5**, 72 [1955].

²³ F. HUTCHINSON, *Rad. Res.* **1**, 43 [1954].

²⁴ R. B. SETLOW, *Proc. mat. Acad. Sci. USA.* **38**, 166 [1952].

²⁵ E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, D. J. MULDFORD, J. ASHWORTH, M. MELIN u. H. L. TAYLOR, *J. Amer. chem. Soc.* **68**, 459 [1946].

²⁶ G. ALDERTON u. H. I. FEVOLD, *J. biol. Chemistry* **164**, 1 [1946].

Die elektrophoretischen Untersuchungen der Proteine wurden in einem Tiselius-Apparat der Firma Aminco durchgeführt. Die Beweglichkeiten (U) wurden aus den Grenzwerten des auf- und absteigenden Zweiges und aus dem Abstand der Komponente von einer konstanten Eichlinie der Zelle berechnet. Die Sedimentations-Konstanten wurden nach SVEDBERG und PETERSEN²⁷ auf Grund der in der Phywe-Ultrazentrifuge ermittelten Werte errechnet.

Zur Analyse der Proteine wurden diese 18 h bei 100° mit 5-n. HCl hydrolysiert. Nach der Entfernung der Salzsäure im Vakuumexsikkator über KOH und konz. H₂SO₄ wurden diese Hydrolysate unter weitgehender Anwendung der Hochspannungs-Elektrophorese (WIELAND und Mitarbb.²⁸), Papierchromatographie, Photometrischer Bestimmungsmethoden und Retentionsanalyse (WIELAND und FISCHER²⁹) nach einem von uns ausgearbeiteten, relativ einfachen Analysengang³⁰ in ihre einzelnen Komponenten aufgetrennt und quantitativ bestimmt.

Die Ermittlung der amino-endständigen Aminosäuren wurde mit Dinitrofluorbenzol nach SANGER durchgeführt³¹. Nach der Hydrolyse des DNP-Proteins wurde die Salzsäure wie oben im Vakuum entfernt. Die Identifizierung des DNP-Derivates erfolgte durch Hochspannungs-Papierlektrophorese, welche mit der Chromatographie völlig übereinstimmende Ergebnisse lieferte. Die Bestimmung der carboxyl-endständigen Aminosäure wurde durch schrittweisen enzymatischen Abbau des Proteins mit Carboxypeptidase in der folgenden Weise durchgeführt: Zu 100 mg des Proteins in 3 ml Phosphatpuffer (0,1-molar; p_H 7,6) wurden 5 mg kristallisierter Carboxypeptidase (Bios, New York) gelöst in 2 ml desselben Puffers zugefügt. Die enzymatische Reaktion wurde bei 30° durchgeführt und alle 2–5 min dem Reaktionsansatz eine Probe entnommen, in der die Reaktion sofort durch Zusatz der gleichen Menge 1-n. HCl und des 6–8-fachen Volumens Aceton unterbrochen wurde. Nach kurzem Stehen bei 0° wurde der Niederschlag in der Kühlzentrifuge sedimentiert und die überstehende Lösung im Vakuum bei 0° stark eingeeengt. Die Identifizierung und Bestimmung der Aminosäuren erfolgte anschließend wieder durch Hochspannungs-Pherographie bei verschiedenen p_H -Werten.

Die biologische Aktivität des Lysozims wurde an *Micrococcus lysodeicticus* nach CASELLI getestet³².

Die Bestrahlungen wurden mit der Dermopan-Anlage von Siemens durchgeführt. Die Proben wurden in kleinen Al-Schälchen bis fast unmittelbar an das Be-Fenster herangeführt. Die Schälchen ruhten auf einem Cu-Block, wodurch stets eine gleichbleibende Temperatur von 20 bis 25° in den Schälchen gewährleistet war. Daten der Apparatur unter Versuchsbedingungen: 45 kV; 25 mA; Dosisleistung ca. 10⁶ r in 2 mm Abstand vom Be-Fenster.

Ergebnisse

Tiselius-Elektrophorese

In einigen Voruntersuchungen fanden wir, daß nach Bestrahlung mit einer Dosis von 0,5 bis 2 · 10⁶ r deutliche Veränderungen der bestrahlten Proteine (Aufzählung derselben s. unter Material und Arbeitsmethoden) gegenüber den unbestrahlten mit Hilfe der elektrophoretischen Arbeitsmethodik nicht aufgefunden werden konnten. Eine Ausnahme bildete das Lysozym. Daher war es für uns zunächst von Interesse das Verhalten von Lysozym gegenüber Röntgenstrahlen zu untersuchen. Das vor allem auch, weil sich dieses Protein – wie wir bereits in einer vorläufigen Mitt. an anderer Stelle berichteten³³ – dadurch auszeichnet, daß es 1. sehr leicht einheitlich und kristallisiert gewonnen werden kann, daß es 2. eines der kleineren bekannten Proteinmoleküle darstellt, dessen Aminosäure-Zusammensetzung recht gut bekannt ist (s. auch DOSE und CAPUTO³⁰), und daß es sich 3. hier um ein Protein mit eingehend untersuchter enzymatischer Aktivität handelt.

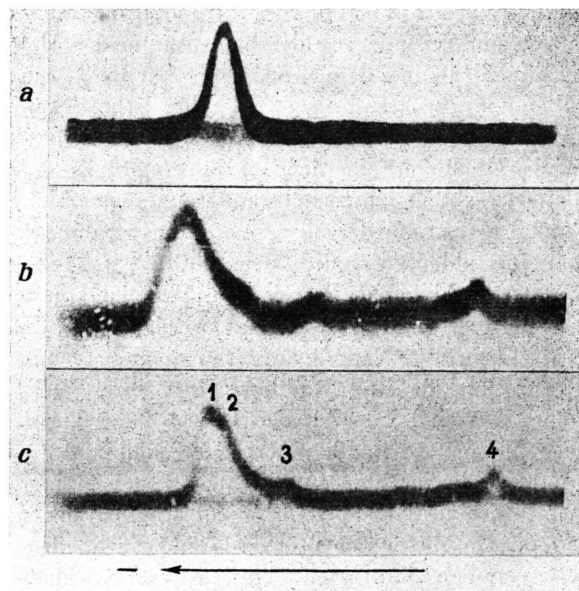


Abb. 1. Elektrophorese-Diagramm (Tiselius-Elektrophorese) von unbestrahltem (a), 2 · 10⁶ r (b) und mit 5 · 10⁶ r (c) bestrahltem Lysozym. Die Aufnahmen wurden am aufsteigenden Zweig gemacht. Phosphatpuffer p_H 7,0; Ionenstärke 0,1 (nach MILLER und GOLDER³⁴).

²⁷ T. SVEDBERG u. O. PETERSEN, „The Ultracentrifuge“ Oxford Press 1940.

²⁸ TH. WIELAND u. Mitarbb., Angew. Chem. **67**, 257 [1955].

²⁹ TH. WIELAND u. EDG. FISCHER, Naturwissenschaften **35**, 29 [1948].

³⁰ K. DOSE u. A. CAPUTO, Biochem. Z. **328**, 376 [1956].

³¹ F. SANGER, Biochem. J. **39**, 507 [1946].

³² P. CASELLI, Boll. Soc. ital. Biol. sperim. **22**, 57 [1946].

³³ A. CAPUTO u. K. DOSE, Nature [London] **78**, 209 [1956].

³⁴ G. L. MILLER u. R. H. GOLDER, Arch. Biochem. Biophysics **29**, 420 [1950].

Abb. 1 zeigt das elektrophoretische Verhalten von unbestrahltem (a) und mit 2 und 5 Millionen r bestrahltem Lysozym.

Aus diesen Diagrammen ist ersichtlich, daß Lysozym durch Bestrahlung mit der genannten Dosis seine Homogenität verliert. An der anodischen Seite der Hauptfraktion tritt eine Asymmetrie auf. Ferner können zwischen ihr und dem Start einige langsamer wandernde Fraktionen beobachtet werden. Eingehendere quantitative Untersuchungen zeigten eine Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeiten aller durch Bestrahlung von Lysozym erhaltbarer Proteinfractionen gegenüber dem nicht bestrahlten Protein. In Abb. 2 sind die Beweglichkeiten als Funktion des p_H -Wertes graphisch dargestellt.

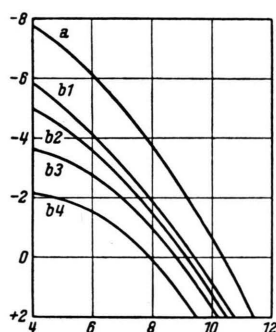


Abb. 2. Beweglichkeit des unbestrahlten (a) und des bestrahlten Lysozyms (b) (Dosis 5 Millionen r) als Funktion des p_H -Wertes. Ordinate: Wasserstoffionen-Konzentration (p_H). Abszisse: Elektrophoretische Beweglichkeit ($U \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$); a: unbestrahltes Lysozym; b_1, b_2, b_3, b_4 : Fraktionen des mit $5 \cdot 10^6$ r bestrahlten Lysozyms; s. auch Einteilung derselben in Abb. 1 c.

Aus den hier dargestellten Kurven lassen sich für die einzelnen Fraktionen von bestrahltem und unbestrahltem Lysozym folgende isoelektrische Punkte ermitteln (Tab. 1):

Fraktion	Isoelektrischer Punkt
a	10,4
b_1	9,4
b_2	9,2
b_3	8,9
b_4	8,0

Tab. 1. Isoelektrische Punkte der einzelnen Fraktionen.

Eine Bestätigung für die Verschiebung des isoelektrischen Punktes von bestrahltem Lysozym kann auch durch Untersuchung der Löslichkeit des Pro-

teins in Abhängigkeit vom p_H -Wert des Mediums erhalten werden.

Zwischen p_H 7 und 12 ist der Rückgang der Löslichkeit des bestrahlten Lysozyms deutlich sichtbar. In Abb. 3 werden diese Verhältnisse veranschaulicht durch die Änderung der Trübung gleich konzentrierter Lösungen von unbestrahltem (a) und bestrahltem (b) Lysozym in Abhängigkeit vom p_H -Wert.

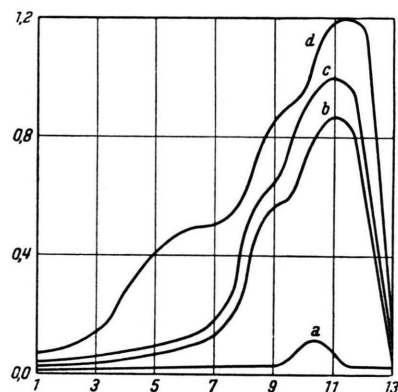


Abb. 3. Trübung gleichkonzentrierter Lysozymlösungen [unbestrahlt (a) und bestrahlt (b)] bei verschiedenen p_H -Werten. Kurve (c) = Summe der Ordinatenwerte von (a) und (b); Kurve (d): experimentell gefundene Werte; bestrahltes: unbestrahltes Lysozym=1:1. Doppelte Gesamtkonzentration an Protein gegenüber (a) und (b). Ordinate: Optische Dichte; Abszisse: H-Ionenkonzentration (Glycin/HCl/NaOH-Puffer).

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung von mit Hilfe der Elektrophorese festgestellten Verschiebungen des isoelektrischen Punktes, sowohl für die Hauptfraktionen (b_1) wie auch für die Nebenfraktionen ($b_3 - b_4$) nach Werten zwischen 9,5 und 8.

Sedimentations-Konstante

In Abb. 4 sind die Sedimentations-Diagramme (Phywe-Zentrifuge) von unbestrahltem (a) und bestrahltem (b) Lysozym nebeneinander wiedergegeben.

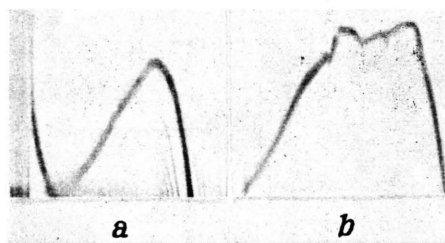


Abb. 4. Sedimentations-Diagramm von unbestrahltem (a) und bestrahltem (b) Lysozym. Phosphat-Puffer nach Miller-Golder; p_H 7,0; 48 750 U/Min.; Aufnahmen 2 Stdn. nach Beginn.

Hieraus geht hervor, daß im bestrahlten Lysozym mindestens 3 starke Komponenten mit vergrößerter Sedimentations-Konstante beobachtet werden können. Die Werte für die Sedimentations-Konstanten (errechnet nach der Svedbergschen Gleichung) sind die folgenden:

Lysozym (unbestrahlt):

$$S_{20} = 2,4 \cdot 10^{-13},$$

Lysozym bestrahlt 1. Haupt-Komponente:

$$S_{20} = 3,2 \cdot 10^{-13},$$

Lysozym bestrahlt 2. Haupt-Komponente:

$$S_{20} = 6,0 \cdot 10^{-13},$$

Lysozym bestrahlt 3. Haupt-Komponente:

$$S_{20} = 7,1 \cdot 10^{-13}.$$

Untersuchungen an den Hydrolysaten

Es ist möglich, mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese einige sehr deutliche Veränderungen in den Hydrolysaten des bestrahlten Lysozyms gegenüber denen des unbestrahlten Proteins festzustellen.

In Abb. 5 wird die Auftrennung eines Hydrolysates von unbestrahltem (a) und mit 5 Millionen r bestrahltem (b) Lysozym wiedergegeben. Die Auftrennung erfolgte bei p_H 6,0 und einem elektrischen Feld von 40 V/cm in 50 Minuten. Deutlich erkennbar ist auf diesen Pherogrammen das Auftreten einiger neuer Fraktionen, vor allem auf der kathodi-

schen Seite, von denen besonders die 4 stark basischen Fraktionen, jenseits der hier am schnellsten wandernden basischen Aminosäure (Lysin), auffallen.

In weiteren Versuchen wurden die in einer 25 cm langen Linie auf 30×30 cm Bogen (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b) aufgetragenen Hydrolysate ebenfalls bei p_H 6,0 aufgetrennt. Auf einem Randstreifen wurde dann die Lage der einzelnen Fraktionen mit Ninhydrin festgestellt und diese darauf ausgeschnitten und eluiert. Die Fraktion der sauren Aminosäuren konnte dann in 1-n. Essigsäure bei p_H 2,3 und 65 V/cm während 45 Min. aufgetrennt werden. Abb. 6 gibt die unter diesen Bedingungen erhaltene Auftrennung der sauren Fraktion aus dem Hydrolysat des mit 5 Millionen r bestrahlten Lysozyms wieder. Wie ersichtlich tritt neben den beiden sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure eine neue saure Aminosäure mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 3,5 und 4 auf. Über die Natur dieser Aminosäure sind uns vorläufig noch keine weiteren Angaben möglich.

Das Eluat der neutralen Aminosäuren wurde bei p_H 1,9 (15% Eisessig, 5% Ameisensäure in Wasser) in einem elektrischen Feld von 40–55 V/cm während 80–60 Min. aufgetrennt. Abb. 7 gibt zum Vergleich die Auftrennung der neutralen Aminosäuren der Hydrolysate von unbestrahltem (a) und bestrahltem (b) Lysozym nebeneinander wieder. Besonders auffällig ist das Auftreten einer neuen –

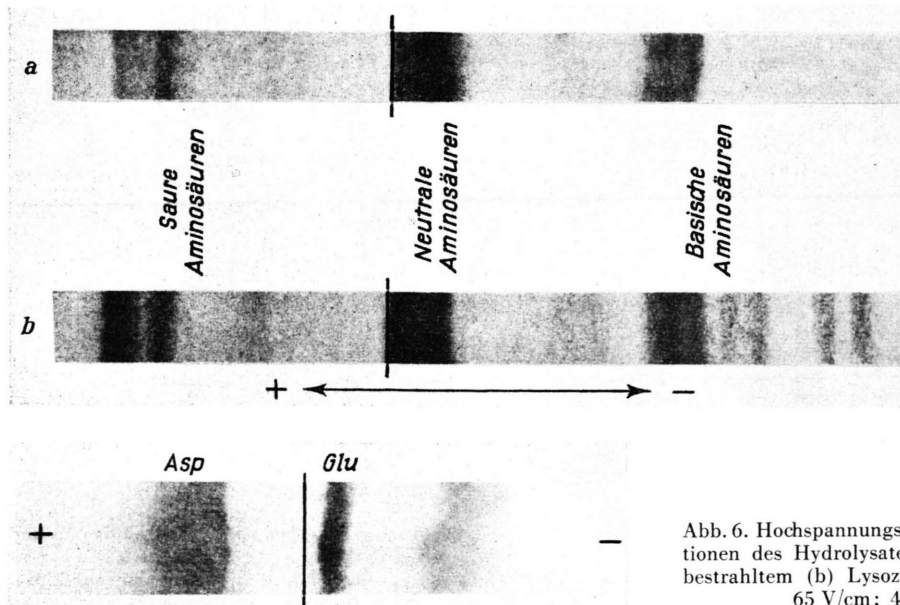


Abb. 5. Hochspannung-Pherographie der Hydrolysate von unbestrahltem (a) und bestrahltem (b) Lysozym; p_H 6,0. — Puffer: 10% Pyridin, 1% Eisessig in Wasser; 40 V/cm; 50 Min. Gleicher Stickstoffgehalt auf beiden Pherogrammen. Entwicklung mit Ninhydrin.

Abb. 6. Hochspannung-Pherographie der sauren Fraktionen des Hydrolysates von unbestrahltem (a) und bestrahltem (b) Lysozym. p_H 2,3 (1-n. Essigsäure); 65 V/cm; 45 Min.; Ninhydrin.

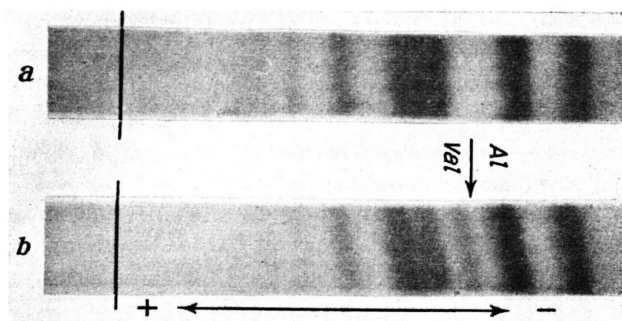


Abb. 7. Pherogramme der neutralen Aminosäuren der Hydrolysate von unbestrahltem (a) und bestrahltem (b) Lysozym; p_H 1,9; Puffer (15% Eisessig, 5% Ameisensäure in Wasser); 40–55 V/cm; 80–60 Min.; Entwicklung mit Ninhydrin.

recht starken Fraktion zwischen Valin und Alanin. Für weitere Untersuchungen wurde diese Fraktion in der geschilderten Weise eluiert. Chromatographische und elektrophoretische Analysen ergaben, daß diese Fraktion nicht einheitlich erhalten werden kann. Namentlich elektrophoretische Untersuchungen bei p_H 6,0 zeigten, daß sie stets in mindestens eine basische und eine neutrale Fraktion aufspaltbar ist. Die Untersuchungen über die Natur dieser Fraktion sind noch nicht abgeschlossen.

Um näheren qualitativen Aufschluß über die zu beobachtenden Amine zu erhalten, wurde eine relativ große Menge von ca. 20 mg des Hydrolysates bei p_H 6 wie oben aufgetrennt. Die nun in gut faßbaren Konzentrationen vorliegenden basischen Fraktionen konnten so auf ihre Identität hin untersucht werden. Durch Vergleich mit einigen Handelspräparaten von Aminen wie auch mit den aus Aminosäuren direkt hergestellten Aminen³⁵ konnte dabei folgende Fraktion mit großer Wahrscheinlichkeit identifiziert werden (s. Abb. 8):

Ammoniak (1), Methylamin (2), Äthylamin (3), Pyrrolidin (4 – auf der Abbildung nicht sichtbar), 2 unbekannte Fraktionen (5 und 6), Phenyläthylamin (7), welche alle schneller wandern als die hier am schnellsten wandernde Fraktion der basischen Aminosäure (8).

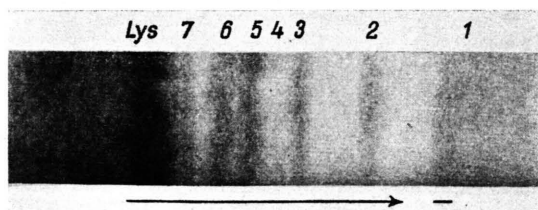


Abb. 8. Pherographie der basischen Komponenten im Hydrolysat von mit 5 Millionen r bestrahltem Lysozym (ca. 20 mg Hydrolysat/Ansatz; neutrale und saure Fraktionen fehlen). p_H 6 (Pyridin-Eisessig-Puffer); 35 V/cm; 40 Min.; Ninhydrin.

In den Eluaten der basischen Aminosäuren selbst konnten qualitative Unterschiede zwischen bestrahltem und unbestrahltem Lysozym nicht gefunden werden. Jedoch ergab eine quantitative Total-Analyse der Hydrolysate mit Hilfe hochspannungserographischer, chromatographischer, retentionsanalytischer und kolorimetrischer Methoden – (eine Darstellung dieser Methoden werden wir an anderer Stelle bringen³⁰) – deutliche Unterschiede zwischen unbestrahltem und bestrahltem Lysozym, wobei besonders die Abnahme des Gehaltes an den basischen Aminosäuren wie auch das Neuaufreten verschie-

	unbestr. Lysozym	bestr. Lysozym
Glutaminsäure	4,40	3,82
Asparaginsäure	18,40	18,00
Arginin	13,70	11,90
Lysin	5,94	4,51
Histidin	1,60	0,48
Alanin	6,10	5,90
Glycin	5,40	5,39
Valin	4,80	4,70
Leucin	6,80	6,80
Isoleucin	5,31	5,19
Serin	6,28	6,15
Threonin	5,40	5,37
Cystein/2	6,20	5,90
Methionin	2,18	2,10
Prolin	1,60	1,30
Tryptophan	8,40	7,94
Tyrosin	4,80	4,70
Phenylalanin	3,23	3,00
Unbekannte saure Fraktion	—	0,30
Unbek. neutrale Fraktion	—	1,00
Ammoniak	—	0,70
Methylamin	—	0,40
Pyrrolidin	—	0,20
Äthylamin	—	0,50
Phenyläthylamin	—	0,40
Andere basische Verbindgn.	—	0,90

Tab. 2. Zusammensetzung von unbestrahltem und mit 5 Millionen r bestrahltem Lysozym.

³⁵ K. DOSE, Nature [London] 1957, im Druck; K. DOSE, Chem. Ber. 1957, im Druck.

dener Amine und verwandter Verbindungen in den Hydrolysaten bestrahlten Lysozyls offenkundig werden lassen, daß wir es im bestrahlten Lysozym mit mindestens einem – sicherlich jedoch mehreren *neuen* Proteinen zu tun haben. Diese Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Hieraus ist im einzelnen ersichtlich: Unter den sauren Aminosäuren eine Abnahme der Glutaminsäure um ca. 11%, unter den basischen Aminosäuren eine Abnahme um 9% für Arginin, 7% für Lysin und 20% für Histidin, unter den neutralen Aminosäuren fällt der Rückgang des Cysteins (10%), des Prolins (8%), des Tryptophans (9%) und des Phenylalanins (9%) auf. Die Analyseergebnisse für die im Hydrolysat des bestrahlten Lysozyls neu auftretenden Verbindungen sind im unteren Teil dieser Tabelle zusammengefaßt.

Untersuchung der endständigen Aminosäuren

Um eine Aussage zu treffen über die α -aminoendständige Gruppe des bestrahlten Lysozyls, wurde nach SANGER³¹ die Kupplung des Proteins mit Dinitrofluorbenzol vorgenommen. Das Hydrolysat des DNP-Lysozyls (bestrahlt) enthielt, wie u. a. durch Hochspannungs-Elektrophorese bei p_H 1,9 und p_H 6,0 nachgewiesen werden konnte, genau wie das unbestrahlte Lysozym offensichtlich nur Lysin als *N*-terminale Aminosäure, womit dieses Ergebnis in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von THOMPSON³⁶ steht, der ebenfalls als *N*-terminale Aminosäure für Lysozym das Lysin erkannte. In Abb. 9 ist die hochspannungs-pherographische Auftrennung bei p_H 1,9 des Hydrolysates von DNP-Lysozym un-

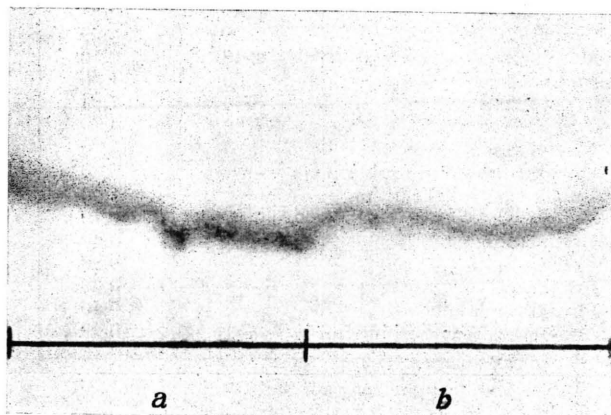


Abb. 9. Hochspannungs-pherographie der Hydrolysate von DNP-Lysozym [unbestrahlt (a) und bestrahlt (b)] bei p_H 1,9; 40 V/cm; 60 Minuten.

bestrahlt (a) und bestrahlt (b) direkt nebeneinander wiedergegeben. Die einzige gelbe kathodisch wandernde Bande wurde als α -Mono DNP-Lysin erkannt.

Um einen ersten Überblick über die carboxyl-endständigen Aminosäuren des bestrahlten Lysozyls in Vergleich zu unbestrahltem zu finden, wandten wir die enzymatische Technik mit Carboxypeptidase an. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von THOMPSON³⁷ fanden auch wir als carboxyl-endständige Aminosäure Leucin für unbestrahltes Lysozym, dagegen für das bestrahlte Lysozym neben Leucin noch einige weitere Aminosäuren, bei denen es sich offenbar um Tryptophan, Tyrosin, Cystein und Arginin handelt. In Abb. 10 ist eine elektrophoretische

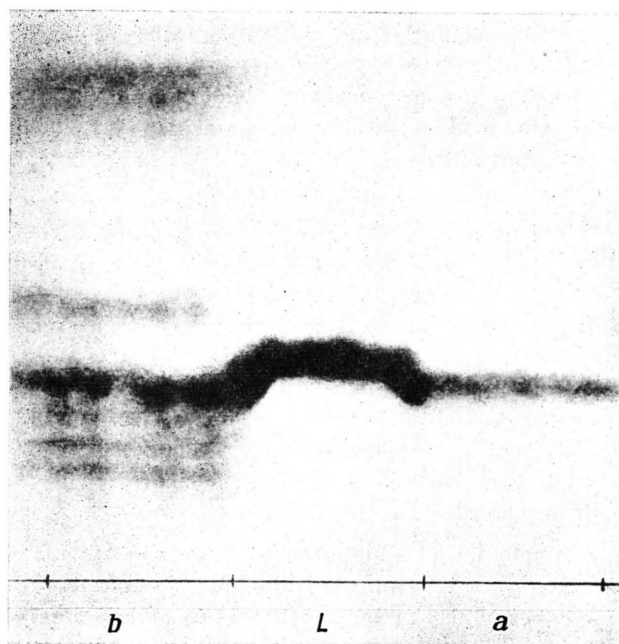


Abb. 10. Hochspannungs-pherogramm der durch Carboxypeptidase aus unbestrahltem (a) und bestrahltem (b) Lysozym abgespaltenen Aminosäuren. In der Mitte Leucin (L) Kontrolle. p_H 1,9; 45 V/cm; 60 Min.; Ninhydrin.

Auftrennung der Aminosäuren wiedergegeben, wie sie bei der Anwendung der beschriebenen Technik nach 10-minütiger Einwirkung von Carboxypeptidase bei 30 Grad auf unbestrahltes (a) und bestrahltes (b) Lysozym erhalten werden kann. Im Mittelstreifen lief zur Kontrolle Leucin (L) allein mit. Das in Teil b zu beobachtende Ammoniak (1) ent-

³⁶ A. R. THOMPSON, Nature [London] 168, 390 [1951].

³⁷ A. R. THOMPSON, Nature [London] 169, 495 [1952].

steht unabhängig von der Einwirkung des Fermentes schon bei der Auflösung des bestrahlten Proteins in Wasser.

Biologische Aktivität: Die Untersuchungen der biologischen Aktivität von unbestrahltem und bestrahltem Lysozym gegenüber *Micrococcus lysodei-ticus* nach CASELLI³² zeigte keine deutliche Änderung der Aktivität von Lysozym nach der Bestrahlung.

Diskussion

Aus den oben angezeigten Ergebnissen lassen sich einige interessante Folgerungen ziehen. Aus dem elektrophoretischen (Tiselius-Elektrophorese) Verhalten des bestrahlten Lysozyms ist es klar ersichtlich, daß dieses Protein durch Bestrahlung in mehrere voneinander verschiedene Komponenten übergeführt wird.

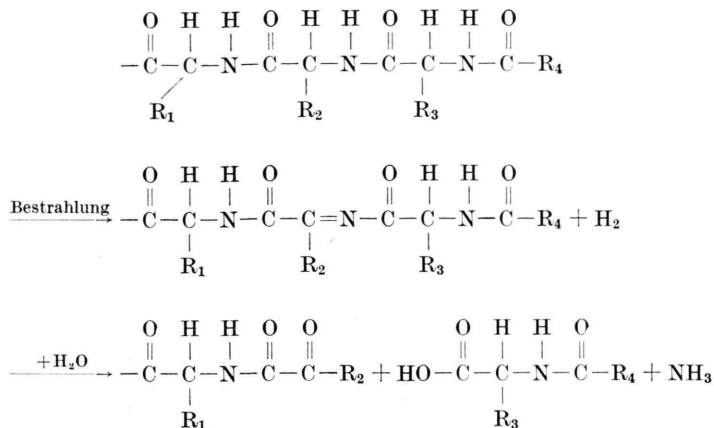
Die Verschiebung des isoelektrischen Punktes nach der sauren Seite bei allen mit Hilfe der elektrophoretischen Methodik beobachtbaren Komponenten des bestrahlten Lysozyms steht in ausgezeichneter Übereinstimmung mit anderen Ergebnissen chemischer Natur. Nach Bestrahlung von Lysozym mit Dosen zwischen 5 und 30 Millionen r konnten direkt aus der wäßrigen Proteinlösung durch Hochspannungs-Elektrophorese verschiedene Amine (bei 5 Millionen r ca. 0,6% des Gesamt-N) und Ammoniak (bei 5 Millionen r ebenfalls ca. 0,6% des Gesamt-N) abgetrennt werden, deren Menge bezogen auf das gesamte Protein-Molekül von sich aus ohne weiteres eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes im bestrahlten Lysozym verständlich machen kann, wenn man sich vorstellt, daß z. B. ein Kettenmolekül wie das des Lysins oder Arginins in der Mitte zerbrochen wird, wobei auf der einen Seite Amine frei werden, auf der anderen Seite aber die in der Peptidkette gebundene α -Amino-carboxylgruppierung nicht verändert wird. Diese Annahme wird gestützt durch strahlenchemische Reaktionen wie sie auch z. B. bei Bestrahlung kristallisierten Lysins beobachtet werden können³⁸. Es muß hier jedoch noch hervorgehoben werden, daß nach bisherigen Untersuchungen die Energieausbeuten für die hier aufgefundenen strahlenchemischen Reaktionen, beim Lysozym etwa um den Faktor 10, höher liegen als im

Durchschnitt bei den einzelnen freien Aminosäuren. Sehr deutlich zeigte sich dieser Unterschied bei der Bestrahlung eines Aminosäuregemisches, welches in seiner Zusammensetzung dem Totalhydrolysat des Lysozyms entsprach. Etwa mit 50 Millionen r mußte bestrahlt werden, um eine Gesamtsumme strahlenchemischer Reaktionen, der Größe wie bei mit 5 Millionen r bestrahltem Lysozym nachweisbar, aufzufinden. Es muß jedoch schon an dieser Stelle gesagt werden, daß die strahlenchemischen Reaktionen des Proteins sich von denen des Modell-Hydrolysates sowohl quantitativ wie auch weitgehend qualitativ deutlich unterscheiden. Wesentlich schwieriger ist es, eine Erklärung abzugeben für das Auftreten von NH_3 nach Auflösen des trocken bestrahlten Proteins in Wasser. Da von vornherein angenommen werden mußte, daß die Abspaltung von Ammoniak aus dem Protein in dem gefundenen Ausmaß nicht auf eine einfache strahlenchemische Primärreaktion zurückgeführt werden kann, war zu vermuten, daß hier durch Hydrolyse des bestrahlten Proteins beim Auflösen in Wasser erst das NH_3 freigesetzt werden würde. Eine derartig leicht verlaufende Hydrolyse konnte aber ihre Erklärung nur darin finden, daß ein kleiner Teil der α -Aminoacyl-Bindungen der Peptidkette des Proteins durch die Bestrahlung in eine α -Iminoacyl-Bindung übergeführt wurde, deren leichte Hydrolysierbarkeit schon lange bekannt ist. Unter dieser Voraussetzung hätte es daher unter Aufspaltung der Peptidkette an dieser Bindung auf der einen Seite zur Bildung eines *N*- α -Ketoacylpeptides oder Proteins (I) und auf der anderen Seite zur Bildung einer neuen Peptidkette (II) mit wahrscheinlich einer von Leucin verschiedenen carboxyl-endständigen Aminosäure kommen müssen (Formel s. S. 180, oben).

Obwohl diese Folgerungen gestützt werden durch die Entdeckung mehrerer ketonhaltiger* Protein-Fractionen nach der Hochspannungs-Elektrophorese des bestrahlten Lysozyms und durch die Tatsache, daß im bestrahlten Lysozym außer Leucin eine Reihe anderer Aminosäuren als carboxyl-endständig angesehen werden muß, während Lysin auch im bestrahlten Lysozym als einzige amino-endständige Aminosäure in Frage kommt [*N*- α -Ketoacylpeptidkette (I) als 2. Spaltstück] – bedarf diese Annahme noch einiger weiterer experimenteller Beweise, über

³⁸ K. Dose, in Vorbereitung.

* Entwicklung des Papier-Pherogramms mit Dinitrophenylhydrazin/HCl.



die sobald wie möglich ebenfalls in dieser Zeitschrift berichtet werden wird³⁸.

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse kann nicht gefolgert werden, daß jedes Mol. bei Bestrahlung mit einer Dosis von 2 bis 5 Millionen r verändert wird, obwohl wir auf Grund der elektrophoretischen Untersuchungen (Tiselius-Elektrophorese der Proteine) feststellen mußten, daß keine Proteinfraktion mit der Beweglichkeit des unbestrahlten Mol. schon im mit 2 Millionen r bestrahlten Lysozym mehr nachweisbar war. Aber wir müssen das ausgezeichnete Vermögen des Lysozyms in Betracht ziehen, mit anderen weniger basischen Proteinen stabile Komplexe zu bilden. So konnte gezeigt werden, daß die Abhängigkeit der Löslichkeit vom p_{H} -Wert beim unbestrahlten Lysozym allein eine andere ist als beim bestrahlten. In Abb. 3, Kurve (a) Lysozym (unbestrahlt) und (b) Lysozym (bestrahlt), wurde hierzu die Trübung gleichkonzentrierter Lösungen in relativen Einheiten als Funktion des p_{H} -Wertes dargestellt. Addiert man nun die Ordinatenwerte beider Kurven, so erhält man Kurve (c). Der Verlauf dieser Kurve ist namentlich im p_{H} -Bereich zwischen 3 und 8 wesentlich verschieden von dem Verlauf der experimentell ermittelten Kurve (d), durch welche die Trübung einer Mischung von unbestrahltem und mit 5 Millionen r bestrahltem Lysozym im Verhältnis 1:1 [doppelte Gesamtkonzentration an Protein gegenüber (a) und (b)] dargestellt wird. Eine Komplexbildung zwischen dem stark basischen Lysozym und seinem weniger basischen Bestrahlungsprodukt könnte auch hiernach als einfache Erklärung für diese Erscheinung vermutet werden.

Aus den Untersuchungen der biologischen Aktivität des bestrahlten Lysozyms ist zu folgern, daß für die biologische Wirksamkeit wichtige Gruppierungen im Molekül durch die Bestrahlung nicht zerstört werden. Dieses Ergebnis ist sehr wohl zu unterscheiden von den Untersuchungen von BARRON, AMBROSE und JOHNSON³⁹, welche Lysozym in wäßriger Lösung bestrahlten. Diese Autoren fanden hierbei eine Abnahme der biologischen Aktivität, welche jedoch hier eine einfache Erklärung in der oxydierenden Wirkung der Röntgenstrahlen auf wäßrige Lösungen aromatischer Aminosäuren und deren Peptide oder Proteine, namentlich auf Tyrosin, finden dürfte. Konnten doch schon 1950 KERTESZ und CASELLI⁴⁰ eine starke Empfindlichkeit der biologischen Aktivität dieses Proteins gegenüber einem Brenzkatechin-Phenoloxydase-System auffinden. Im Gegensatz zur Bestrahlung wäßriger Lysozym-Lösungen wird das UV-Absorptionsspektrum des in Substanz bestrahlten Proteins nach unseren Untersuchungen nicht verändert.

Es ist uns eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. Dr. Boris Rajewsky für seine äußerst rege Teilnahme an unserer Arbeit, deren materieller Unterstützung, vielen nützlichen Anregungen und Diskussionen auch an dieser Stelle auf das herzlichste zu danken. Weiterhin gilt unser Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung einer Sachbeihilfe (an Dr. K. D.). Den technischen Hilfskräften Fr. Ingeborg Jakob und Fr. Lotte Saß haben wir gleichfalls für sorgfältige Mitarbeit sehr zu danken.

³⁹ E. S. GUZMAN BARRON, J. AMBROSE u. PH. JOHNSON, Radiat. Res. **2**, 145 [1955].

⁴⁰ D. KERTESZ u. P. CASELLI, Bull. Soc. Chim. biol. **32**, 583 [1950].