

die immunologische Teilspezifität oder Identität mit dem Makroglobulin der M.W. verantwortlich ist, ist bislang nicht aufgeklärt. Man muß vermuten, daß es sich um ein Makroglobulin des menschlichen Normalserums handelt. Das hochmolekulare α_2 -Glykoprotein $S_{20,w}^{0,8} = 19 - 20^{40}$ ließ in von uns durchgeführten Untersuchungen keinen Anhaltspunkt für eine Teilspezifität mit Makroglobulinen der M.W. erkennen. Ein in neuerer Zeit von KUNKEL⁴¹ aus Normalserum isoliertes hochmolekulares γ_1 -Globulin ist unter diesem Aspekt noch nicht untersucht worden.

Die Anwendung der Immuno-Elektrophorese bei pathologischen Serumveränderungen zeigte bislang signifikante Unterschiede gegenüber dem Normalserum beim Plasmocytom. GRABAR, FAUVERT, BURTIN und HARTMANN^{26, 27} beschrieben Abweichungen im Bereich der β_2 - und schneller wandernder γ -Globuline. Die von uns erhobenen besonderen immunoelektrophoretischen Befunde bei der M.W. liegen in erster Linie im Bereich der gleichen elektrophoretischen Beweglichkeit, gewisse Ähnlichkeiten sind unverkennbar, eine eindeutige Unterscheidung ermöglicht die Verwendung spezifischer Antiseren.

⁴⁰ H. E. SCHULTZE, I. GÖLLNER, K. HEIDE, M. SCHÖNENBERGER u. G. SCHWICK, Z. Naturforsch. **10b**, 463 [1955].

⁴¹ H. J. MÜLLER-EBERHARD, H. G. KUNKEL u. E. L. FRANKLIN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **93**, 146 [1956] u. persönl. Mitteilung.

Anm. b. d. Korr.: Folgende in der Zwischenzeit veröffentlichte Untersuchungen über Makroglobulinämie Waldenström konnten bei der Diskussion unserer Ergebnisse nicht mehr berücksichtigt werden:

⁴² P. BURTIN, L. HARTMANN, J. HEREMANS, J. J. SCHEIDEGGER, F. WESTENDORP-BOERMA, R. WIEME, CH. WUNDERLY, R. FAUVERT u. P. GRABAR, Rev. franc. Études Chim. Biol. **II**, 161 [1957].

⁴³ F. WESTENDORP-BOERMA u. E. MANDEMA, J. Lab. clin. Med. **49**, 358 [1957].

⁴⁴ A. H. SEHON, L. GYENES, J. GORDON, M. RICHTER u. B. ROSE, J. clin. Invest. **36**, 456 [1957].

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

II. Untersuchung an Peptiden und Aminosäuren

Von BORIS RAJEWSKY und KLAUS DOSE

Aus dem Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.
(Z. Naturforsch. **12b**, 384—393 [1957]; eingegangen am 3. Januar 1957)

Die Primärwirkung von Röntgenstrahlen einer Dosis von etwa 0,5 bis 150 Millionen r auf die kristallisierte Trockensubstanz von Aminosäuren und Peptiden wurde mit Hilfe chemischer, biochemischer und physikalisch-chemischer Arbeitsmethoden untersucht. Es wurde gefunden, daß in allen prinzipiell möglichen Fällen folgende Reaktionen stets wiederkehren: Aminbildung infolge Decarboxylierung; Bildung einer α -Imino- bzw. α -Ketocarbonsäure infolge einer Dehydrierung in α - β -Stellung; Bildung von β , γ - bzw. γ - δ -ungesättigten α -Aminocarbonsäuren oder deren γ - bzw. δ -Lactonen; Bruch und Vernetzung der aliphatischen Kohlenstoffketten. Bei Peptiden treten die gleichen Reaktionen wie bei den Aminosäuren auf, jedoch in einem anderen Verhältnis; hinzu kommt die strahlenchemische Dehydrierung einer Peptidbindung an der Aminogruppe zu einer energiereichen Iminoacyl-Bindung, welche bei Gegenwart von Wasser sofort hydrolysiert wird. Endprodukt namentlich bei länger-kettigen Peptiden: Zwei Bruchstücke (daneben NH_3); das eine mit alter amino-endständiger und neuer carboxyl-endständiger Aminosäure und das andere mit der alten carboxy-endständigen Aminosäure, statt Aminogruppe am anderen Ende jetzt Ketogruppe. — In fast allen Fällen wurden die Ionenausbeuten auch quantitativ bestimmt. Die Ionenausbeuten für die Bildung von α -Ketosäuren aus α -Aminosäuren fallen exponentiell mit der eingestrahelten Dosis. Eine relativ einfache Funktion erklärt diese Verhältnisse. Die Ionenausbeute für die Bildung von Brenztraubensäure aus Serin ist dagegen unabhängig von der Dosis.

Vor einigen Jahren gelang es uns, einige Fortschritte in der Frage der Deutung der Grundvorgänge bei der „biologischen Strahlenwirkung“ zu erzielen. Dabei hat sich die Bedeutung der „indirekten Treffer“ (RAJEWSKY) immer wieder gezeigt. Diese

Feststellungen führten uns erneut zu den Fragen der Beeinflussung der biologischen Grundsubstanzen, vor allem Proteine, aber auch Fermente. Diese Untersuchungen wurden im vollen Umfang dadurch ermöglicht, daß durch die Konstruktion von Röntgen-

bestrahlungs-Anlagen sehr hoher Leistung¹ wir die Möglichkeit bekommen haben, sehr große Dosen von Röntgenstrahlen in kurzer Zeit zu verabreichen.

Über die Veränderungen, die Lysozym und andere Proteine bei Bestrahlung ihrer kristallisierten Trockensubstanz mit Röntgenstrahlen erfahren, wurde vor einiger Zeit berichtet². Im Rahmen eines größeren Arbeitsprogrammes wurden diese Untersuchungen nun auch auf Aminosäuren und Peptide ausgedehnt. Die Untersuchung der Strahlenbiologie und Strahlenchemie der Eiweißkörper wird bekanntlich außerordentlich erschwert durch die Konkurrenz von „direkter“ und „indirekter“ Strahlenwirkung bei der Bestrahlung ihrer wäßrigen Lösungen und durch den zusätzlichen Einfluß der strahlenbiologischen Sekundärreaktion bei der Betrachtung biologischer Systeme^{3,4}, wobei die recht starke Abhängigkeit verschiedener strahlenchemischer Sekundärreaktionen (indirekte Treffer) vom Sauerstoffgehalt des Mediums eine Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Röntgenstrahlung auf biologische Systeme noch mehr erschweren. So wertvoll auch die Beiträge verschiedener Autoren über die Wirkung von Röntgenstrahlen z. B. auf wäßrige Lösungen von Aminosäuren^{5,6,7,8} waren, ist es bisher — abgesehen von einigen unübersehbaren Fällen — weder gelungen, eine allgemeine Entscheidung zwischen primärer (direkter Treffer) und sekundärer (indirekter Treffer) strahlenchemischer Reaktion zu geben, noch eine allgemeine Strahlenchemie der Aminosäuren und Peptide aufzurichten. In dieser Arbeit wird der Versuch unternommen, eine Übersicht zu geben über diejenigen strahlenchemischen Veränderungen, welche die natürlichen Aminosäuren und einige niedermolekulare Peptide durch Bestrahlung ihrer kristallisierten Trockensubstanzen erfahren.

Material und Arbeitsmethoden

Sämtliche normalerweise in Proteinen vorkommenden Aminosäuren (Merck, Darmstadt)

Peptide und *N*-Acyl- α -Aminosäuren:
 Glutathion red. (Boehringer u. Söhne)
 Glycyl-Val-Alanin
 Triglycin
 Phalloidin aus *Amanita phalloides* } Geschenk von Herrn Prof. WIELAND, Inst. f. Org. Chem., Ffm.
 γ -Glutamylalanin
N-Benzoylalanin

Hochspannungs-Papierlektrophorese nach WIELAND und Mitarbb.⁹, MICHL¹⁰ und WEBER¹¹.

Hydrolyse der Peptide mit 5-*n*. HCl in 18 Stdn. bei 100° C. Entfernung der Salzsäure anschließend über KOH und konz. H₂SO₄ im Vakuum.

Zum Nachweis von *N*-acyl- α -Aminocarboxyl-Gruppen in Bestrahlungsprodukten des Phalloidins wurden diese mit Carboxypeptidase (Bios, New York) abgebaut.

Ansatz: Zu 0,5 mg des Peptids in 0,5 ml Phosphatpuffer (0,1-*m*.; pH 7,6) wurden 10 γ des Enzyms in 0,1 ml desselben Puffers zugefügt. Die enzymatische Reaktion wurde in 2–18 Stdn. bei 30 Grad durchgeführt.

Die als Bestrahlungsprodukt einiger Aminosäuren auftretende Brenztraubensäure wie auch die aus Glycin entstehende Glyoxylsäure wurde mit Milchsäuredehydrogenase und hydriertem Diphosphorpyridin-nucleotid (DPNH) in einem optischen Test nach KUBOWITZ und OTT¹² bestimmt. Andere durch Bestrahlung von Aminosäuren entstehende α -Ketocarbonsäuren wurden nach einem Verfahren von FRIEDEMANN und HAUGEN¹³ quantitativ bestimmt. Für die Identifizierung der einzelnen Verbindungen auf den Elektrophogrammen wurden folgende Reagenzien benutzt:

Aminocarbonsäuren	} 2% Ninhydrin in <i>n</i> -Butanol,
Amine	
Ketoverbindungen	1% 2,4-Dinitro-phenylhydrazin in 2- <i>n</i> . HCl,
Indolkörper	1% Zimtaldehyd in Methanol, nach dem Besprühen einhängen in gesättigte HCl-Atmosphäre,
Sulphydrylverbindungen	Wäßrige Lösung von Natriumnitrosopentacyanoferrat (III). Dann einhängen in gesättigte NH ₃ -Atmosphäre,
Phenole	Paulys Diazoreagenz.

Die Bestrahlungen erfolgten in der Dermopan-Anlage von Siemens. Die Proben wurden in kleinen Al-Schälchen bis fast unmittelbar an das Be-Fenster herangeführt. Die Schälchen selbst ruhten auf einem Cu-Block,

¹ B. RAJEWSKY, Jahrbuch der Max-Planck-Gesellschaft, 1952; O. HEUSE, Z. angew. Physik **5**, 361 [1953].
² A. CAPUTO u. K. DOSE, Z. Naturforsch. **12 b**, 172 [1957].
³ W. M. DALE, Biochem. J. **46**, 80 [1942].
⁴ B. RAJEWSKY, Zehn Jahre Forschung physikal. med. Grenzgebiet, Leipzig 1931.
⁵ N. E. SHARPLESS, A. E. BLAIR u. C. R. MAXWELL, Rad. Res. **2**, 135 [1950].
⁶ C. R. MAXWELL, D. C. PETERSON u. W. C. WHITE, Rad. Res. **2**, 431 [1955].

⁷ E. S. G. BARRON, J. AMBROSE u. P. JOHNSON, Rad. Res. **2**, 145 [1955].
⁸ W. M. DALE, J. Chim. physique **48**, 245 [1951].
⁹ Th. WIELAND u. Mitarbb., Angew. Chem. **67**, 257 [1955].
¹⁰ H. MICHL, Chemie **82**, 489 [1951]; **83**, 737 [1952].
¹¹ R. WEBER, Helv. chim. Acta **34**, 2031 [1951].
¹² F. KUBOWITZ u. B. OTT, Biochem. Z. **314**, 94 [1943].
¹³ T. E. FRIEDEMANN u. G. E. HAUGEN, J. biol. Chemistry **144**, 67 [1942].

wodurch stets eine gleichbleibende Temperatur von 20 bis 25 Grad in den Schälchen gewährleistet war. Daten der Apparatur unter Versuchsbedingungen: 45 kV; 25 mA; Dosisleistung ca. 10^6 r pro min in 2 mm Abstand vom Be-Fenster.

Ergebnisse

I. Decarboxylierung

Untersuchungen über die Decarboxylierung von α -Aminocarbonsäuren und deren am Stickstoff acylierten Derivate durch eine direkte Wirkung von Röntgenstrahlen lagen bisher noch nicht vor, jedoch geht aus einer kleinen Zahl anderer Arbeiten hervor, daß eine solche Decarboxylierung bei Bestrahlung wäßriger Lösungen verschiedener Aminosäuren beobachtet werden kann. So fanden z. B. MAXWELL, PETERSON und WHITE⁶ unter den Reaktionsprodukten von in wäßriger Lösung bestrahltem Glycin Methylamin + CO₂ und SHARPLESS, BLAIR und MAXWELL⁵ analog für den Fall des Alanins Äthylamin + CO₂. Jedoch ist auf Grund dieser Untersuchungen eine Unterscheidung zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung nicht möglich. Die Decarboxylierbarkeit aliphatischer Karbonsäuren durch Lichtquanten mit Wellenlängen um 2000 Å wurde bereits vor mehr als 2 Jahrzehnten z. B. von FARKAS und WANSBROUGH¹⁴ näher untersucht.

Als Hauptprodukte der Spaltung werden hierbei das entsprechende Alkan und CO₂ im wesentlichen im Verhältnis 1 : 1 erhalten. Nur zu einem sehr kleinen Teil können auch Dialkyl-Verbindungen beobachtet werden, als Folge einer gegenseitigen Absättigung der Alkylradikale. Als Ergebnis der mit einer Dosis von 80 Mill. r (45 kV – Röntgenstrahlen) in einer Schicht von 30 mg/cm² bestrahlten natürlichen Aminocarbonsäuren zeigte sich, daß diese hierbei vielleicht analog zu der photochemischen Spaltung der aliphatischen Carbonsäuren mit einer Ionenausbeute von etwa 0,5 (gebildete Aminmoleküle/Ionenpaar) * unter Abspaltung von CO₂ in die entsprechenden Amine übergehen.

Eine allgemeine Voraussage über die Ionenausbeuten bei der Decarboxylierung der Aminocarbonsäuren durch Röntgenstrahlen ist jedoch bisher nicht möglich. Mit relativ großen Ausbeuten (um 0,8 M/N) werden z. B. Lysin, Histidin, Leucin, *i*-Leucin und

Phenylalanin decarboxyliert, relativ schwer dagegen merkwürdigerweise z. B. Tyrosin, Tryptophan, Arginin, Serin, Methionin, Threonin, Glycin (Ausbeuten zwischen 0,2 und 0,5 Mol. Amin/Ionenpaar). Für Asparaginsäure und Glutaminsäure ist die Decarboxylierungs-Rate relativ groß, jedoch werden bei diesen Dicarbonsäuren beide Carboxylgruppen mit etwa gleicher Wahrscheinlichkeit abgespalten, so daß im einzelnen die Ionenausbeuten für die daraus entstehenden neutralen Aminosäuren (Alanin + β -Alanin bzw. α - + γ -Aminobuttersäure) etwa gleich hoch sind. Bezogen auf die einzelnen Decarboxylierungs-Produkte liegt daher die Ionenausbeute auf derselben mittleren Höhe wie für die Äthylaminbildung aus Alanin oder die *i*-Butylaminbildung aus Valin (ca. 0,5 Mol./Ionenpaar). Die Abtrennung der Amine erfolgte im allgemeinen in einem Puffer vom p_H 6 (10% Pyridin, 1% Eisessig in Wasser) durch Hochspannungs-Papierelktrophorese bei einem Feld von 40 V/cm in 30 Minuten. Die Amino-Verbindungen wurden mit Ninhydrinreagenz sichtbar gemacht und ihre Anteile durch direkte Bestimmung der Licht-Absorption der einzelnen Fraktionen auf dem Elektropherogramm in einem Photometer (Eppendorf) bestimmt. Die Identifizierung der Decarboxylierungs-Produkte erfolgte mit Hilfe chromatographischer und elektrophoretischer Untersuchungsmethoden durch Vergleich mit präparativ synthetisierten Aminen¹⁵. Das nach Bestrahlung von Cystein zu erwartende Cysteamin ging nach dem Auflösen in Wasser infolge Hydrolyse teilweise in Colamin und Schwefelwasserstoff über.

Tab. 1 zeigt eine Zusammenstellung der durch Bestrahlung der natürlichen α -Aminocarbonsäuren erhaltenen Amine. In Abb. 1 werden die Unterschiede der strahlenchemischen Decarboxylierbarkeit zwischen Glycin und Lysin demonstriert. Bezüglich des Nutzeffektes dieser radiochemischen Decarboxylierungs-Reaktionen muß hervorgehoben werden, daß die Bildung von Aminen aus α -Aminocarbonsäuren einen exothermen Vorgang darstellt, bei dem durch die Strahlenenergie lediglich die Aktivierungswärmen aufzubringen sind. Einige Daten hierüber liegen lediglich vor über Decarboxylierungs-Reaktionen nach dem Ionenmechanismus, nicht jedoch nach dem Radikalmechanismus.

¹⁴ L. FARKAS u. O. H. WANSBROUGH-JONES, Z. physik. Chem. Abt. B **18**, 124 [1932].

* Zahl der gebildeten Moleküle pro Ionenpaar = M/N.

¹⁵ K. DOSE, Nature [London] **179**, 734 [1957]; Chem. Ber. 1957, im Druck.

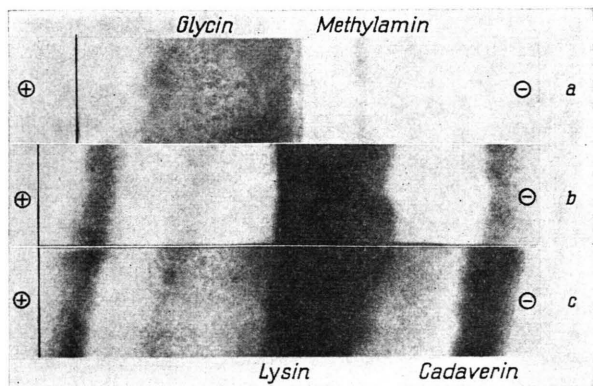


Abb. 1. Hochspannungs-Phorographie der Bestrahlungsprodukte von Glycin (a), p_H 1,9 (15% Eisessig, 5% Ameisensäure) und Lysin (b+c), p_H 6,0 (10% Pyridin, 1% Eisessig); 40 V/cm; 30 Min. Strahlendosis für 1a+1b: 80 Mill. r; für 1c: 160 Mill. r.

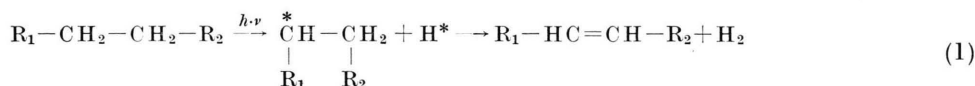
Aminosäuren	Decarboxylierungs-Produkte
Glycin	Methylamin
Alanin	Äthylamin
Valin	<i>i</i> -Butylamin
Leucin	<i>i</i> -Amylamin
<i>i</i> -Leucin	2-Methylbutylamin
Serin	Colamin
Threonin	Methylcolamin
Cystein	Cysteamin + Colamin
Cystin	oxyd. Cysteamin
Methionin	S-Methylhomocysteamin
Prolin	Pyrrolidin
Tryptophan	Tryptamin
Phenylalanin	β -Phenyläthylamin
Tyrosin	Tyramin
Histidin	Histamin
Lysin	Cadaverin
Asparaginsäure	Alanin + β -Alanin
Glutaminsäure	α - + β -Aminobuttersäure

Tab. 1. Die Decarboxylierungs-Produkte der natürlichen α -Aminocarbonsäuren. Röntgenstrahlen: 80×10^6 r. Ionen- ausbeuten 0,2–0,8 Mol./Ionenpaar.

II. Dehydrierungen

Gesättigte aliphatische Kohlenwasserstoff-Verbindungen sind gegenüber Quarz-UV-Licht unempfindlich, da sie in diesem Bereich nicht absorbieren¹⁶. Zum Bruch einer C–H-Bindung ist die Absorption einer Energie von etwa 90 kcal/Mol. bzw. 3,8 eV/Mol. notwendig. Durch die von Röntgenstrahlen ausgelösten Sekundärelektronen kann diese Energie natürlich ohne weiteres aufgebracht werden. Die durch eine Aufspaltung einer C–H-Bindung erhaltenen Radikale (Alkylradikal und H-Atom) suchen sich

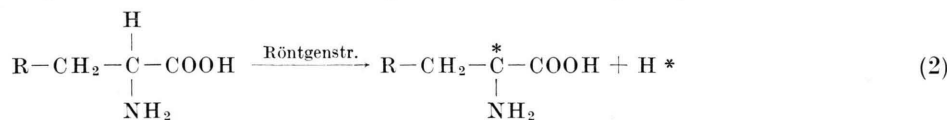
zu stabilisieren. Diese Stabilisierung kann z. B. erfolgen: durch Rekombination, durch Absättigung zweier C-Radikale untereinander (Ausbildung einer neuen C–C-Bindung) oder auch durch eine Sekundärreaktion, welche dadurch eingeleitet wird, daß das H-Atom mit einem zum radikalistischen C-Atom α -ständigen Wasserstoffatom molekularen Wasserstoff bildet¹⁷ und das hierbei auftretende Diradikal sich durch Aufrichtung einer π -Elektronenbindung stabilisiert:



Anstatt einer C–H-Bindung ist auch die Beteiligung einer N–H-Bindung an dieser Reaktion grundsätzlich möglich.

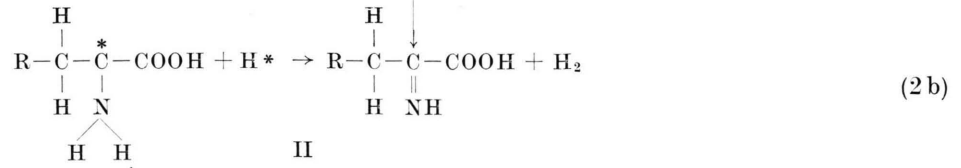
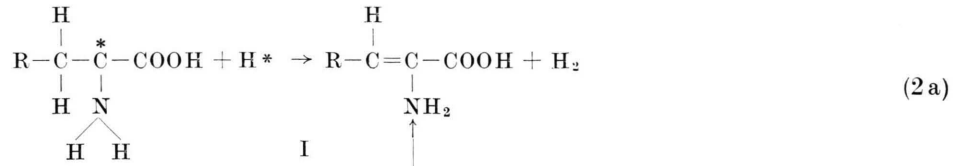
a) Bildung von α -Ketosäuren aus α -Aminosäuren

Unter den Bestrahlungsprodukten sämtlicher α -Aminocarbonsäuren lassen sich stets relativ beträchtliche Mengen an α -Ketocarbonsäuren nachweisen. Für das Auftreten dieser Verbindungen kann im Prinzip ein Reaktionsmechanismus angenommen werden, der der folgenden Formulierung entspricht:



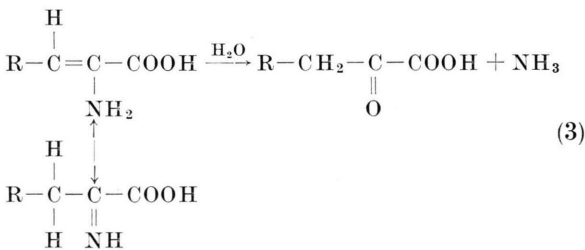
¹⁶ D. BERTHELOT u. H. GAUDECHON, C. V. 156, 1243 [1913].

¹⁷ K. F. BONHOEFFER u. Z. HARTECK, Z. physik. Chem., Haber-Band, 64 [1928].



Die Reaktionsprodukte I und II sind miteinander tautomer. Andererseits kann aber auch die Dehydrierung durch Abspaltung eines H-Atoms vom Stickstoff oder dem β -ständigen C-Atom eingeleitet werden. Auch dann ist unter Einhaltung des angegebenen Reaktionsprinzips eine der tautomeren Formen von I oder II das primäre Endprodukt. Eine weitere Möglichkeit ist die direkte, praktisch gleichzeitige Abspaltung zweier Wasserstoffatome aus dem angelegten Molekül.

Bei der Auflösung der Reaktionsprodukte I und II in Wasser gehen diese unter hydrolytischer Abspaltung von NH_3 in die homologe α -Ketocarbonsäure über (Gl. 3).



Es konnte gefunden werden, daß die Bildung von NH_3 und α -Ketocarbonsäure etwa im Verhältnis 1:1 erfolgt.

Die Identifizierung einzelner α -Ketocarbonsäuren erfolgte nach Abtrennung durch Hochspannungselektrophorese bei p_{H} 6,0 aus dem Gemisch der unveränderten α -Aminocarbonsäuren und ihrer Bestrahlungsprodukte mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin oder in einem spezifischen Test mit DPNH* und Milchsäuredehydrase¹² (Glyoxylsäure und Brenztraubensäure).

Genauere Untersuchungen der Ionenausbeuten für diese Dehydrierungsreaktion wurden durchgeführt für die Bildung von Brenztraubensäure aus Alanin,

* Hydriertes Phosphorpyridinnucleotid.

von Glyoxylsäure aus Glycin und von Oxalessigsäure aus Asparaginsäure. Oxalessigsäure, welche durch Abspaltung von CO_2 sehr leicht in Brenztraubensäure übergeht, konnte dabei ebenfalls mit Hilfe des erwähnten enzymatischen Testes bestimmt werden. Die Abhängigkeit der Bildung der Brenztraubensäure aus Alanin und der Glyoxylsäure aus Glycin (in $\mu\text{Mol/g}$) von der eingestrahelten Dosis Röntgenstrahlen (in r) sind in Abb. 2 und Tab. 2 wiedergegeben. Die Kurven entsprechen weitgehend einer Funktion:

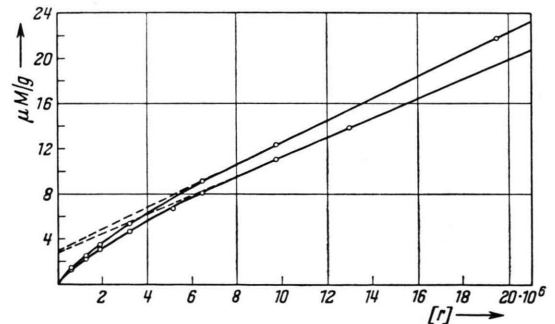


Abb. 2. Bildungsraten von Brenztraubensäure aus Alanin (obere Kurve) und Glyoxylsäure aus Glycin (untere Kurve). Ordinate: μMole der Ketosäure pro g bestrahlter Substanz, Abszisse: eingestrahelte Röntgendosis in r.

$$y = \frac{a}{k} (1 - e^{-kD}) + a_1 D,$$

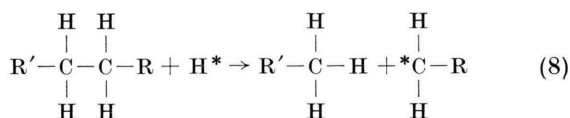
wobei y die gebildete Menge an α -Ketosäure in $\mu\text{Mol/g}$ und D die eingestrahelte Röntgendosis darstellen. a , a_1 und k sind Konstanten, deren Bedeutung nach Bildung des 1. Differentialquotienten der genannten Funktion klar wird:

$$\frac{dy}{dD} = a \cdot e^{-kD} + a_1,$$

dy/dD gibt hier die Ausbeute an Bestrahlungsprodukt in $\mu\text{Mol/g} \cdot \text{r}$ an, a_1 ist die Steigung der Gera-

dungen, denen zu einem Teil jede saure Funktion fehlt (s. Abb. 1 b und 1 c). Das Auftreten dieser Verbindungen erklärt sich aus der Tatsache, daß die Moll. nach der Absorption größerer Energiebeträge (ungefähr 5 eV/Mol.) einen Bruch der aliphatischen C – C-Kette erleiden können, wonach es schließlich über noch unbekannte Mechanismen zu einer Absättigung der zunächst auftretenden Alkylradikale kommen dürfte.

Aber auch das als primäres Strahlenprodukt der Kohlenwasserstoff-Verbindungen auftretende H-Atom kann nach BONHOEFFER den Bruch einer aliphatischen C – C-Kette herbeiführen¹⁷ (s. Gl. 8).



Die auch nach diesem Mechanismus zu erwartende Alkylradikale können sich z. B. gegenseitig absättigen, wodurch neue C – C-Bindungen gebildet werden. Auf diese Weise wird auch die Entstehung größerer Moll. verständlich. Eine Identifizierung solcher Verbindungen, die in großer Zahl unter den Bestrahlungsprodukten aller organischen Verbindungen zu erwarten sind, bereitet zur Zeit noch erhebliche Schwierigkeiten. Eine Aufklärung dieser Reaktionsmechanismen ist aber nicht zuletzt auch für die Radiochemie der Kunststoffe sehr aktuell (s. z. B. l. c. 8, 19, 20).

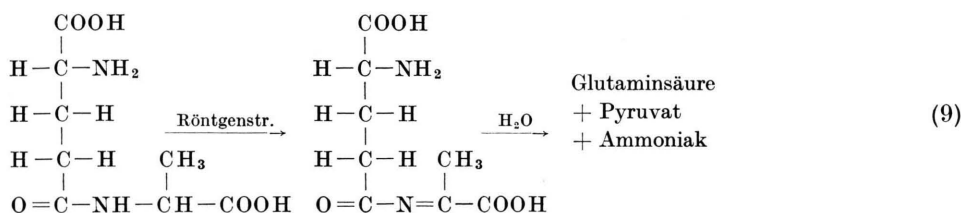
V. Untersuchungen an Peptiden

Allgemein konnten auch an Peptiden sämtliche strahlenchemischen Reaktionen beobachtet werden,

wie sie an ihren isolierten Bausteinen, den Aminosäuren, auftreten. Jedoch kommen die einzelnen Reaktionen mit unterschiedlicher Häufigkeit vor. Bei niedermolekularen Peptiden mit 2 – 3 Aminosäuren überwiegen zumeist Decarboxylierungs-Reaktionen. Eine allgemeine Voraussage darüber, welche Reaktionen bei Bestrahlung bestimmter Peptide überwiegen, ist jedoch auch hier nicht möglich. Bemerkenswert ist das Auftreten einer Dehydrierungs-Reaktion an der Peptidbildung, die beim Auflösen des Peptids in Wasser zu dessen Spaltung führt. Für diese Folgereaktion, deren Auftreten schon früher vermutet wurde², konnten nun weitere Beweise erbracht werden.

Ionenpaar-Ausbeuten von je etwa 0,5 (M/N) wurden unter den Bestrahlungsprodukten des γ -Glutamylalanins für zwei neutrale, ninhydrin-positive Fraktionen aufgefunden, von denen die eine nach der Hydrolyse als α -Amino-butyro-alanin und die andere als γ -Glutamyläthylamin erkannt wurde. Eine bei p_{H} 6,0 im elektrischen Feld rasch zur Anode wandernde ninhydrin-positive Fraktion, welche sich außerdem durch ihre charakteristische Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin als Ketoverbindung erwies, konnte durch vorsichtige Hydrolyse in α -Ketoglutarsäure und Alanin aufgespalten werden. Wahrscheinlich handelte es sich hier um ein Produkt der oxydativen Desaminierung des γ -Glutamylalanins, dem γ -(α -Ketoglutaryl-)alanin.

Von besonderem Interesse war jedoch im Falle des γ -Glutamylalanins das Auftreten der freien Glutaminsäure und der Brenztraubensäure [Ionenausbeute ungefähr 0,1 (M/N)] unter den Bestrahlungsprodukten. Folgender Reaktionsablauf ist wahrscheinlich:



Die durch strahlenchemische Dehydrierung erhaltene α -Iminoacyl-Verbindung stellt eine energiereiche Acyl-Verbindung dar, welche bei Gegenwart von Wasser sofort unter Abspaltung von Ammoniak in

ihre energieärmeren Bestandteile: Pyruvat und Glutaminsäure zerfällt. Obwohl es sich im Falle des γ -Glutamylalanins nicht um die Spaltung einer echten Peptidbindung handelt, darf diese Reaktion als

¹⁹ M. DOLE, C. D. KEELING u. D. G. ROSE, Amer. chem. Soc. 76, 4304 [1954].

²⁰ A. CHARLESBY, Rad. Res. 2, 96 [1955].

typisch für die strahlenchemische Spaltung einer Peptidbindung angesehen werden, da es sich hier um eine allgemeine Eigenschaft von *N*-Iminoacyl-Verbindungen handelt. Bei der nach diesem Mechanismus verlaufenden Spaltung langkettiger Peptide liegt also stets der eine Teil als *N*- α -Ketoacyl-Verbindung, der andere dagegen als normale Peptidkette mit unveränderter amino-endständiger, aber mit anderer carboxyl-endständiger Aminosäure vor. Die erste Bestätigung hierfür konnte bereits vor einiger Zeit durch Untersuchungen an den Bestrahlungsprodukten des Lysozyms erhalten werden².

Auch unter den Bestrahlungsprodukten des *N*-Benzoylalanins konnte – allerdings erst nach 5 Min. Hydrolyse mit 2-*n*. HCl bei 100 Grad – in geringer Menge Brenztraubensäure durch den genannten enzymatischen Test nachgewiesen werden. Überraschend hoch liegen die Ionenpaar-Ausbeuten für 2-basische Fraktionen unter den Bestrahlungsprodukten des *Tripeptids Glycyl-Valyl-Alanin* [je 5 (*M/N*)], s. Abb. 3.

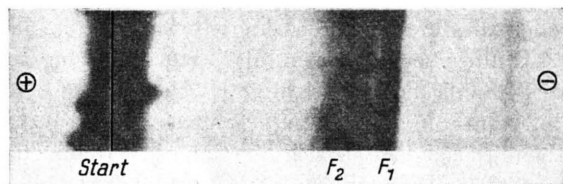


Abb. 3. Die Abb. zeigt eine elektrophoretische Auftrennung der durch Bestrahlung ($8 \cdot 10^7$ r) von Glycyl-Valyl-Alanin erhaltenen Komponenten. Zwei etwa gleich starke basische Hauptfraktionen ($F_1 + F_2$) wandern bei p_H 6 (40 V/cm; 40 Min.) mit nur wenig unterschiedlicher Beweglichkeit zur Kathode. Am Start weitgehend unverändertes Ausgangsprodukt.

Es gelang, diese beiden basischen Hauptfraktionen durch Hochspannungs-Elektrophorese voneinander zu trennen und vom Papier zu eluieren. Nach der Hydrolyse wurden als Bausteine der langsameren Fraktion zu gleichen Teilen Glycin, Valin und Äthylamin erkannt, wodurch sich diese als das decarboxylierte Tripeptid: Glycyl-Valyl-äthylamin auswies. Im Hydrolysat der schnelleren dagegen fanden sich ebenfalls zu gleichen Teilen Glycin, eine valin-ähnliche Komponente und Äthylamin. Die noch unbekannt valin-ähnliche Komponente zeigte bei p_H 1,9 eine etwas größere Beweglichkeit als Valin selbst, außerdem konnte sie durch Behandlung mit konz. HCl reversibel in ein basisches Lacton umgewandelt werden. Wahrscheinlich handelt es sich hier um ein in γ -, δ -Stellung radiochemisch dehydriertes Valin.

Triglycin wurde mit einer Ionenausbeute von etwa 0,5 (*M/N*) in Diglycylmethylamin übergeführt, daneben wurde aber eine größere Zahl (mindestens 3) stärker basischer Komponenten beobachtet, deren Ionenausbeuten jedoch bei Werten unter 0,05 (*M/N*) nicht sicher bestimmbar waren. Auch Glyoxylsäure und ein freie Ketogruppen sowie Glycin enthaltendes Peptid wurden unter den Bestrahlungsprodukten des Triglycins gefunden.

Mit einer Ionenausbeute von etwa 4 (*M/N*) wurde aus *Glutathion (red.)* Kohlendioxyd abgespalten. Die hierdurch entstandenen neutralen Peptide wurden bei p_H 1,9 weiter aufgetrennt. Es konnten so u. a. zwei Fraktionen abgetrennt werden, von denen sich die eine nach der Hydrolyse als γ -Aminobutyrocysteinylglycin, die andere als γ -Glutamylcysteinylmethylamin erwies.

Ferner wurde unter den übrigen Bestrahlungsprodukten Glyoxylsäure, Schwefelwasserstoff sowie eine ketokörper-haltige Fraktion nachgewiesen, welche bei p_H 6 im elektrischen Feld von unverändertem Glutathion nicht zu trennen war.

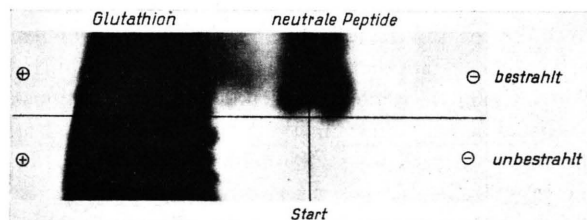


Abb. 4. Die Abb. zeigt eine Trennung des Glutathions von den bei p_H 6 im elektrischen Feld nicht wandernden Decarboxylierungs-Produkten des Glutathions.

Größere Schwierigkeiten bereitete die Untersuchung des toxischen Cyclo-Peptids aus dem grünen Knollenblätter-Pilz (*Amanita phalloides*), dem *Phalloidin*. Die Aussicht, dieses Peptid, welches selbst nicht durch eines der bekannten proteolytischen Fermente abzubauen ist, durch Bestrahlung teilweise in ein offenkettiges System mit einer freien Carboxylgruppe überzuführen, war an sich verlockend, da eine derartige Verbindung durch Carboxypeptidasen abbaubar sein mußte. Durch Bestrahlung mit einer Dosis von $1,5 \cdot 10^8$ r konnte auch tatsächlich das Phalloidin zu etwa 2 bis 3% in eine Verbindung übergeführt werden, welche im Gegensatz zum neutralen Ausgangsprodukt bei p_H 6 im elektrischen Feld relativ langsam zur Anode wanderte, mit 2.4-

Dinitrophenylhydrazin eine gelbe (Keto-Körper) und mit Zimtaldehyd/Salzsäure ähnlich dem Phalloidin eine violette Reaktion (Indol-Körper) ergab. Eine freie Aminogruppe wurde nicht gefunden. Die an dieser im mikropräparativen Maßstab rein dargestellten Verbindung unternommenen Abbauprobe mit Carboxypeptidase gelangen jedoch nicht vollständig. Wie auch von anderer Seite festgestellt

wurde*, setzten selbst Partialhydrolysate des Phalloidins allen enzymatischen Abbauprobe großen Widerstand entgegen.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützte auch diese Arbeiten in dankenswerter Weise durch die Gewährung einer Sachbeihilfe.

* TH. WIELAND, Privatmitteilung.

Über die Wirkung von Wasserstoffperoxyd auf Krebszellen und auf embryonale Zellen

VON OTTO WARBURG, KARLFRIED GAWEHN und AUGUST-WILHELM GEISSLER

Aus dem Max-Planck-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem

(Z. Naturforschg. 12 b, 393—395 [1957]; eingegangen am 2. Mai 1957)

Die Manometrie der Körperzellen unter physiologischen Bedingungen zeigt, daß Krebszellen, als partielle Anaerobier, viel weniger Katalase enthalten als embryonale Zellen. Die Möglichkeit einer Anwendung auf die Wirkung der Röntgenstrahlen wird diskutiert.

Züchtet man Lactobazillen anaerob, so verlieren sie von der Kette der Atmungsfermente zunächst ihre Eisenfermente, Eisenoxygenase, Katalase, Peroxydase. Bringt man solche Zellen in Berührung mit Sauerstoff, so übertragen sie Sauerstoff mit ihren gelben Fermenten und produzieren dabei H₂O₂, das sie tötet. Setzt man jedoch Katalase zu den Zellen, so wird das gebildete H₂O₂ schnell zerstört, und die Zellen bleiben auch bei Berührung mit Sauerstoff am Leben¹.

Krebszellen, als partielle Anaerobier, haben ihre Eisenfermente z. T. verloren. Sie haben erheblich weniger Katalase als embryonale Zellen und sind deshalb gegenüber Sauerstoff empfindlicher als embryonale Zellen. Es ist eine Erfahrung unseres Instituts, daß bei längeren manometrischen Versuchen mit Krebszellen der Sauerstoffdruck nicht 1 Atmosphäre, sondern nur $\frac{1}{5}$ Atmosphäre betragen darf; während unter sonst gleichen Bedingungen 1 Atmosphäre Sauerstoff von den embryonalen Zellen ohne Schädigung vertragen wird².

Wir beschreiben im folgenden Versuche über die verschiedene Empfindlichkeit von Krebszellen und embryonalen Zellen gegenüber H₂O₂, die in Serum

mit der kürzlich beschriebenen manometrischen Versuchsanordnung ausgeführt wurden³. Es zeigte sich, daß embryonale Zellen H₂O₂ viel schneller zersetzen als Krebszellen, anfangs etwa 10-mal so schnell, wenn die Temperatur 38° beträgt. Ist die Anfangskonzentration des H₂O₂ 1/200-normal (Abb. 1), so haben nach 60 Min. die embryonalen Zellen das H₂O₂ vollständig zersetzt, während die Krebszellen nur 30% des berechneten Sauerstoffs entwickelt haben. Der nicht entwickelte Sauerstoff ist dann zum größten Teil noch in der Krebszellen-Suspension enthalten, wie man durch Titration mit Permanganat (nach Trichloressigsäure-Fällung) oder durch Zusatz von Katalase nachweisen kann. Nur ein kleiner Teil des zugesetzten H₂O₂ ist also durch Reaktion mit den Zellen verbraucht worden.

Dieser kleine Teil ist es, der in der 1-stündigen Versuchszeit den Stoffwechsel der Krebszellen größtenteils vernichtet und der bewirkt, daß die Zellen nach der 1-stdg. Versuchszeit nicht mehr transplantierbar sind; während unter sonst gleichen Bedingungen das H₂O₂ den embryonalen Zellen nicht zu schaden scheint, da nach der 1-stdg. Versuchszeit der Stoffwechsel fast vollständig erhalten war.

¹ Der Schutz der Anaerobier gegenüber Sauerstoff durch Zusatz von Katalase ist 1924 im Rockefeller-Institute in New York von O. T. AVERY entdeckt worden (J. exp. Medicine 39, 275, 347, 357 [1924]). Der chemische Mechanismus der H₂O₂-Bildung in den Anaerobiern durch die Reoxydation der gelben Fermente ist 1933 in Dahlem

entdeckt worden. (Biochem. Z. 260, 499 [1933]; 266, 377 [1933]).

² Vgl. dazu auch O. WARBURG, Arch. Geschwulstforsch. 6, 7 [1953].

³ O. WARBURG, K. GAWEHN u. A. GEISSLER, Z. Naturforschg. 12 b, 115 [1957].