

KFK-427

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM  
KARLSRUHE**

März 1966

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
in der Helmholtz-Gemeinschaft  
Hauptabteilung Bibliothek und Medien

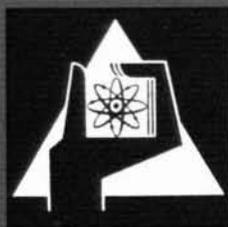
KFK 427

Institut für Strahlenbiologie

Zur Strahleninaktivierung von Ribonuclease

I. Auftrennung der Bestrahlungsprodukte

H. Jung, H. Schüssler



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE

Zur Strahleninaktivierung von Ribonuclease  
**I. Auftrennung der Bestrahlungsprodukte**  
HORST JUNG und HELGA SCHÜSSLER

## Zur Strahleninaktivierung von Ribonuclease

## I. Auftrennung der Bestrahlungsprodukte

HORST JUNG und HELGA SCHÜSSLER

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforschg. 21 b, 224—231 [1966]; eingegangen am 15. Dezember 1965)

Ribonuclease A was irradiated in water with  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation, and the products formed were separated according to their molecular weight by column chromatography on Sephadex G-50. When the irradiations are carried out in nitrogen atmosphere aggregation to dimers and higher polymers is observed. An appreciable fraction of this aggregated component retains enzymatic activity. At higher doses the enzymatic activity of the aggregates is inactivated at the same rate as monomer ribonuclease A. Irradiation in air yields two components; one is equivalent to that found in nitrogen atmosphere, the other has an apparent molecular weight of about 20 000 but contains no enzymatic activity. This last component is not observed when methionine is present during irradiation. In methionine containing solutions all inactivated ribonuclease molecules exist in the form of dimers and polymers. Irradiation in the dry state leads to the same result. Consequently, every model designed to describe the radiation action on ribonuclease has to consider the fact that in solution, in the presence of a protecting agent, and in the dry state the loss of enzymatic activity is always accompanied by aggregation to products with increased molecular weight.

Bei Studien über die Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf Enzyme interessiert man sich nicht nur für die nach einer bestimmten Dosis verbleibende Enzym-Aktivität, sondern auch für die physikalischen und chemischen Prozesse, die zur schließlich beobachteten Schädigung führen. Bei früheren Untersuchungen war man im wesentlichen darauf angewiesen, aus dem Verlauf von Dosis-Effekt-Kurven Rückschlüsse auf die wirksamen Inaktivierungs-Mechanismen zu ziehen. Da die meisten Enzyme nach Ein-Treffer-Kurven<sup>1</sup> inaktiviert werden, war der Informationsgehalt solcher Experimente relativ gering. Die historisch älteste „Theorie“, die die Wirkung von energiereicher Strahlung auf Proteine zu erklären versuchte, war die Punktwärmethorie von DESSAUER<sup>2</sup>. Danach wird durch Absorption von Strahlung ein größerer Energiebetrag an ein kleines Volumen in der bestrahlten Materie übertragen und die dadurch an der betreffenden Stelle erzeugte „Punktwärme“ führt zur thermischen Denaturierung des Moleküls. Als man später erkannt hatte, daß eine merkliche Punktwärme nur in der Spur von sehr dicht ionisierender Partikelstrahlung auftritt, entwickelte LEA<sup>3</sup> ein Modell (one-ionization

model), wonach ein Proteinmolekül dann seine enzymatische Aktivität verliert, wenn durch die Bestrahlung irgendwo in dem Molekül eine Primärionisation ausgelöst worden ist. Dieses Modell, das später von POLLARD, HUTCHINSON und Mitarbb.<sup>4-6</sup> weiter ausgebaut und verfeinert wurde, kann allerdings nicht erklären, wie die primär im Molekül erzeugte Ionisation schließlich zum Verlust von dessen Aktivität führt. Eine solche Aussage, wenigstens über die nach einer Ionisation ablaufenden physikalischen Prozesse, gibt der von PLATZMAN und FRANCK<sup>7</sup> zur Diskussion gestellte Inaktivierungs-Mechanismus. Nach diesem Modell erzwingt das Auftreten einer elektrischen Ladung innerhalb eines Proteinmoleküls eine Neuorientierung polarisierbarer Seitengruppen. Dadurch werden pro Elementarladung im Mittel etwa 10 Wasserstoffbrücken aufgebrochen. Da eine Primärionisation durchschnittlich aus etwa 1,6 Ionenpaaren besteht<sup>8</sup>, werden durch ein solches Primäreignis etwa 30 Wasserstoffbrücken pro Molekül gelöst. PLATZMAN und FRANCK vertreten die Ansicht, daß diese Zahl von 30 aufgebrochenen Wasserstoffbrücken höchstens bei sehr kleinen Proteinmolekülen zur Auflösung der

<sup>1</sup> K. G. ZIMMER, Akad. Wiss. Lit. Mainz, Abh. math. naturwiss. Klasse 3, 107 [1960].

<sup>2</sup> F. DESSAUER, Z. Physik 12, 38 [1922].

<sup>3</sup> D. E. LEA, Actions of radiations on Living Cells. University Press, Cambridge 1946.

<sup>4</sup> E. C. POLLARD, W. R. GUILD, F. HUTCHINSON u. R. B. SETLOW, Progr. Biophysics biophysic. Chem. 5, 72 [1955].

<sup>5</sup> F. HUTCHINSON, Radiat. Res. Suppl. 2, 49 [1960].

<sup>6</sup> F. HUTCHINSON u. E. POLLARD, in: Mechanisms in Radiobiology I (eds. ERRERA u. FORSSBERG), S. 71. Academic Press, New York 1961.

<sup>7</sup> R. L. PLATZMAN u. J. FRANCK, in: Symposium on Information Theory in Biology (eds. JOCKEY, PLATZMAN u. QUASTLER), S. 262. Pergamon Press, New York 1958.

<sup>8</sup> A. ORE u. A. LARSEN, Radiat. Res. 21, 331 [1964].

Sekundärstruktur und somit zur Inaktivierung führt. Nach einem weiteren von AUGENSTEIN<sup>9</sup> vorgeschlagenen Inaktivierungsmodell wandert die in irgendwelchen Teilen des Moleküls absorbierte Strahlungsenergie die Kovalenzbindungen entlang, bis sie sich in ganz bestimmten „schwachen Bindungen“ (weak links) konzentriert. Als schwache Bindungen sind nach AUGENSTEIN die für die Sekundärstruktur notwendigen Disulfidbrücken anzusehen. Durch Konzentration einer Energie von 0,9 eV in einer solchen Bindung wird zunächst diese aufgebrochen; nach Unterbrechung mehrerer innermolekularer Bindungen (z. B. Wasserstoffbrücken) folgt der Bruch einer zweiten S-S-Bindung ohne weitere Energiezufuhr. Wenn eine S-S-Brücke unterbrochen ist, soll das Molekül reversibel inaktiviert sein, wenn aber zwei dieser Brücken gelöst sind, so führt das zum endgültigen Verlust der enzymatischen Aktivität. Schließlich postuliert BRAAMS<sup>10</sup> bei der Inaktivierung von Proteinen zwei verschiedene Arten von Schäden. Durch die absorbierte Strahlungsenergie wird ein Makromolekül in zwei Radikale aufgespalten; eines davon ist sehr klein und wahrscheinlich ein Wasserstoffradikal. Da dieses mit weiteren durch die Strahlung nicht geschädigten Molekülen unter Ausbildung eines permanenten Strahlenschadens reagieren kann, so muß man unterscheiden zwischen den primär durch die Strahlung geschädigten Molekülen und solchen, die durch den Angriff von Wasserstoffradikalen inaktiviert werden. Im Gegensatz zu den anfangs genannten Mechanismen gestattet dieses Modell, die Modifizierung des Strahlenschadens durch Sauerstoff, Schutzstoffe, tiefe Temperaturen u. ä. zu beschreiben.

Bis jetzt ist noch keine Entscheidung gefallen, welche der angegebenen Hypothesen den tatsächlich ablaufenden Vorgängen am nächsten kommt. Ein Charakteristikum aller aufgeführten Mechanismen für die Inaktivierung von Enzymmolekülen besteht darin, daß man in allen Fällen die strahleninaktivierten Moleküle als einzelne, lediglich in ihrer Funktion geschädigte Moleküle ansieht. Das ist aber, wie wir in der vorliegenden Arbeit nachweisen, nicht immer richtig. Wie hier am Beispiel der Ribonuclease gezeigt wird, entstehen durch Bestrahlung keine monomeren und inaktivierten Moleküle; der

Verlust der enzymatischen Aktivität ist stets begleitet von einer Aggregation zu höhermolekularen Einheiten.

## 1. Methodik

### 1.1. Reinigung der Ribonuclease

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde Ribonuclease (RNase) von Sigma Chemical Company, St. Louis, USA, verwendet. Durch Chromatographie über eine Säule (4·35 cm) von Amberlite IRC-50 (XE-64) mit 0,2-m. Phosphatpuffer (pH 6,47) konnte reine Ribonuclease A<sup>11</sup> erhalten werden. Das im Eluat enthaltene Phosphat wurde mit Sephadex G-25 fein (Säule: 3·50 cm) und 0,1-m. Essigsäure vom Enzym abgetrennt. Die Fraktionen, die Ribonuclease enthielten und in denen sich kein Phosphat mehr nachweisen<sup>12</sup> ließ, wurden gefriergetrocknet. Die so gewonnene Ribonuclease A wurde in einem weiteren chromatographischen Trennverfahren auf ihre Einheitlichkeit geprüft. Dazu wurden 5 mg RNase über Amberlite IRC-50 (XE-64) (Säule: 1·30 cm) mit einem Gradienten von 3·35 ml 0,15-m. (pH 6,40) und 1·35 ml 1,0-m. (pH 6,47) Phosphatpuffer aufgetrennt<sup>13</sup> und die Anfärbung des Eluates mit Ninhydrin mit Hilfe eines Autoanalyzers (Technicon Chromatography Corp., Chaucy, New York) automatisch registriert. Nur Präparate, die sich als einheitlich erwiesen, kamen für die Experimente zur Verwendung.

### 1.2. Bestrahlung

Jeweils 5 mg gereinigte Ribonuclease A wurden im Reagenzglas in 1 ml doppeltquarzdest. Wasser gelöst und anschließend in einer <sup>60</sup>Co- $\gamma$ -Quelle bei einer Dosisrate von 0,25 Mrad/Stde. bestrahlt. Während der Bestrahlung perlte Luft in gleichmäßigem Strom durch die RNase-Lösung, um eine konstante O<sub>2</sub>-Konzentration aufrechtzuerhalten. Um O<sub>2</sub>-freie Proben herzustellen, wurde 1 Stde. lang nachgereinigter Stickstoff durch die RNase-Lösung geleitet und anschließend das Glasgefäß mit der Lösung unter Stickstoffatmosphäre abgeschmolzen. Zur Bestrahlung in trockenem Zustand wurden jeweils 5 mg gereinigter und gefriergetrockneter Ribonuclease A in einem Glasgefäß 24 Stdn. auf 10<sup>-5</sup> Torr evakuiert und danach unter Hochvakuum abgeschmolzen.

### 1.3. Auftrennung der Bestrahlungsprodukte

Die bestrahlte Ribonuclease-Lösung wurde auf eine Säule (2·140 cm) von Sephadex G-50 fein aufgetragen, die vorher 6 Stdn. lang mit 0,2-m. Phosphatpuffer (pH 6,47) gewaschen worden war. Wir eluierten

<sup>9</sup> L. G. AUGENSTEIN, in: Symposium on Information Theory in Biology (eds. JOCKEY, PLATZMAN u. QUASTLER), S. 287. Pergamon Press, New York 1958.

<sup>10</sup> R. BRAAMS, Nature [London] **200**, 752 [1963].

<sup>11</sup> C. H. W. HIRS, S. MOORE u. W. H. STEIN, J. biol. Chemistry **200**, 493 [1953].

<sup>12</sup> O. BODANSKY u. M. K. SCHWARTZ, Meth. Med. Res. **9**, 83 [1961].

<sup>13</sup> J. A. RUPLEY u. H. A. SCHERAGA, Biochemistry **2**, 421 [1963].

mit 0,2-m. Phosphatpuffer, der mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,35 ml/Min. auf die Säule gepumpt wurde, und fingen das Eluat in 3-ml-Fractionen mit einem Fraktionssammler auf.

#### 1.4. Enzymbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den einzelnen Fraktionen diente deren optische Absorption bei 278 m $\mu$ . Die enzymatische Aktivität der RNase wurde nach einer Modifikation der Methode von KALNITSKY et al.<sup>14</sup> bestimmt, die bereits ausführlich beschrieben wurde<sup>15</sup>. Von den einzelnen Fraktionen pipettierten wir jeweils 0,1 ml in 1 ml 0,1-m. Acetatpuffer (pH 5,0) und leiteten durch Zugabe von 1 ml RNS-Substratlösung die Reaktion zwischen Enzym und Substrat ein. Die unverbrauchte RNS wurde durch Zugabe von 1 ml einer 0,75-proz. Lösung von Uranylacetat in 25-proz. Perchlorsäure ausgefällt, das Gemisch sofort im Eisbad auf 0 °C abgekühlt und der Niederschlag nach weiteren 20 Min. bei 6000 UpM abzentrifugiert. Nach Verdünnung von 1 ml des Überstandes mit dest. Wasser 1 : 3 bestimmten wir die Absorption dieser Lösung bei 260 m $\mu$  in einem Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) gegen eine entsprechend behandelte Kontrolle ohne Enzym.

## 2. Ergebnisse

Durch Chromatographie über das Dextran-Gel Sephadex ist es möglich, Substanzen mit unterschiedlichen Mol.-Gew. zu trennen. Die Trennwirkung dieses Verfahrens beruht darauf, daß Moleküle mit kleinem Mol.-Gew. in die Gelkörner eindringen können und dadurch gegenüber höhermolekularen Einheiten verzögert werden. Folglich werden die Komponenten mit dem größten Mol.-Gew. zuerst eluiert, die niedermolekularen Anteile kommen um so später von der Säule je geringer ihr Mol.-Gew. ist. Trennt man 5 mg unbestrahlte Ribonuclease A in der bereits beschriebenen Weise über Sephadex G-50 auf und bestimmt man die optische Absorption der einzelnen Fraktionen bei 278 m $\mu$ , so findet man (vgl. Abb. 1, „Kontrolle“) ein ausgeprägtes Maximum bei Fraktion 48 (Maximum „I“) und ein sehr kleines Maximum bei Fraktion 36 (Maximum „III“). Die enzymatische Aktivität in den einzelnen Fraktionen zeigt den gleichen Verlauf wie die Ex-

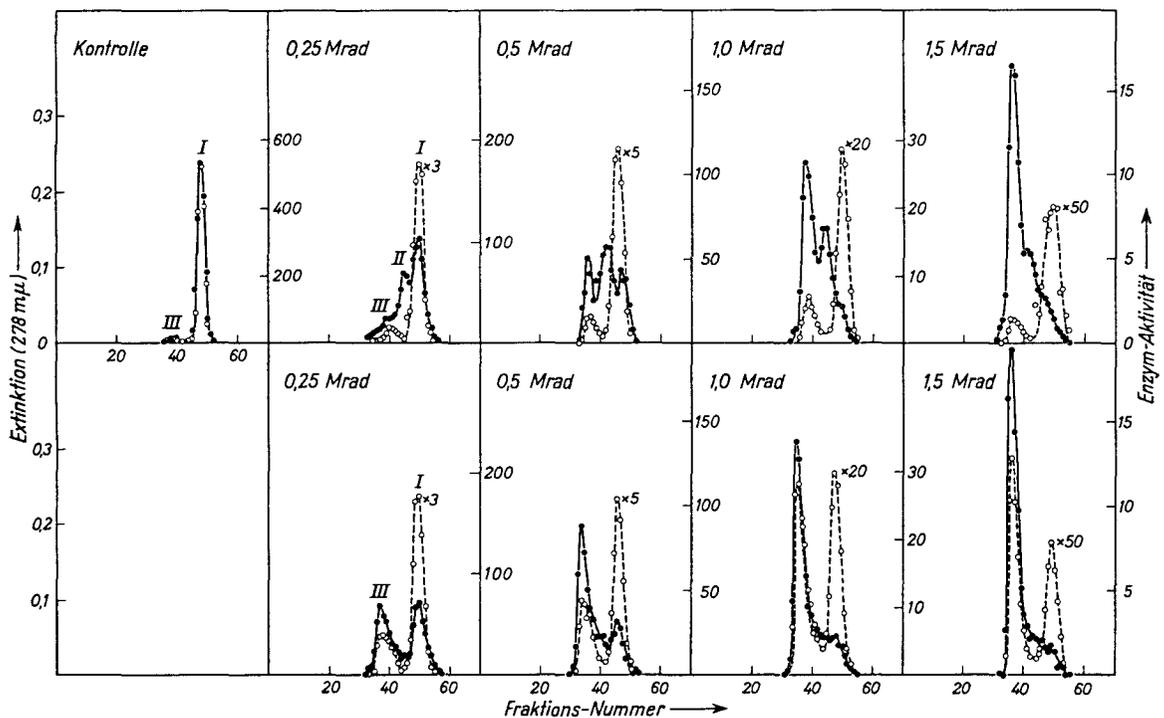


Abb. 1. Chromatographische Auftrennung von 5 mg Ribonuclease A nach Bestrahlung mit <sup>60</sup>Co- $\gamma$ -Strahlung. Oben: Bestrahlung in Luft. Unten: Bestrahlung in Stickstoff. —●— Extinktion bei 278 m $\mu$ ; - - ○ - - enzymatische Aktivität (eine Einheit entspricht der Aktivität von 1  $\mu$ g RNase/ml).

<sup>14</sup> G. KALNITSKY, J. P. HUMMEL, H. RESNICK, J. R. CARTER, L. B. BARNETT u. C. DIERKS, *Ann. New York Acad. Sci.* **81**, 542 [1959].

<sup>15</sup> H. JUNG, *Z. Naturforsch.* **20 b**, 764 [1965].

tinktion. Auf Abb. 1 sind die beiden Skalen für die Extinktion (linker Ordinatenmaßstab, schwarze Punkte, ausgezogene Kurven) bzw. für die Enzym-Aktivität (rechter Ordinatenmaßstab, offene Kreise, unterbrochene Kurven) so gegeneinander angeordnet, daß Extinktion und Enzym-Aktivität in Fraktion 48 zusammenfallen. Bei dieser Fraktion (Maximum I) wird die monomere Ribonuclease A eluiert; das bei Fraktion 36 gelegene kleine Maximum rührt von höhermolekularen Aggregaten her, die aber ebenfalls enzymatische Aktivität besitzen. Diese höhermolekulare Komponente tritt, wie CRESTFIELD, STEIN und MOORE<sup>16</sup> gezeigt haben, beim Gefrier-trocknen der essigsäuren Lösung auf; ihr Anteil beträgt in unserem Fall 1,8 Prozent. Werden 5 mg Ribonuclease in 1 ml bidest. Wasser unter Durchleiten von Luft in der Co- $\gamma$ -Quelle bestrahlt, so zeigt die Extinktion ein weiteres Maximum bei Fraktion 44 (Abb. 1, oben, Maximum „II“), das bemerkenswerterweise keine enzymatische Aktivität besitzt. Gleichzeitig wird die Größe von Maximum I verringert, während für Maximum III eine Zunahme der Extinktion festzustellen ist. Bei 0,5 Mrad hat die optische Absorption aller drei Maxima annähernd den gleichen Wert. Mit steigender Dosis nimmt Maximum II zunächst noch etwas zu; bei noch höheren Strahlendosen wird auch dieses Maximum abgebaut, so daß bei 1,5 Mrad fast die gesamte Extinktion in Maximum III zu finden ist. Werden die Bestrahlungen unter O<sub>2</sub>-freien Bedingungen durchgeführt, so fehlt Maximum II völlig (Abb. 1, unten). Mit steigender Dosis verringert sich lediglich die Größe von Maximum I, während die von Maximum III gleichzeitig anwächst. Die enzymatische Aktivität von Komponente I nimmt mit anwachsenden Strahlendosen ab, Komponente III enthält einen um so größeren Anteil der Gesamtaktivität je höher die Dosis ist. Damit ist zunächst qualitativ gezeigt, daß bei der Inaktivierung von Ribonuclease in Lösung mit zunehmender Dosis eine ausgeprägte Aggregation zu höhermolekularen Einheiten zu beobachten ist, von denen ein Teil enzymatische Aktivität besitzt. Bei Bestrahlung in Luft tritt eine Komponente auf (Maximum II), die unter O<sub>2</sub>-freien Bedingungen nicht nachzuweisen ist.

Die Extinktion der einzelnen Komponenten läßt sich nicht exakt angeben, da für diesen Zweck die verschiedenen Maxima nicht genügend weit von ein-

ander getrennt sind. Dagegen kann man die Gesamt-extinktion aller drei Komponenten zusammen recht genau bestimmen, und zwar durch Aufsummieren der in den einzelnen Fraktionen gemessenen Extinktionswerte. Wie aus Abb. 2 ersichtlich ist, steigt die auf die Absorption der Kontrolle bezogene Gesamt-extinktion mit zunehmender Dosis an. Die Zunahme erfolgt bei den in Luft bestrahlten Proben schneller als bei den in Stickstoff bestrahlten.

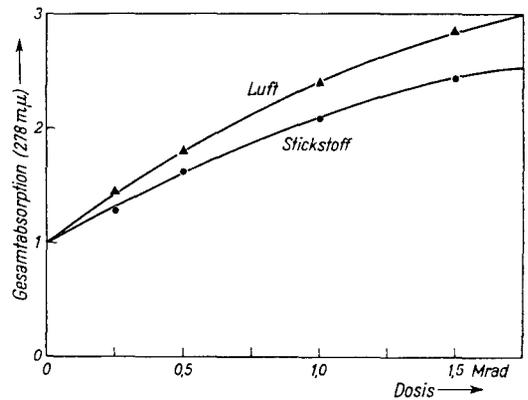


Abb. 2. Zunahme der Gesamtabsorption bei 278 m $\mu$  in Ribonuclease A nach Bestrahlung in Wasser mit verschiedenen Dosen <sup>60</sup>Co- $\gamma$ -Strahlung.

Um die Abnahme der in Maximum I enthaltenen Enzym-Aktivität (monomere RNase A) mit steigender Dosis zu ermitteln, wurde die in den einzelnen Fraktionen gefundene Aktivität aufsummiert und in Abb. 3 über der Strahlendosis aufgetragen. Die bei Bestrahlung in Luft und in Stickstoff erhaltenen Meßpunkte liegen bei halblogarithmischer Auftragung auf einer Geraden, deren Steigung einer 37%-

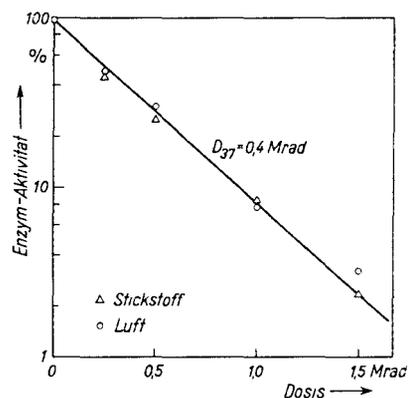


Abb. 3. Enzymatische Aktivität von Komponente I nach Bestrahlung in Wasser mit verschiedenen Dosen <sup>60</sup>Co- $\gamma$ -Strahlung (100% = Gesamtaktivität einer unbestrahlten Kontrolle).

<sup>16</sup> A. M. CRESTFIELD, W. H. STEIN u. S. MOORE, Arch. Biochem. Biophysics Suppl. 1, 217 [1962].

Dosis ( $D_{37}$ ) von 0,4 Mrad entspricht. Trägt man dagegen die Aktivität von Komponente III in entsprechender Weise über der Dosis auf (Abb. 4), so findet man einen völlig anderen Verlauf. Bis zu Dosen von etwa 0,3 Mrad nimmt die Enzym-Aktivität zunächst zu, wobei nach Bestrahlung in Stickstoff die

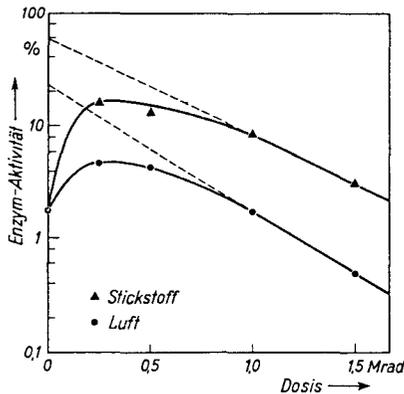


Abb. 4. Enzymatische Aktivität von Komponente III nach Bestrahlung in Wasser mit verschiedenen Dosen  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung (100% = Gesamtaktivität einer unbestrahlten Kontrolle).

Aktivität um einen Faktor von 3 größer ist als nach Bestrahlung in Luft. Aus dem Kurvenverlauf geht hervor, daß zwei Konkurrenzreaktionen ablaufen. Die eine führt zur Aggregation der RNase-Moleküle, wobei jedoch ein Teil der enzymatischen Aktivität erhalten bleibt, die zweite hat die Inaktivierung dieser höhermolekularen Komponente zur Folge. Die Steigung der beiden Kurven in Abb. 4 entspricht bei hohen Dosen einer  $D_{37}$  von etwa 0,4 Mrad. Das zeigt, daß die in Maximum III enthaltene Enzym-Aktivität mit der gleichen Geschwindigkeit inaktiviert wird wie die monomere Ribonuclease (Maximum I). Die Extrapolation dieser Steigung bei hohen Dosen (Abb. 4, unterbrochene Geraden) zeigt, daß bei Bestrahlung in Stickstoff etwa 60% der Gesamtaktivität zuerst in Komponente III übergehen, ehe sie bei weiterer Strahleneinwirkung inaktiviert werden. Bei Bestrahlung in Luft beträgt dieser Anteil etwas über 20 Prozent. Die Summe der in den Komponenten I und III enthaltenen Enzym-Aktivität stellt die Gesamtaktivität dar. Wie Abb. 5 zeigt, nimmt diese nach Bestrahlung in Stickstoff schneller ab als nach Bestrahlung in Luft. Aus den entsprechenden 37%-Dosen von 0,44 bzw. 0,53 Mrad resultiert somit ein „Sauerstoff-Effekt“ von 1,2.

Wird Ribonuclease nicht in Wasser, sondern in  $5 \cdot 10^{-2}$ -m. Methioninlösung bestrahlt, so tritt nach

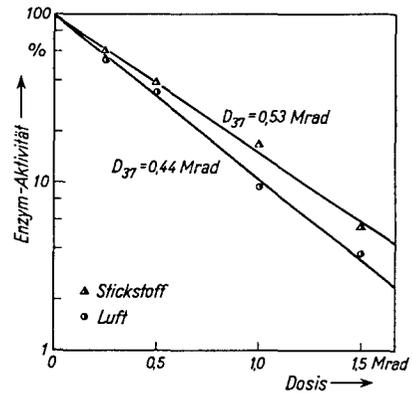


Abb. 5. Gesamtaktivität von Ribonuclease (= Summe von Komponente I und III) nach Bestrahlung in Wasser mit verschiedenen Dosen  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung.

Bestrahlung in Luft die Komponente II nicht auf (vgl. Abb. 6). Abb. 6 zeigt darüber hinaus, daß in Maximum I die Absorption bei  $278 \text{ m}\mu$  durch die Bestrahlung um den gleichen Betrag verringert wird wie die enzymatische Aktivität. (Die Anordnung der Skalen für Extinktion und Aktivität ist auf Abb. 6 dieselbe wie bei der Kontrolle auf Abb. 1.) Mit steigender Dosis nimmt die Extinktion in Maximum I ab und in Maximum III zu, und zwar in ähnlicher Weise wie nach Bestrahlung in Wasser unter Stickstoff-Atmosphäre (vgl. Abb. 1, unten). Die in Maximum I enthaltene Aktivität wird auch

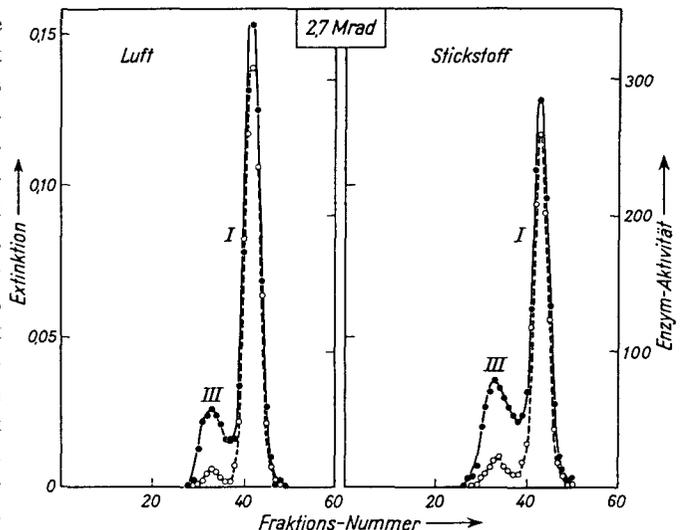


Abb. 6. Chromatographische Auftrennung von 5 mg Ribonuclease A nach Bestrahlung in  $5 \cdot 10^{-2}$ -m. Methionin-Lösung mit 2,7 Mrad  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung. —●— Extinktion bei  $278 \text{ m}\mu$ ; —○— enzymatische Aktivität (eine Einheit entspricht der Aktivität von  $1 \mu\text{g}$  RNase/ml).

bei Anwesenheit von Methionin in Luft und Stickstoff gleich schnell inaktiviert (Abb. 7, helle Kreise und Dreiecke). Aus der Neigung der Inaktivierungskurve ergibt sich eine  $D_{37}$  von 4 Mrad. Das heißt, daß durch die Gegenwart des Methionins die Strahlenempfindlichkeit der Ribonuclease gegenüber den in Wasser durchgeführten Experimenten um einen Faktor von 10 verringert wird. Die Enzym-Aktivität in Maximum III steigt mit der Dosis zunächst an, um bei höheren Dosen wieder abzunehmen (Abb. 7, dunkle Punkte und Dreiecke). Allerdings ist dieser

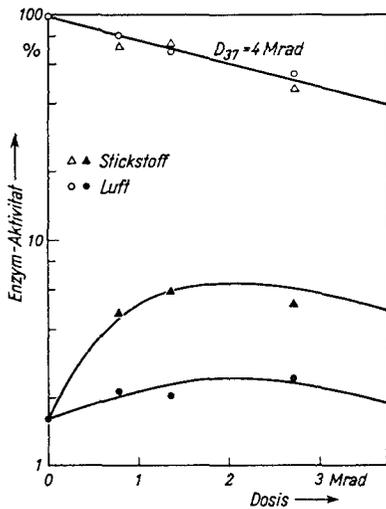


Abb. 7. Enzymatische Aktivität von Komponente I ( $\Delta$  und  $\circ$ ) und Komponente III ( $\blacktriangle$  und  $\bullet$ ) nach Bestrahlung in  $5 \cdot 10^{-2}$ -m. Methionin-Lösung mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung (100% = Gesamtkaktivität einer unbestrahlten Kontrolle).

Verlauf nicht genau zu bestimmen, da oberhalb von 2 Mrad durch Umsetzung der Bestrahlungsprodukte des Methionins die bestrahlten Lösungen trübe werden und die Resultate stark zu streuen beginnen. Aus Abb. 7 geht hervor, daß bei Bestrahlung in Stickstoff der Anteil der enzymatisch aktiven Komponente in Maximum III etwa um einen Faktor von 3 größer ist als nach Bestrahlung in Luft. Das gleiche Verhältnis findet man auch nach Bestrahlung in Wasser (vgl. Abb. 4), jedoch ist in diesem Fall der Absolutbetrag der Enzym-Aktivität in Maximum III sowohl in Luft als auch in Stickstoff 2,5-mal höher als in Gegenwart von Methionin. Diese Versuche zeigen, daß auch bei Anwesenheit eines Schutzstoffes der Verlust der Enzym-Aktivität stets mit einer Aggregation verbunden ist. Allerdings tritt hier die in Wasser nach Bestrahlung in Luft beobachtete Komponente II nicht auf.

Trocken bestrahlte Ribonuclease führt nach dem Auftrennen zu sehr ähnlichen Spektren, wie sie bereits nach Bestrahlung in Wasser oder Methionin-Lösung gefunden wurden (vgl. Abb. 8). Durch Bestrahlung mit 26 Mrad  $\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung bei 77 °K wird die Gesamt-Aktivität auf 95% der Kontrolle verringert. Gleichzeitig steigt die Aktivität in Maximum III von 1,8% (in der Kontrolle) auf über 5%

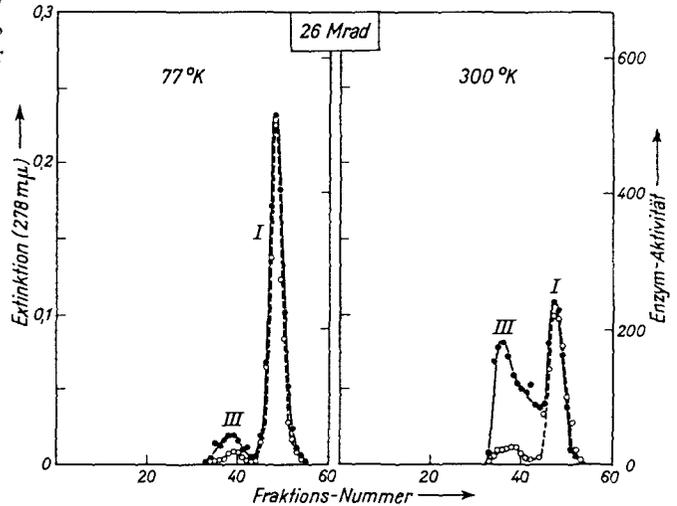


Abb. 8. Chromatographische Auftrennung von 5 mg Ribonuclease A nach Bestrahlung im Trockenem mit 26 Mrad  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Bestrahlung. —●— Extinktion bei 278  $\text{m}\mu$ ; - -  $\circ$  - - enzymatische Aktivität (eine Einheit entspricht der Aktivität von 1  $\mu\text{g}$  RNase/ml).

an. Wird die gleiche Dosis bei Zimmertemperatur verabreicht, so konzentrieren sich fast 11% der ursprünglich in der Kontrolle vorhandenen Enzym-Aktivität in Maximum III, während in Komponente I die Aktivität um etwa 40% abnimmt. Die starke Zunahme der Extinktion in Maximum III zeigt außerdem, daß auch bei Bestrahlung im Trockenem die inaktivierten Moleküle nicht als Monomere vorliegen, sondern daß sie sich zu höhermolekularen Einheiten zusammenlagern. Bezogen auf gleichen Inaktivierungsgrad ist der Anteil der Enzym-Aktivität enthaltenden Aggregate in Maximum II etwa ebenso groß wie nach Bestrahlung in Wasser unter Stickstoffatmosphäre.

### 3. Diskussion

Unsere Resultate erlauben eine Reihe von Rückschlüssen auf die Reaktionen, die bei der Strahleninaktivierung von Ribonuclease in Lösung ablaufen.

Der Befund, daß die in der monomeren Komponente I enthaltene Enzym-Aktivität sowohl bei Bestrahlung in Luft als auch bei Bestrahlung in Stickstoff mit gleicher Geschwindigkeit abnimmt (vgl. Abb. 3), zeigt, daß in beiden Fällen die gleiche Anzahl von Ribonuclease-Molekülen durch den Angriff von Wasserradikalen aktiviert und zur Reaktion mit ihrer Umgebung befähigt werden. Allerdings ist die Art ihrer Weiterreaktion von der  $O_2$ -Konzentration abhängig. Unter Stickstoffatmosphäre wird durch die Bestrahlung die native Ribonuclease A (Maximum I) in Komponente III überführt, während in Luft eine Umwandlung in die Komponenten II und III vorgeht. Vorläufige Mol.-Gew.-Bestimmungen<sup>17</sup> ergaben für Maximum II einen Wert von etwa 20 000, für Maximum III einen solchen von 30–35 000. Das Mol.-Gew. von Komponente II entspricht folglich etwa  $1\frac{1}{2}$  Ribonuclease-Molekülen, während Komponente III aus einem Gemisch von Dimeren und höhermolekularen Aggregaten zu bestehen scheint. Demnach werden die Ribonuclease-Moleküle durch die Einwirkung von Strahlung bei Abwesenheit von  $O_2$  zur Polymerisation befähigt, wobei sich zwei Moleküle zusammenlagern. Dabei bleibt etwa die Hälfte der ursprünglichen Enzym-Aktivität erhalten. Bei weiterer Bestrahlung wird die in den Aggregaten enthaltene Aktivität mit der gleichen Geschwindigkeit inaktiviert wie die von Komponente I ( $D_{37} = 0,4$  Mrad). Durch Bestrahlung in Luft wird die monomere Ribonuclease in die Komponenten II und III umgewandelt. Offensichtlich laufen hier zwei Konkurrenzreaktionen ab. Die eine entspricht den Vorgängen in Stickstoffatmosphäre. Dabei entstehen Aggregate mit einem mittleren Mol.-Gew. von 30 000 und mehr, die z. T. noch enzymatische Aktivität enthalten. Doch tritt bei Anwesenheit von  $O_2$  diese Komponente III weniger häufig auf als nach Bestrahlung unter  $N_2$ -Atmosphäre; denn in Luft ist sowohl die optische Absorption (vgl. Abb. 1) als auch die enzymatische Aktivität (vgl. Abb. 4) von Maximum III kleiner als in Stickstoff. Die nicht in Maximum III erscheinenden Bestrahlungsprodukte werden in Komponente II überführt. Da diese Komponente das  $1\frac{1}{2}$ -fache Mol.-Gew. eines Ribonuclease-Moleküls besitzt und außerdem keine enzymatische Aktivität zeigt, ist ihr Auftreten nicht leicht zu erklären. Möglicherweise werden bei Bestrahlung in

Luft die Disulfidbrücken der Ribonuclease oxydiert. Dadurch würde ermöglicht, daß ein RNase-Molekül durch einen Bruch in der Peptidkette in zwei Bruchstücke aufgespalten wird. Ob sich jeweils drei solcher Bruchstücke zusammenlagern oder ob ein Bruchstück mit einem RNase-Molekül reagiert und dieses dabei inaktiviert, läßt sich auf Grund unserer Versuche nicht entscheiden.

Die Untersuchungen in Methionin-Lösung bzw. an trocken bestrahlter Ribonuclease ergaben, daß auch hier die inaktivierten Moleküle praktisch ausschließlich als Dimere und höhere Aggregate vorliegen. Diese Tatsache ist bemerkenswert, da nach bisheriger Auffassung bei Bestrahlung im Trocknen völlig andere Mechanismen zur Inaktivierung führen als beim Bestrahlen in Lösung. Weiterhin ist auffallend, daß in Luft durch die Anwesenheit des Methionins die Entstehung von Molekülbruchstücken und damit das Auftreten von Komponente II verhindert wird.

SLOBODIAN und Mitarbb.<sup>18</sup> untersuchten die bei  $\gamma$ -Bestrahlung von Ribonuclease auftretenden Produkte mit Hilfe von Chromatographie über Carboxymethylcellulose (CM-Cellulose). Sie gingen von chromatographisch gereinigter Ribonuclease A aus, bei der 1,6% der Gesamtaktivität nicht als RNase A vorlagen. Da bei unseren Versuchen nach der Reinigung 1,8% der Enzym-Aktivität in den Aggregaten von Maximum III enthalten war, dürften damit die Ausgangsbedingungen der Experimente die gleichen gewesen sein. Beim Bestrahlen finden SLOBODIAN et al. eine Umwandlung der Ribonuclease A in fünf verschiedene Komponenten, die alle etwas enzymatische Aktivität zeigen. In einigen der bestrahlten Proben stieg die nicht in der RNase A enthaltene Aktivität auf das 9–10-fache der Kontrolle an. Da in unseren Versuchen bei Bestrahlung in  $N_2$  die enzymatische Aktivität in Maximum III von 1,8 bis auf 16% der Gesamtaktivität anstieg, scheint unsere Komponente III aus mehreren, in chemischer Hinsicht verschiedenen Einzelkomponenten zu bestehen und umgekehrt dürfte es sich bei den von SLOBODIAN nachgewiesenen Bestrahlungsprodukten um höhermolekulare Aggregate handeln. Es erscheint somit lohnend, die bei Auftrennung über Sephadex in Maximum III gemeinsam eluierten Komponenten anschließend einer Chromatographie über CM-Cellulose zu unterwerfen.

<sup>17</sup> J. R. WHITHACKER, *Analytic. Chem.* **35**, 1950 [1963].

<sup>18</sup> E. SLOBODIAN, M. FLEISHER, W. NEWMAN u. S. RUBENFELD, *Arch. Biochem. Biophysics* **97**, 59 [1962].

Durch Chromatographie über Sephadex findet SHAPIRA<sup>19</sup> nach Bestrahlung in O<sub>2</sub> teilweise oxydierte Ribonuclease, die noch enzymatische Aktivität besitzt, während in N<sub>2</sub> nur aggregiertes, enzymatisch inaktives Protein nachgewiesen wurde. Die nach Bestrahlung in Luft aufgenommenen Chromatogramme zeigen eine ähnliche Form wie unsere bei Abwesenheit von O<sub>2</sub>; umgekehrt sind die in N<sub>2</sub> beobachteten Spektren in etwa mit den von uns in Luft gemessenen vergleichbar. Diese Diskrepanz dürfte darauf zurückzuführen sein, daß bei nicht genau kontrolliertem O<sub>2</sub>-Gehalt die in N<sub>2</sub> bestrahlten Proben nach 79 krad, die in Luft bestrahlten nach 316 krad chromatographiert wurden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Versuche (vgl. Abb. 8) findet SHAPIRA beim Auftrennen von trocken bestrahlter Ribonuclease keine Aggregation. Allerdings beträgt bei der verabreichten Dosis von 316 krad der Anteil der strahleninduzierten Aggregate weniger als 1%, so daß er nur schwer nachzuweisen ist. FRIEDBERG und HAYDEN<sup>20</sup> beobachten in Lösungen von trocken bestrahlter Ribonuclease mit steigender Dosis eine Zunahme der Viskosität, aber keine Erhöhung des osmotischen Druckes. Aus dem zweiten experimentellen Befund schließen sie, daß bei der Bestrahlung von trockener Ribonuclease keine Aggregation auftritt. Die Ursache für diese Diskrepanz mit unseren Ergebnissen ist nicht geklärt.

Da die optische Gesamtabsorption mit zunehmender Dosis ansteigt (vgl. Abb. 2), ist die von uns beobachtete Aggregation offensichtlich nicht die einzige Veränderung, die an bestrahlter Ribonuclease auftritt. Die aggregierten Moleküle scheinen noch zusätzliche chemische Veränderungen oder Änderungen in der Konformation aufzuweisen. Daß bestrahlte Ribonuclease einen höheren Extinktionskoeffizienten besitzt als native, wurde bereits von einigen Autoren<sup>20-22</sup> beobachtet; doch ist die Ursache dieser Extinktionszunahme noch nicht geklärt. Es erscheint möglich, daß mit einer Auffaltung des Moleküls eine erhöhte optische Absorption verknüpft ist<sup>23</sup>. Wahrscheinlicher ist aber, daß die beobachteten großen Extinktionsänderungen durch das Zusammenwirken von zwei Ursachen zustandekommen. Nach HERMANS und SCHERAGA<sup>24</sup> werden bei der Denaturierung der Ribonuclease die Carboxyl-

Tyrosyl-Wasserstoffbrücken zerstört und außerdem die Tyrosylgruppen aus dem hydrophoben Innern des Moleküls in Kontakt mit dem Lösungsmittel gebracht. Beide Prozesse bewirken, daß die vorher maskierten Gruppen zur Erhöhung der optischen Absorption beitragen können.

Aus unseren Versuchen geht außerdem hervor, daß bei der Interpretation von „Sauerstoff-Effekten“ sehr sorgfältig vorgegangen werden sollte. Wie Abb. 5 zeigt, nimmt die enzymatische Gesamtaktivität in Luft und in N<sub>2</sub> verschieden schnell mit der Strahlendosis ab. Die beiden entsprechenden 37%-Dosen unterscheiden sich um einen Faktor von 1,2. Wenn nur die Gesamtaktivität berücksichtigt wird, verleitet ein solches Resultat zu dem Schluß, daß in Luft die Zahl der im Lösungsmittel erzeugten inaktivierenden Radikale um einen Faktor von 1,2 größer ist als in Stickstoff. Der beobachtete „Sauerstoff-Effekt“ ist aber nicht auf einen quantitativen, sondern auf einen qualitativen Unterschied zurückzuführen; d. h. in Luft ist nicht die Zahl der durch die Strahlung induzierten primären Umsetzungen höher als in N<sub>2</sub>, sondern in Luft laufen andere Reaktionen ab als in Stickstoff. Da diese Reaktionen weniger Enzym-Aktivität in den polymerisierten Komponenten erhalten (vgl. Abb. 4), verringert sich die Gesamtaktivität, so daß schließlich ein „Sauerstoff-Effekt“ zu beobachten ist. Dieser Befund macht deutlich, daß Dosis-Effekt-Kurven (Gesamtaktivität über der Dosis) nicht genügend Information enthalten, um Rückschlüsse auf eventuell wirksame Reaktionsmechanismen zuzulassen.

Zusammenfassend sei als wichtigstes Ergebnis der vorliegenden Arbeit der experimentelle Nachweis hervorgehoben, daß bei der Bestrahlung von Ribonuclease in Lösung, in Gegenwart eines Schutzstoffes und im Trockenen der Verlust der enzymatischen Aktivität stets mit einer Aggregation zu höhermolekularen Einheiten verbunden ist. Damit muß jede Theorie, welche die bei der Strahleninaktivierung von Ribonuclease ablaufenden Reaktionen beschreiben will, auch die Vorgänge bei der Polymerisation mit einschließen.

Herrn Professor Dr. K. G. ZIMMER danken wir für sein förderndes Interesse an dieser Arbeit, Frau U.-B. JUNG und Fräulein H. RECKERT für sorgfältige und fleißige Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente.

<sup>19</sup> R. SHAPIRA, *Int. J. Rad. Biol.* **7**, 537 [1963].

<sup>20</sup> F. FRIEDBERG u. G. A. HAYDEN, *Radiat. Res.* **26**, 263 [1965].

<sup>21</sup> J. W. HUNT u. J. F. WILLIAMS, *Radiat. Res.* **23**, 26 [1964].

<sup>22</sup> T. W. SMITH u. S. J. ADELSTEIN, *Radiat. Res.* **24**, 119 [1965].

<sup>23</sup> K. ROSENHECK u. P. DOTY, *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 1775 [1961].

<sup>24</sup> J. HERMANS u. H. A. SCHERAGA, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 3293 [1961].