

KERNFORSCHUNGSZENTRUM

KARLSRUHE

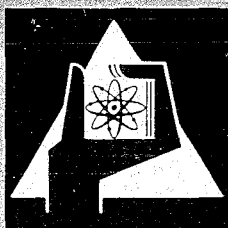
Juli 1968

KFK 827

Institut für Strahlenbiologie

Strahleninaktivierung von Ribonuclease bei erhöhten Temperaturen
und unterschiedlichen Dosisraten

K. Kürzinger, H. Jung



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE

Strahleninaktivierung von Ribonuclease bei erhöhten Temperaturen und unterschiedlichen Dosisraten

KLAUS KÜRZINGER und HORST JUNG

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforschg. 23 b, 949—952 [1968]; eingegangen am 28. Oktober 1967)

The radiosensitivity of dry ribonuclease was determined at various temperatures between 120 °K and 440 °K using 2 MeV protons. Within this temperature range the inactivation cross section $S(T)$ of ribonuclease may be described as a function of temperature by the expression

$$S(T) = (1.28 + 16 \cdot e^{-1000/RT} + 14\,000 \cdot e^{-6500/RT}) \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2.$$

This result indicates that the observed radiation damage to ribonuclease is produced by three different mechanisms, one being independent of temperature, the other two having apparent activation energies of 1 kcal/mole and 6.5 kcal/mole, respectively. From these relatively small activation energies the conclusion may be drawn that radical reactions contribute to the inactivation of enzymes in the dry state. Experiments with Co gamma radiation showed that the radiosensitivity of ribonuclease at 77 °K depends on dose rate; at room temperature a dose rate effect was not observed.

Wie in einer früheren Arbeit¹ gezeigt wurde, kann für eine große Zahl verschiedenartiger Makromoleküle und biologischer Objekte die Abhängigkeit des Inaktivierungs-Querschnitts S von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur durch den Ausdruck

$$S(T) = S_0 + S_1 \cdot e^{-E_1/RT} + S_2 \cdot e^{-E_2/RT} \quad (1)$$

beschrieben werden. Hierbei bedeutet R die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Die aus Gl. (1) ermittelten Aktivierungsenergien E_1 und E_2 stimmen für die verschiedenen untersuchten Objekte überein: E_1 beträgt recht genau 1 kcal/Mol, während E_2 stärkere Schwankungen um einen Mittelwert von 4 kcal/Mol zeigt. Diese zweite temperaturabhängige Komponente ist allein schon dadurch mit einem großen Fehler behaftet, daß sie durch doppelte Differenzbildung ermittelt wird. Darüber hinaus können die Versuche zur Bestimmung von E_2 wegen der thermischen Inaktivierung der Proben nicht zu beliebig hohen Temperaturen ausgedehnt werden, so daß nur in einem relativ kleinen Temperaturintervall der Beitrag des dritten Termes von Gl. (1) mit den beiden ersten vergleichbar ist. Es

war somit nicht leicht zu entscheiden, ob die Schwankungen der für E_2 ermittelten Werte allein von Meßfehlern herrühren, oder ob verschiedene Prozesse oder Prozeßketten mit unterschiedlichen Aktivierungsenergien beteiligt sind.

Methodik

Wir dehnten unsere früher bei Temperaturen unterhalb von Zimmertemperatur ausgeführten Experimente¹ auf den Bereich erhöhter Temperaturen aus, um den letzten Term von Gl. (1) $S_2 \cdot e^{-E_2/RT}$ genauer zu untersuchen. Die dazu verwendete Ribonuclease (RNase) bietet den Vorteil, daß sie thermisch sehr stabil ist, so daß wir unsere Messungen bis 170 °C ausdehnen konnten. Der Beitrag der thermischen Inaktivierung wurde dadurch eliminiert, daß die Kontrollen zusammen mit den bestrahlten Proben erwärmt und nach erfolgter Bestrahlung wieder abgekühlt wurden.

Für die Experimente mit 2 MeV-Protonen wurde eine Kammer verwendet, deren Konstruktion gewährleistet, daß die Enzym-Proben allseitig von erwärmten schwarzen Flächen umgeben waren, die mit Hilfe eines Ölthermostaten bei jeweils konstanter Temperatur gehalten wurden. Die Aufheizung erfolgte somit über Wärmestrahlung. Dadurch wurde sichergestellt, daß sich die Proben bei derselben Temperatur wie ihre Trägerplatte befanden. Bei Aufheizung durch Wärmelei-

¹ W. GÜNTHER u. H. JUNG, Z. Naturforschg. 22 b, 313 [1967].

tung ist dies infolge des hohen Isolationsvermögens der bestrahlten Substanzen nicht ohne weiteres zu erreichen. Weitere experimentelle Einzelheiten, wie Dosimetrie und Aufbau der Bestrahlungskammer^{2,3}, Probenherstellung und Bestrahlung¹ sowie die Methode der Enzymbestimmung^{4,5} wurden bereits beschrieben.

Die Experimente mit Co- γ -Strahlung sollten zeigen, ob die Dosisrate einen Einfluß auf die Größe der beobachteten Temperaturabhängigkeit hat. Deshalb wurden sie unter völlig identischen Bedingungen wie früher¹ ausgeführt; sie unterschieden sich einzig und allein dadurch, daß die Dosisrate nicht 0,4 Mrad/Stde., sondern 2 Mrad/Stde. betrug.

Ergebnisse und Diskussion

Experimente mit 2 MeV-Protonen: Bei allen untersuchten Temperaturen ergaben sich für die Inaktivierung von Ribonuclease durch 2 MeV-Protonen exponentielle Dosis-Effekt-Kurven, so daß die Angabe der 37%-Dosis (D_{37}) zur Charakterisierung der Strahlenempfindlichkeit genügt. In Abb. 1 sind die ermittelten Inaktivierungs-Querschnitte S

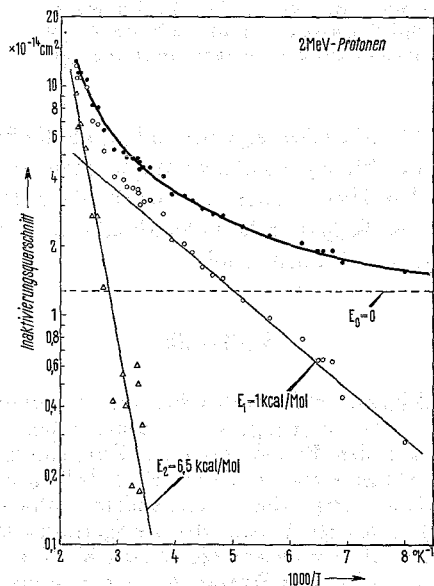


Abb. 1. Wirkungsquerschnitte für die Inaktivierung von Ribonuclease durch 2 MeV-Protonen in Abhängigkeit von der reziproken absoluten Temperatur (weitere Erklärungen im Text).

² K. O. HERMANN, Z. Naturforsch. **21 b**, 678 [1966].

³ H. H. CÜNTHER u. K. O. HERMANN, Z. Naturforsch. **22 b**, 53 [1967].

⁴ H. JUNG, Z. Naturforsch. **20 b**, 764 [1965].

⁵ H. JUNG, Z. Naturforsch. **21 b**, 1165 [1966].

⁶ T. BRUSTAD, in: Biological Effects of Neutron and Proton Irradiations II, S. 404. Internat. Atomic Energy Agency, Vienna 1964.

($= 1/D_{37}$) zusammen mit den Resultaten einer früheren Arbeit¹ in Form einer Arrhenius-Darstellung über der reziproken absoluten Temperatur aufgetragen. Mit zunehmenden Werten von $1/T$ scheint die Kurve einem konstanten Wert zuzustreben, der experimentell nicht erfaßt wurde. Doch ist an der Existenz dieses konstanten Anteils nicht zu zweifeln. Denn bei allen Experimenten, die bisher zwischen der Temperatur des flüssigen Stickstoffs und der des flüssigen Heliums ausgeführt wurden, zeigte sich, daß die Inaktivierungsrate zwischen 4 °K und 77 °K nicht von der Temperatur abhängt; dieser Befund gilt für Trypsin bei verschiedenen Strahlenarten⁶, für T1-Bakteriophagen unter diversen experimentellen Bedingungen⁷ sowie für Sporen von *B. megaterium*⁸. Durch Extrapolation des gemessenen Kurvenverlaufes ergibt sich ein von der Temperatur unabhängiger Inaktivierungs-Querschnitt von $S_0 = 1,28 \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2$ (Abb. 1, unterbrochene horizontale Gerade mit $E_0 = 0$). Wird dieser Wert von den Meßpunkten subtrahiert, so erhält man die Kreise, die unterhalb von Zimmertemperatur auf einer Geraden liegen, deren Steigung einer Aktivierungsenergie von $(1,0 \pm 0,1) \text{ kcal/Mol}$ entspricht. Ohne Einbeziehung der hier neu hinzugekommenen Meßpunkte war früher ein Wert von $E_1 = 1,05 \text{ kcal/Mol}$ ermittelt worden. Durch nochmalige Differenzbildung zwischen den Kreisen und der extrapolierten Geraden ergeben sich die Dreiecke, die über zwei Dekaden hinweg recht gut auf einer Geraden mit einer Aktivierungsenergie von $(6,5 \pm 1,5) \text{ kcal/Mol}$ liegen. Die Abhängigkeit des Inaktivierungs-Querschnitts von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur kann somit durch den Ausdruck

$$S(T) = (1,28 + 16 \cdot e^{-1000/RT} + 14\,000 \cdot e^{-6500/RT}) \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2 \quad (2)$$

wiedergegeben werden. Die auf Abb. 1 durch die Meßpunkte gelegte Kurve entspricht dieser Gl. (2). Legt man eine lineare Energieabgabe von $166,5 \text{ MeV} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ zugrunde⁹, so kann der Teilchenfluß in die entsprechende Dosis umgerechnet werden, wodurch ein Vergleich zwischen Gl. (2) und den mit

⁷ J. UENZELMANN, Dissertation, Universität Heidelberg 1968.

⁸ R. B. WEBB, C. F. EHRET u. E. L. POWERS, Experientia [Basel] **14**, 324 [1958].

⁹ D. E. LEA, Actions of Radiations on Living Cells. University Press, Cambridge 1946.

2 MeV-Deuteronen¹ und 3 MeV-Elektronen¹⁰ erhaltenen Daten ermöglicht wird:

$$2 \text{ MeV-p: } S(T) = 0,0048 + 0,060 \cdot e^{-1000/RT} + 52 \cdot e^{-6500/RT} \text{ Mrad}^{-1}. \quad (3)$$

$$2 \text{ MeV-d: } S(T) = 0,0055 + 0,070 \cdot e^{-1050/RT} \text{ Mrad}^{-1}. \quad (4)$$

$$3 \text{ MeV-e: } S(T) = 0,005 + 0,06 \cdot e^{-1060/RT} + 25 \cdot e^{-6100/RT} \text{ Mrad}^{-1}. \quad (5)$$

Diese Zusammenstellung zeigt, daß die Inaktivierungsrate für alle drei Strahlenarten in gleicher Weise von der Temperatur abhängt, d. h. nicht nur die ermittelten Aktivierungs-Energien, sondern auch die Koeffizienten, die den absoluten Betrag der Strahlenempfindlichkeit beschreiben, sind innerhalb der Fehlergrenzen identisch. Die Bestrahlungen mit 2 MeV-Deuteronen wurden nur bei Temperaturen unterhalb von 20 °C durchgeführt, so daß die zweite temperaturabhängige Komponente $S_2 \cdot e^{-E_2/RT}$ nicht erfaßt werden konnte.

Die hier mitgeteilten Aktivierungsenergien möchten wir als „formale Aktivierungsenergien“ bezeichnen, da die Angabe einer Aktivierungsenergie keinen Sinn hat, wenn nicht die zugehörigen Prozesse bekannt sind. Unter „Aktivierungsenergie“ soll lediglich ein Temperatur-Exponent verstanden werden, der die Abhängigkeit der experimentell ermittelten Inaktivierungsraten von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur beschreibt. Dabei soll auch nicht impliziert werden, daß diese Bestrahlungstemperatur mit irgendeiner „Reaktionstemperatur“ identisch ist. Zwar werden durch die Absorption von Strahlung recht große Energiebeträge in relativ kleinen Volumina konzentriert, wodurch die Anwendung des Temperaturbegriffs ohnehin problematisch wird, doch scheint es nicht ganz zwingend zu sein, aus der Existenz des temperaturunabhängigen Anteils S_0 auf Reaktionstemperaturen von 1000 °K und mehr zu schließen¹¹; denn die Wirkungen ionisierender Strahlen beruhen nicht nur auf Temperatur-gesteuerten Reaktionen, es gibt auch Prozesse, wie z. B. die Ionisierung eines Moleküls, die in erster Näherung nicht von der Temperatur abhängen. Daneben sind aber auch Inaktivierungs-Prozesse denkbar, deren Geschwindigkeits-

Konstante nicht durch die lokale Temperaturerhöhung am Ort der Strahlenabsorption beeinflusst wird, wodurch die Bestrahlungstemperatur die Bedeutung einer Reaktionstemperatur erlangt. Einer dieser Prozesse ist die Schädigung der RNase-Moleküle durch kleine diffusible Radikale (wie z. B. H-Atome). Daß atomarer Wasserstoff in der Lage ist, die enzymatische Aktivität von RNase und die biologische Funktionsfähigkeit von DNS und Bakteriophagen im Trockenen zu zerstören, konnten wir kürzlich nachweisen¹². Eine Untersuchung der Frage, ob und wie weit die Temperaturabhängigkeit solcher Radikalreaktionen mit den hier angegebenen Aktivierungsenergien korrelierbar ist, wurde von uns soeben begonnen. Doch unabhängig von der noch nicht abgeschlossenen Diskussion, ob die Anwendung der thermodynamischen Betrachtungsweise auf die hier diskutierten Probleme streng zulässig ist oder nicht, halten wir die Tatsache für bemerkenswert, daß die Strahlenempfindlichkeit zahlreicher biologischer Objekte durch Gl. (1) als Funktion der Temperatur beschrieben werden kann mit $E_1 = 1 \text{ kcal/Mol}$ und $E_2 = 4 - 6 \text{ kcal Mol}$.

Experimente mit γ -Strahlung: Wie unsere früheren Untersuchungen¹ ergaben, tritt beim Bestrahlen mit Co- γ -Strahlung keine temperaturunabhängige Komponente S_0 auf. Da bei Verwendung von 3 MeV-Elektronen der Term S_0 jedoch die gleiche Größe hat wie bei den Protonen- und Deuteronen-Experimenten (vgl. Gln. 3, 4 und 5), konnte die unterschiedliche Ionisierungsdichte von Protonen und γ -Strahlen nicht zur Erklärung dieser Diskrepanz herangezogen werden. Da die Experimente mit γ -Strahlung bei einer Dosisrate von 0,4 Mrad/Stde., die mit Protonen, Deuteronen und Elektronen jedoch bei einigen Mrad pro Sek. ausgeführt worden waren, lag es nahe, den Einfluß der Dosisrate auf den Temperatureffekt zu untersuchen*. Steigert man hierzu die Dosisrate der γ -Strahlung auf 2 Mrad/Stde., dann beträgt die bei 20 °C bestimmte 37%-Dosis 41 Mrad (vgl. Abb. 2). Dieser Wert stimmt mit der bei kleiner Dosisrate erhaltenen D_{37} von 42 Mrad¹ sehr gut überein. Bei Zimmertemperatur hängt im untersuchten Bereich die Strahlenempfindlichkeit der RNase folglich nicht von der Dosisrate der γ -Strahlung ab. Werden die Bestrahlungen da-

¹⁰ D. J. FLUKE, Radiat. Res. 28, 677 [1966].

¹¹ H. PAULY, Biophysik 3, 40 [1966].

¹² H. JUNG u. K. KÜRZINGER, Radiat. Res., im Druck.

* Bereits 1965 ist von THOMSON und STRATTON auf eine mögliche Dosisraten-Abhängigkeit des Temperatureffektes von Ribonuclease hingewiesen worden (D. H. THOMSON u. K. STRATTON, Radiat. Res. 25, 247 [1965]).

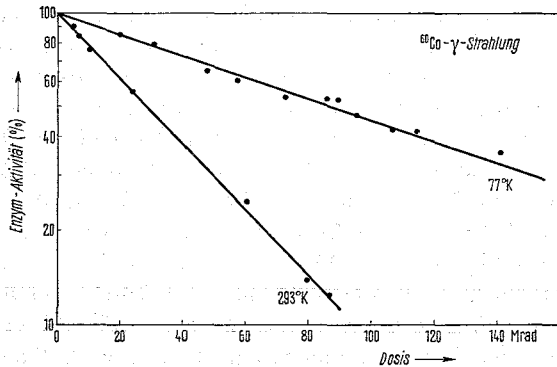


Abb. 2. Inaktivierung von trockener Ribonuclease durch ^{60}Co - γ -Strahlung im Vakuum bei verschiedenen Temperaturen (Dosisrate 2 Mrad/Stde.).

gegen bei 77 °K ausgeführt, dann ergibt sich eine $D_{37} = 125$ Mrad (Abb. 2), was gegenüber der bei kleinen Dosisraten ermittelten $D_{37} > 800$ Mrad eine ausgeprägte Sensibilitätssteigerung bedeutet.

Bestimmt man aus Gl. (2) die Inaktivierungs-Querschnitte für 2 MeV-Protonen für die Temperaturen $T = 293$ °K und $T = 77$ °K, so ergeben sich $4,31 \cdot 10^{-14}$ cm² und $1,31 \cdot 10^{-14}$ cm². Der Quotient aus den beiden Wirkungs-Querschnitten beträgt $p = 3,3$. Vergleichen wir diesen Wert mit dem für γ -Strahlung ermittelten Temperatureffekt von $p = 125/41 = 3,1$, so ergibt sich eine schöne Übereinstimmung zwischen den Experimenten mit Protonen, Deuteronen bzw. Elektronen und den Versuchen mit γ -Strahlung bei erhöhter Dosisrate.