

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

Juli 1968

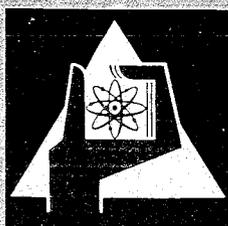
KFK 828

Institut für Strahlenbiologie

Zur Strahleninaktivierung von Ribonuclease

III. Aminosäuren-Veränderungen nach Bestrahlung im Trockenen

H. Jung, H. Schüssler



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE



Zur Strahleninaktivierung von Ribonuclease

III. Aminosäuren-Veränderungen nach Bestrahlung im Trockenen^{1,2}

HORST JUNG und HELGA SCHÜSSLER

Zur Strahleninaktivierung von Ribonuclease

III. Aminosäuren-Veränderungen nach Bestrahlung im Trockenen^{1,2}

HORST JUNG * und HELGA SCHÜSSLER **

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe *
und Institut für Med. Strahlenkunde der Universität Erlangen-Nürnberg **

(Z. Naturforschg. 23 b, 934—943 [1968]; eingegangen am 4. Januar 1968)

Dry ribonuclease was irradiated with ⁶⁰Co gamma radiation in vacuo, under oxygen atmosphere, and at 77 °K. By chromatography on Sephadex G-50 active ribonuclease was separated from inactive radiation products. From the elution pattern and by ultracentrifugation it was shown that mainly unfolded dimers are formed by gamma irradiation of dry ribonuclease. Amino acid analysis of these various products shows that in all components cystine, methionine, tyrosine, phenylalanine, lysine, and histidine are destroyed with increasing dose whereas glycine shows a small increase. Thus, in ribonuclease irradiated in the dry state the same amino acids are changed as was found after irradiation in aqueous solutions. The radiosensitivity of dry ribonuclease shows an increase by the presence of oxygen of about 2 and a decrease at low temperature in vacuo of about 5. The same factors were also found for the alteration of amino acids, which means that under various experimental conditions amino acid destruction is proportional to loss of enzymatic activity of ribonuclease. The observed selectivity of amino acid destruction may be explained by energy migration or by the attack of atomic hydrogen liberated at random from the molecule. The total number of amino acids destroyed per ribonuclease molecule increases with dose. In enzymatically inactive products this value is always higher by one amino acid residue than in the active components. From this result and from the increase with dose it is concluded that after destruction of one amino acid residue the ribonuclease molecule has a probability (not depending on dose of irradiation) of 0.45 to become inactivated whereas in 55 per cent of all cases the molecule maintains its enzymatic activity.

Im Rahmen der seit Jahren andauernden Diskussion über die Mechanismen, die bei der Strahleninaktivierung von Enzymen von Bedeutung sind, wurde der Verlust der enzymatischen Aktivität am häufigsten auf folgende Prozesse zurückgeführt: 1. Zerstörung von Aminosäuren-Seitenketten, wodurch wesentliche Elemente des aktiven Zentrums verändert werden; 2. Unterbrechung von einigen spezifischen sekundären und tertiären Bindungen, die für die Aufrechterhaltung der Konformation des aktiven Zentrums verantwortlich sind; 3. Vernetzung und Brüche in der Hauptkette; 4. Veränderung der Konformation durch das gleichzeitige Aufbrechen mehrerer Wasserstoffbindungen. Während der letzten Jahre versuchten zahlreiche Autoren die Frage zu klären, welcher der angeführten Mechanismen in dem Dosisbereich wirksam ist, in dem die enzymatische Funktionsfähigkeit des Moleküls zerstört wird. Bei diesen Experimenten konzentrierte man sich in erster Linie auf Parallelmessungen von Enzymakti-

vität und physikalischen und chemischen Veränderungen, wie optische Absorption, Radikalerzeugung, elektrophoretisches und chromatographisches Verhalten, Freisetzung von titrierbaren Gruppen, Aminosäuren-Zusammensetzung, Affinität für das Substrat, u. ä. Die dabei für Ribonuclease (RNase) erbrachten Resultate sind jedoch recht widersprüchlich. Einige Autoren³⁻⁵ berichten, daß in trocken bestrahlter Ribonuclease Cystin mit zunehmender Dosis verändert wird, während nach HAYDEN und FRIEDBERG⁶ bis 45 Mrad weder Cystin noch Methionin, Tyrosin oder Phenylalanin abgebaut werden. Die gleichen Autoren konnten weder durch Ultrazentrifugation⁶ noch durch osmotische Daten⁷ eine Aggregation nachweisen, dagegen fanden HASKILL und HUNT⁸ aggregierte RNase-Moleküle nach Bestrahlung im Trockenen. Die Veränderung von Extinktion und optischer Rotation spricht ferner für das Vorhandensein von Konformations-Änderungen^{5,7,8}, von denen jedoch nicht sicher ist, ob sie zur Erklä-

¹ I. Mitt.: H. JUNG u. H. SCHÜSSLER, Z. Naturforschg. 21 b, 224 [1966].

² II. Mitt.: H. SCHÜSSLER u. H. JUNG, Z. Naturforschg. 22 b, 614 [1967].

³ D. K. RAY, F. HUTCHINSON u. H. J. MOROWITZ, Nature [London] 186, 312 [1960].

⁴ L. G. AUGENSTEIN u. K. GRIST, zitiert bei L. G. AUGENSTEIN, Advances in Enzymol. 24, 359 [1962].

⁵ J. W. HUNT u. J. F. WILLIAMS, Radiat. Res. 23, 26 [1964].

⁶ G. A. HAYDEN u. F. FRIEDBERG, Radiat. Res. 22, 130 [1964].

⁷ F. FRIEDBERG u. G. A. HAYDEN, Radiat. Res. 26, 263 [1965].

⁸ J. S. HASKILL u. J. W. HUNT, Radiat. Res. 31, 327 [1967].

rung der beobachteten Aktivitätsabnahme ausreichen. Aus diesem Grunde erschien es uns erforderlich, die nach Bestrahlung im Trockenem entstehenden Aminosäuren-Veränderungen sowie das Auftreten von aggregierten Bestrahlungsprodukten näher zu untersuchen.

Ein weiterer Grund für die Durchführung dieser Versuche war folgender: Wie wir in einer früheren Arbeit⁹ zeigten, beträgt die 37%-Dosis (D_{37}) für die Inaktivierung von Ribonuclease durch $^{60}\text{Co-}\gamma$ -Strahlung 42 Mrad. Dieser Wert gilt für Zimmertemperatur und stimmt mit den Befunden von HUNT und WILLIAMS⁵ ($D_{37} = 48$ Mrad) und von FRIEDBERG und HAYDEN⁷ ($D_{37} = 38$ Mrad) gut überein. Legt man einen mittleren Energieaufwand von 60 eV pro Primäronisation zugrunde (dies scheint uns aus der Vielzahl der bisher publizierten Werte der wahrscheinlichste zu sein¹⁰), dann ergibt sich aus der D_{37} mit Hilfe der Treffbereichstheorie¹¹ für das empfindliche Target ein Mol.-Gew. von 13 750. Vergleicht man diesen Wert mit dem Mol.-Gew. von Ribonuclease ($MG = 13\,680$ ¹²), dann könnte diese „exzellente“ Übereinstimmung als Beweis für die Anwendbarkeit der Treffbereichstheorie angesehen werden (ganz entsprechende Folgerungen^{13,14} wurden schon aus der LET-Abhängigkeit des Inaktivierungs-Querschnitts von RNase¹⁵ gezogen – allerdings für ein Mol.-Gew. von 27 000). Nach dieser Abschätzung sollten nur diejenigen RNase-Moleküle inaktiviert werden, in denen eine Primäronisation auftritt, während die enzymatisch aktive Komponente aus völlig unveränderten Molekülen besteht. Nachdem uns früher bei bestrahlten wäßrigen Lösungen von Ribonuclease die Trennung von aktiven und inaktiven Bestrahlungsprodukten gelungen war¹, wodurch Aminosäuren-Analysen an beiden Komponenten möglich wurden², erschien uns die Anwendung dieser Untersuchungsmethode zur Klärung des zur Diskussion stehenden Problems erfolgversprechend. Wenn die Vorstellungen der Treffbereichstheorie zutreffen, dann sollten die enzymatisch

aktiven Moleküle die gleiche Aminosäuren-Zusammensetzung aufweisen wie unbestrahlte RNase; die in den inaktivierten Bestrahlungsprodukten auftretenden Veränderungen sollten dagegen mehr oder weniger gleichmäßig über alle Aminosäuren verteilt sein, da die Absorption der Strahlung rein statistisch erfolgt.

Wenn die Bestrahlungen bei Zimmertemperatur im Vakuum und unter Sauerstoff sowie bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden, dann sollte ein solches Experiment darüber hinaus noch Informationen über die Mechanismen von Sauerstoff- und Temperatureffekt liefern. Es ist bekannt, daß die Strahlenempfindlichkeit von Ribonuclease in O_2 -Atmosphäre größer ist als im Vakuum^{9,16}, bei tiefen Temperaturen jedoch wesentlich geringer als bei Zimmertemperatur^{9,17}. Es sollte sich somit die Frage klären lassen, ob die Inaktivierung der enzymatischen Funktionsfähigkeit und die Zerstörung der Aminosäuren parallel laufen (was bedeuten würde, daß es auch einen O_2 - bzw. Temperatureffekt hinsichtlich der Aminosäuren-Veränderungen gibt) oder ob die Zahl der zerstörten Aminosäuren einzig und allein von der Dosis abhängt.

Methodik

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde reine Ribonuclease A¹⁸ verwendet, die durch Chromatographie über Amberlite IRC-50 (XE-64) aus käuflicher RNase erhalten wurde. Reinigungsverfahren, Entsalzen und Prüfung der gereinigten RNase A auf Einheitlichkeit wurden bereits früher mitgeteilt¹. Für die Bestrahlungen unter O_2 -Atmosphäre wurden jeweils 30 mg der gereinigten und gefriergetrockneten Ribonuclease in Ampullen aus Pyrexglas eingewogen, längere Zeit mit getrocknetem O_2 gespült und dann abgeschmolzen. Für die Experimente unter anaeroben Bedingungen wurden die Ampullen mit der RNase vor dem Abschmelzen mindestens 24 Std. auf 10^{-5} Torr evakuiert. Die Bestrahlung erfolgte in einer $^{60}\text{Co-}\gamma$ -Quelle bei einer Dosisleistung von 1,8 Mrad/Stde. Nach Ende der Bestrahlung wurden die Proben in 6 ml 0,05-m. Ammoniumacetat gelöst, auf eine Säule von 3 m Länge

⁹ W. GÜNTHER u. H. JUNG, Z. Naturforschg. **22b**, 313 [1967].

¹⁰ H. JUNG u. K. G. ZIMMER, in: Current Topics in Radiation Research II (eds. EBERT u. HOWARD), S. 69. North-Holland Publishing Co., Amsterdam 1966.

¹¹ K. G. ZIMMER, Studies on Quantitative Radiation Biology. Oliver & Boyd, Edinburgh/London 1961.

¹² C. H. W. HIRS, S. MOORE u. W. H. STEIN, J. biol. Chemistry **235**, 633 [1960].

¹³ F. HUTCHINSON u. E. C. POLLARD, in: Mechanismus in Radiobiology I (eds. ERRERA u. FORSSBERG), S. 71. Academic Press, New York 1961.

¹⁴ F. DESSAUER u. K. SOMMERMEYER, Quantenbiologie. Springer-Verlag, Berlin 1964.

¹⁵ R. A. DEERING, Radiat. Res. **5**, 238 [1956].

¹⁶ J. W. HUNT, J. E. TILL u. J. W. WILLIAMS, Radiat. Res. **17**, 703 [1962].

¹⁷ D. J. FLUKE, Radiat. Res. **28**, 677 [1966].

¹⁸ C. H. W. HIRS, S. MOORE u. W. H. STEIN, J. biol. Chemistry **200**, 493 [1953].

und 2 cm Durchmesser von Sephadex G-50/fein aufgetragen, mit 0,05-m. Ammoniumacetat eluiert und das Eluat in 3-ml-Fractionen aufgefangen. Nach Messung der Enzymaktivität^{19, 20} und der optischen Absorption bei 278 m μ wurden die das gleiche Bestrahlungsprodukt enthaltenden Fractionen gemeinsam gefriergetrocknet und nach Hydrolyse²¹ in 6-n. HCl einer Aminosäuren-Analyse²² unterworfen. Einzelheiten dieser Methode sowie das Auswerteverfahren wurden bereits beschrieben².

Ergebnisse

Abb. 1 zeigt Dosis-Effekt-Kurven für die Inaktivierung von jeweils 5 mg gefriergetrockneter Ribonuclease durch Co- γ -Strahlung, die unter verschiedenen Versuchsbedingungen aufgenommen wurden.

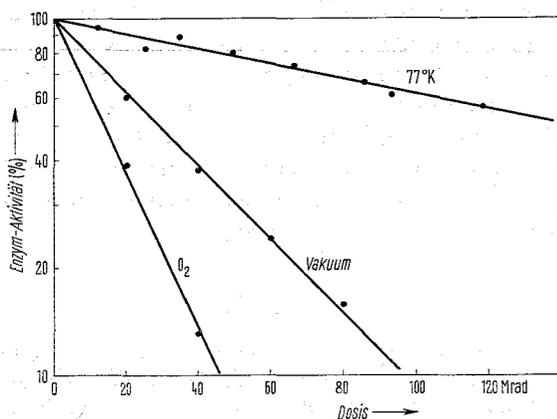


Abb. 1. Inaktivierung von 5-mg-Proben trockener Ribonuclease mit ⁶⁰Co- γ -Strahlung unter O₂-Atmosphäre, im Vakuum und bei 77 °K.

Bei Bestrahlung unter O₂-Atmosphäre beträgt die 37%-Dosis (D₃₇) 20 Mrad, im Vakuum 42 Mrad und bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs 200 Mrad. Bezogen auf die Strahlenempfindlichkeit bei Zimmertemperatur wird durch die Anwesenheit des O₂ die Sensibilität der RNase um einen Faktor von 2,1 erhöht, bei tiefen Temperaturen wird sie um einen Faktor von 4,8 verringert. Trennt man unbestrahlte RNase A in der beschriebenen Weise über Sephadex G-50 auf, so findet man (vgl. Abb. 2) ein ausgeprägtes Maximum (Peak I_n), das aus monomerer RNase A besteht. Etwa 2% der Ribonuclease liegen als Dimere vor, was sich durch das kleine

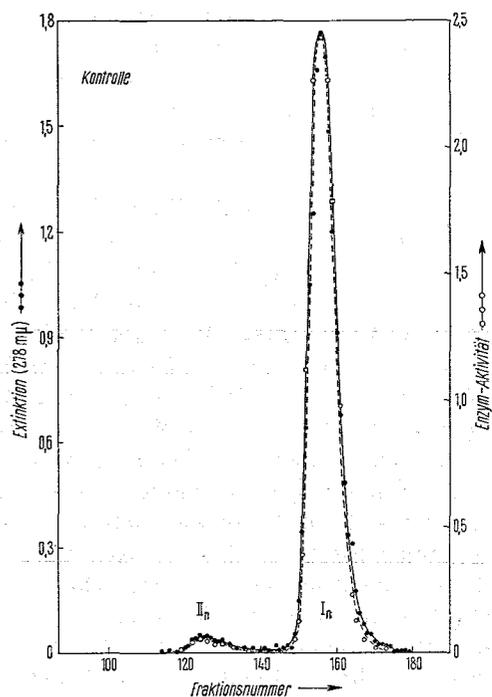


Abb. 2. Chromatographische Auftrennung von 90 mg Ribonuclease A über Sephadex G-50 (eine Einheit der Enzym-Aktivität entspricht 1 mg RNase/ml).

Maximum II_n bemerkbar macht. Diese Dimere entstehen beim Gefrier-trocknen²³, besitzen aber enzymatische Aktivität. Nach Bestrahlung unter O₂-Atmosphäre bei Zimmertemperatur treten (vgl. Abb. 3) zwei neue Maxima auf (Komponente I_d und II_d). Mit zunehmender Dosis wächst II_d an, während I_d bis etwa 40 Mrad konstant bleibt und dann ebenfalls abnimmt. Unter anaeroben Bestrahlungsbedingungen tritt (vgl. Abb. 4) Komponente I_d praktisch nicht auf; die native RNase I_n wird mit zunehmender Inaktivierung in Komponente II_d umgewandelt. Nach 45 Mrad (O₂) bzw. 95 Mrad (Vakuum) ist die Extinktion von Komponente II_d stets größer als 0,3; sie weist jedoch stärkere Schwankungen auf, da mit fortschreitendem Inaktivierungsgrad ein Teil der Bestrahlungsprodukte unlöslich wird und somit im Peak II_d „fehlt“. Komponente II_d enthält noch etwas enzymatische Aktivität, und zwar unter Vakuum etwas mehr als nach Bestrahlung in O₂-Atmosphäre; doch ist dieser Unterschied geringer als bei bestrahlten wässrigen Lösungen¹. Bei kleinen Dosen er-

¹⁹ H. JUNG, Z. Naturforschg. **20b**, 764 [1965].

²⁰ H. JUNG, Z. Naturforschg. **21b**, 1165 [1966].

²¹ G. GUNDLACH, W. H. STEIN u. S. MOORE, J. biol. Chemistry **234**, 1754 [1959].

²² D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN u. S. MOORE, Analytic Chem. **30**, 1190 [1958].

²³ A. M. CRESTFIELD, W. H. STEIN u. S. MOORE, Arch. Biochem. Biophysics Suppl. **1**, 217 [1962].

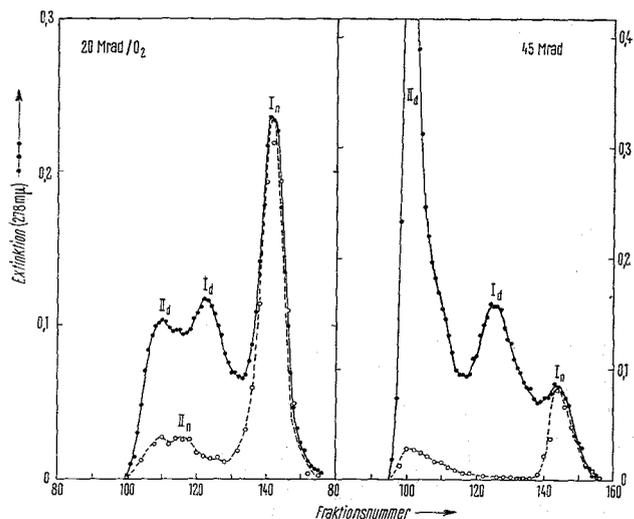


Abb. 3. Chromatographische Auftrennung von 30 mg Ribonuclease A nach Bestrahlung in O_2 -Atmosphäre mit 20 bzw. 45 Mrad (die Restaktivität beträgt ca. 40 bzw. 10%).

Es ist möglich, aus der Lage der einzelnen Komponenten im Elutionsdiagramm auf ihr Mol.-Gew. zu schließen²⁴. Die von uns benutzte Säule wurde zu diesem Zweck mit Ribonuclease, Chymotrypsin, Pepsin, Eialbumin und Blue Dextran geeicht. Außerdem wurden die Mol.-Gew. mit Hilfe einer Analytischen Ultrazentrifuge (Beckman, Spinco Modell E) nach der Methode von YPHANTIS²⁵ bestimmt. Die nach beiden Methoden erhaltenen Werte sind in Tab. 1 zusammengestellt. Die Komponenten I_d und II_d kommen früher von der Säule, als es ihrem Mol.-Gew. entspricht. Ihre Struktur muß sich folg-

Komponente	Mol.-Gew.-Bestimmung		Zustand
	Sephadex	Ultra-zentrifuge	
I_n	14 000	monomer	nativ
I_d	18—20 000	monomer	denaturiert
II_n	28 000	dimer	nativ
II_d	30—35 000	dimer	denaturiert

Tab. 1. Vergleich der Mol.-Gew.-Bestimmungen über Sephadex und mit der Analytischen Ultrazentrifuge.

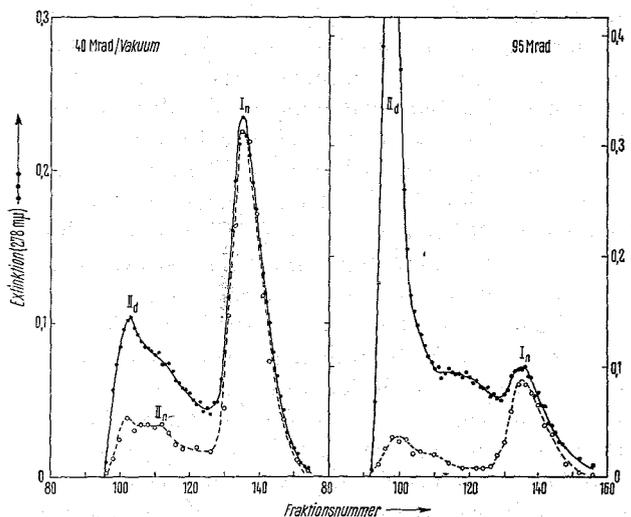


Abb. 4. Chromatographische Auftrennung von 30 mg Ribonuclease A nach Bestrahlung im Vakuum mit 40 bzw. 95 Mrad (die Restaktivität beträgt 40 bzw. 10%).

scheint neben der Enzym-Aktivität von Komponente II_d noch die Aktivität der nativen Dimere II_n . Der Beitrag dieser letzten Komponente verringert sich mit zunehmender Dosis; denn II_d wird stetig inaktiviert, während die Aktivität von II_d zunächst ansteigt, erst bei höheren Dosen verläuft die Inaktivierung schneller als die Neubildung von enzymatisch aktiven Aggregaten.

lich durch die Bestrahlung so verändert haben, daß sie einen größeren Raum einnehmen als native Moleküle. Diese Untersuchungen zeigen, daß Komponente I_n aus nativer monomerer RNase besteht; Maximum I_d enthält denaturierte (aufgefaltete) Einzelmoleküle, II_n native Dimere und II_d denaturierte Dimere. Bei der letzten Komponente II_d ist die Anwesenheit eines kleinen Anteils an höheren Aggregaten jedoch nicht mit Sicherheit auszuschließen. Diese hier benutzte Nomenklatur weicht von den früher^{1, 2} verwendeten Bezeichnungen ab. Die Gründe für diese Änderung wurden bereits dargelegt²⁶; sie soll vor allem die bisher übliche uneinheitliche Nomenklatur beseitigen (für native RNase findet man z. B. in der Literatur die Bezeichnungen I^{1, 2}, II²⁷ und III⁸). Den wesentlichen Vorteil dieser neuen Benennung sehen wir darin, daß sie Information über die Art der betreffenden Komponente enthält: Die römischen Ziffern geben die Zahl der bei der Aggregation beteiligten Moleküle an, der Index n steht für „nativ“, d für „denaturiert“.

Abb. 5 zeigt die Elutionsdiagramme von Ribonuclease, die bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs bestrahlt wurde. Bei Dosen unterhalb von 120 Mrad wird zunächst Komponente II_n gebildet, d. h. es erfolgt eine Dimerisierung von nicht aufgefalteten Molekülen. Bei 180 Mrad macht sich das

²⁴ J. R. WHITAKER, *Analytic. Chem.* **35**, 1950 [1963].

²⁵ D. A. YPHANTIS, *Ann. New York Acad. Sci.* **83**, 586 [1960].

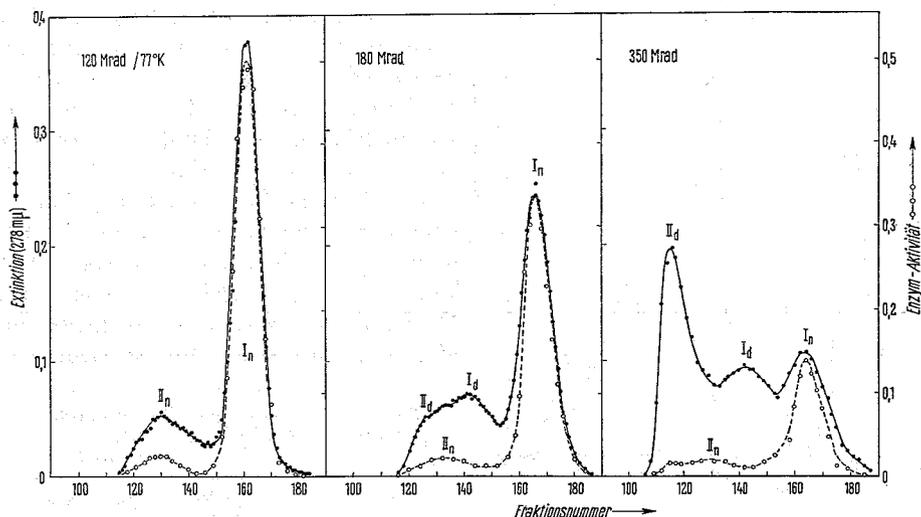


Abb. 5. Chromatographische Auftrennung von 30 mg Ribonuclease A nach Bestrahlung bei 77 °K mit 120, 180 bzw. 350 Mrad (die Restaktivität beträgt 60, 45 bzw. 15%).

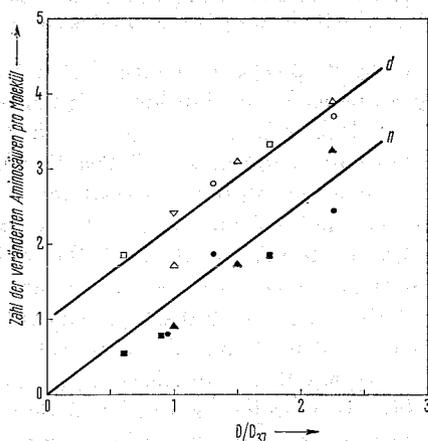


Abb. 6. Summe der insgesamt zerstörten Aminosäuren pro Ribonuclease-Molekül in den verschiedenen Komponenten. n = enzymatisch aktive Ribonuclease, d = inaktivierte Bestrahlungsprodukte.

	Vak.	O ₂	77 °K
Komponente I _n	●	▲	■
Komponente I _d	—	▽	—
Komponente II _d	○	△	□

Auftreten von denaturierten Monomeren und Dimeren bereits bemerkbar und bei 350 Mrad liegt das bestrahlte Material zum überwiegenden Teil in die-

sen beiden Komponenten I_d und II_d vor. Wie bei Zimmertemperatur wird auch durch Bestrahlung bei 77 °K ein Teil der Bestrahlungsprodukte unlöslich, so daß in den Chromatogrammen die denaturierte Komponente II_d wesentlich kleiner ist als es der Menge an insgesamt inaktivierter RNase entspricht.

Wie die Abn. 2–5 zeigen, können bei trocken bestrahlter Ribonuclease durch Chromatographie über Sephadex die nativen Moleküle von den weitgehend denaturierten Komponenten abgetrennt werden. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, die verschiedenen durch Bestrahlung entstehenden Produkte einzeln einer Aminosäuren-Analyse zu unterwerfen, um auf diese Weise die Änderungen in der Primärstruktur zu ermitteln, durch die sich aktive und inaktive Moleküle unterscheiden. Bei den eingangs zitierten Arbeiten anderer Autoren wurden stets Gemische von aktiven und inaktiven Produkten analysiert, so daß eine solche Aussage nicht erbracht werden konnte.

Die Aminosäuren-Zusammensetzung der beiden nach Bestrahlung im Vakuum separierbaren Komponenten I_n und II_d (vgl. Abb. 4) ist aus Tab. 2 ersichtlich. Die für unbestrahlte Ribonuclease A („Kontrolle“) ermittelten Resultate stimmen gut mit den theoretisch zu erwartenden Werten²⁸ überein. Die Abweichung im Falle des Isoleucins ist auf un-

²⁶ H. JUNG u. H. SCHÜSSLER, *studia biophysica* 7, 23 [1968].

²⁷ V. I. MAKSIMOV, V. I. OSIPOV u. YE. D. KAVERZNEVA, *Biokhimiya* 32, 403 [1967].

²⁸ C. H. W. HIRS, S. MOORE u. W. H. STEIN, *J. biol. Chemistry* 219, 623 [1956].

Aminosäure	Theoretischer Wert	Kontrolle	Komponente I _n			Komponente II _d	
			40 Mrad	55 Mrad	95 Mrad	55 Mrad	95 Mrad
Asparaginsäure	15	14,91	14,63	15,03	14,86	14,81	14,81
Threonin	10	10,12	10,09	9,92	10,19	10,28	10,01
Serin	15	14,95	14,98	14,70	15,65	14,60	14,73
Glutaminsäure	12	12,05	11,88	12,13	11,95	11,87	11,99
Glycin	3	3,07	3,28	3,33	3,50	3,34	3,58
Alanin	12	12,06	12,22	12,21	11,63	12,29	12,19
Valin	9	8,86	8,87	8,85	8,49	8,95	9,00
1/2 Cystin	8	7,93	7,60	7,28	7,23	6,83	6,35
Methionin	4	3,97	3,90	3,94	3,83	3,96	3,83
Isoleucin	3	2,35	2,28	2,47	2,27	2,43	2,54
Leucin	2	2,08	2,31	2,13	2,27	2,21	2,18
Tyrosin	6	5,98	5,87	5,62	5,54	5,42	5,47
Phenylalanin	3	3,01	2,97	2,95	2,89	2,81	2,75
Lysin	10	10,14	10,02	9,53	9,41	9,44	9,21
Histidin	4	3,83	3,70	3,68	3,51	3,59	3,54
Arginin	4	4,01	4,13	3,94	4,08	3,95	3,93

Tab. 2. Aminosäuren-Zusammensetzung von Komponente I_n und II_d nach Bestrahlung von trockener Ribonuclease mit Co- γ -Strahlung im Vakuum.

vollständige Hydrolyse zurückzuführen²⁹; es hat sich aber eingebürgert, diesen Wert ohne Korrektur direkt anzugeben. Wie Tab. 2 zeigt, werden im Verlauf der Bestrahlung Cystin, Methionin*, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Histidin in zunehmendem Maße zerstört. Bei Glycin ist eine Zunahme festzustellen; das bedeutet, daß einige der veränderten Aminosäuren zu Glycin, der einfachsten Aminosäure, abgebaut werden. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß in der enzymatisch aktiven Komponente

I_n die gleichen Aminosäuren abgebaut werden wie in den weitgehend inaktivierten Aggregaten von Peak II_d. Nach Bestrahlung unter O₂-Atmosphäre und bei tiefen Temperaturen ergeben sich die gleichen Befunde (vgl. die Tabn. 3 und 4): Auch hier verringert sich mit zunehmendem Inaktivierungsgrad der Gehalt an Cystin, Methionin*, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Histidin, während die Glycin-Konzentration leicht ansteigt. Unter beiden experimentellen Bedingungen sind die beobachteten

Aminosäure	Theoret. Wert	Kontrolle	Komponente I _n			Komp. I _d		Komponente II _d	
			20 Mrad	30 Mrad	45 Mrad	20 Mrad	30 Mrad	45 Mrad	
Asparaginsäure	15	14,91	14,73	14,83	14,67	14,93	14,82	14,97	15,16
Threonin	10	10,12	10,03	10,31	9,93	10,08	10,21	10,20	9,86
Serin	15	14,95	15,36	14,84	14,79	15,00	14,93	15,39	15,04
Glutaminsäure	12	12,05	12,11	12,07	12,14	12,35	12,20	11,91	11,84
Glycin	3	3,07	3,16	3,32	3,59	3,54	3,20	3,34	3,51
Alanin	12	12,06	11,84	11,83	12,24	11,85	11,99	11,82	12,01
Valin	9	8,86	8,94	8,68	9,05	8,83	8,78	8,81	8,96
1/2 Cystin	8	7,93	7,64	7,08	6,59	7,18	7,27	7,07	6,52
Methionin	4	3,97	3,91	3,88	3,74	3,83	3,85	3,76	3,73
Isoleucin	3	2,35	2,17	2,51	2,47	2,26	2,25	2,37	2,50
Leucin	2	2,08	2,20	2,22	2,17	2,09	2,18	2,08	2,12
Tyrosin	6	5,98	5,67	5,64	5,23	5,27	5,41	5,17	4,75
Phenylalanin	3	3,01	2,94	3,01	2,88	2,80	3,01	2,91	2,89
Lysin	10	10,14	10,07	9,86	9,59	9,83	9,92	9,32	9,45
Histidin	4	3,83	3,72	3,65	3,57	3,55	3,68	3,52	3,62
Arginin	4	4,01	4,02	4,09	3,92	3,99	4,02	3,85	3,90

Tab. 3. Aminosäuren-Zusammensetzung von Komponente I_n, I_d und II_d nach Bestrahlung von trockener Ribonuclease mit Co- γ -Strahlung unter O₂-Atmosphäre.

²⁹ C. H. W. HIRS, S. MOORE u. W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 211, 941 [1954].

* Bei Methionin ist die Größe der Veränderung vergleichbar mit unserer Versuchsgenauigkeit. Doch zeigt die Zusammenstellung der prozentualen Veränderungen auf Tab. 5, daß wahrscheinlich eine geringe Abnahme eintritt.

Aminosäure	Theoret. Wert	Kontrolle	Komponente I _n			Komp. II _n		Komp. II _d
			120 Mrad	180 Mrad	350 Mrad	120 Mrad	350 Mrad	
Asparaginsäure	15	14,91	14,62	14,51	14,71	14,70	14,70	
Threonin	10	10,12	10,22	10,14	9,85	10,04	10,48	
Serin	15	14,95	14,95	15,10	15,32	15,04	15,09	
Glutaminsäure	12	12,05	12,08	12,29	11,73	11,91	11,69	
Glycin	3	3,07	3,19	3,28	3,46	3,27	3,56	
Alanin	12	12,06	12,25	12,10	12,46	12,10	12,23	
Valin	9	8,86	8,83	9,02	8,86	9,02	8,72	
½ Cystin	8	7,98	7,48	7,78	7,40	7,29	6,67	
Methionin	4	3,97	3,98	3,78	3,89	3,80	3,44	
Isoleucin	3	2,35	2,35	2,25	2,27	2,43	2,32	
Leucin	2	2,08	2,11	2,03	2,18	2,20	2,16	
Tyrosin	6	5,98	6,06	5,69	5,73	5,63	5,24	
Phenylalanin	3	3,01	3,06	2,98	2,85	3,04	2,96	
Lysin	10	10,14	9,95	10,05	9,45	9,62	9,55	
Histidin	4	3,83	3,78	3,79	3,69	3,62	3,57	
Arginin	4	4,01	4,03	3,95	4,01	3,96	3,99	

Tab. 4. Aminosäuren-Zusammensetzung von Komponente I_n, II_n und II_d nach Bestrahlung von trockener Ribonuclease mit Co- γ -Strahlung bei 77 °K im Vakuum.

Veränderungen nicht nur auf die denaturierten Komponenten beschränkt, sondern sie treten auch in der enzymatisch aktiven Ribonuclease der Komponente I_n auf.

Diskussion

Die Elutionsdiagramme auf Abb. 4 zeigen, daß bei anaerober Inaktivierung von trockener Ribonuclease die inaktiven Produkte größtenteils als denaturierte Dimere (und unlösliche Aggregate) vorliegen. Durch Bestrahlung unter O₂-Atmosphäre entstehen daneben noch denaturierte Monomere (Komponente I_d), die bei höheren Dosen ebenfalls in Komponente II_d überführt werden: Bei kleinen Dosen überwiegt zunächst die Bildung von I_d, zwischen 20 und 40 Mrad verlaufen Erzeugung und Umwandlung in II_d etwa gleich schnell und bei höheren Dosen dominiert die Dimerisierung, so daß sich der Anteil an denaturierten Monomeren wieder verringert. Durch Bestrahlung bei 77 °K entstehen zunächst nicht-aufgefaltete Dimere, die sich aber mit zunehmender Inaktivierung in Komponente II_d und unlösliche (wahrscheinlich höhere) Aggregate umwandeln. Ob diese Dimere und höheren Aggregate schon im Trockenen entstehen oder ob zunächst Radikale gebildet werden, die erst nach Auflösung der bestrahlten Substanzen miteinander reagieren, kann aus unseren Versuchen nicht entschieden werden. Sowohl das Elutionsverhalten der inaktivierten Komponenten als auch die Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge zeigen jedoch eindeutig, daß durch Ein-

wirkung von γ -Strahlung auf trockene Ribonuclease unter verschiedenen experimentellen Bedingungen vorzugsweise denaturierte Dimere entstehen. Den gleichen Befund hatten wir früher² schon an bestrahlten wäßrigen Lösungen von Ribonuclease erhalten: Unter Stickstoff treten nur die Komponenten I_n und II_d auf, während an Luft I_n, I_d und II_d mit etwa derselben Verteilung entstehen wie bei den vorliegenden Experimenten nach Bestrahlung von trockener Ribonuclease.

Um den Vergleich der unter verschiedenen experimentellen Bedingungen erhaltenen Aminosäuren-Veränderungen zu ermöglichen, ist in Tab. 5 die relative Abnahme der einzelnen Aminosäuren (in Prozent einer unbestrahlten Kontrolle) aufgeführt. Wie die Zusammenstellung zeigt, hat bei gleichem Inaktivierungsgrad die Wahl der Versuchsbedingungen keinen nennenswerten Einfluß auf Art und Zahl der veränderten Aminosäuren. Durch Bestrahlung im Vakuum, unter O₂ und bei tiefen Temperaturen werden in allen Komponenten die gleichen Aminosäuren Cystin, Methionin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin und Histidin mit zunehmender Dosis zerstört. Diese Resultate zeigen, daß es keine besonders wichtige Aminosäure („key amino acid“, „weak link“) im RNase-Molekül gibt, deren alleinige Modifizierung zum Verlust der Enzym-Aktivität führt; darüber hinaus wird deutlich, daß die früher³⁻⁵ vermutete Korrelation zwischen Inaktivierung und Spaltung der Disulfidbrücken nicht besteht, was auch aus einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von RAY und

Aminosäure	Bestrahlung unter Vakuum					Bestrahlung unter Sauerstoff						Bestrahlung bei 77°K					
	I _n		II _d			I _n		I _d		II _d		I _n		II _d			
	40	55	95	55	95	20	30	45	20	20	30	45	120	180	350	120	350
[Mrad]																	
Asparaginsäure	98	101	100	99	99	99	99	98	100	99	100	102	98	97	99	99	99
Threonin	100	98	101	102	99	99	102	98	100	101	101	97	101	100	97	99	104
Serin	100	98	105	98	99	103	99	99	100	100	103	101	100	101	102	101	101
Glutaminsäure	99	101	99	99	100	100	100	101	102	101	99	98	100	102	97	99	97
Glycin	107	108	114	109	117	103	108	117	115	104	109	114	104	107	113	107	116
Alanin	101	101	96	102	101	98	98	101	98	99	98	100	102	100	103	100	101
Valin	100	100	96	101	102	101	98	102	100	99	99	101	100	102	100	102	98
1/2 Cystin	96	92	91	86	80	96	89	83	91	92	89	82	94	98	93	92	84
Methionin	98	99	96	100	96	98	98	94	96	97	95	94	100	95	98	96	87
Isoleucin	97	105	97	103	108	92	107	105	96	96	101	106	100	96	97	103	99
Leucin	111	102	109	106	105	106	107	104	100	105	100	102	101	98	105	106	104
Tyrosin	98	94	93	91	91	95	94	87	88	90	86	79	101	95	96	94	88
Phenylalanin	99	98	96	93	91	98	100	96	93	100	97	96	102	99	95	101	98
Lysin	99	94	93	93	91	99	97	95	97	98	92	93	99	98	93	95	94
Histidin	97	96	92	94	92	97	95	93	93	96	92	95	99	99	96	95	93
Arginin	103	98	102	99	98	100	102	98	100	100	96	97	100	99	100	99	100

Tab. 5. Aminosäuren-Zusammensetzung von trocken bestrahlter Ribonuclease: Prozentuale Veränderungen (in % der Kontrolle) der einzelnen Aminosäuren nach Bestrahlung im Vakuum, unter O₂-Atmosphäre bzw. bei 77 °K.

HUTCHINSON³⁰ hervorgeht. In Tab. 6 werden unsere Befunde mit dem Aminosäuren-Abbau unter anderen Versuchsbedingungen verglichen. Dabei ergibt sich der bemerkenswerte Befund, daß durch Bestrahlung im Trockenem dieselben 6 Aminosäuren zerstört werden wie beim Bestrahlen von wäßrigen Lösungen^{2, 31} oder bei Einwirkung von Wasserstoffatomen auf Ribonuclease in Lösung³². Diese Selektivität des Aminosäuren-Abbaus wurde bei bestrahlten Lösungen auf die Einwirkung von OH-Radikalen zurückgeführt²⁶, die unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit den einzelnen Aminosäuren besitzen³³. Wie die Experimente von HOLMES, NAVON und STEIN³² zeigen, scheinen die H-Atome die gleichen Aminosäuren bevorzugt anzugreifen wie die OH-Radikale.

Die spezifische Veränderung einiger weniger Aminosäuren ist im Trockenem wesentlich schwieriger zu erklären als in Lösung. Als eine Möglichkeit der Erklärung wäre anzuführen, daß durch die Bestrahlung primär nur Radikale gebildet werden, die erst nach Auflösen der bestrahlten Substanzen zur Reaktion kommen; diese Annahme wird besonders durch unseren Befund gestützt, daß in wäßriger Lösung die gleichen Aminosäuren verändert werden wie beim Bestrahlen im Trockenem. Wenn man die Aminosäuren-Veränderungen jedoch als unmittelbare Folge der Strahlenabsorption ansieht, dann würde dies die Wanderung der Energie entlang der Peptidkette bis zu den besonders empfindlichen Aminosäuren notwendig machen. Zur Bedeutung der Energiewanderung in chemischen und biologi-

Versuchsbedingung	zerstörte Aminosäuren	Autor
Lösung ^a	cys, met, tyr, phe, lys, his	SLOBODIAN et al. ³¹
Lösung, N ₂	cys, met, tyr, phe, lys, his	SCHÜSSLER u. JUNG ²
Lösung, Luft	cys ^b , met, tyr, phe, lys, his	SCHÜSSLER u. JUNG ²
H-Atome, Lösung ^a	cys, met, tyr, phe, his	HOLMES, NAVON u. STEIN ³²
trocken, Vakuum	cys, met ^b , tyr, phe, lys, his	diese Arbeit
trocken, O ₂	cys, met ^b , tyr, phe, lys, his	diese Arbeit
trocken, 77 °K	cys, met ^b , tyr, phe, lys, his	diese Arbeit

Tab. 6. Aminosäuren-Veränderungen in den aufgetrennten aktiven und inaktivierten Bestrahlungsprodukten von Ribonuclease nach γ-Bestrahlung unter verschiedenen Versuchsbedingungen. ^a Aminosäuren-Veränderungen in einem Gemisch aus aktiven und inaktiven Produkten. ^b Sehr geringe Abnahme.

³⁰ D. K. RAY u. F. HUTCHINSON, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **147**, 347 [1967].

³¹ E. SLOBODIAN, W. NEWMAN, M. FLEISHER u. S. RUBENFELD, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **111**, 181 [1965].

³² B. E. HOLMES, G. NAVON u. G. STEIN, *Nature* [London] **213**, 1087 [1967].

³³ R. BRAAMS, in: *Radiation Research* (ed. SILINI), S. 371. North-Holland Publishing Co., Amsterdam 1967.

schen Systemen existiert eine umfangreiche Literatur (neuere Zitate bei PHILLIPS³⁴), so daß dieser Mechanismus keiner weiteren Diskussion mehr bedarf. Eine dritte Möglichkeit der Interpretation wäre, daß die Strahlungsenergie weitgehend statistisch über das Molekül verteilt absorbiert wird, worauf in den meisten Fällen Wasserstoffatome freigesetzt werden³⁵. Diese H-Atome diffundieren zu anderen RNase-Molekülen und schädigen diese. Dabei sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion mit den schwefelhaltigen und mit den ein Ringsystem enthaltenden Aminosäuren besonders groß, was in Lösung auch für H- und OH-Radikale zutrifft (vgl. Tab. 6). Daß bei Bestrahlung unter O₂-Atmosphäre ein nennenswerter Teil der H-Atome durch O₂ weggefangen wird, halten wir nicht für wahrscheinlich, da den Wasserstoffatomen gewichtsmäßig wesentlich mehr RNase zur Reaktion zur Verfügung steht als Sauerstoff. Wenn die Aminosäuren, die den Wasserstoff liefern, weitgehend statistisch verteilt sind, dann werden mit zunehmender Dosis alle Aminosäuren um den gleichen relativen Betrag abnehmen. Eine solche Veränderung kann durch die hier angewendete Meßmethode nicht erfaßt werden, da der Mittelwert der nicht (selektiv) veränderten Aminosäuren bei unserem Auswertungsverfahren als Bezugspunkt dient. Wir müssen uns somit auf die Bestimmung der selektiv veränderten Aminosäuren beschränken. Deshalb wurden in Modifizierung unseres früher angewandten Verfahrens² die Resultate in den Tabn. 2–4 so normiert, daß die Summe der nicht fettgedruckten Meßwerte in allen Komponenten gleich ist. Vergleicht man die Summe der veränderten Aminosäuren in den einzelnen Komponenten (Summe der fettgedruckten Werte ohne Glycin auf Tabn. 2–4) mit dem entsprechenden Wert einer unbestrahlten Kontrolle, dann kann dadurch die Gesamtzahl der selektiv zerstörten Aminosäuren ermittelt werden. Glycin wurde dabei nicht berücksichtigt, da seine Zunahme auf Bestrahlungsprodukten der anderen Aminosäuren beruht. Diese Aminosäuren-Veränderungen sind in Abb. 6 über D/D_{37} aufgetragen. Die hierbei benutzten 37%-Dosen wurden aus Abb. 1 entnommen. Die für die monomere und enzymatisch aktive Komponente I_n erhaltenen Meßpunkte (Abb. 6, schwarze Zeichen) liegen auf einer gemeinsamen Geraden (Kurve n), d. h. unter den getesteten Versuchsbedingungen (O₂-

Atmosphäre, Vakuum, tiefe Temperaturen) verlaufen Abbau der Aminosäuren und Verlust der enzymatischen Aktivität parallel, obwohl sich die absoluten Strahlendosen bis um einen Faktor von 10 unterscheiden. Weiterhin zeigt Abb. 6, daß in den denaturierten Komponenten I_d und II_d (bei 77 °K auch in II_n) die Zahl der veränderten Aminosäuren stets um 1 größer ist als in I_n . Die durch die Meßpunkte gelegte Gerade hat die gleiche Steigung wie die für Komponente I_n , schneidet aber die Ordinate bei 1 (streng mathematisch ist diese Kurve für $D=0$ nicht definiert, da bei dieser Dosis die d-Komponenten nicht auftreten). Pro inaktiviertem RNase-Molekül ($D/D_{37}=1$) sind in der enzymatisch aktiven Komponente 1,25 Aminosäuren verändert, während in den denaturierten Produkten bereits 2,25 Aminosäuren zerstört sind. Das besagt folgendes: Wenn eine dieser sechs Aminosäuren verändert wird, dann besteht für das Molekül eine Wahrscheinlichkeit von 45 Prozent inaktiviert zu werden. Die Aussage, daß bei $D/D_{37}=0,08$ in Komponente I_n (Abb. 6, Kurve n) 0,1 Aminosäuren verändert sind, bedeutet, daß in einem aus zehn RNase-Molekülen 1 Aminosäure zerstört ist. Bei der gleichen Dosis beläuft sich der Aminosäure-Abbau in den denaturierten Komponenten (Abb. 6, Kurve d) auf 1,1; in diesem Fall ist in jedem inaktivierten Molekül eine Aminosäure verändert und zusätzlich noch eine weitere pro zehn Molekülen. Diese Befunde zeigen, daß die verschiedenen über Sephadex separierbaren Bestrahlungsprodukte von Ribonuclease sich dadurch unterscheiden, daß in den Komponenten ohne Enzym-Aktivität eine Aminosäure mehr verändert ist als in den enzymatisch aktiven Molekülen. Allerdings scheint dies keine bestimmte Aminosäure zu sein, sondern eine aus sechs besonders reaktionsfähigen Aminosäuren. Da die inaktiven Produkte aufgefalt sind, während die aktiven Moleküle noch weitgehend globuläre Struktur besitzen, so dürften die von uns beobachteten Veränderungen in der Primärstruktur nicht die einzigen Kriterien sein, in denen sich aktive und inaktive Moleküle unterscheiden. Die außerdem noch auftretenden Konformations-Änderungen lassen sich durch Untersuchung von Extinktion, Viskosität, Schmelzpunkt und Verhalten bei Rechromatographie genauer charakterisieren; über entsprechende Experimente wird später berichtet werden³⁶.

³⁴ G. O. PHILLIPS (ed.), *Energy Transfer in Radiation Processes*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1966.

³⁵ R. BRAAMS, *Nature* [London] **200**, 752 [1963].

³⁶ H. SCHÜSSLER, in Vorbereitung.

Unsere Resultate lassen sich durch folgende Hypothese ** beschreiben: Durch Absorption von Strahlung werden in trockener Ribonuclease statistisch über das Molekül verteilt Wasserstoffatome (oder Elektronen) ausgelöst. Die freigesetzten H-Atome reagieren vorzugsweise mit 6 bestimmten Aminosäuren. Durch Veränderung einer dieser Aminosäuren wird ein RNase-Molekül mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,45 inaktiviert, während in 55% aller Fälle die enzymatische Aktivität erhalten bleibt. Dieser hier vorgeschlagene Inaktivierungsmechanismus wird durch den kürzlich erhaltenen Befund gestützt, wonach atomarer Wasserstoff im Trockenen die enzymatische Aktivität von Ribonuclease sowie die biologische Funktionsfähigkeit von DNS und Bakteriophagen mit großer Wirksamkeit zerstört³⁷.

** Hypothese ist hier in der von N. W. TIMOFÉEFF-RESSOVSKY (1966) formulierten Bedeutung gebraucht; Übersetzung bei K. G. ZIMMER, Strahlentherapie 134, 161 [1967].

Durch Bestrahlung bei 77 °K werden fünfmal weniger Aminosäuren pro Dosisinheit verändert als bei Zimmertemperatur und im gleichen Verhältnis verringert sich auch die Inaktivierungsrate. Ob diese Abnahme auf einer bei tiefen Temperaturen verringerten Reaktivität der H-Atome beruht oder ob primär weniger Wasserstoff freigesetzt wird, läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht entscheiden. Ein Experiment zur direkten Bestimmung von Emissions- und Reaktionsgeschwindigkeit von H-Atomen bei tiefen Temperaturen wird vorbereitet³⁸.

Herrn Prof. Dr. K. G. ZIMMER danken wir für sein förderndes Interesse, Herrn Prof. Dr. U. HAGEN und Frau U. BAUERLE für die Ausführung der Mol.-Gew.-Bestimmungen an der Ultrazentrifuge, den Assistentinnen K. BRAUER, R. MODEST und E. KUSSING für sorgfältige Mitarbeit.

³⁷ H. JUNG u. K. KÜRZINGER, Radiat. Res., im Druck.

³⁸ K. KÜRZINGER u. H. JUNG, in Vorbereitung.