

ou après irradiation à une séparation du fer. Celle-ci s'effectue selon le mode opératoire donné à la page 1569.

Nous remercions le FONDS NATIONAL SUISSE, COMMISSION POUR LA SCIENCE ATOMIQUE, grâce auquel nous avons pu entreprendre ce travail.

SUMMARY

The authors describe a method for the radiochemical assay of cobalt based on the formation of cobalt 60m after activation with thermal neutrons; the conditions of irradiation, the method for determination of loss during separation, also the influence of manganese 56 and of iron on this estimation, are given in detail. Following the procedure indicated it is possible to estimate as little as 0,07 μg of cobalt with an accuracy of $\pm 7\%$. For a single analysis the time required is 46,5 min., for ten analyses approximately 2 h.

Laboratoire de Chimie minérale, de Chimie analytique
et de Microchimie de l'Université de Genève

194. Wirkungsmechanismus der Inaktivierung krist. Leber-Alkoholdehydrogenase durch RÖNTGEN-Strahlen

von A. Temperli, H. Aebi und A. Zuppinger

(18. VIII. 61)

Auf die besondere Strahlenempfindlichkeit von Enzymen mit freien, funktionell wichtigen SH-Gruppen ist von BARRON *et al.*¹⁾ hingewiesen worden. Nach der Auffassung von BARRON besteht das Wesen dieses Inaktivierungsvorganges in einer Oxydation dieser Gruppen zu Disulfiden. Reaktivierungsversuche mit reduziertem Glutathion (z. B. an Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase, Hexokinase aus Hefe) bestätigen diese Annahme, sofern nur niedrige Strahlendosen angewandt werden. Die einzelnen bisher untersuchten Thiol-Enzyme zeigen indessen hinsichtlich Strahlenempfindlichkeit und Reaktivierbarkeit ein unterschiedliches Verhalten (vgl. DALE²⁾, LANGE *et al.*³⁾). Während über Hefe-Alkoholdehydrogenase mehrere Untersuchungen vorliegen (BARRON *et al.*⁴⁾, LANGE *et al.*³⁾, PAULY & RAJEWSKY^{4a)}), ist dies bei dem entsprechenden Enzym aus Leber nicht der Fall. Wir haben daher die Strahleninaktivierung von reiner Leber-Alkoholdehydrogenase sowie die Wirkung verschiedener Effektoren auf Enzymaktivität und Gehalt an freien SH-Gruppen untersucht.

¹⁾ E. S. G. BARRON, S. DICKMAN, J. A. MUNTZ & T. P. SINGER, *J. gen. Physiology* **32**, 537 (1949); E. S. G. BARRON & S. DICKMAN, *ibid.* **32**, 595 (1949).

²⁾ W. M. DALE, Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism, J. & A. Churchill, London 1956.

³⁾ R. LANGE, A. PIHL & L. ELDJARN, *Int. J. Rad. Biology* **1**, 73 (1959).

⁴⁾ E. S. G. BARRON & P. JOHNSON, *Arch. Biochemistry Biophysics* **48**, 149 (1954).

^{4a)} H. PAULY & B. RAJEWSKY, *Jahrbuch der Max-Planck-Gesellschaft*, S. 128 (1958).

1. Methodik. – a) *Bestimmung der Enzymaktivitäten:* Die Aktivität der Leber-Alkoholdehydrogenase wurde im optischen Test nach BONNICHSEN⁵⁾ bestimmt. Als Mass diente die Extinktionszunahme während der ersten Minute unmittelbar nach Zugabe des Enzyms zum Reaktionsgemisch. Die Messungen erfolgten mit dem EPPENDORF-Photometer bei 366 m μ und bei 20°. Die pro Bestimmungsansatz à 3 ml verwendete Proteinmenge betrug ca. 40 γ . – Die Bestimmung der Katalaseaktivität erfolgte titrimetrisch nach der Methode von FEINSTEIN⁶⁾. Bei der verwendeten Katalase (aus Leber) und Peroxydase (aus Meerrettich) handelt es sich um «BOEHRINGER»-Präparate.

b) *Analytische Methoden:* Protein wurde nach einer modifizierten Methode von FOLIN⁷⁾ bestimmt, wobei kristallisiertes Bovinalbumin (ARMOUR) als Standard diente. Die Bestimmung der freien SH-Gruppen geschah optisch nach der von BOYER⁸⁾ beschriebenen Methode mit Hilfe von p-Chlormercuribenzoat (PCMB) durch Messung der Extinktion bei 250 m μ im BECKMAN-DU-Spektrophotometer. Als Standard diente reines, im Vakuum getrocknetes reduziertes Glutathion («BOEHRINGER»). Der Gehalt der p-Chlormercuribenzoat-Lösungen wurde durch Messung der Extinktion bei 232 m μ und unter Benützung des molaren Extinktionskoeffizienten $E_m = 1,69 \times 10^4$ ermittelt.

c) *Vorbehandlung der Enzymlösung durch Dialyse:* Leber-Alkoholdehydrogenase (vom Pferd) wurde als kristalline Suspension von der Firma «BOEHRINGER» bezogen. Da diese als Stabilisator ca. 10% Äthanol enthielt, war es notwendig, das Enzym durch Dialyse von diesem Stoff zu befreien. Ein allfälliger Einfluss des Stabilisators auf die strahleninduzierte Wirkung sollte dadurch ausgeschaltet werden. Eine bestimmte Menge Enzymsuspension, ca. 1700 γ Protein enthaltend, wurde in 5,0 ml Phosphatpuffer (10⁻²M, pH 7,2) bei Zimmertemperatur gelöst und anschliessend während 18–20 Std. in der Kälte (3–5°) gegen 1,5–2,0 l Puffer in Cellulose-Schläuchen (VISCING) dialysiert. Die Schläuche wurden durch Waschen mit 5 \times 10⁻³M Komplexon III in 10⁻²M Phosphatpuffer (pH 7,2) und anschliessendes intensives Spülen mit dest. Wasser vorbehandelt. Nach erfolgter Dialyse wurde die Enzymlösung durch Zugabe von Puffer auf einen Proteingehalt von ca. 100 γ /ml verdünnt.

d) *Bestrahlung und Dosimetrie:* Sämtliche Bestrahlungsexperimente wurden bei Zimmertemperatur mit einem Therapie-Pendelgerät (Modell MÜLLER-TU I) ausgeführt. Die Dosisleistung betrug bei 250 kV und 13 mA 380–420 r/min. Die Strahlung wurde durch 2,0 mm Al und 0,35 mm Cu gefiltert. Zum Ausgleich der Feldinhomogenitäten wurden die Ansätze (meist 8–12 je Serie) unter der Röhre rotierend bewegt. Das Volumen der Bestrahlungsansätze betrug in allen Fällen 1,0 ml, die Schichtdicke ca. 5 mm. Die Dosimetrie erfolgte mit der VICTOREEN-Kammer. Vor und nach der Bestrahlung wurden die Versuchsansätze immer in Eis aufbewahrt. Gasphase: Luft.

2. Beziehungen zwischen Strahleninaktivierung und SH-Oxydation. – Figur 1 zeigt die Inaktivierung einer verdünnten Lösung von Leber-Alkoholdehydrogenase. Daraus geht hervor, dass die Restaktivität mit steigender Strahlendosis exponentiell abfällt. Gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme an freien SH-Gruppen in etwa gleichem Ausmass. Es ist daraus ersichtlich, dass eine Restaktivität von 37% unter den hier gewählten Bedingungen bei ca. 5000 r erreicht wird; eine entsprechende Abnahme der freien SH ist bei ca. 6500 r zu beobachten. Aus dem in Fig. 1 gegebenen Kurvenverlauf lässt sich ein G-Wert (Anzahl inaktivierte Alkoholdehydrogenase-Molekeln/100 eV) von 0,20 bzw. eine Ionenausbeute von 0,066 errechnen. Die Strahlenempfindlichkeit hängt indessen, wie ROBINSON⁹⁾ gezeigt hat, stark von der Sub-

⁵⁾ R. K. BONNICHSEN & N. G. BRINK, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press Inc., New York 1955.

⁶⁾ R. N. FEINSTEIN, *J. biol. Chemistry* 180, 1197 (1949).

⁷⁾ O. H. LOWRY, B. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* 193, 265 (1954).

⁸⁾ P. D. BOYER, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 4331 (1954).

⁹⁾ T. ROBINSON, Abstracts of papers presented at the Meeting of the American Chemical Society (Div. of Biolog. Chemistry), Boston, April 1959.

strat- und Coenzymkonzentration im Medium ab. So ist nach Bestrahlung mit 10000 r in undialysierten Proben eine Restaktivität von ca. 40%, in 18 Std. dialysierten dagegen eine solche von ca. 15% zu beobachten.

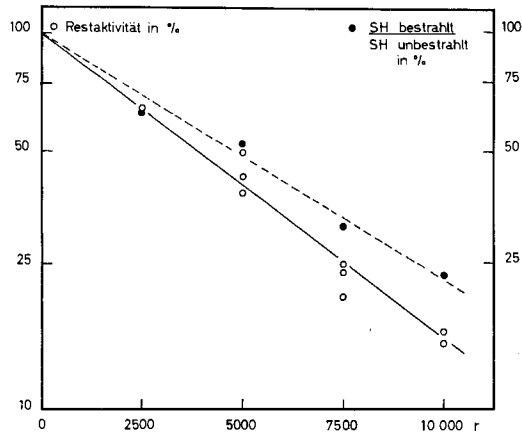


Fig. 1. Dosis-Wirkungskurve für die Strahleninaktivierung von Leber-Alkoholdehydrogenase. Ordinate: links: Restaktivität in Prozent der unbestrahlten Kontrolle; rechts: titrierbare SH-Gruppen.

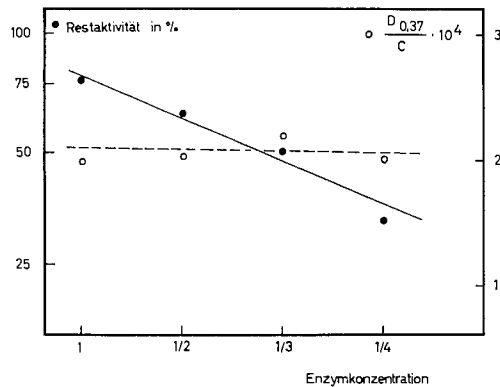


Fig. 2. Inaktivierung von Leber-Alkoholdehydrogenase durch RÖNTGEN-Strahlen in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

Abszisse: Relative Enzymkonzentration bzw. Verdünnungsgrad (Konz. 1 = 80 γ krist. Leber-ADH/ml).

Ordinate: links: Restaktivität in der bestrahlten Lösung in Prozent der unbestrahlten Kontrolle; rechts: spezifische Inaktivierungsdosis (D = Zur Erzielung einer Restaktivität von 37% erforderliche Strahlendosis; C = Relative Proteinkonzentration).

Die Unterscheidung zwischen direkter und indirekter Wirkung geschieht zweckmässigerweise im «Verdünnungsexperiment». Dabei wird der Effekt einer konstanten Röntgendosis auf eine Reihe von Ansätzen mit variiertem Enzymkonzentration untersucht. Aus Fig. 2 geht hervor, dass mit zunehmender Verdünnung des Enzyms die prozentuale Restaktivität exponentiell abnimmt, d.h. der Inaktivierungseffekt ist umso grösser, je stärker die Verdünnung. Handelt es sich um einen indirekten Bestrah-

lungseffekt, dann muss die spezifische Inaktivierungsdosis konstant sein (DALE¹⁰). Wie Fig. 2 zeigt, ist diese Forderung im vorliegenden Falle erfüllt. Wie PAULY & RAJEWSKY^{4a}) gezeigt haben, besteht im Falle der Hefe-Alkoholdehydrogenase umgekehrte Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und dem sog. «empfindlichen Bereich», was für das Vorliegen einer indirekten Strahlenwirkung spricht.

3. Abdeckungs- und Reaktivierungsversuche. – Dieser Befund (vgl. Fig. 1) scheint zunächst die oben erwähnte Theorie von BARRON zu stützen, wonach die Inaktivierung der SH-Enzyme über eine Oxydation der SH-Gruppen zu Disulfiden verläuft. Sofern BARRON's Hypothese zutrifft, sollte es prinzipiell möglich sein, durch Anwendung geeigneter Reduktionsmittel (z.B. reduziertes Glutathion, NaBH₄) die bei der Strahleneinwirkung gebildeten Disulfidbrücken aufzuspalten und damit eine völlige oder partielle Reaktivierung der Enzymaktivität zu erreichen. Solche Experimente wurden unter den verschiedensten Bedingungen durchgeführt und zeigten stets ein negatives Ergebnis. Aus diesen Versuchen geht hervor, dass sich mit 2500 bis 10000 r bestrahlte Leber-Alkoholdehydrogenase nicht mehr reaktivieren lässt. Ein Zusatz von 6×10^{-3} – 6×10^{-2} M red. Glutathion ist ohne Einfluss auf die Restaktivität. Die Inaktivierung ist somit nicht einfach auf eine Oxydation der freien SH-Gruppen zu S-S zurückzuführen. Es müssen daher folgende beiden Möglichkeiten erwogen werden:

a) Das angewandte Reduktionsmittel ist unter den herrschenden experimentellen Bedingungen wirkungslos, d.h. nicht in der Lage, die gebildeten S-S-Gruppen reaktiv zu spalten.

b) Das Reduktionsmittel bewirkt zwar eine Reduktion der S-S-Gruppen zu SH. Die Bestrahlung hat jedoch gleichzeitig eine Proteindenaturierung zur Folge.

Um abzuklären, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, haben wir folgende Modellversuche ausgeführt: Wird Alkoholdehydrogenase mit H₂O₂ versetzt, sinkt die Restaktivität auf ca. 35%; gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme an freien SH-Gruppen (gemessen als Extinktionsabnahme bei 250 m μ) von ca. 40%. Durch geeignete Behandlung des Enzyms mit dem Reduktionsmittel NaBH₄ kann eine teil-

Tab. I. Einfluss von H₂O₂ auf Enzymaktivität und freie SH-Gruppen von krist. Leber-Alkoholdehydrogenase.

Versuchsbedingungen: Endkonzentration an H₂O₂: 0,38 M; Dauer der Vorinkubierung 15 min (0°). Disulfidreduktion durch Na-Borhydrid 15 min nach erfolgtem H₂O₂-Zusatz.

System	ADH-Aktivität ($\Delta E_{366}/\text{min} \cdot 10^3$)	Freie SH ($E_{250} \cdot 10^3$)
ADH	52	94
ADH + H ₂ O ₂	18	54
ADH + H ₂ O ₂ + NaBH ₄ . .	(5)	80
ADH + NaBH ₄	(36)	–

weise Reduktion der gebildeten S-S-Gruppen erreicht werden. Dabei steigt der SH-Gehalt auf ca. 85% des Ausgangs-Wertes an, wogegen die Enzymaktivität noch weiter abfällt (vgl. Tab. I). Dass kein Parallelismus zwischen Aktivitätseinbusse und SH-Oxydation zu bestehen braucht, geht ebenfalls aus «Abdeckungsexperimenten» her-

¹⁰) W. M. DALE, L. H. GRAY & W. J. MEREDITH, Phil. Trans. 242 A, 33 (1949).

vor. Das Resultat eines derartigen Versuches ist in Tabelle II wiedergegeben. Wird Alkoholdehydrogenase mit p-Chlormercuribenzoat versetzt, tritt eine Aktivitätsabnahme auf, welche in erster Linie auf eine Abdeckung der freien SH-Gruppen mit dem Reagens zurückzuführen ist. Durch Zugabe von reduziertem Glutathion (30 min, 20°) gelingt eine partielle Reaktivierung einer derart vorbehandelten (unbestrahlten) Enzymlösung. Im bestrahlten Ansatz ist dagegen infolge der geringen Restaktivität kein deutlicher Effekt zu beobachten.

Tab. II. *Reaktivierbarkeit der Alkoholdehydrogenase-Aktivität durch reduziertes Glutathion (GSH) nach vorgängiger Abdeckung der freien SH-Gruppen mit p-Chlormercuribenzoat (PCMB).*

Versuchsbedingungen: 0,008 μ Mol/ml PCMB, nach 30 min (20°) Reaktivierung mit 50 μ Mol/ml GSH.

System	ADH-Aktivität in $\Delta E_{366}/\text{min} \cdot 10^3$	
	unbestrahlte Ansätze	nach Bestrahlung mit 5000 r
ADH	49	26
ADH + PCMB	7	2
ADH + PCMB + GSH . .	20	5

4. Beeinflussung der Strahlenempfindlichkeit durch Thiole. – Bekanntlich sind Thiolverbindungen zu den wirksamsten Strahlenschutzstoffen zu zählen (vgl. ¹¹⁾). Wie dies bereits an einer Reihe anderer Fermente gezeigt worden ist, kann auch die Leber-Alkoholdehydrogenase-Aktivität durch Glutathionzusatz geschützt werden (vgl. Fig. 3). Um die Aktivität des Enzyms auf 37% des Ausgangswertes zu reduzieren (= D_{37} -Wert) bedarf es in Gegenwart einer Glutathionkonzentration von

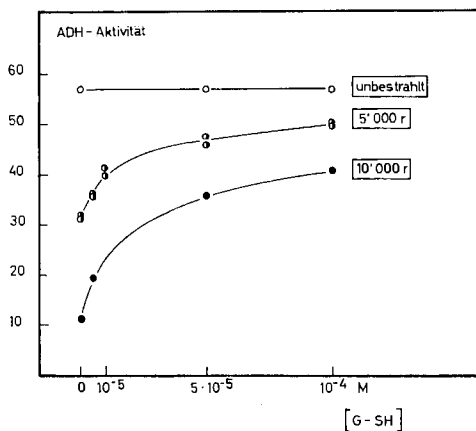


Fig. 3. *Schutzwirkung von reduziertem Glutathion auf die Strahleninaktivierung von krist. Leber-Alkoholdehydrogenase.*

Abszisse: Molare Endkonzentration an GSH.

Ordinate: ADH-Aktivität in $\Delta E_{366}/\text{min} \cdot 10^3$. Enzymkonzentration in den Ansätzen ca. 80 γ /ml.

¹¹⁾ A. HERVÉ & Z. M. BACQ, C. r. Séances Soc. biol. 143, 881 (1949); H. M. PATT, E. B. TYREE, R. L. STRAUBE & D. E. SMITH, Science 70, 213 (1949).

10^{-5}M einer Dosis von ca. 12500 r, bei einer solchen von 10^{-4}M sogar 26000 r. Demgegenüber beträgt der D_{37} -Wert für die entsprechenden Kontrollen (ohne Glutathion) ca. 5000 r. Im hier verwendeten Konzentrationsbereich beeinflusst Glutathion die im optischen Test bestimmte Alkoholdehydrogenase-Aktivität nicht. Die Untersuchung weiterer Thiolverbindungen wird dadurch erschwert, dass diese die Alkoholdehydrogenase-Bestimmung an sich stören (z.B. 10^{-3}M Cysteamin, Cystamin).

5. Hydroperoxydasen als Effektoren der Alkoholdehydrogenase-Strahleninaktivierung. – Befinden sich ausser der Leber-Alkoholdehydrogenase weitere, inerte Proteine in Lösung, so üben diese gleichfalls eine gewisse Schutzwirkung aus. Dieser Effekt dürfte darauf zurückzuführen sein, dass auch Proteinmolekeln mit den primären Bestrahlungsprodukten reagieren können. Wie aus Tabelle III hervorgeht, ist eine derartige Schutzwirkung nach Zugabe von Human-Serumalbumin (95-proz.; Schweiz. Rotes Kreuz) schon bei einer Konzentration von 40 γ/ml deutlich vorhanden. Während sich hitzeinaktivierte Hydroperoxydasen gleich verhalten, resultiert auf Zusatz von aktivem Enzym eine gegenteilige Wirkung. Tab. III zeigt, dass ein Zusatz von aktiver Katalase bzw. Peroxydase eine Verstärkung der Strahleninaktivierung von Alkoholdehydrogenase verursacht. Dieser Effekt lässt sich indessen nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich beobachten. Während die Erfassbarkeitsgrenze bei einigen γ/ml liegt, wird diese Sensibilisierungserscheinung bei höheren Konzentrationen (über ca. 40 γ/ml) in zunehmendem Masse durch die oben beschriebene unspezifische Schutzwirkung verdeckt. Entsprechend dieser biphasischen Konzentrationsabhängigkeit resultieren Q -Werte, welche teils < 1 (= Verstärkung), teils > 1 (= Abschwächung) sind. Dass für dieses Verhalten das aktive Enzym erforderlich ist, geht aus Versuchen mit hitzeinaktivierter Katalase hervor. Diese verhält sich gleich wie Serumalbumin (Q -Wert stets > 1).

6. Wirkung von H_2O_2 -Zusätzen auf die Alkoholdehydrogenase-Aktivität. – Da bei der Radiolyse des Wassers u. a. H_2O_2 gebildet wird, sind auch Versuche

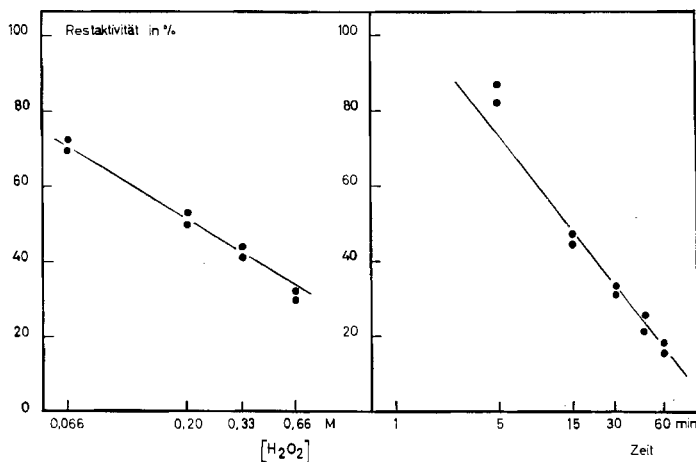


Fig. 4. Inaktivierung von Leber-Alkoholdehydrogenase durch H_2O_2 -Zusatz.

Links: Einfluss der zugesetzten H_2O_2 -Menge auf die nach 15 min und bei einer Inkubierungstemperatur von 0° verbleibende Restaktivität. Rechts: Abhängigkeit der Restaktivität von der Inkubierungsdauer (0,2 M H_2O_2).

Tab. III. Die Wirkung von Hydroperoxydassen und Proteinen auf die Strahleninaktivierung der Leber-Alkoholdehydrogenase.

Zusammensetzung der Ansätze: 0,8 ml gepufferte Leber-ADH-Lösung (enthaltend ca. 80 γ Protein) + 0,2 ml Effektorenlösung.

System krist. Leber-ADH + Effektor	Konzentra- tion des Effektors (γ /ml)	ADH-Aktivität (ΔE_{366} /min \cdot 10 ³)		Wirkung des Effektors (Q-Wert*)
		unbestrahlte Kontrolle	nach Bestrahlung mit 5000 r	
krist. Leberkatalase	0	60	35	–
	2,5	58	28	0,8
	10	59	23	0,7
	40	58	36	1,1
	160	58	41	1,2
krist. Leberkatalase; hitzeinaktiviert	0	59	35	–
	2,5	59	45	1,2
	10	59	42	1,2
	40	59	44	1,3
	160	59	55	1,6
Meerrettich- Peroxydase	0	45	24	–
	10	45	16	0,6
	40	45	20	0,8
krist. Serum-Albumin	0	60	37	–
	2,5	61	40	1,1
	10	63	43	1,1
	40	63	52	1,3
	160	63	57	1,5
* $Q = \frac{\text{Restaktivität des bestrahlten Enzyms mit Effektor}}{\text{Restaktivität des bestrahlten Enzyms ohne Effektor}}$				

mit direkt zugesetztem, bzw. enzymatisch gebildetem H_2O_2 ausgeführt worden. Zur Inaktivierung von Leber-Alkoholdehydrogenase sind relativ hohe H_2O_2 -Konzentrationen erforderlich. In Fig. 4 ist rechts der Einfluss der Einwirkungsdauer auf Restaktivität und links die Wirkung verschiedener H_2O_2 -Zusätze dargestellt. Es lässt sich hieraus eine dem D_{37} -Wert entsprechende H_2O_2 -Konzentration von ca. 0,3 M entnehmen. Vergleichshalber sei erwähnt, dass zur Strahleninaktivierung von Alkoholdehydrogenase im gleichen Ausmass ca. 5000 r erforderlich sind. Nimmt man für die konventionelle RÖNTGEN-Bestrahlung einen $G_{+H_2O_2}$ -Wert von ca. 4 an, entspräche dies einer H_2O_2 -Anhäufung im katalasefreien Ansatz von ca. 10^{-5} M. Durch Notatin und Glucosezusatz im Ansatz selbst erzeugtes H_2O_2 ist ohne Einfluss auf die Alkoholdehydrogenase-Aktivität.

Die inaktivierende Wirkung von direkt zugesetztem H_2O_2 erfährt in Gegenwart von Fe^{2+} eine Verstärkung (vgl. Tab. IV). Bei der Interpretation dieses Befundes ist zu berücksichtigen, dass H_2O_2 und Fe^{2+} zusammen (= FENTON's Reagens) als ein OH-Radikale lieferndes System angesehen werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Fe^{2+} (0,17 μ Äq./ml; als $FeSO_4$ zugesetzt) im Bestrahlungsversuch eine Abschwächung der Strahlenwirkung auf die Alkoholdehydrogenase-Aktivität

Tab. IV. Vergleich der Wirkungen von enzymatisch gebildetem und direkt zugefügtem H_2O_2 auf Leber-Alkoholdehydrogenase, in Abwesenheit und Gegenwart von $FeSO_4$ (FENTON-Reagens). Konzentration der Zusätze: 0,8 mg Notatin, 6 mg Glucose bzw. 10 μ Mol H_2O_2 , 0,09 μ Mol $FeSO_4$ pro Ansatz à 1 ml.

System	ADH-Aktivität in ($\Delta E_{366}/\text{min} \cdot 10^3$)	
	gemessener Wert	relativer Effekt (Kontrolle = 100%)
ADH	58	—
ADH + (Notatin + Glucose). . .	56	(- 4%)
ADH + H_2O_2	41	-29%
ADH + $FeSO_4$	57	(- 2%)
ADH + H_2O_2 + $FeSO_4$	33	-43%

bewirkt. Da Versuche dieser Art aus methodischen Gründen bei neutraler Reaktion ausgeführt werden müssen (Oxydation, Ausfällung!), kann indessen nicht ohne weiteres entschieden werden, worauf dieser Effekt zurückzuführen ist.

Diskussion

Die gleichzeitige Verfolgung von Enzymaktivität und SH-Oxydation stützt zunächst die von DALE²⁾ vertretene Auffassung, wonach der Inaktivierungsvorgang durch Bestrahlung nicht allein durch eine Thiol-Oxydation erklärt werden kann. Ein gewisser Parallelismus ist zwar gelegentlich festzustellen. Gegenbeispiele (z.B. die hier mitgeteilten Reaktivierungsversuche) zeigen, dass sich diese beiden Eigenschaften im Falle der Leber-Alkoholdehydrogenase recht divergent verhalten können. Dies ist z.B. auch bei den Versuchen von ROMANI & TAPPEL¹²⁾ der Fall, welche Hefe-Alkoholdehydrogenase unter anaeroben Bedingungen bestrahlt haben. Im gleichen Sinne darf wohl die von uns beobachtete Abnahme der Löslichkeit von bestrahlter Leber-Alkoholdehydrogenase sowie die Erhöhung der UV.-Absorption in der Region von 240–280 $m\mu$ interpretiert werden. Es wird daher die Auffassung vertreten, dass die Inaktivierung von Leber-Alkoholdehydrogenase durch RÖNTGEN-Strahlen zwar mit einer (z. T. reversiblen) SH-Oxydation einhergeht, dass es aber gleichzeitig zu einer (irreversiblen) Denaturierung des Enzymproteins kommt.

Die Strahlenempfindlichkeit von Leber- und Hefe-Alkoholdehydrogenase hängt stark von den Versuchsbedingungen, speziell der Zusammensetzung des Ansatzes ab. Dies erklärt, weshalb die in der Literatur zu findenden Angaben stark differieren. So haben z.B. LANGE *et al.*³⁾ auf Grund ihrer Versuche mit Hefe-Alkoholdehydrogenase einen G-Wert von 0,06 (bzw. Ionenausbeute 0,02) erhalten, während sie für die Versuche von BARRON & JOHNSON⁴⁾ einen solchen von 1,5 errechnet haben. Für die Leber-Alkoholdehydrogenase lässt sich nach den Daten von ROBINSON & PHILLIPS¹³⁾ ein G-Wert von 0,05 errechnen, wogegen auf Grund der eigenen Untersuchungen ein solcher von 0,2, d. h. eine 4mal grössere Strahlenempfindlichkeit resultiert. Im Hinblick auf die von ROBINSON⁹⁾¹³⁾ beobachtete Effektorenwirkung von Alkoholen, Pufferionen u. a. ist in unseren Versuchen eine möglichst vollständige Entfernung unkontrollierbarer Faktoren angestrebt worden. Der obige Autor hat keine diesbezüglichen Angaben gemacht, weshalb die Möglichkeit besteht, dass die in seinen Versuchen beob-

¹²⁾ R. J. ROMANI & A. L. TAPPEL, *Arch. Biochemistry Biophysics* 79, 323 (1959).

¹³⁾ T. ROBINSON & A. W. PHILLIPS, *Biochem. biophys. Acta* 42, 290 (1960).

achtete grössere Strahlenresistenz durch schützende Begleitstoffe (Äthanol als Stabilisatorzusatz!) bedingt worden ist.

Nach den vorliegenden Untersuchungen ist es unwahrscheinlich, dass die Inaktivierung der Leber-Alkoholdehydrogenase durch RÖNTGEN-Strahlen auf das dabei entstehende H_2O_2 zurückzuführen ist. Jedenfalls sind bei direktem Zusatz H_2O_2 -Mengen erforderlich, welche um einen Faktor von 10^4 grösser sind als das bei der Strahleneinwirkung in wässriger Lösung entstehende H_2O_2 . Wie erwähnt, werden durch 5000 r ca. $10^{-5}M$ chemisch fassbares H_2O_2 gebildet, wogegen äquivalente Inaktivierungseffekte erst bei Zusätzen von 0,1–0,5 M H_2O_2 auftreten. Die Experimente mit FENTON-Reagens weisen gleichfalls darauf hin, dass die Inaktivierung in erster Linie durch Radikale (z. B. $OH \cdot$) bedingt sein dürfte.

Die Zugabe von inertem Protein oder inaktivierten Peroxydasen bewirkt einen Schutzeffekt, der je nach Konzentration recht ausgeprägt sein kann. Diese Erscheinung lässt sich darauf zurückführen, dass auch das zugesetzte Protein mit den Bestrahlungsprodukten reagiert. Diese Schutzwirkung ist ihrerseits ein Ausdruck für die indirekte Strahlenwirkung. Es ist bekannt, dass Katalase als H_2O_2 zerlegendes Ferment in allen denjenigen Systemen strahlenschützend wirkt, in denen es bei der Strahleneinwirkung zu einer Anhäufung von H_2O_2 über einen bestimmten Grenzwert kommt. Wird diese Konzentration aus irgendeinem Grunde nicht erreicht, so entfällt verständlicherweise jegliche Schutzwirkung. Dies ist z. B. dann der Fall, wenn in Gegenwart eines geeigneten H-Donors das gebildete H_2O_2 fortlaufend peroxydatisch umgesetzt wird. Diese Doppelrolle der Katalase lässt es somit als verständlich erscheinen, dass diese je nach Zusammensetzung des bestrahlten Systems entweder H_2O_2 -zerlegend, d. h. strahlenschützend, oder peroxydatisch im Sinne einer Verstärkung der Strahlenwirkung wirkt.

Es ist denkbar, dass sich der in geringer Menge bildende Katalase- H_2O_2 -Komplex I peroxydatisch mit den oxydablen Gruppen der Alkoholdehydrogenase-Molekel direkt oder indirekt umsetzt. Für diese Annahme spricht der Befund, dass die Oxydation verschiedener niedermolekularer Thiolverbindungen durch Katalase katalytisch (nicht enzymatisch!) beschleunigt wird (BOERI & BONNICHSEN¹⁴), AEBI & FREI¹⁵)). Diese Versuche bestätigen den früher erhobenen Befund, wonach die Katalase unter bestimmten Voraussetzungen die Strahlen-chemische Ausbeute zu erhöhen vermag (vgl. AEBI *et al.*¹⁶)). Eine Verallgemeinerung der diesem Enzym zugeschriebenen Strahlen-Schutzwirkung ist daher nicht statthaft.

Die Ausführung dieser Arbeit erfolgte mit Unterstützung der KOMMISSION FÜR ATOMWISSENSCHAFT des SCHWEIZ. NATIONALFONDS, wofür bestens gedankt sei.

SUMMARY

1. Radiation induced inactivation of horse liver alcohol-dehydrogenase in dilute aqueous solution has been investigated (G -value ~ 0.2).

2. Whereas the enzyme can be protected by the addition of reduced glutathion as well as by inert proteins, its sensitivity towards X-rays can be increased by addition of small amounts of catalase.

¹⁴) E. BOERI & R. K. BONNICHSEN, *Acta chem. scand.* 6, 968 (1952).

¹⁵) H. AEBI & EVA FREI, *Helv.* 41, 361 (1958).

¹⁶) H. AEBI, R. GRESSLY, R. OESTREICHER & A. ZUPPINGER, *Helv.* 42, 2531 (1959).

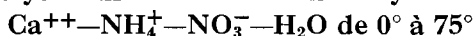
3. In radiation induced inactivation there is a parallelism between the proportion of lost activity and thiol oxidation. After inactivation a partial regeneration of free SH-groups can be achieved, but this regeneration does not restore enzymatic activity. It is suggested that radiation induced inactivation is due to denaturation rather than SH-oxidation only.

Medizinisch-chemisches Institut und Röntgeninstitut
der Universität Bern

195. Contribution à l'étude du système quinaire



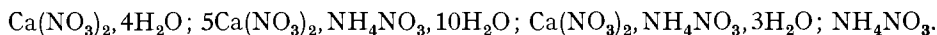
XX. La polytherme de saturation du système ternaire



par R. Flatt, G. Brunisholz et R. Muhlethaler

(19. VIII. 61)

Lors d'une étude de solubilité se rapportant au système quaternaire $\text{Ca}^{++}-\text{NH}_4^+-\text{H}^+-\text{NO}_3^--\text{H}_2\text{O}^1$ ²⁾, l'isotherme de saturation du système ternaire $\text{Ca}^{++}-\text{NH}_4^+-\text{NO}_3^--\text{H}_2\text{O}$ a été établie pour 25° . A cette température, le diagramme de solubilité se compose de 4 courbes de saturation représentant des solutions saturées respectivement des phases solides suivantes:



Nous avons étudié ce même système à d'autres températures dans le but de pouvoir construire la polytherme du système ternaire $\text{Ca}^{++}-\text{NH}_4^+-\text{NO}_3^--\text{H}_2\text{O}$. Nos expériences concernent essentiellement les isothermes de saturation pour 0° , 50° et 75° . En outre, nous avons fait un certain nombre d'essais de saturation à des températures intermédiaires afin de nous orienter sur la position de quelques points invariants de la polytherme.

Au cours de notre étude, nous avons constaté que les composés suivants peuvent apparaître entre 0° et 75° comme phases solides stables en équilibre avec des solutions saturées:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	(symbole Ca^4)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 3\text{H}_2\text{O}$	(» Ca^3)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ anhydre	(» Ca^0)
NH_4NO_3	(» NH_4^0)
$5\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, \text{NH}_4\text{NO}_3, 10\text{H}_2\text{O}$	(» $\text{D}^{5.1.10}$)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, \text{NH}_4\text{NO}_3, 3\text{H}_2\text{O}$	(» $\text{D}^{1.1.3}$)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, \text{NH}_4\text{NO}_3(\alpha)$	(» $\text{D}^{1.1.0}$)

Outre les trois nitrates de calcium Ca^4 , Ca^3 et Ca^0 , on connaît le nitrate de calcium dihydraté $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 2\text{H}_2\text{O}$. On peut préparer ce composé en faisant cristalliser le nitrate de calcium à température ordinaire (25°) dans l'acide nitrique à env. 50%. Dans le système binaire $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2-\text{H}_2\text{O}$, le sel $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 2\text{H}_2\text{O}$ ne peut se former qu'en

¹⁾ P. FRITZ, thèse, Berne 1946.

²⁾ R. FLATT & P. FRITZ, *Helv.* 33, 2045 (1950).