

## Röntgenkleinwinkeluntersuchungen der strahleninduzierten Aggregation von Ribonuclease, Lactat-Dehydrogenase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Serumalbumin. Ein Vergleich mit Malatsynthase

Peter Zipper<sup>a,\*</sup>, Hans G. Gatterer<sup>a</sup>, Josef Schurz<sup>a</sup>  
und Helmut Durchschlag<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institut für Physikalische Chemie, Universität Graz,  
A-8010 Graz, Österreich

<sup>b</sup> Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie,  
Universität Regensburg, D-8400 Regensburg, Bundesrepublik Deutschland

(Eingegangen 20. Dezember 1979. Angenommen 7. Januar 1980)

*Small-Angle X-Ray Scattering Studies on the X-Ray Induced Aggregation of Ribonuclease, Lactate Dehydrogenase, Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase and Serum Albumin. A Comparison with Malate Synthase*

The X-ray induced aggregation of ribonuclease, lactate dehydrogenase (*LDH*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and serum albumin in aqueous solution was monitored in situ by means of small-angle X-ray scattering. The time dependence of several molecular parameters viz. the apparent radius of gyration  $\bar{R}$ , the maximum visible diameter  $D$ , the mean degree of aggregation  $\bar{x}$ , and the mean radius of gyration  $\bar{R}$  was used to compare the various proteins with each other and with malate synthase which has been studied previously (*P. Zipper* and *H. Durchschlag*, *Radiat. and Environm. Biophys.*, 1980).

Measurements carried out with ribonuclease, *LDH* and serum albumin in the absence of dithiothreitol (*DTT*) and with *GAPDH* in the presence of 0.2 mM *DTT* established the following series for the rates of aggregation of the proteins under these conditions: ribonuclease > *LDH* > *GAPDH* > serum albumin. The rate of aggregation of *GAPDH* was found to be of similar magnitude as that obtained for malate synthase under comparable experimental conditions (presence of 0.2 mM *DTT*, similar X-ray intensity) in our previous study. Within six hours from the beginning of irradiation (i.e. about the time required for the exposure of one complete scattering curve under the conditions of our experiments) the following increases of  $\bar{R}$  resulted: ribonuclease 9%, *LDH* 7%, *GAPDH* 4%, serum albumin < 1%. Changes of  $\bar{R}$  exceeding 1% are, of course, too high to be tolerated in conventional scattering experiments.

Measurements carried out with *LDH* and *GAPDH* in the presence of 2 mM *DTT* established a strong protective effect of *DTT* against the X-ray induced aggregation of these enzymes. The initial increase of  $\bar{R}$  upon irradiation of *LDH* and *GAPDH* in the presence of 2 mM *DTT* was found to be even lower than the increase of  $\bar{R}$  observed when serum albumin was irradiated in the absence of *DTT*. However, the observed decrease of  $\bar{x}$  of *LDH* and *GAPDH* at the early stages of irradiation suggested the occurrence of fragmentation of the enzymes as another consequence of radiation damage. This finding is discussed in context with the results from previous scattering experiments and electrophoretic studies on malate synthase.

(*Keywords: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Lactate dehydrogenase, Radiation damage, Ribonuclease, Serum albumin, Small-angle X-ray scattering*)

### Einleitung

Die Technik der Röntgenkleinwinkelstreuung hat sich in bereits sehr zahlreichen Anwendungen als eine äußerst wertvolle Methode zur Durchführung von Strukturuntersuchungen an Biopolymeren in Lösung erwiesen<sup>1-4</sup>. Die Möglichkeit des Auftretens von Strahlenschäden in der zu untersuchenden Probe während der Röntgenkleinwinkelmessung wurde allerdings bisher, wenn überhaupt, zumeist nur beiläufig erwähnt. Nur wenige Autoren berichteten über Veränderungen der Probe, welche eventuell auf Strahlenschäden zurückzuführen waren (z. B.<sup>5,6</sup>). Von mehreren Autoren wurde bei der Durchführung von Röntgenkleinwinkeluntersuchungen an Enzymen die Enzymaktivität vor und nach dem Streuexperiment verglichen; die beobachteten Unterschiede waren zumeist nur geringfügig (vgl.<sup>7-11</sup>).

Andererseits ist das Phänomen der Strahlenschädigung von Biopolymeren auf Grund der Ergebnisse anderer Untersuchungsmethoden wohlbekannt. Untersuchungen der Schädigung von Proteinen in wäßriger Lösung haben gezeigt, daß die Bestrahlung unter anderem zur Veränderung der Aminosäurezusammensetzung, zur Zerstörung von Sekundär- und Tertiärstruktur, zu Strangbrüchen, zur Bildung von Aggregaten und zum Verlust der biologischen Funktion führen kann<sup>12-15</sup>. Als besonders strahlenempfindlich erwiesen sich die schwefelhaltigen und die aromatischen Aminosäuren der Proteine.

Daß auch während Röntgenkleinwinkelmessungen durchaus Strahlenschäden in beträchtlichem Ausmaß auftreten können, zeigte sich deutlich bei der Durchführung von Messungen an der Malatsynthase<sup>16-19</sup>. Das aus wahrscheinlich 3 Untereinheiten aufgebaute Enzym besitzt ein Molekulargewicht von 170 000—187 000 und enthält  $17 \pm 1$  SH-Gruppen<sup>20</sup>. Bei den Kleinwinkelmessungen konnten mit zunehmender Bestrahlungsdauer wesentliche Veränderungen des Streuverhaltens der Probe festgestellt werden, die sich unschwer als

Ausdruck einer durch die Bestrahlung ausgelösten Aggregation der Enzymmoleküle interpretieren ließen. Eine genaue Analyse der bei einem Langzeitversuch in regelmäßigen Zeitabständen aufgenommenen Streukurven des Enzyms führte schließlich zu einem Modell für den räumlichen Ablauf des Aggregationsprozesses<sup>19, 21, 22</sup>. Weiters zeigte sich, daß die Aggregationsgeschwindigkeit durch verschiedene Faktoren beträchtlich reduziert werden konnte, so zum Beispiel durch die Verringerung der Intensität der Primärstrahlung oder durch die Zugabe von Dithiothreitol (*DTT*) oder Ethanol oder den Substraten oder einem Substratanalogen zur Enzymlösung<sup>19, 21</sup>. Die Kombination von niedriger Primärintensität und hoher Konzentration von *DTT* setzte die Aggregationsgeschwindigkeit so weit herab, daß Röntgenkleinwinkeluntersuchungen des nativen Enzyms durchgeführt werden konnten, bei denen, nicht zuletzt dank einem häufigen Präparatwechsel und einer strengen Kontrolle der Meßdaten, eine Verfälschung der Resultate durch Strahlenschäden weitgehend auszuschließen war<sup>23</sup>. Diese Vorsichtsmaßnahmen erwiesen sich insbesondere für die Untersuchung von Strukturänderungen bei der Substratbindung als unumgänglich notwendig.

Zur Klärung der Frage, ob sich die Malatsynthase etwa durch eine ungewöhnlich hohe Strahlenempfindlichkeit auszeichnet oder ob auch andere Proteine bei Röntgenkleinwinkelmessungen unter den üblichen Bedingungen eine Strahlenschädigung in vergleichbarem Ausmaß erleiden, führten wir entsprechende Untersuchungen an den Enzymen Ribonuclease, Lactat-Dehydrogenase (*LDH*) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) sowie an Serumalbumin durch. Diese vier Proteine wurden deshalb gewählt, da sie alle bereits Gegenstand eingehender strahlenbiologischer Untersuchungen mittels anderer Methoden waren, wobei in vielen Fällen ebenfalls Aggregatbildung festgestellt werden konnte<sup>24-35</sup>. Mit Ausnahme der *LDH* sind an diesen Proteinen auch schon mehrmals Röntgenkleinwinkeluntersuchungen durchgeführt worden<sup>5, 11, 36-46</sup>. Bei den Röntgenkleinwinkelmessungen an der *GAPDH* wurde bereits eine Aggregation beobachtet; diese wurde zum damaligen Zeitpunkt aber nicht auf eine Strahlenschädigung des Enzyms zurückgeführt<sup>5</sup>.

Die Eigenschaften der von uns verwendeten Proteine sind bereits ausführlich beschrieben worden<sup>47-50</sup>. Alle vier Proteine enthalten Cystein und/oder Cystin: Ribonuclease A aus Rinderpankreas ( $M_r = 13\,700$ ) besitzt 4 Disulfidbrücken, aber keine freie SH-Gruppe; *LDH* aus Schweineherz ( $M_r = 140\,000$ ) besitzt 16 Cystein, aber keine Disulfidbrücken; *GAPDH* aus Hefe ( $M_r = 146\,000$ ) besitzt 8 Cystein und ebenfalls keine Disulfidbrücken; Albumin aus Rinderserum ( $M_r = 66\,200$ ) enthält 17 Disulfidbrücken und < 1 freie SH-Gruppe.

*LDH* und *GAPDH* sind aus je 4, Ribonuclease und Serumalbumin aus je 1 Untereinheit aufgebaut.

Die Schutzwirkung von *DTT* gegen die strahleninduzierte Inaktivierung von Enzymen ist wohlbekannt<sup>15, 51–53</sup>. Als Schutzfaktor gegen das Auftreten von strahleninduzierten Aggregaten während Röntgenkleinwinkelmessungen wurde *DTT* bisher nur im Fall der Malat-synthase angewandt<sup>18, 19, 21, 23</sup>. Durch unsere vorliegenden Untersuchungen, über die an anderer Stelle bereits kurz berichtet wurde<sup>54</sup>, sollte auch geklärt werden, ob *DTT* auch bei anderen Proteinen als Schutzfaktor gegen strahleninduzierte Strukturänderungen während Röntgenkleinwinkelmessungen Verwendung finden kann.

## Methodik

### Chemikalien

Dithiothreitol (*DTT*) wurde von Calbiochem, Luzern, Phenylmethylsulfonfylfluorid (*PMSF*) von Serva, Heidelberg, ultrareines Ammoniumsulfat von Schwarz/Mann, Orangeburg (USA), bezogen. Alle anderen verwendeten Reagenzien waren von analytischem Reinheitsgrad, zumeist von Merck, Darmstadt.

### Proteine

*GAPDH* (EC 1.2.1.12) wurde in Anlehnung an bestehende Vorschriften<sup>55, 56</sup> bei 4°C aus Bäckerhefe isoliert: Der Zellaufschluß erfolgte bei niedriger Ionenstärke in Anwesenheit von *DTT*, *EDTA* und des Proteaseinhibitors *PMSF* mit Hilfe eines Manton-Gaulin Hochdruckhomogenisators (600 kg/cm<sup>2</sup>). Nach zwei fraktionierten Fällungen mit Ammoniumsulfat (0–65%, 65–85% Sättigung) und Entsalzung durch Gelfiltration (Sephadex G-50 medium) erfolgte die weitere Reinigung durch DEAE-Cellulose Chromatographie (Whatman DE 52). Nach Konzentrierung des Enzyms, durch Fällung mit Ammoniumsulfat (85% Sättigung) und Entsalzung durch Dialyse, wurde das Enzym mit Aktivkohle behandelt, um coenzymfreies Apoenzym zu erhalten. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus ultrareinem Ammoniumsulfat konnte schließlich ein elektrophoretisch reines Enzym mit einer spezifischen Aktivität von etwa 160 U/mg und einem Verhältnis  $A_{280}/A_{260} = 2,15$  erhalten werden. Das Enzym wurde als Kristallsuspension in Ammoniumsulfatlösung aufbewahrt.

Die anderen verwendeten Proteine waren kommerziell erhältlich: Ribonuclease A (EC 3.1.27.5) aus Rinderpankreas (Typ III-A) von Sigma, München; LDH (EC 1.1.1.27) aus Schweineherz (Kristallsuspension in Ammoniumsulfatlösung) von Boehringer, Mannheim; Albumin aus Rinderserum (krist. reinst) von Serva, Heidelberg.

### Proteinlösungen

Zur Herstellung der Lösungen für die Röntgenkleinwinkelmessungen wurden die Proteine in den folgenden Puffern gelöst und durch ausreichende Dialyse (> 60 h) bei 4°C ins Gleichgewicht gebracht: 1/15 M-Kaliumphosphatpuffer *pH* 7,0 für Ribonuclease und *LDH*; 50 mM Tris-HCl Puffer *pH* 7,0 für Serumalbumin; 50 mM Natriumpyrophosphat-HNO<sub>3</sub> Puffer *pH* 8,5, mit

5 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  und 0,2 oder 2 mM  $\text{DTT}$ , für  $\text{GAPDH}$ . Die Herstellung einer an  $\text{DTT}$  2 mM Lösung von  $\text{LDH}$  erfolgte durch Zugabe einer konzentrierten  $\text{DTT}$ -Lösung zur bereits dialysierten Lösung. Zur Herstellung aller Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

Die Konzentrationsbestimmungen der Proteine erfolgten spektralphotometrisch durch Messung der Absorption bei 280 nm. Für 0,1%ige Lösungen wurden folgende Werte zugrunde gelegt:  $A_{280\text{ nm}}^{0,1\%} = 0,695$  für Ribonuclease, 1,40 für  $\text{LDH}$ , 0,894 für  $\text{GAPDH}$ , 0,66 für Serumalbumin.

Falls erforderlich, wurden die Proteinlösungen vor Beginn der Kleinwinkelexperimente zentrifugiert (Sorvall RC2-B Kühlzentrifuge, 30 min bei 20 000 rpm).

### Röntgenkleinwinkelstreuung

Die Durchführung der Röntgenkleinwinkelmessungen und die Auswertung der Streudaten erfolgte in ähnlicher Weise wie bei früheren Messungen<sup>19, 21</sup>. Die Arbeit<sup>19</sup> enthält auch einen kurzen Abriss der Streutheorie. Die Präparate befanden sich während der Messung in Mark-Kapillaren von 1 mm Durchmesser und wurden auf 4 °C gekühlt. Alle Röntgenkleinwinkelexperimente wurden unter Verwendung der nicht monochromatisierten Strahlung einer Cu-Röhre (betrieben mit 50 kV und 30 mA) durchgeführt. Die für die Röntgenkleinwinkelstreuung maßgebliche integrale Intensität der Primärstrahlung (das ist im wesentlichen der auf die  $\text{CuK}_\alpha$ - und  $\text{K}_\beta$ -Linien entfallende Intensitätsanteil) wurde mit Hilfe eines geeichten Lupolenblättchens<sup>57</sup> bestimmt.

## Ergebnisse

### Die spaltverschmierten Streukurven

Die Durchführung von Röntgenkleinwinkelmessungen an Ribonuclease,  $\text{LDH}$  und Serumalbumin in Abwesenheit von  $\text{DTT}$  und von  $\text{GAPDH}$  in Gegenwart von 0,2 mM  $\text{DTT}$  erbrachte folgende Ergebnisse. Bei allen vier Proteinen war eine mit zunehmender Bestrahlungsdauer fortschreitende Veränderung des Streuverhaltens vor allem im Bereich kleiner und kleinster Streuwinkel zu beobachten, wobei die Streuintensität in diesem Winkelbereich zunahm und die Streukurven steiler wurden. Dieser experimentelle Befund, welcher eine durch die Bestrahlung ausgelöste Aggregation widerspiegelt, wird durch die Abb. 1, 2a, 3a und 4 klar zum Ausdruck gebracht. Die Abbildungen zeigen Guinier-Auftragungen von experimentellen spaltverschmierten Streukurven, welche in bestimmten, meist regelmäßigen Zeitabständen aufgenommen wurden. Die aus den Steigungen der eingezeichneten Geraden berechneten apparenten Streumassenradien  $\bar{R}$  sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Um die einzelnen Proteine besser vergleichen zu können, erfolgt die Angabe der apparenten Streumassenradien in relativen Einheiten  $\bar{R}/\bar{R}_1$ , wobei  $\bar{R}_1$  der apparente Streumassenradius des nicht aggregierten Proteins ist. Wie man der Tab. 1 (Werte für 0 bzw. 0,2 mM  $\text{DTT}$ ) entnehmen kann, nimmt unter den

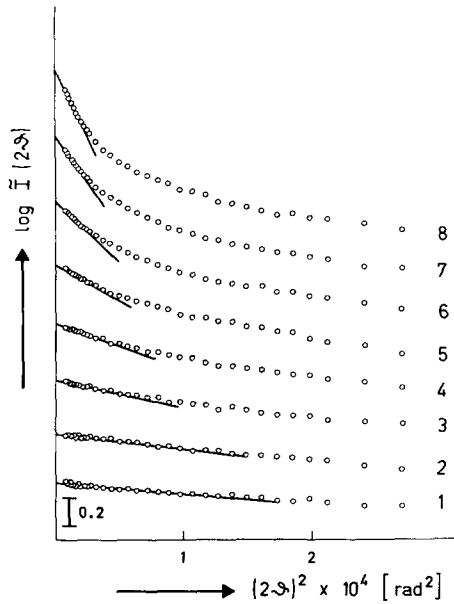


Abb. 1. Guinier-Auftragungen von experimentellen Röntgenkleinwinkelstreu-  
kurven von aggregierender Ribonuclease ( $c = 10 \text{ mg/ml}$ , ohne  $DTT$ ; integrale  
Primärintensität  $P_0 = 4,4 \cdot 10^7 \text{ Pulse cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Zeitintervall zwischen auf-  
einanderfolgenden Kurven jeweils etwa 8,3 h. ( $\bar{I}$ : spaltverschmierte Streu-  
intensität;  $2\theta$ : Streuwinkel)

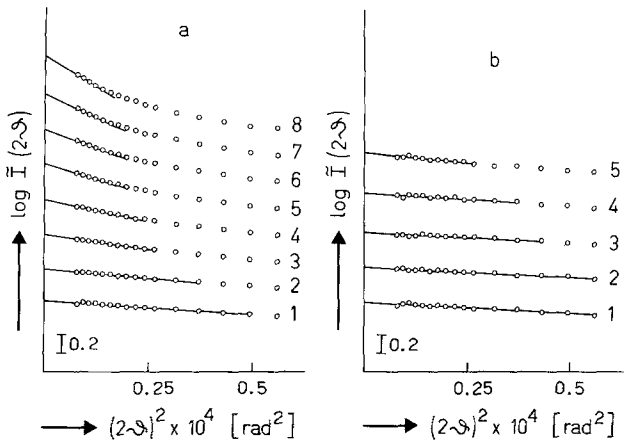


Abb. 2. Guinier-Auftragungen von experimentellen Röntgenkleinwinkelstreu-  
kurven von aggregierender LDH. *a*  $c = 7,1 \text{ mg/ml}$ , ohne  $DTT$ ,  $P_0 = 4,09 \cdot 10^7$   
 $\text{Pulse cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; Zeitintervall zwischen aufeinanderfolgenden Kurven jeweils  
etwa 7,8 h, nur zwischen den Kurven 7 und 8 15,8 h; *b*  $c = 7,6 \text{ mg/ml}$ ,  
 $2 \text{ mM } DTT$ ,  $P_0 = 5,4 \cdot 10^7 \text{ Pulse cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; Zeitintervall zwischen aufeinander-  
folgenden Kurven jeweils etwa 14,5 h

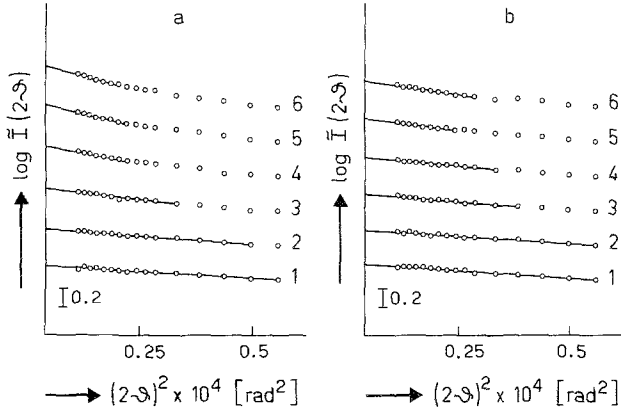


Abb. 3. Guinier-Auftragungen von experimentellen Röntgenkleinwinkelstreu-  
kurven von aggregierender GAPDH. a  $c = 10 \text{ mg/ml}$ ,  $0,2 \text{ mM DTT}$ ,  
 $P_0 = 5,42 \cdot 10^7 \text{ Pulse cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; Zeitintervall zwischen aufeinanderfolgenden  
Kurven jeweils etwa  $12,2 \text{ h}$ ; b  $c = 10 \text{ mg/ml}$ ,  $2 \text{ mM DTT}$ ,  $P_0 = 5,45 \cdot 10^7 \text{ Pulse}$   
 $\text{cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; Zeitintervall zwischen aufeinanderfolgenden Kurven jeweils etwa  
 $12,3 \text{ h}$

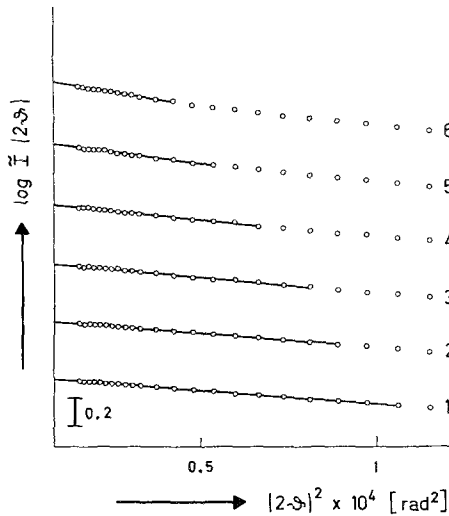


Abb. 4. Guinier-Auftragungen von experimentellen Röntgenkleinwinkelstreu-  
kurven von aggregierendem Serumalbumin ( $c = 30 \text{ mg/ml}$ , ohne DTT,  
 $P_0 = 3,84 \cdot 10^7 \text{ Pulse cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Zeitintervall zwischen aufeinanderfolgenden  
Kurven jeweils  $12,2 \text{ h}$

Tabelle 1. Molekülparameter  $\bar{R}$ ,  $D$ ,  $\bar{x}$  und  $\bar{R}$  von Ribonuclease, LDH, GAPDH und Serumalbumin als Funktion der Bestrahlungsdauer<sup>t</sup>

Protein	$c$ (mg/ml)	$c_{DTT}$ (mM)	$F_0 \cdot 10^{-7a}$ (Pulse $\text{cm}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	Kurve	$t$ (h)	$\bar{R}/\bar{R}_1^b$	$D/D_1^c$	$\bar{x}^a$	$\bar{R}/R_1^e$
Ribonuclease	10	0	4,4	1	0	1,0	1,0	1,0	1,0
				2	8,3	1,18	2,6	1,38	1,75
				3	16,5	1,6	2,65	1,95	2,06
				4	24,9	2,04	3,75	3,28	2,75
				5	33,1	2,58	5,95	6,58	4,3
				6	41,5	3,32	7,5	11,5	5,1
				7	49,8	4,1	7,6	21,6	5,9
				8	58,0	4,93	—	—	—
LDH	7,1	0	4,09	1	0	1,0	1,0	1,0	1,0
				2	7,8	1,14	2,05	1,26	1,4
				3	15,6	1,44	2,7	1,93	2,08
				4	23,3	1,77	2,7	2,94	2,33
				5	31,0	2,14	3,3	4,15	2,96
				6	38,6	2,36	3,8	5,7	3,4
				7	46,4	2,64	3,85	7,6	3,66
				8	62,2	3,0	4,15	11,4	4,06
LDH	7,6	2	5,40	1	0	1,0	1,0	1,0	1,0
				2	14,5	1,01	0,95	0,93	1,0
				3	28,9	1,0	1,02	0,93	1,01
				4	43,5	1,1	1,05	0,94	1,03
				5	58,2	1,37	1,2	1,0	1,10



GAPDH	10	0,2	5,42	1	0	1,0	1,0	1,0	1,0
				2	12,2	1,1	1,1	0,92	1,05
				3	24,5	1,54	2,4	1,16	1,63
				4	37,0	1,82	3,15	1,72	2,49
				5	49,4	2,06	3,7	2,16	2,9
				6	62,0	2,16	—	—	—
GAPDH	10	2	5,45	1	0	1,0	1,0	1,0	1,0
				2	12,3	1,01	1,15	0,92	1,04
				3	24,7	1,09	1,15	0,89	1,04
				4	37,1	1,15	1,55	0,95	1,17
				5	49,7	1,43	2,75	1,25	2,0
				6	62,0	1,59	—	—	—
Serumalbumin	30	0	3,84	1	0	1,0	1,0	1,0	1,0
				2	12,2	1,02	1,05	1,04	1,04
				3	24,6	1,12	1,4	1,12	1,17
				4	37,3	1,3	1,9	1,27	1,43
				5	49,8	1,34	1,95	1,52	1,66
				6	62,3	1,51	—	—	—

a Integrale Primärintensität, bestimmt mit Eichlupolen.

b  $\bar{R}$  = apparenter Streumassenradius, bestimmt aus der spaltverschmierten Streukurve.

c  $\bar{D}$  = größter sichtbarer Teilchendurchmesser, bestimmt aus der  $p(\tau)$ -Funktion.

d Mittlerer Aggregationsgrad, bestimmt aus der  $p(\tau)$ -Funktion.

e  $\bar{R}$  = mittlerer Streumassenradius, bestimmt aus der  $p(\tau)$ -Funktion.

gegebenen experimentellen Bedingungen der apparente Streumassenradius der Ribonuclease am raschesten zu, während die Zunahme im Fall des Serumalbumins am langsamsten erfolgt. Der apparente Streumassenradius der *LDH* wächst etwas rascher an als der der *GAPDH*.

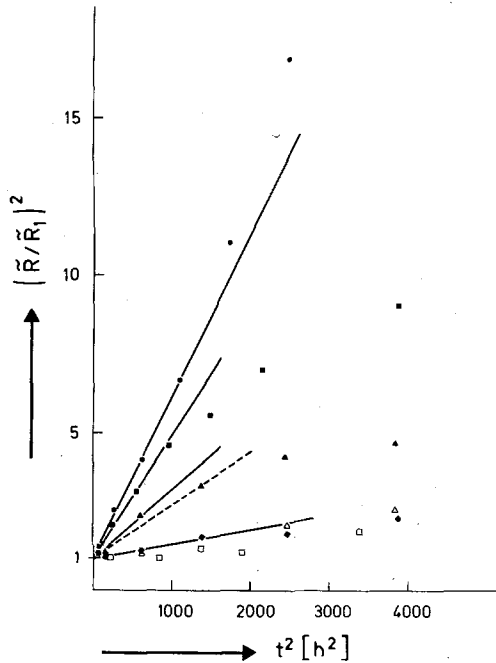


Abb. 5. Stabilitätsauftragungen für die vier Proteine Ribonuclease (●), *LDH* (■, □), *GAPDH* (▲, △) und Serumalbumin (◆). Die Kurven geben die Abhängigkeit der aus den Abb. 1—4 bestimmten apparenten Streumassenradien  $\tilde{R}$  von der Bestrahlungsdauer  $t$  wieder. Volle Symbole beziehen sich auf Messungen bei niedriger *DTT*-Konzentration (0 bzw. 0,2 mM *DTT*), die ausgezogenen Geraden entsprechen dem linearen Anfangsverlauf der Stabilitätskurven unter diesen Bedingungen. Die gestrichelte Gerade ist die Stabilitätskurve der Malatsynthese für ähnliche experimentelle Bedingungen ( $c = 41,7$  mg/ml, 0,2 mM *DTT*,  $P_0 = 4,3 \cdot 10^7$  Pulse  $\text{cm}^{-1} \text{s}^{-1}$ )<sup>21</sup>. Leere Symbole beziehen sich auf Messungen in Gegenwart von 2 mM *DTT*.

Dieser Sachverhalt wird durch die in Abb. 5 gezeigten Stabilitätsauftragungen  $[(\tilde{R}/\tilde{R}_1)^2$  gegen das Quadrat  $t^2$  der Bestrahlungsdauer] besonders deutlich zum Ausdruck gebracht (Kurven mit vollen Symbolen).

Im Gegensatz zu unseren früheren Messungen an der Malatsynthese, deren Stabilitätskurven über einen weiten Bereich von  $t^2$  durch

Geraden approximiert werden konnten<sup>18,21</sup>, ist eine lineare Approximation bei den vorliegenden Proteinen nur im Anfangsbereich der Stabilitätskurven möglich. Im Fall der Ribonuclease krümmt sich die Stabilitätskurve bei höheren  $t^2$ -Werten stark nach oben, bei den anderen Proteinen krümmt sie sich nach unten.

Die Enzyme *LDH* und *GAPDH* wurden auch in Gegenwart von  $2\text{ mM DTT}$  vermessen. Die *Guinier*-Auftragungen der bei diesen Messungen erhaltenen spaltverschmierten Streukurven sind in den Abb. 2*b* und 3*b* wiedergegeben. Wie man aus dem Vergleich der Abb. 2*b* mit der Abb. 2*a*, bzw. der Abb. 3*b* mit der Abb. 3*a* ersieht, sind die bei der Bestrahlung in Gegenwart von  $2\text{ mM DTT}$  auftretenden Veränderungen im Streuverhalten der beiden Enzyme weit geringer als bei der Bestrahlung in Abwesenheit von *DTT* (*LDH*) oder in Gegenwart von nur  $0,2\text{ mM DTT}$  (*GAPDH*). Daher erfolgt auch die Zunahme der apparenten Streumassenradien in Gegenwart von  $2\text{ mM DTT}$  wesentlich langsamer (vgl. Tab. 1). Dieser experimentelle Befund kommt in den Stabilitätskurven (Abb. 5, Kurven mit leeren Symbolen) besonders gut zum Ausdruck. Die Stabilitätskurven für in Gegenwart von  $2\text{ mM DTT}$  bestrahlte *LDH* bzw. *GAPDH* verlaufen wesentlich flacher als die in Abwesenheit von  $2\text{ mM DTT}$  erhaltenen Kurven. Sie liegen nun knapp unter der Kurve für das (in Abwesenheit von *DTT* bestrahlte) Serumalbumin, wobei die Werte für die *LDH* sogar noch etwas tiefer liegen als die Werte für die *GAPDH*.

#### Die Abstandsverteilungsfunktionen

Die aus den spaltverschmierten Streukurven durch „Entschmierung“ erhaltenen Streukurven der vier Proteine wurden *Fourier*-transformiert. Die dabei erhaltenen Abstandsverteilungsfunktionen  $p(r)$  sind in den Abb. 6—9 wiedergegeben. Während in der Theorie die Abstandsverteilungsfunktion eines Teilchens nur für Abstände, die kleiner sind als der größte Teilchendurchmesser, von null verschieden ist und für alle größeren Abstände den Wert null annimmt, können sich in der Praxis der  $p(r)$ -Funktion durch Meßfehler, Interferenzeffekte und Abbrucheffekte bei der *Fourier*-transformation Oszillationen überlagern, welche eine genaue Bestimmung des größten Teilchendurchmessers erschweren. Immerhin kann aber die Lage des ersten Nulldurchganges der  $p(r)$ -Funktionen in den Abb. 6—9 in guter Näherung als Maß für den größten sichtbaren Teilchendurchmesser  $D$  gelten. Mit Hilfe der  $p(r)$ -Funktionen kann also die mit fortschreitender Aggregation erfolgende Zunahme von  $D$  unmittelbar verfolgt werden. Darüber hinaus ist die Fläche unter der  $p(r)$ -Funktion dem mittleren Aggregationsgrad  $\bar{x}$  proportional und aus dem Verhältnis von zweitem

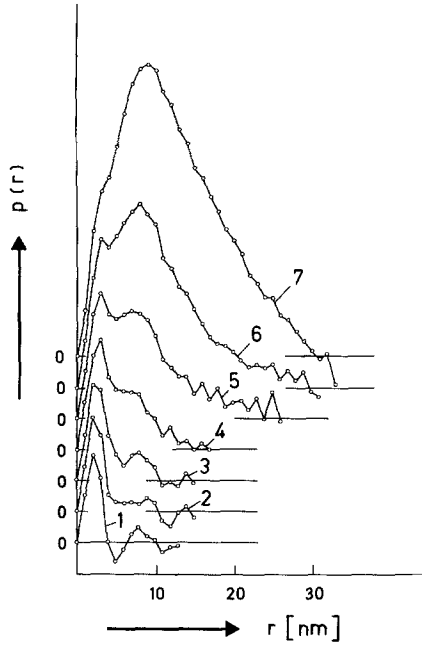


Abb. 6. Abstandsverteilungsfunktionen  $p(r)$  für aggregierende Ribonuclease (ohne *DTT*)

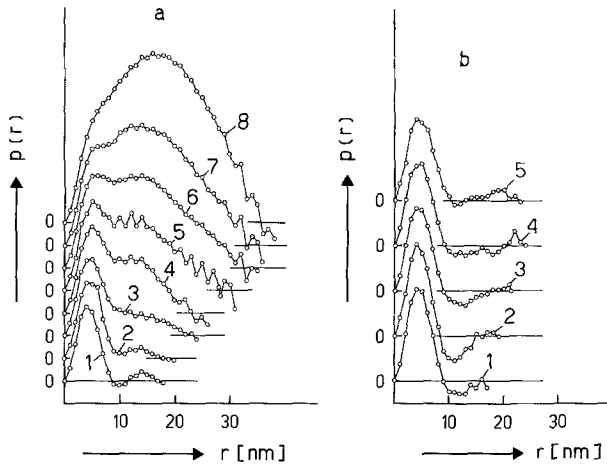


Abb. 7. Abstandsverteilungsfunktionen  $p(r)$  für aggregierende *LDH*. *a* Ohne *DTT*; *b* 2 mM *DTT*

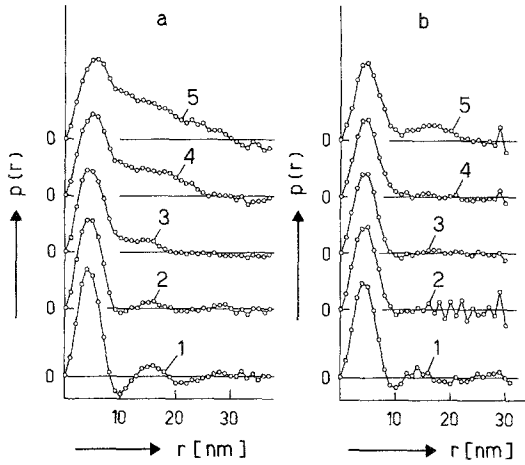


Abb. 8. Abstandsverteilungsfunktionen  $p(r)$  für aggregierende *GAPDH*.  
 a 0,2 mM DTT; b 2 mM DTT

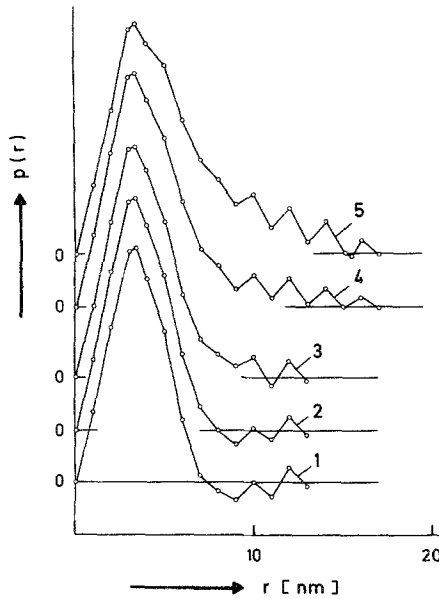


Abb. 9. Abstandsverteilungsfunktionen  $p(r)$  für aggregierendes Serumalbumin  
 (ohne DTT)

und nullem Moment der  $p(r)$ -Funktion kann der mittlere Streumassenradius  $\bar{R}$  berechnet werden.

Die durch Analyse der  $p(r)$ -Funktionen erhaltenen Parameter  $\bar{x}$   $\bar{R}$  und  $D$  (letztere wieder in relativen Einheiten  $\bar{R}/R_1$  bzw.  $D/D_1$ ) sind ebenfalls in der Tab. 1 angeführt. Der Vergleich dieser Parameter für die vier untersuchten Proteine zeigt folgendes:

Die Bestrahlung der Proteine in Abwesenheit einer hohen  $DTT$ -Konzentration führt in jedem Fall zu einer Zunahme des Streumassenradius  $\bar{R}$  sowie des Durchmessers  $D$ . Ebenso erfolgt unter denselben Bedingungen durchwegs eine Zunahme des Aggregationsgrades  $\bar{x}$ ; lediglich im Fall der  $GAPDH$  ( $0,2\text{ mM } DTT$ ) ist im Anfangsstadium der Messung ein Absinken von  $\bar{x}$  auf einen Wert unter 1 festzustellen, während bei längerer Bestrahlung eine beträchtliche Zunahme von  $\bar{x}$  eintritt.

Die Bestrahlung der Enzyme  $LDH$  und  $GAPDH$  in Gegenwart von  $2\text{ mM } DTT$  führt ebenfalls zu einer Zunahme von  $\bar{R}$ , die Geschwindigkeit der Zunahme ist aber wesentlich geringer als in Abwesenheit von  $DTT$  ( $LDH$ ) oder in Gegenwart von nur  $0,2\text{ mM } DTT$  ( $GAPDH$ ). Der Durchmesser  $D$  und vor allem der Aggregationsgrad  $\bar{x}$  sinken hingegen zeitweilig auf Werte ab, die kleiner sind als die Ausgangswerte, und nehmen erst bei lang andauernder Bestrahlung wieder zu. Der hemmende Einfluß einer hohen  $DTT$ -Konzentration auf die Aggregation von  $LDH$  und  $GAPDH$  ist auch unmittelbar aus den  $p(r)$ -Funktionen (Abb. 7 und 8) zu ersehen.

#### *Querschnittsauftragungen der entschmierten Streukurven*

Die durch die Bestrahlung der vier Proteine verursachten unterschiedlichen Veränderungen des Streuverhaltens im Bereich kleiner und mittlerer Streuwinkel lassen sich recht gut auch durch *Guinier*-Auftragungen der mit dem Streuwinkel durchmultiplizierten entschmierten Streukurven (sogenannte Querschnittsauftragungen) sichtbar machen.

Im Fall der in Abwesenheit von  $DTT$  bestrahlten Enzyme Ribonuclease und  $LDH$  (vgl. Abb. 10 und 11a) kommt es als Folge der Bestrahlung zu einer beträchtlichen Intensitätszunahme im Innenteil der Querschnittskurven, welche schließlich zu Aufsätzen bei den kleinsten Streuwinkeln führt, sowie zu einer deutlichen Intensitätsabnahme bei größeren Streuwinkeln. Bei der in Gegenwart von  $0,2\text{ mM } DTT$  bestrahlten  $GAPDH$  (Abb. 12a) kommt es zwar auch zu einer Intensitätszunahme im Innenteil, diese führt jedoch nicht bis zur

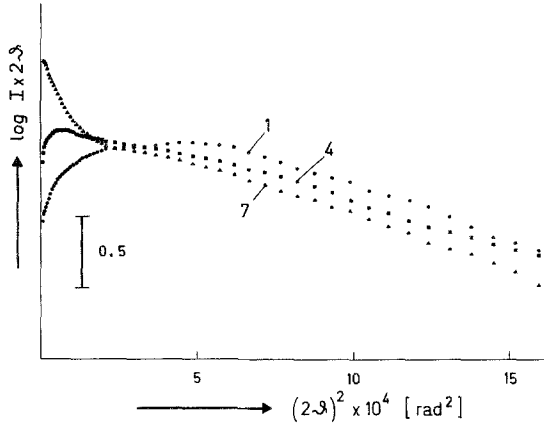


Abb. 10. Querschnitt-Guinier-Auftragungen von ausgewählten Streukurven der aggregierenden Ribonuclease (ohne *DTT*)

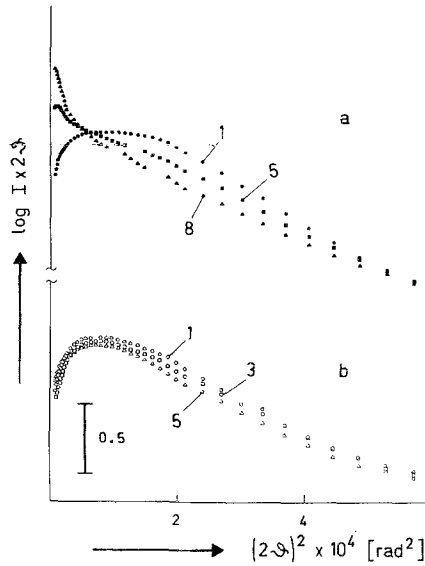


Abb. 11. Querschnitt-Guinier-Auftragungen von ausgewählten Streukurven der aggregierenden LDH. a Ohne *DTT*; b 2 mM *DTT*

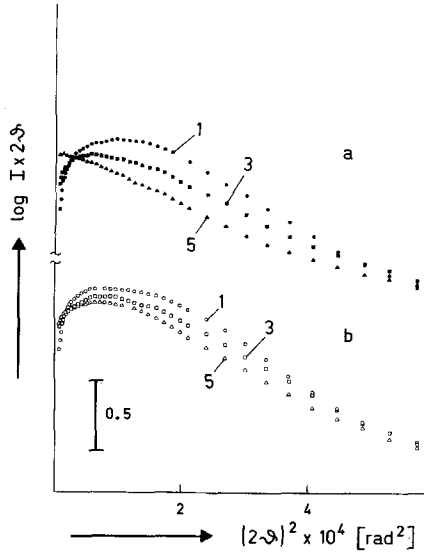


Abb. 12. Querschnitts-Guinier-Auftragungen von ausgewählten Streukurven der aggregierenden GAPDH. a 0,2 mM DTT; b 2 mM DTT

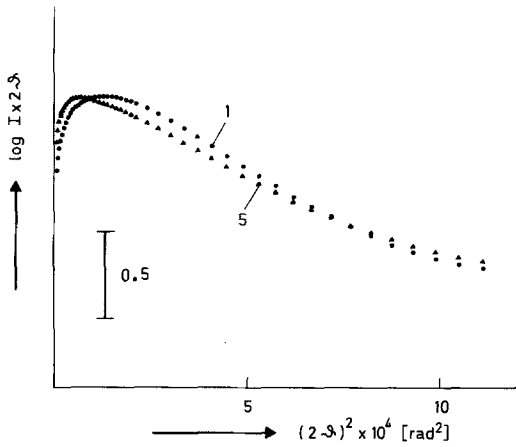


Abb. 13. Querschnitts-Guinier-Auftragungen von ausgewählten Streukurven des aggregierenden Serumalbumins (ohne DTT)



Ausbildung von Aufsätzen. Hingegen ist die Intensitätsabnahme im Mittelteil der bei der *LDH* beobachteten vergleichbar.

Bei der Bestrahlung in Gegenwart von  $2\text{ mM DTT}$  kommt es sowohl bei der *LDH* als auch bei der *GAPDH* zu nur geringfügigen Intensitätszunahmen im Innenteil der Kurven (Abb. 11*b* und 12*b*). Die Intensitätsabnahme bei größeren Streuwinkeln ist verringert, und zwar bei der *LDH* in wesentlich stärkerem Ausmaß als bei der *GAPDH*.

Die bei der Bestrahlung von Serumalbumin (in Abwesenheit von *DTT*) auftretenden Änderungen der Kurvenform in der Querschnittsauftragung (Abb. 13) sind sehr klein und denen von *LDH* in Gegenwart von  $2\text{ mM DTT}$  ähnlich (vgl. Abb. 11*b*).

### Diskussion

Die Meßergebnisse an den von uns in dieser Arbeit untersuchten Proteinen zeigen, daß es bei jedem dieser Proteine während der Durchführung von Röntgenkleinwinkelmessungen zu Strahlenschäden kommt, welche, vor allem in Abwesenheit einer hohen *DTT*-Konzentration, zur Bildung von Proteiaggregaten führen, wie aus der beobachteten gleichzeitigen Zunahme der Molekülparameter  $D$ ,  $\bar{x}$  und  $\bar{R}$  folgt.

Das bei der Messung von *GAPDH* in Gegenwart von  $0,2\text{ mM DTT}$  und bei der Messung von *LDH* und *GAPDH* in Gegenwart von  $2\text{ mM DTT}$  beobachtete zeitweilige Absinken von  $D$  und insbesondere von  $\bar{x}$  unter die Ausgangswerte bei gleichzeitiger Konstanz oder geringfügiger Zunahme von  $\bar{R}$  läßt darauf schließen, daß neben der Aggregatbildung, welche durch *DTT* offensichtlich gehemmt wird, auch die Auffaltung von Proteinmolekülen und die Bildung von Proteinbruchstücken als mögliche Folgen der Strahlenschädigung in Betracht gezogen werden müssen.

Im Fall der *LDH* könnte dieses Absinken von  $D$  und  $\bar{x}$  teilweise auch mit dem Auftreten von ausgeprägten Minima in den  $p(r)$ -Funktionen nach dem ersten Nulldurchgang zusammenhängen (vgl. Abb. 7*b*), welche vielleicht auf verstärkte Interferenzeffekte oder auf Meßungenauigkeiten zurückzuführen sind. Andererseits konnte gerade bei der *LDH* die Bildung von Proteinfragmenten bei der Bestrahlung sowohl durch eigene Untersuchungen mittels Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese<sup>58</sup> als auch durch Untersuchungen anderer Autoren<sup>31</sup> bestätigt werden. Diese Resultate stehen im übrigen in gutem Einklang mit den bei der Malatsynthese erhaltenen Ergebnissen, welche ebenfalls neben Aggregation auch Fragmentierung (und Inaktivierung) als Folgen der Strahlenschädigung nachwiesen<sup>19, 22, 59, 60</sup>. Bei der Malat-

synthase konnte allerdings eine Abnahme von  $\bar{x}$  in dem hier beobachteten Ausmaß nur in einem Fall, nämlich bei der Untersuchung eines außerhalb der Röntgenkleinwinkelkamera in Gegenwart von  $0,2\text{ mM DTT}$  vorbestrahlten Enzym-Pyruvat Komplexes, festgestellt werden<sup>19, 59</sup>. Pyruvat erwies sich als ein sehr wirksamer Inhibitor der strahleninduzierten Aggregation von Malatsynthase<sup>19, 21, 59</sup>.

Die früheren Röntgenkleinwinkelmessungen an der *GAPDH*<sup>5</sup> wurden unter Verwendung des exakt gleichen Puffers wie in der vorliegenden Arbeit (Pyrophosphatpuffer  $pH\ 8,5$  mit  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  und  $0,2\text{ mM DTT}$ ) durchgeführt, allerdings infolge der damaligen Problemstellung bei der viel höheren Temperatur von  $40^\circ\text{C}$ . Die damaligen Messungen ergaben eine Zunahme des apparenten Streumassenradius um fast 70% und eine solche des Molekulargewichts um rund 90% bereits nach einer Meßdauer von etwa einer Stunde; nach drei Stunden hatte sich der apparente Streumassenradius bereits nahezu verdreifacht und das Molekulargewicht war rund viermal so hoch wie zu Beginn der Messung. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit den in Tab. 1 angeführten Werten zeigt, daß die Aggregatbildung bei den früheren Versuchen mit wesentlich größerer Geschwindigkeit erfolgt ist als bei unseren jetzigen Versuchen. Die Erklärung für diese Diskrepanz der Aggregationsgeschwindigkeiten dürfte sicher in den bei beiden Messungen verschiedenen Temperaturen ( $40$  bzw.  $4^\circ\text{C}$ ) zu finden sein. Während aber in der früheren Arbeit die Aggregatbildung allein auf eine Hitzedenaturierung der *GAPDH* zurückgeführt wurde, lassen unsere jetzigen Ergebnisse vermuten, daß zusätzlich auch Strahlenschäden bei der damals beobachteten Aggregation beteiligt gewesen sein dürften.

Für die Aggregationsgeschwindigkeit der vier in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine bei niedriger *DTT*-Konzentration ( $0$  bzw.  $0,2\text{ mM DTT}$ , vgl. Tab. 1 und Abb. 5) gilt folgende Reihe: Ribonuclease > *LDH* > *GAPDH* > Serumalbumin. Allerdings ist hierbei zu beachten, daß unsere Messungen aus technischen bzw. praktischen Gründen nicht unter exakt denselben Bedingungen hinsichtlich Strahlungsintensität, Puffersystem und Proteinkonzentration durchgeführt wurden. So betrug z. B. die integrale Primärintensität  $P_0$ , welche der von den Proben absorbierten Dosisleistung proportional ist, etwa  $3,8 \cdot 10^7$  bis  $5,5 \cdot 10^7$  Pulse  $\text{cm}^{-1}\text{ s}^{-1}$  (vgl. Tab. 1). Unter der Annahme einer Abhängigkeit der Anfangssteigungen der Stabilitätskurven vom Quadrat der integralen Primärintensität<sup>21</sup> läßt sich aber zeigen, daß die oben angeführte Reihe mit Sicherheit nicht eine bloße Folge der unterschiedlichen Primärintensitäten ist. In Tab. 2 sind die experimentell bestimmten Anfangssteigungen  $k_R^2$  sowie die auf eine einheitliche Primärintensität von  $4,3 \cdot 10^7$  Pulsen  $\text{cm}^{-1}\text{ s}^{-1}$  (siehe unten) umgerechneten Steigungen  $k'_R{}^2$  zusammengefaßt. Wie man sieht, erhält

man aus den  $k'_{R^2}$ -Werten dieselbe Reihe für die Aggregationsgeschwindigkeiten wie aus den  $k_{R^2}$ -Werten. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß die Stellung der *GAPDH* in der angegebenen Reihe durch den Umstand beeinflußt wurde, daß dieses Enzym in Gegenwart von 0,2 mM *DTT* untersucht wurde, die anderen Proteine aber in Abwesenheit von *DTT*. *DTT* vermag ja, wie unsere Messungen gezeigt haben, die Aggregationsgeschwindigkeit der *GAPDH* zu verlangsamen. Auch das im Puffer für die *GAPDH* außer *DTT* noch enthaltene *EDTA* könnte übrigens eine ähnliche Wirkung haben (vgl. <sup>61</sup>).

Tabelle 2. Die aus Abb. 5 bestimmten ( $k_{R^2}$ ) und die auf eine einheitliche Primärintensität  $P_0 = 4,3 \cdot 10^7$  korrigierten ( $k'_{R^2}$ ) Anfangssteigungen der Stabilitätskurven

Protein	$c_{DTT}$ (mM)	$P_0 \cdot 10^{-7}$ (Pulse $\text{cm}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_{R^2} \cdot 10^3$ ( $\text{h}^{-2}$ )	$k'_{R^2} \cdot 10^3$ ( $\text{h}^{-2}$ )
Ribonuclease	0	4,4	5,1	4,9
<i>LDH</i>	0	4,09	3,9 <sub>5</sub>	4,3 <sub>5</sub>
<i>GAPDH</i>	0,2	5,42	2,2	1,4
Serumalbumin	0	3,84	0,46	0,58
Malatsynthase	0,2	4,3	1,7	

Bei unseren früheren Untersuchungen an der Malatsynthase<sup>21</sup> wurden einige Messungen unter experimentellen Bedingungen durchgeführt, die den hier verwendeten Bedingungen annähernd vergleichbar sind, nämlich unter Verwendung einer integralen Primärintensität von  $4,3 \cdot 10^7$  Pulsen  $\text{cm}^{-1} \text{s}^{-1}$  und in Gegenwart von 0,2 mM *DTT*. Die bei diesen Kleinwinkelmessungen erhaltene Stabilitätskurve der Malatsynthase ist in der Abb. 5 eingezeichnet (gestrichelte Gerade) und ihre Steigung ist auch in Tab. 2 enthalten. Wie man sieht, ist die Steigung dieser Geraden etwas kleiner als die unkorrigierte Anfangssteigung der *GAPDH*-Kurve, aber wesentlich größer als die Anfangssteigung der Stabilitätskurve des Serumalbumins. Eine Korrektur für die unterschiedlichen Primärintensitäten würde den Unterschied in den Steigungen der Stabilitätskurven für *GAPDH* und Malatsynthase gerade umkehren, so daß unter identischen Intensitätsbedingungen die Stabilitätskurve der Malatsynthase etwas steiler verlaufen würde als die Kurve für die *GAPDH* (vgl. Tab. 2). Der Vergleich der Malatsynthase mit den hier untersuchten Proteinen zeigt jedenfalls klar, daß sich die Malatsynthase sicher nicht durch eine ungewöhnlich hohe Strahlenempfindlichkeit auszeichnet.

Das unterschiedliche Aggregationsverhalten der hier untersuchten

Proteine bei niedrigen *DTT*-Konzentrationen (0 bzw. 0,2 *mM DTT*) spiegelt sich auch in den Querschnittsauftragungen der Streukurven wider. So finden sich Aufsätze in den Innenteilen der Querschnittskurven nur bei den rasch aggregierenden Proteinen Ribonuclease und *LDH*, nicht aber bei den langsamer aggregierenden Proteinen *GAPDH* und Serumalbumin. Ähnliche Aufsätze wurden auch bei den früheren Messungen an der Malatsynthese (in Gegenwart von 0,2 *mM DTT*) gefunden<sup>19, 21</sup>. Das Auftreten solcher Aufsätze ist ein deutlicher Hinweis auf das Vorkommen von Teilchen mit einem größeren Molekülquerschnitt als für das nicht aggregierte Proteinmolekül und schließt somit aus, daß die Aggregation nur in einer Richtung verläuft, was zu stäbchenförmigen Aggregaten mit einem dem nativen Proteinteilchen entsprechenden Querschnitt führen würde. Ob die Aggregation bei den hier untersuchten Proteinen in allen drei Richtungen erfolgt oder nur in zwei Richtungen, wie es wahrscheinlich bei der Malatsynthese der Fall ist<sup>19, 21, 22</sup> konnte bisher nicht geklärt werden, da die Streukurven der hier untersuchten Proteine im Gegensatz zur Streukurve der Malatsynthese keinen ausgeprägten Dickenfaktor enthalten<sup>58</sup>.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Strahlenschäden von Proteinen während der Durchführung von Röntgenkleinwinkelmessungen treten in vollem Umfang erst dann in Erscheinung, wenn man die Messungen über den üblichen Zeitraum hinaus ausdehnt. Daß aber auch schon bei kürzeren Meßzeiten die Strahlenschäden zu einer nicht mehr vernachlässigbaren Verfälschung der Resultate führen können, zeigt die Analyse der Anfangssteigungen der bei unseren Messungen bei 0 bzw. 0,2 *mM DTT* erhaltenen Stabilitätskurven (vgl. Abb. 5 und Tab. 2). Wir haben aus den Steigungen  $k_R^2$  berechnet, nach welcher Bestrahlungsdauer unter den Bedingungen unserer Experimente eine Vergrößerung des apparenten Streumassenradius um 1% eintritt. Wie die Rechnung zeigt, tritt diese Veränderung von  $\bar{R}$  bei der Ribonuclease und bei der *LDH* bereits nach etwa 2 h ein, bei der *GAPDH* nach etwa 3 h und nur beim Serumalbumin erst nach etwa 6,5 h. Als Durchschnittswert für die Dauer der Messung einer Röntgenkleinwinkelstreu- kurve unter den verwendeten experimentellen Bedingungen können etwa 6—7 h angenommen werden. Das heißt aber, daß während dieses Zeitraumes bei niedriger *DTT*-Konzentration (0 bzw. 0,2 *mM DTT*) bei drei der von uns untersuchten vier Proteine infolge Strahlenschädigung Strukturänderungen auftreten, welche die Toleranzgrenze bei weitem übersteigen. So nimmt der apparente Streumassenradius der Ribonuclease innerhalb von 6 h nach Strahlenbeginn um rund 9% zu, der der *LDH* um rund 7% und der der *GAPDH* um etwa 4%.

Daß bei den früheren Röntgenkleinwinkeluntersuchungen an der Ribonuclease<sup>11, 36, 37</sup> derart gravierende Veränderungen des Streuver-

haltens während der Messung offenbar nicht beobachtet wurden, könnte unter anderem darauf zurückzuführen sein, daß diese Messungen zumeist in Gegenwart höherer Salzkonzentrationen (z. B. 0,15 *M*-KCl oder 0,2 *M*-Na-Acetat) durchgeführt wurden als unsere jetzigen Messungen. Hohe Salzkonzentrationen können die strahleninduzierte Aggregation von Proteinen hemmen<sup>30</sup>.

Wie unsere Messungen an der *LDH* und *GAPDH* in Gegenwart von 2 *mM* *DTT* sowie die früheren gleichartigen Messungen an der Malatsynthese<sup>19, 21</sup> übereinstimmend gezeigt haben, kann durch eine hohe Konzentration von *DTT* der Zeitraum, innerhalb dessen keine nennenswerten Änderungen des apparenten Streumassenradius eintreten, beträchtlich verlängert werden (vgl. Tab. 1). Daß aber bei unseren jetzigen Messungen an der *LDH* und *GAPDH* gerade in Gegenwart von *DTT* zu Beginn der Bestrahlung eine deutliche Abnahme des Aggregationsgrades auf Werte unter 1 zu beobachten war, könnte bedeuten, daß *DTT* zwar ein wirksamer Schutzfaktor gegen die strahleninduzierte Aggregation von *LDH* oder *GAPDH* ist, gegen die strahleninduzierte Fragmentierung der beiden Enzyme aber weniger Wirksamkeit besitzt, oder daß die Gegenwart von *DTT* die Bildung von Proteinfragmenten sogar noch fördert.

Bei den früheren Röntgenkleinwinkelmessungen an der Malatsynthese ist eine Abnahme des Aggregationsgrades in Gegenwart von 2 *mM* *DTT* nicht beobachtet worden. Elektrophoretische Untersuchungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat an bestrahlter Malatsynthese haben gezeigt, daß die Anwesenheit von *DTT* während der Bestrahlung zu keiner signifikanten Intensitätsabnahme der Banden der Proteinfragmente führt, wohl aber zu einer leichten Zunahme der Zahl dieser Banden<sup>62</sup>. Ob dies auch für die *LDH* und *GAPDH* zutrifft, soll durch analoge Untersuchungen an diesen Enzymen geklärt werden.

Trotz der erneut bestätigten Schutzwirkung von *DTT* gegen die strahleninduzierte Aggregation von Proteinen erscheint die Verwendung von *DTT* als Schutzfaktor bei Röntgenkleinwinkelmessungen nach unseren vorliegenden Ergebnissen nur bedingt möglich zu sein. Man wird von Fall zu Fall klären müssen, ob außer der durch *DTT* hemmbaren Aggregation auch noch andere gravierende Schädigungen der Proteinteilchen auftreten. Insbesondere wird *DTT*, vor allem in hoher Konzentration, dann sicher nicht anwendbar sein, wenn auf Grund seines Reduktionsvermögens eine Spaltung von im Protein vorhandenen und dessen Struktur stabilisierenden Disulfidbrücken zu befürchten ist.

Mehrere Möglichkeiten, durch apparative Vorkehrungen ebenfalls einen Schutz von Biopolymeren vor Strahlenschäden während Röntgenkleinwinkelmessungen zu erreichen, wurden bereits an anderer

Stelle<sup>59</sup> diskutiert. Eine der vorgeschlagenen Möglichkeiten, die Verwendung einer Durchflußapparatur, hat sich bei der Untersuchung der nativen *GAPDH* bereits bestens bewährt<sup>5, 38</sup>. Ob man sich nun für diese Maßnahme entscheidet, welche immerhin den Präparatbedarf für eine Kleinwinkelmessung nicht unerheblich erhöht, oder für andere apparative Maßnahmen (wie etwa die Monochromatisierung der Primärstrahlung oder die Ausblendung der Primärstrahlung während aller Positionierungsoperationen des Goniometers), die Strahlenbelastung der Probe sollte auf jeden Fall auf das für die Durchführung des Streuexperimentes unbedingt notwendige Ausmaß reduziert werden. Die Befolgung dieser Schutzmaßnahmen würde noch genauere Röntgenkleinwinkelmessungen als bisher ermöglichen.

### Dank

Die Autoren danken der Österreichischen Akademie der Wissenschaften für die Bereitstellung eines Röntgenerators und der Registriereinrichtung. *H. D.* dankt Herrn Prof. *R. Jaenicke*, Regensburg, für das der Arbeit entgegengebrachte Interesse und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung.

### Literatur

- <sup>1</sup> *O. Kratky*, Progr. Biophys. Mol. Biol. **13**, 105 (1963).
- <sup>2</sup> *O. Kratky* und *I. Pilz*, Q. Rev. Biophys. **5**, 481 (1972).
- <sup>3</sup> *H. Pessen*, *T. F. Kumosinski* und *S. N. Timasheff*, in: Methods in Enzymology **27**, 151—209 (1973).
- <sup>4</sup> *I. Pilz*, *O. Glatter* und *O. Kratky*, in: Methods in Enzymology **61**, 148—249 (1979).
- <sup>5</sup> *H. Durchschlag*, *G. Puchwein*, *O. Kratky*, *I. Schuster* und *K. Kirschner*, Eur. J. Biochem. **19**, 9 (1971).
- <sup>6</sup> *I. Pilz*, *O. Glatter* und *O. Kratky*, Z. Naturforsch. **27 b**, 518 (1972).
- <sup>7</sup> *H. Sund*, *I. Pilz* und *M. Herbst*, Eur. J. Biochem. **7**, 517 (1969).
- <sup>8</sup> *G. Puchwein*, *O. Kratky*, *C. F. Gölker* und *E. Helmreich*, Biochemistry **9**, 4691 (1970).
- <sup>9</sup> *I. Pilz*, *M. Herbst*, *O. Kratky*, *D. Oesterhelt* und *F. Lynen*, Eur. J. Biochem. **13**, 55 (1970).
- <sup>10</sup> *H. Durchschlag*, Biophys. Struct. Mechanism **1**, 153 (1975).
- <sup>11</sup> *A. A. Timchenko*, *O. B. Ptitsyn*, *D. A. Dolgikh* und *B. A. Fedorov*, FEBS Lett. **88**, 105 (1978).
- <sup>12</sup> *H. Schüßler*, Biophysik **9**, 315 (1973).
- <sup>13</sup> *O. Yamamoto*, in: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 86 A (*M. Friedman*, Hrsg.): Protein Crosslinking. Biochemical and Molecular Aspects, S. 509—547. New York-London: Plenum Press. 1977.
- <sup>14</sup> *K. R. Lynn*, in: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 86 A (*M. Friedman*, Hrsg.): Protein Crosslinking. Biochemical and Molecular Aspects, S. 557—570. New York-London: Plenum Press. 1977.
- <sup>15</sup> *D. A. Armstrong* und *J. D. Buchanan*, Photochem. Photobiol. **28**, 743 (1978).
- <sup>16</sup> *P. Zipper* und *H. Durchschlag*, Acta Cryst. **A 31** (S), S. 59 (1975).

- 17 *P. Zipper* und *H. Durchschlag*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **358**, 329 (1977).
- 18 *P. Zipper* und *H. Durchschlag*, Biochem. Biophys. Res. Comm. **75**, 394 (1977).
- 19 *P. Zipper* und *H. Durchschlag*, Radiat. and Environm. Biophys., im Druck (1980).
- 20 *H. Durchschlag*, *F. Bogner*, *D. Wilhelm*, *R. Jaenicke*, *P. Zipper* und *F. Mayer*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **359**, 1077 (1978).
- 21 *P. Zipper* und *H. Durchschlag*, Mh. Chem., im Druck (1980).
- 22 *P. Zipper* und *H. Durchschlag*, Z. Naturforsch., eingereicht (1980).
- 23 *P. Zipper* und *H. Durchschlag*, Eur. J. Biochem. **87**, 85 (1978).
- 24 *R. Shapira*, Int. J. Radiat. Biol. **7**, 537 (1963).
- 25 *H. Jung* und *H. Schüßler*, Z. Naturforsch. **21 b**, 224 (1966).
- 26 *H. Schüßler* und *H. Jung*, Z. Naturforsch. **22 b**, 614 (1967).
- 27 *L. K. Mee*, *S. J. Adelstein* und *G. Stein*, Radiat. Res. **52**, 588 (1972).
- 28 *H. Delincée* und *B. J. Radola*, Int. J. Radiat. Biol. **28**, 565 (1975).
- 29 *J. A. Winstead* und *T. C. Reece*, Radiat. Res. **41**, 125 (1970).
- 30 *H. Schüßler* und *P. Denkl*, Int. J. Radiat. Biol. **21**, 435 (1972).
- 31 *H. Schüßler*, *P. Niemczyk*, *M. Eichhorn* und *H. Pauly*, Int. J. Radiat. Biol. **28**, 401 (1975).
- 32 *D. Rosen*, *S. Brohult* und *P. Alexander*, Arch. Biochem. Biophys. **70**, 266 (1957).
- 33 *D. Rosen* und *H. G. Boman*, Arch. Biochem. Biophys. **70**, 277 (1957).
- 34 *B. J. Radola*, Biochim. Biophys. Acta **160**, 469 (1968).
- 35 *M. Hay* und *K. Zakrzewski*, Radiat. Res. **34**, 396 (1968).
- 36 *D. L. Filmer* und *P. Kaesberg*, Brookhaven Symp. Biol. **15**, 210 (1962).
- 37 *J. W. Anderegg* und *R. W. Hendricks*, J. Appl. Cryst. **4**, 417 (1971).
- 38 *H. Durchschlag*, *G. Puchwein*, *O. Kratky*, *I. Schuster* und *K. Kirschner*, FEBS Lett. **4**, 75 (1969).
- 39 *I. Simon*, Eur. J. Biochem. **30**, 184 (1972).
- 40 *H. N. Ritland*, *P. Kaesberg* und *W. W. Beeman*, J. Chem. Phys. **18**, 1237 (1950).
- 41 *J. W. Anderegg*, *W. W. Beeman*, *S. Shulman* und *P. Kaesberg*, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 2927 (1955).
- 42 *M. Champagne*, *V. Luzzati* und *A. Nicolaieff*, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 1002 (1958).
- 43 *G. H. Echols* und *J. W. Anderegg*, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 5085 (1960).
- 44 *V. Luzzati*, *J. Witz* und *A. Nicolaieff*, J. Mol. Biol. **3**, 379 (1961).
- 45 *G. Damaschun*, *G. Kley*, *J. J. Müller* und *H. V. Pürschel*, Acta biol. med. germ. **20**, 409 (1968).
- 46 *P. Laggner*, *O. Kratky*, *W. H. Palm* und *A. Holasek*, Mh. Chem. **102**, 1729 (1971).
- 47 *F. M. Richards* und *H. W. Wyckoff*, in: The Enzymes, Vol. IV, 3. Aufl. (*P. D. Boyer*, Hrsg.), S. 647—806. New York-San Francisco-London: Academic Press. 1971.
- 48 *J. J. Holbrook*, *A. Liljas*, *S. J. Steindel* und *M. G. Rossmann*, in: The Enzymes, Vol. XI, 3. Aufl. (*P. D. Boyer*, Hrsg.), S. 191—292. New York-San Francisco-London: Academic Press. 1975.
- 49 *J. I. Harris* und *M. Waters*, in: The Enzymes, Vol. XIII, 3. Aufl. (*P. D. Boyer*, Hrsg.), S. 1—49. New York-San Francisco-London: Academic Press. 1976.

- <sup>50</sup> *T. Peters, jr.*, in: *The Plasma Proteins*, Vol. 1, 2. Aufl. (*F. W. Putnam*, Hrsg.), S. 133—181. New York-San Francisco-London: Academic Press. 1975.
- <sup>51</sup> *J. L. Redpath*, *Radiat. Res.* **55**, 109 (1973).
- <sup>52</sup> *M. Lal, W. S. Lin, G. M. Gaucher* und *D. A. Armstrong*, *Int. J. Radiat. Biol.* **28**, 549 (1975).
- <sup>53</sup> *W. S. Lin, D. A. Armstrong* und *M. Lal*, *Int. J. Radiat. Biol.* **33**, 231 (1978).
- <sup>54</sup> *H. G. Gatterer, P. Zipper* und *J. Schurz*, *Österr. Chemie Z.* **1979**, 214.
- <sup>55</sup> *K. Kirschner* und *B. Voigt*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**, 632 (1968).
- <sup>56</sup> *W. B. Stallcup, S. C. Mockrin* und *D. E. Koshland, jr.*, *J. Biol. Chem.* **24**, 6277 (1972).
- <sup>57</sup> *O. Kratky, I. Pilz* und *P. J. Schmitz*, *J. Colloid Interface Sci.* **21**, 24 (1966).
- <sup>58</sup> *H. G. Gatterer*, Dissertation, Universität Graz, 1979.
- <sup>59</sup> *P. Zipper* und *H. Durchschlag*, *Mh. Chem.*, im Druck (1980).
- <sup>60</sup> *H. Durchschlag* und *P. Zipper*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 239 (1980).
- <sup>61</sup> *H. Schüßler*, *Int. J. Radiat. Biol.* **23**, 175 (1973).
- <sup>62</sup> *H. Durchschlag* und *P. Zipper*, in Vorbereitung.