

# Strahleninduzierte Aggregatbildung von Proteinen: Bindung von Aminosäuren an Myoglobin

Radiation-Induced Aggregation of Proteins: Binding of Amino Acids to Myoglobin

Vera Jakubick und Henry Delincée

Institut für Biochemie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe

Z. Naturforsch. 33 c, 203–209 (1978) ; eingegangen am 23. September 1977/27. Januar 1978

Irradiation, Protein Aggregation, Myoglobin, Amino Acids, Specific Binding

When myoglobin is irradiated in the presence of amino acids, the most radiation-reactive species, like the aromatic and sulfur-containing amino acids, will bind preferentially to the protein. The radiation-induced binding is strongly dependent on the concentration of protein and amino acid. Subsequent to irradiation of myoglobin in the presence of radioactively labelled tryptophan followed by tryptic hydrolysis, only a single radioactive spot was detected on the fingerprint. The binding of amino acids is thus not randomly distributed over the protein molecule but occurs at specific reactive sites.

## Einleitung

Bei der Bestrahlung von Proteinen entsteht eine Population von mehr oder weniger geschädigten und von unveränderten Molekülen. Die Auftrennung und Charakterisierung der Bestrahlungsprodukte mit verschiedenen Methoden ist wichtig für ein Verständnis der Strahlendenaturierung von Proteinen. Besonders erfolgreich war die Anwendung der Gelfiltration, mit deren Hilfe strahleninduzierte Veränderungen der Molekülgröße festgestellt wurden. Die Untersuchungen ergaben, daß es bei der Bestrahlung globulärer Proteine und Enzyme zur Bildung höhermolekularer Produkte, sogenannter Aggregate, kommt [1–6]. Die strahleninduzierte Aggregatbildung kann zur Inaktivierung von bestrahlten Enzymen beitragen. Häufig wurden jedoch enzymatisch aktive Aggregate nachgewiesen [1, 2, 4–6]. Die spezifische Aktivität der Aggregate ist geringer als die des „nativen“ Proteins; mittels elektrophoretischer Methoden wurden die strahleninduzierten Veränderungen charakterisiert [4–6].

Welche Bindungen für die Aggregatbildung verantwortlich sind, ist noch weitgehend unklar [1–13]. Es kann zur Ausbildung von kovalenten Bindungen kommen, wenn zwei strahlengeschädigte Proteinmoleküle (Radikale) miteinander reagieren; außerdem kommen auch Bindungen nichtkovalenter Art infrage, also elektrostatische Wechselwirkungen, hydrophobe Bindungen und Wasserstoffbrücken. Die kovalenten Bindungen können wahrscheinlich

außer durch Verknüpfung von Aminosäureseitenketten auch durch Reaktion von radiolytisch erzeugten Peptidradikalen ( $C_\alpha$ -Radikalen) entstehen [3, 14]. Bei Proteinen, die SH-Gruppen enthalten, werden Aggregate anscheinend bevorzugt durch Disulfidbrücken gebildet. Bei der RNase werden 10–60% der Aggregate einer Disulfidbindung zugeschrieben [7], während beim Lysozym überwiegend Disulfidbrücken an der Aggregation beteiligt sind [12]. Daß kovalente Bindungen bei der Aggregatbildung eine Rolle spielen, wurde durch vergebliche Versuche, strahleninduzierte Aggregate mittels konzentrierter Harnstoff- oder Guanidiniumchloridlösungen oder Detergentien völlig zu spalten, angedeutet, z. B. bei RNase [11], Lysozym [11], Serumalbumin [8, 13], Meerrettich-Peroxidase [4]. Ein erheblicher Anteil nichtkovalenter Bindungen in den strahleninduzierten Aggregaten ist u. a. bei Chymotrypsin, Peroxidase, RNase und Myoglobin beobachtet worden [15, 16, 4–6]. Neben einer teilweisen Dissoziation der Aggregate wurde beim Chymotrypsin sogar eine Regenerierung der Enzymaktivität nach Behandlung mit 8M Harnstoff gefunden [15]. Schüssler *et al.* [17] berichten, daß die strahleninduzierten Aggregate der Lactat-Dehydrogenase durch Einwirkung von Natriumdodecylsulfat (SDS) praktisch vollständig zu Fragmenten kleiner als die monomere Einheit der Lactat-Dehydrogenase gespalten wurden. Bei der Radiolyse der Lactat-Dehydrogenase kommt es demnach in einem beträchtlichen Umfang zur Spaltung von Peptidbindungen. Die Spaltstücke werden durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zusammengehalten. Kovalente Bindungen spielen demgemäß bei der Aggregatbildung der Lactat-Dehy-

Sonderdruckanforderungen an H. Delincée, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Engesserstr. 20, D-7500 Karlsruhe 1.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

drogenase kaum eine Rolle. In neueren Versuchen wurden bestrahlte Proteinlösungen mittels der SDS-Elektrophorese in Polyacrylamidgelen und der Gel-filtration in Gegenwart von 0,1% SDS aufgetrennt [18]. Diese Versuche haben gezeigt, daß beim Serumalbumin, Ovalbumin und Myoglobin die strahleninduzierten Aggregate keinesfalls alle durch SDS-Einwirkung gespalten werden, sondern daß ein Großteil der Aggregate bestehen bleibt, wahrscheinlich durch kovalente Bindungen. Auch Lyc-metros und Brown [19] gelang es nicht, die strahleninduzierten Aggregate von Myoglobin durch SDS-Einwirkung zu dissoziieren.

In einigen Veröffentlichungen haben Yamamoto [20–26] und Friedberg [27] die Bindungsverhältnisse von zusammen mit Proteinen bestrahlten Aminosäuren untersucht und die Ergebnisse mit der strahleninduzierten Aggregation korreliert. Unsere Untersuchungen sollten helfen, die Frage zu beantworten, ob es bei der Aggregation spezifische Bindungsstellen gibt, oder ob die Verteilung der Bindungsstellen im Proteinmolekül zufällig ist. Als Modellprotein haben wir Walfisch-Myoglobin eingesetzt, dessen Struktur gut bekannt ist [28]. Über das Verhalten von Myoglobinen bei der Bestrahlung liegen einige Arbeiten vor [16, 19, 29, 30]. Durch Bestrahlung von Walfisch-Myoglobin in Gegenwart von radioaktiv markierten Aminosäuren sollten die Bindungsstellen für die Aggregatbildung untersucht werden. Messungen in Abhängigkeit von der Dosis und Konzentrationen sollten dazu beitragen, einen besseren Überblick über die quantitativen Veränderungen bei der Bestrahlung zu gewinnen.

## 1. Material und Methoden

### 1.1. Chemikalien

$^{14}\text{C}$ -markierte Aminosäuren (in Klammern ist die spezifische Radioaktivität angegeben): L-[ $^{14}\text{C}$ ]Ala (135 mCi/mmol), L-[ $^{14}\text{C}$ ]Arg·HCl (270 mCi/mmol), L-[ $^{14}\text{C}$ ]Glu (125 mCi/mmol), L-[ $^{14}\text{C}$ ]His (275 mCi/mmol), L-[ $^{14}\text{C}$ ]Leu (348 mCi/mmol), L-[ $^{14}\text{C}$ ]Lys·HCl (348 mCi/mmol), L-[ $^{14}\text{C}$ ]Met (60 mCi/mmol), L-[Methyl- $^{14}\text{C}$ ]Met (50 mCi/mmol), L-[ $^{35}\text{S}$ ]Met (100 mCi/mmol), L-[ $^{14}\text{C}$ ]Phe (225 mCi/mmol), L-[ $^{14}\text{C}$ ]Ser (150 mCi/mmol), L-[Methylen- $^{14}\text{C}$ ]Trp (45 mCi/mmol), L-[ $^{14}\text{C}$ ]Tyr (483 mCi/mmol) bezogen wir von Amersham-Buchler (Wenden/Braunschweig, BRD). Die Aminosäurelösungen, die zur Verminderung

der Selbstzersetzung 2% Äthanol enthielten, wurden zur Trockene eingeeengt, um das Äthanol zu entfernen. Nicht markierte Aminosäuren (p.a.) und Myoglobin vom Wal (reinst) waren Produkte von Serva (Heidelberg, BRD). Alle anderen Chemikalien waren analytisch rein. Zur Herstellung der Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

### 1.2. Bestrahlung

Je 0,5 ml der Myoglobin-Lösung im 0,001 M Phosphatbuffer pH 7,0, die jeweils eine der Aminosäuren enthielt (Tracermenge: 0,5–5  $\mu\text{Ci}$ ), wurde in Luft-Atmosphäre in einer Pyrex-Glasampulle (5 ml) eingeschmolzen und in einer  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Quelle (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada, Ltd.) bei 0 °C bestrahlt.

### 1.3. Bindungsmessung

Nach Bestrahlung wurden 0,5 ml 20-prozentige Trichloressigsäure der Probelösung zugesetzt, und die Probe wurde 15 min im Eisbad gekühlt. Das Präzipitat wurde mit Hilfe eines Selectron-Glasfiltrationsgeräts für Unterdruck mit Glasfritte (Selectron, Schleicher & Schüll, Dassel, BRD) und einem Selectron-Celluloseacetatfilter ( $\phi$  20 mm, Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ) filtriert und mit 10 ml 5-prozentiger kalter Trichloressigsäure nachgespült. Erhöhte Spülvolumina (bis 20 ml) ergaben die gleichen Ergebnisse. Das Protein wurde durch Schütteln auf einer Schüttelmaschine (Modell G-33-A, New Brunswick Scientific Co., N.J., USA) mit 1,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  von dem Filter getrennt. Die Radioaktivität im präzipitierten Protein wurde in einem Flüssigkeitszintillationszählgerät (Modell CPM 2007, Beckman, USA) gemessen.

### 1.4. Trypsinolyse und Fingerprint

Eine 0,5 ml Probe von 0,1-prozentigem Myoglobin und  $5 \times 10^{-4}$  M-L-Tryptophan wurde mit 1 Mrad bestrahlt und entsprechend den Proben zur Bindungsmessung behandelt. Das vom Filter abgetrennte Protein wurde im Exsikkator über KOH getrocknet. Die Probe wurde in 100  $\mu\text{l}$  0,1%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Pufferlösung pH 9,0 gelöst, nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  0,1% Trypsin im gleichen Puffer 16 h bei 37 °C inkubiert, anschließen im Exsikkator über KOH getrocknet und in 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Zur Elektrophorese (DE-Doppelkammer 12 20 00, Desaga, Heidelberg, BRD) wurden 5  $\mu\text{l}$  auf eine Cellulose-Dünnschichtplatte (0,1 mm Schichtdicke,

Merck, Darmstadt, BRD) aufgetragen und im System Pyridin : Eisessig : H<sub>2</sub>O (10 : 1 : 89) bei 1000 V und 25 mA 50 min getrennt. In der zweiten Richtung wurde im System Methanol : Pyridin : Eisessig : H<sub>2</sub>O (80 : 4 : 1 : 20) 3 h chromatographiert. Der Fingerprint wurde durch Ansprühen mit Ninhydrin erhalten. Die Verteilung der Radioaktivität wurde mit dem Riodünnschichtscanner (Berthold LB 2722, Wildbad, BRD) und mit der Isotopen-Kamera (Birchover, Instr. Ltd., Zinsser, Frankfurt/M., BRD) untersucht.

2. Ergebnisse

Bei der Bestrahlung einer 0,1-prozentigen Walfisch-Myoglobulinlösung ( $6 \times 10^{-5}$  M) in Gegenwart von verschiedenen radioaktiv markierten Aminosäuren ( $5 \times 10^{-4}$  M) läßt sich eine von der Art der Aminosäure abhängige Bindung an das Protein beobachten. Bei Tryptophan, Methionin, Histidin, Phenylalanin, Tyrosin und Leucin wurde eine bedeutend höhere Bindung an das Myoglobin gemessen als bei Lysin und Arginin; bei Serin, Alanin und Glutaminsäure wurde nur eine geringe Bindung festgestellt (Abb. 1). Da im Walfisch-Myoglobin weder Cystein noch Cystin auftreten [28], wurde die Bindung dieser Aminosäuren nicht untersucht. Die relativ hohe Bindung von Methionin ( $\sim 1,0$  mol Methionin/mol Myoglobin bei 1 Mrad) wurde nur beim [Methyl-<sup>14</sup>C]Methionin und [<sup>35</sup>S]Methionin beobachtet, während das [1-<sup>14</sup>C]Methionin eine sehr sehr geringe Bindung aufwies.

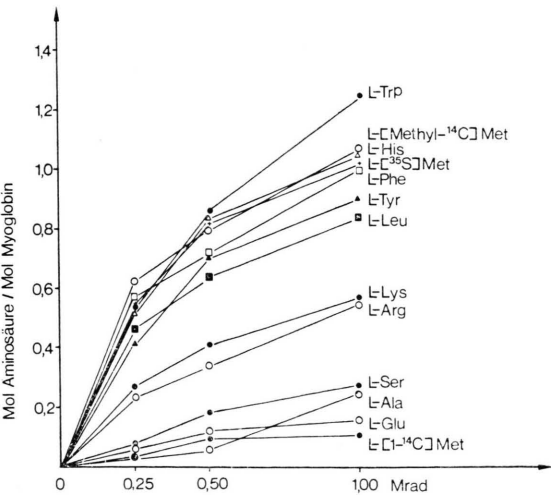


Abb. 1. Strahleninduzierte Bindung von Aminosäuren ( $5 \times 10^{-4}$  M) an Myoglobin ( $0,1\% = 6 \times 10^{-5}$  M) mit steigender Strahlendosis.

Um zu prüfen, ob die strahleninduzierte Bindung der Aminosäuren an das Myoglobin auch im höheren Dosisbereich mit der Strahlendosis weiter zunimmt, wurde die Bindung einiger Aminosäuren bei Strahlendosen bis zu 5 Mrad gemessen (Tab. I).

Aminosäure	mol Aminosäure/ mol Myoglobin
L-Glu	0,750
L-Ala	0,600
L-Ser	0,449
L-Arg	1,400
L-Lys	1,375
L-Leu	1,620
L-Tyr	1,235
L-Phe	1,550
L-His	1,160
L-Trp	1,323

Tab. I.  
Strahleninduzierte Bindung von Aminosäuren ( $5 \times 10^{-4}$  M) an das Myoglobin ( $0,1\%$ ). Strahlendosis: 5 Mrad.

Bei Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin und Histidin war die Erhöhung der Bindung bei Strahlendosen über 1 Mrad nur unbedeutend, während bei Leucin, Lysin und Arginin eine deutliche Zunahme der Bindung bei höheren Dosen zu beobachten war. Auch bei Serin, Alanin und Glutaminsäure war eine wesentliche Bindungszunahme zu verzeichnen. Bei den höheren Strahlendosen war eine Trübung der Proteinslösung zu beobachten, die die Bindungsmessung erschwerte. In einigen Versuchen wurde das in den käuflichen radioaktiven Aminosäuren vorhandene Äthanol nicht entfernt, damit es als „radical scavenger“ der OH<sup>•</sup> Radikale dienen könnte. Schon bei einer Äthanolkonzentration von 0,004% nahm die Bindung bedeutend ab, z. B. wurde für Tryptophan bei 1 Mrad ein Wert von 0,35 mol/Mol Myoglobin gemessen.

Bei einer konstanten Strahlendosis von 1 Mrad wurde sowohl die Protein- als auch die Aminosäurekonzentration variiert. Die Bindung des Tryptophans wurde mit steigender Proteinkonzentration kleiner: bei 5% Myoglobin konnte praktisch keine strahleninduzierte Bindung festgestellt werden,

Tab. II. Strahleninduzierte Bindung von Tryptophan an Myoglobin (mol/mol) bei verschiedenen Tryptophan- und Myoglobinkonzentrationen. Strahlendosis: 1 Mrad.

Myo- globin [%]	L-Tryptophan [M]					
	$5 \times 10^{-4}$	$10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-2}$
0,1	1,20	1,45	1,70	1,70	1,97	—
1	—	0,33	0,21	0,19	0,22	—
5	—	—	—	0,02	0	0

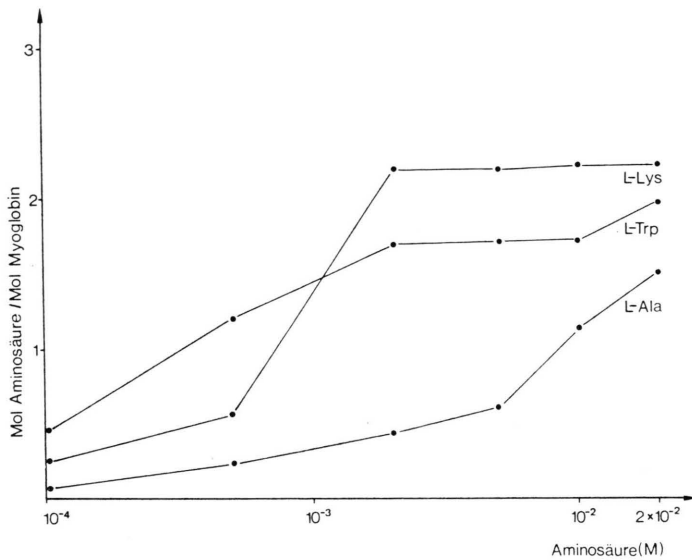


Abb. 2. Strahleninduzierte Bindung von Tryptophan, Lysin und Alanin an Myoglobin (0,1%) mit steigender Aminosäurekonzentration. Strahlendosis 1 Mrad.

auch nicht bei erhöhter Tryptophankonzentration (Tab. II). Die Zunahme der Bindung mit steigender Aminosäurekonzentration beim konstanten Proteingehalt (0,1% Myoglobin) ist in Abb. 2 dargestellt. (Bei den unbestrahlten Vergleichsproben wurde mit steigender Tryptophankonzentration eine wesentlich erhöhte Bindung an das Myoglobin festgestellt, eine spontane Bindung von Tryptophan an verschiedene Proteine ist bekannt [26, 31].)

Der Frage, ob die strahleninduzierte Bindung an eine spezifische Stelle des Myoglobin-Moleküls erfolgt, dienten die weiteren Versuche. Es wurde nur Tryptophan eingesetzt, da diese Aminosäure bis zu 1 Mrad die höchste Bindung aufwies. Das in Gegenwart von Tryptophan bestrahlte Myoglobin wurde tryptisch hydrolysiert und mit Hilfe der Fingerprinttechnik aufgetrennt. Der Fingerprint des Hydrolysats war gut reproduzierbar und es konnten etwa 14 mit Ninhydrin anfärbbare Peptidflecken beobachtet werden (Abb. 3). Der Fingerprint des mit 1 Mrad bestrahlten Myoglobins unterschied sich geringfügig von dem unbestrahlten. Unter unseren Bestrahlungsbedingungen blieb demnach die Primärstruktur des Myoglobins noch recht gut erhalten. Nur an einer Stelle der Platte wurde  $^{14}\text{C}$ -Aktivität gemessen (schraffierter Fleck in Abb. 3), die bei wiederholten Bestrahlungsversuchen immer in der gleichen Position nachgewiesen wurde. Kontrollversuche ergaben, daß freies Tryptophan und seine Radiolyseprodukte nach der zweidimensionalen Auftrennung an einer anderen Stelle der Platte lokalisiert waren.

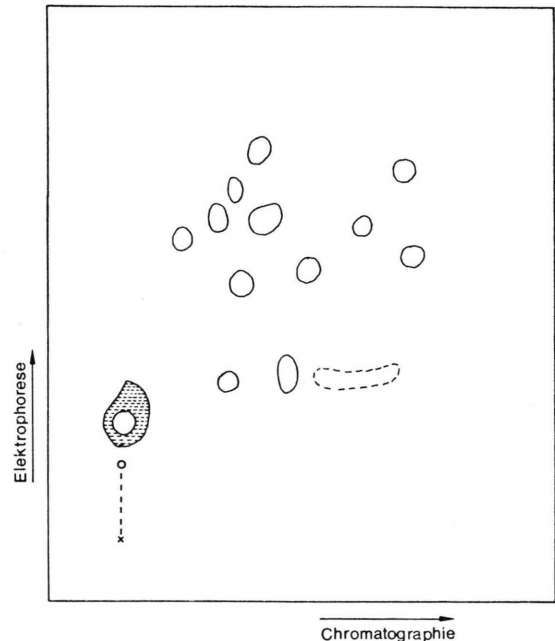


Abb. 3. Strahleninduzierte Bindung von radioaktiv markiertem Tryptophan an Myoglobin. Fingerprint des tryptischen Hydrolysats von Myoglobin (0,1%) bestrahlt in Gegenwart von Tryptophan ( $5 \times 10^{-4}$  M). Strahlendosis 1 Mrad. Radioaktivität (schraffierter Fleck) wurde mit Hilfe einer Isotopenkamera nachgewiesen. — X — Startpunkt, O — durch Endomose transferierter Startpunkt (mit Glukose markiert).

### Diskussion

Werden Proteinlösungen in Gegenwart radioaktiv markierter Aminosäuren bestrahlt, so läßt sich eine von der Art der Aminosäure abhängige Bin-

dung der Aminosäure an das Protein beobachten (Abb. 1). Eine bevorzugte Bindung von schwefelhaltigen und aromatischen Aminosäuren an Rinder-serumalbumin wurde von Yamamoto gemessen [20–25]; er fand auch, daß diese Aminosäuren untereinander eine strahleninduzierte Bindung eingehen können. So verbinden sich z. B. Cystein, Cystin oder Methionin mit Tryptophan oder Phenylalanin [21, 22], und Tryptophan, Phenylalanin, Histidin binden sich gegenseitig [23]. Wenn stat Serumalbumin Polyglutaminsäure in Gegenwart von Aminosäuren bestrahlt wurde, fand keine Bindung der Aminosäuren an die Polyglutaminsäure statt [23]. Yamamoto nimmt daher an, daß nur spezifische freie Aminosäuren oder spezifische Aminosäuren im Proteinmolekül an der strahleninduzierten Bindung teilnehmen [20, 23, 25]. In einem Versuch, die Bedeutung der Kohlenstoff- und Schwefel-Bindungen bei der strahleninduzierten Aggregatbildung von Proteinen aufzuklären, fand Friedberg [27] eine 5-fach höhere Bindung von Cystin als von Asparaginsäure an die Ribonuclease, wenn die RNase im Trockenen in Gegenwart dieser Aminosäuren bestrahlt wurde. Da der Anteil nicht-schwefelhaltiger Aminosäuren in einem Protein immer relativ groß ist, mißt Friedberg den intermolekularen Kohlenstoffbindungen die größte Bedeutung zu.

Unsere Ergebnisse über die Bindung von Aminosäuren an einem schwach basischen Protein wie Wal-fisch-Myoglobin deuten ebenfalls auf eine erhöhte Beteiligung der schwefelhaltigen und aromatischen Aminosäuren an der strahleninduzierten Bindung im Bereich bis zu 1 Mrad hin (Abb. 1). Bei höheren Dosen schien die Bindung dieser Aminosäuren einen Grenzwert zu erreichen, während die Bindung der übrigen Aminosäuren weiter zunahm (Tab. I). Da die schwefelhaltigen und aromatischen Aminosäuren die größten Geschwindigkeitskonstanten mit den primären Wasserradikalen aufweisen [32–35] und in den bisherigen Untersuchungen die Aminosäuren immer bei gleicher molarer Konzentration verglichen wurden (Abb. 1, ref. [21–27]), ist es nicht verwunderlich, daß bei diesen reaktiven Aminosäuren die größte Bindung festgestellt wurde. Wenn jedoch die Aminosäurekonzentration der weniger reaktiven Aminosäuren, wie Lysin oder Alanin, erhöht wurde, so daß in etwa gleiche Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht werden, ließ sich eine vergleichbare Bindung dieser wenig

reaktiven Aminosäuren an das Protein feststellen (Abb. 2).

Für eine strahleninduzierte Aggregatbildung von Proteinen kommen wahrscheinlich nur die aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren in Frage, da deren Reaktivität im Vergleich zu den anderen Aminosäuren sehr viel größer ist. In einer Reihe von Arbeiten über die Zerstörung von Aminosäuren in Proteinen nach Bestrahlung waren es vor allem die aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren, die abnahmen [2, 9, 10, 36–42]. Pulsradio-lytische Studien an RNase [14, 43, 44] haben gezeigt, daß Energieübertragungsprozesse entlang der Aminosäurekette eine große Rolle spielen, und daß die aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren bevorzugt bei der intramolekularen Energieleitung als Radikalstellen auftreten. Mee, Adelstein und Stein [2] fanden in den aggregierten Fraktionen der bestrahlten RNase selektive Zerstörung von Cystein, Methionin, Tyrosin und Phenylalanin, jedoch im monomeren Enzym keine signifikanten Veränderungen. Dagegen fanden Jung und Schüssler [9, 10] auch im monomeren Enzym die Zerstörung der gleichen Aminosäuren wie in den Aggregaten der RNase, nämlich Cystein, Methionin, Tyrosin und Phenylalanin und zusätzlich Histidin und Lysin. Diese ausführlichen Studien befaßten sich mit der RNase, einem Enzym, das kein Tryptophan enthält. Bei tryptophanhaltigen Enzymen ist häufig eine bevorzugte Schädigung dieser aromatischen Aminosäure beschrieben worden, so bei Lysozym [45–47],  $\alpha$ -Chymotrypsin [48, 49], Trypsin [48, 50], Carboxypeptidase [51] etc. Als erstes Experiment zur Prüfung der Spezifität der Bindung haben wir Tryptophan eingesetzt, einerseits wegen der oben erwähnten Reaktivität, und andererseits, weil Tryptophan in unseren Versuchen bis zu 1 Mrad die höchste Bindung aufwies.

Unser Ergebnis, daß Tryptophan nur an einem Peptid des Myoglobinmoleküls gebunden wird (Abb. 3), deutet darauf hin, daß die Bindungsreaktion nicht mit zufällig durch die Bestrahlung aktivierten Aminosäuren im Molekül stattfindet, sondern daß spezifische Stellen für die Aggregatbildung zuständig sind. Zugleich bedeutet es, daß wahrscheinlich Aminosäureseitenketten-Radikale für die strahleninduzierte Bindung verantwortlich sind. Wenn es Peptidradikale ( $C_\alpha$ -Radikale) wären, müßte man einer Verteilung des Tryptophans an mehreren Stellen des Proteinmoleküls erwarten.

Reaktive Radikalstellen befinden sich wahrscheinlich an den aromatischen Ringsystemen. Yamamoto fand bei der Chromatographie von bestrahlten aromatischen Aminosäuren, daß hauptsächlich der aromatische Ring modifiziert wurde [23, 25]. Es wurden Dimere, wahrscheinlich durch Ringverknüpfungen, gebildet [23]. Methionin und Cystein reagieren ebenfalls mit dem Ringsystem der aromatischen Aminosäuren [22]. Versuche mit an verschiedenen Stellen markierten Aminosäuren könnten hier zur Aufklärung beitragen. Unsere Ergebnisse mit Methionin zeigten, daß eine Spaltung des Methionins eintritt und nur ein Teil des Methionin-Moleküls am Protein gebunden wird. Sequenzanalyse des entsprechenden radioaktiven Peptids von Myoglobin, wenn dieses in Gegenwart von radioaktiven Aminosäuren bestrahlt wurde, könnte Auskunft über die Größe des markierten Peptids geben und zugleich klären, an welche Stellen des Myoglobins und in welcher Art die freien Aminosäuren, z. B. das Tryptophan, gebunden werden.

Unsere Vorstellungen über die kovalente strahleninduzierte Aggregatbildung gehen jetzt davon aus, daß spezifische Aminosäuren im Proteinverband durch die Bestrahlung aktiviert werden, miteinander reagieren und inter- oder intramolekulare Vernetzungsverbindungen eingehen. Bevorzugt aktiviert werden die aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren. Diese Selektivität ist zum großen Teil intramolekularer Energieleitung oder Umlagerungen im Proteinmolekül zuzuschreiben. Erst nach entsprechender Aktivierung kann eine Aggregat-

bildung einsetzen. Die Beobachtung, daß hauptsächlich OH<sup>•</sup> Radikale für die Aggregatbildung verantwortlich sind [2, 41, 52], korreliert gut mit der Abnahme der Bindung in unseren Versuchen mit Zusatz von Äthanol, und mit der Erhöhung der Bindung der aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren – mit Ausnahme von Cystein – an Serumalbumin in N<sub>2</sub>O-Atmosphäre [22, 23, 25]. Die Tatsache, daß bei konstanter Strahlendosis eine Erhöhung der Proteinkonzentration eine Abnahme der gebundenen freien Aminosäuren zur Folge hat (Tab. II), deutet darauf hin, daß eine gewisse primäre Schädigung der monomeren Proteinmoleküle vorliegen muß, bevor eine Bindung mit einer Aminosäure zustande kommt, oder eine Aggregation stattfindet. Die Beobachtung, daß bei gleicher Dosis durch Erhöhung der Proteinkonzentration die Aggregatbildung abnimmt, so bei Meerrettich-Peroxidase [4, 5], RNase [6], Myoglobin, Ovalbumin und Rinderserumalbumin [18] unterstützt diese Annahme. Die Befunde von Jung und Schüssler [9, 10] über die Zerstörung der gleichen Aminosäuren in den Aggregaten wie in den Monomeren stimmen ebenfalls mit unseren Vorstellungen überein. Weitere Versuche über die Spezifität der Bindung, wenn Myoglobin in Gegenwart von anderen Aminosäuren als Tryptophan bestrahlt wird, und Fingerprints von strahleninduzierten Myoglobin-Aggregaten sollen dazu beitragen, die für die Aggregatbildung verantwortlichen Bindungen aufzuklären.

Frau E. Haller danken wir für geschickte Assistenz.

- [1] H. Dertinger u. H. Jung, „Molekulare Strahlenbiologie“, Springer, Berlin 1969.
- [2] L. K. Mee, S. J. Adelstein u. G. Stein, *Radiat. Res.* **52**, 588–602 (1972).
- [3] H. Schüssler, *Biophysik* **9**, 315–324 (1973).
- [4] H. Delincée u. B. J. Radola, *Radiat. Res.* **58**, 9–24 (1974).
- [5] H. Delincée u. B. J. Radola, *Radiat. Res.* **59**, 572–584 (1974).
- [6] H. Delincée u. B. J. Radola, *Int. J. Radiat. Biol.* **28**, 565–579 (1975).
- [7] J. S. Haskill u. J. W. Hunt, *Radiat. Res.* **32**, 827–848 (1967).
- [8] P. Alexander, L. D. G. Hamilton u. K. A. Stacey, *Radiat. Res.* **12**, 510–525 (1960).
- [9] H. Schüssler u. H. Jung, *Z. Naturforsch.* **22b**, 614–621 (1967).
- [10] H. Jung u. H. Schüssler, *Z. Naturforsch.* **23b**, 934–943 (1968).
- [11] F. Friedberg, *Radiat. Res.* **38**, 34–42 (1969).
- [12] D. J. Marciani u. B. M. Tolbert, *Biochim. Biophys. Acta* **271**, 262–273 (1972).
- [13] K. Zakrzewski, M. Kloczewiak u. M. Hay, *Radiat. Res.* **53**, 124–133 (1973).
- [14] N. N. Lichtin, J. Ogden u. G. Stein, *Biochim. Biophys. Acta* **276**, 124–142 (1972).
- [15] V. Kasche, Dissertation, Acta Universitas, Upsaliensis 2 (1971), p. 94.
- [16] B. J. Radola, *Proceedings of the Intern. Colloq. on Identification of Irradiated Foodstuffs*, 24–25 Oct. 1973, Karlsruhe (Luxembourg: Commission of the European Communities, EUR 5126) 27–44 (1974).
- [17] H. Schüssler, P. Niemczyk, M. Eichhorn u. H. Pauly, *Int. J. Radiat. Biol.* **28**, 401–408 (1975).
- [18] H. Delincée u. V. Jakubick, *Int. J. Appl. Radiat. Isotop.* **28**, 939–945 (1977).
- [19] C. Lycometros u. W. D. Brown, *J. Food Sci.* **38**, 971–977 (1973).
- [20] O. Yamamoto, *Int. J. Radiat. Biol.* **12**, 467–476 (1967).
- [21] O. Yamamoto, *Int. J. Radiat. Phys. Chem.* **4**, 227–236 (1972).
- [22] O. Yamamoto, *Int. J. Radiat. Phys. Chem.* **4**, 335–345 (1972).

- [23] O. Yamamoto, *Radiat. Res.* **54**, 398–410 (1973).
- [24] O. Yamamoto, *Int. J. Radiat. Phys. Chem.* **5**, 213–229 (1973).
- [25] O. Yamamoto u. A. Okuda, *Radiat. Res.* **61**, 251–260 (1975).
- [26] O. Yamamoto, *Radiat. Res.* **61**, 261–273 (1975).
- [27] F. Friedberg, *Z. Naturforsch.* **27b**, 85 (1972).
- [28] A. B. Edmundson, *Nature* **205**, 883–887 (1965).
- [29] L. D. Satterlee, W. D. Brown u. C. Lycometros, *J. Food Sci.* **37**, 213–217 (1972).
- [30] P. Paul u. U. S. Kumta, *Radiat. Res.* **56**, 238–245 (1973).
- [31] F. Fadda, G. Bibbio u. G. Liguori, *Experientia* **30**, 635–637 (1974).
- [32] M. Anbar u. P. Neta, *Int. J. Appl. Radiat. Isotop.* **18**, 493–523 (1967).
- [33] P. Neta u. R. H. Schuler, *Radiat. Res.* **47**, 612–627 (1971).
- [34] G. E. Adams, in: *Advances in Radiation Chemistry* (M. Burton u. J. L. Magee, Eds.), Bd. 3, 125–208. Wiley-Interscience, New York 1972.
- [35] L. M. Dorfman u. G. E. Adams, *Nat. Stand. Ref. Data Ser. Nat. Bur. Stand. (U.S.)* **46**, 47–49 (1973).
- [36] F. Shimazu u. A. L. Tappel, *Radiat. Res.* **23**, 203–209 (1964).
- [37] M. Burke u. L. Augenstein, *Biochem. J.* **114**, 535–545 (1969).
- [38] K. Ohtsuki, M. Fukuhara, K. Sumizu u. H. Hatano, *J. Radiat. Res.* **11**, 113–119 (1970).
- [39] C. Colson u. E. Fredericq, *Bull. Cl. Sci., Acad. Roy. Belg.* **56**, 960–982 (1970).
- [40] K. Dose u. M. C. Brand, *Biophysik* **7**, 146–151 (1971).
- [41] L. K. Mee u. S. J. Adelstein, *Radiat. Res.* **60**, 422–431 (1974).
- [42] K. R. Lynn u. W. J. Skinner, *Radiat. Res.* **57**, 358–363 (1974).
- [43] N. N. Lichtin, J. Ogden u. G. Stein, *Biochim. Biophys. Acta* **263**, 14–30 (1972).
- [44] N. N. Lichtin, J. Ogden u. G. Stein, *Radiat. Res.* **55**, 69–80 (1973).
- [45] G. E. Adams, R. L. Willson, J. E. Aldrich u. R. B. Cundall, *Int. J. Radiat. Biol.* **16**, 333–342 (1969).
- [46] J. E. Aldrich u. R. B. Cundall, *Int. J. Radiat. Biol.* **16**, 343–358 (1969).
- [47] D. J. Marciani u. B. M. Tolbert, *Biochim. Biophys. Acta* **351**, 387–395 (1974).
- [48] K. R. Lynn, *Radiat. Res.* **51**, 254–264 (1972).
- [49] K. R. Lynn, *Int. J. Radiat. Biol.* **23**, 227–233 (1973).
- [50] T. Masuda, J. Ovidia u. L. I. Grossweiner, *Int. J. Radiat. Biol.* **20**, 447–459 (1971).
- [51] P. B. Roberts, *Int. J. Radiat. Biol.* **24**, 143–152 (1973).
- [52] H. Delincée u. B. J. Radola, *Radiat. and Environm. Biophys.* **11**, 213–218 (1975).