Über die Rezeptorsubstanz für den Phagen T5 V.* Das rezeptoraktive Areal

VON WOLFHARD WEIDEL und JÜRGEN HOMANN

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. WEIDEL, Tübingen

(Z. Naturforsch. 15 b, 34—37 [1960]; eingegangen am 24. November 1959)

Highly purified T5-receptor substance was irradiated with X-rays, and a one-hit dose response was obtained. By comparing quantitatively the results of two independent tests, both of which measure "survival" of receptor after irradiation, it was possible to conclude that the receptor-active site of one receptor particle must be larger than the cross-section of a T5-phage tail. However, since receptor particles were never definitely observed to have combined with more than one T5-particle, secondary processes must be involved in the binding reaction, leading to a rapid inactivation of any surplus receptor-active areas on the receptor particle undergoing the reaction.

Bringt man T5-Rezeptorteilchen mit T5-Phagen zusammen, dann stellt man sowohl im Abzähltest¹ als auch durch direkte Beobachtung mit dem Elektronenmikroskop² fest, daß jedes Rezeptorteilchen nur *ein* Phagenteilchen bindet, obwohl auf seiner Oberfläche eine größere Anzahl durchaus Platz hätte. Zur Erklärung dieses merkwürdigen Umstandes bieten sich zwei Hypothesen ohne weiteres an:

1. Jedes Rezeptorteilchen hat auf seiner Oberfläche *nur ein* rezeptoraktives Areal, etwa vom Durchmesser eines T5-„Schwanzes“. Der Rest der Teilchenoberfläche hat eine andere molekulare Konfiguration und ist daher von vornherein inaktiv.

2. Jedes Rezeptorteilchen trägt *mehrere* rezeptoraktive Oberflächenareale, doch werden sie sämtlich sehr rasch durch irgendeinen Sekundärprozeß inaktiviert, sobald eines von ihnen die spezifische Bindungsreaktion mit der Schwanzspitze eines T5-Teilchens eingeht.

Studien über Bestrahlungs-Inaktivierung der Rezeptorteilchen sollten es ermöglichen, zwischen beiden Hypothesen zu unterscheiden, wenn man folgende Überlegungen zugrunde legt: Für die quantitative Messung von Rezeptormengen stehen zwei gegenseitig unabhängige experimentelle Methoden zur Verfügung. Die eine Methode¹ arbeitet mit Rezeptorüberschuß, und es wird der Bruchteil zugesetzter T5-Teilchen bestimmt, der nach einer gewissen Zeit mit Rezeptor reagiert hat, d. h. inaktiviert wurde. Es sind also die Bedingungen einer pseudo-monomolekularen Reaktion gegeben. Der Logarithmus des Bruchteils inaktivierter Phagenteilchen ist pro-

portional zur Gesamtzahl aller reaktionsfähigen Rezeptorareale im Reaktionsvolumen, unabhängig von ihrer räumlichen Verteilung. So kann daher ihre Konzentration gemessen werden. Wir nennen diese Anordnung den *kinetischen Test*. Die zweite Methode¹ kehrt diese Anordnung um, indem bei Phagenüberschuß gearbeitet wird. Ein zugesetztes Quantum Rezeptorsubstanz inaktiviert dann eine gewisse Anzahl von Phagenteilchen, und die Reaktion kommt zum Stillstand, wenn das letzte Rezeptorteilchen reagiert hat. Weil aber jedes Rezeptorteilchen nur *ein* Phagenteilchen verbraucht, muß die (absolute) Zahl inaktivierter Phagenteilchen gleich sein der Anzahl von Rezeptorteilchen im zugesetzten Quantum Rezeptorsubstanz. Bestimmt man dieses Quantum zuvor im kinetischen Test (ausgedrückt in willkürlich festgelegten „Einheiten“ E), dann ergibt die zweite Methode, von uns *Abzähltest* genannt, unmittelbar die Anzahl von Rezeptorteilchen/E.

Wenn man nun mit Hilfe von energiereicher Strahlung und möglichst unter Ausschaltung indirekter Strahlenwirkungen durch diffusible Agentien versucht, einzelne Rezeptor-Areale zu treffen und funktionsunfähig zu machen, dann würde man bei Gültigkeit der Hypothese Nr. 1 mit jedem Treffer zugleich ein ganzes Rezeptor-Teilchen ausschalten, d. h. man müßte beim Vergleich der Ergebnisse von kinetischem Test und Abzähltest finden, daß eine Rezeptormenge, die durch Bestrahlung z. B. 50% ihrer Aktivität, gemessen als E, verloren hat, auch im Abzähltest nur noch halb soviel Rezeptorteilchen ergibt wie vor der Bestrahlung.

* IV. Mitt.: G. KOCH u. W. WEIDEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 303, 213 [1956].

¹ W. WEIDEL, G. KOCH u. K. BOBOSCH, Z. Naturforsch. 9 b, 573 [1954].

² W. WEIDEL u. E. KELLENBERGER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 17, 1 [1955].

Ist dagegen Hypothese Nr. 2 richtig, dann würde dieselbe bestrahlte Rezeptormenge, trotz Verlustes von 50% ihrer in E gemessenen Aktivität, im Abzähltest noch immer annähernd die vor der Bestrahlung zählbar gewesene Anzahl von Rezeptorteilchen ergeben. Im Abzähltest würden ja jetzt nur diejenigen Rezeptorteilchen endgültig ausfallen, auf deren Oberfläche *sämtliche*, als in Mehrzahl vorhandenen angenommene Rezeptor-Areale einen inaktivierenden Strahlungstreffer erhielten. Die Häufigkeit solcher Teilchen aber muß einer bestimmten Wahrscheinlichkeits-Verteilung gehorchen, so daß sich hieraus auch abschätzen lassen sollte, wieviele aktive Rezeptor-Areale ein unbeschädigtes Rezeptorteilchen tatsächlich trägt oder, vorsichtiger ausgedrückt, wieviel Prozent seiner aktiven Oberfläche durch einen wirksamen Strahlungstreffer ausgeschaltet werden.

Die Durchführung entsprechender Experimente erbrachte klare Hinweise für die Gültigkeit der Hypothese Nr. 2.

Material und Methoden

1. *Rezeptorsubstanz*: Präparierung wie früher¹ beschrieben, mit geringfügigen Abänderungen. Die Bakterien (*E. coli* B) erhielten Glucose an Stelle von Lactat als Kohlenstoffquelle und wurden sofort nach Erreichen der stationären Phase abzentrifugiert. — Die Rezeptor-Stammlösung enthielt 1160 Einheiten (E)/ml $m/15\text{-Na}_2\text{HPO}_4$. Reinheitsgrad 0.68 γ N/E.

2. *T 5-Bakteriophagen*: Anreicherung aus hochtitrigen Lysaten durch differentielles Zentrifugieren. Letzte Reinigung durch Behandlung mit präzipitierendem Antiserum gegen den Wirtszelltyp (*E. coli* B). Die Phagenstammlösung enthielt $5,5 \cdot 10^{12}$ T 5-Teilchen/ml 0,06-m. Phosphatpuffer pH 7,0, dem pro l 0,002 Mol MgSO_4 zugesetzt waren.

3. *Kinetischer und Abzähltest*: l. c.¹. Beide Tests in Difco Nutrient Broth. T 5-Konzentration beim Abzähltest $5,5 \cdot 10^{11}$ /ml.

4. *Bestrahlung*: Bestrahlt wurde Rezeptorstammlösung, 1:5 verdünnt mit einer 8-proz., wässrigen Lösung von Difco Hefeextract. Die Verdünnung muß solange stehen, bis sie einen konstanten E-Titer erreicht hat, d. h. kleine Aggregate von Rezeptor aufgelöst sind. Als Strahlungsquelle diente eine Röntgenröhre (Typ MC 50, Fa. C. H. F. Müller, Hamburg) mit 1,5 mm Be-Fenster, die bei 25 mA Heizstrom und 100 kV Spannung am Ort der bestrahlten Probe eine Leistung von $5 \cdot 10^5$ r/min abgab. Die Bestrahlungen wurden in Plexiglasschälchen bei einer Schichtdicke von 0,95–1,9 mm vorgenommen, wobei ein feiner, schräg zur Flüssigkeitsoberfläche aufgeblasener Luftstrom für sehr gutes Rühren sorgte. Auf Einfrieren wurde wegen der geringen Eindringtiefe der weichen Röntgenstrahlung verzichtet. Die Absorption in der Lösung wurde bei jeder verwen-

deten Schichtdicke bestimmt und bei der Dosisangabe berücksichtigt.

5. *Kontrollen*: Außer den üblichen Kontrollen bei E- und Abzähltitration wurde sichergestellt, daß bestrahlter Hefeextrakt allein keine Inaktivierung von T 5-Phagen bewirkt.

Ergebnisse

Zunächst mußte, um einen Überblick über die Strahlenempfindlichkeit der Rezeptorsubstanz zu erhalten, eine Dosiskurve aufgenommen werden. Sie ist in Abb. 1 als Gerade wiedergegeben. Die eingetragenen Punkte sind Mittelwerte aus insgesamt 22 Einzelmessungen. Titriert wurden „überlebende E“ (kinetischer Test). Bis auf die Abknickung nach unten bei der sehr hohen Dosis von 35 Mega-Röntgen ergibt sich also eine typische Eintreffer-Kurve, und es ist wichtig, sich noch einmal klarzumachen, daß dies gar nichts über die Anzahl der rezeptoraktiven Areale pro Rezeptorteilchen aussagt. Die Strahlenresistenz des Rezeptormaterials ist bei weitgehender Ausschaltung indirekter Effekte enorm hoch (Inaktivierungsdosis für e^{-1} „überlebende E“ fast 20 Mega-Röntgen!). Für Dosen bis zu $2 \cdot 10^7$ r wurde genau der gleiche Verlauf der Dosiskurve be-

Abb. 1. Dosisgerade für Einheiten-Inaktivierung (Δ) sowie daraus berechnete Mehrtrefferkurven. Die gefundenen Werte für den Bruchteil abzählbar bleibender Rezeptorteilchen in Abhängigkeit von der Dosis sind als ($\bullet$) eingetragen.

reits vor einigen Jahren im Rahmen von Voruntersuchungen erhalten, die am Institut du Radium in Paris unternommen werden konnten. Die Proben wurden damals in gefrorenem Zustande bestrahlt.

Das Abknicken der Kurve bei sehr hoher Dosis ist wahrscheinlich nicht reell, doch bleibt dies, wie aus dem Folgenden hervorgehen wird, auf jeden Fall ohne Einfluß auf die zu treffende Entscheidung zwischen den beiden eingangs aufgestellten Hypothesen. Um jeden möglichen Fehler bei der physikalischen Dosismessung für den nunmehr durchzuführenden

Vergleich der Ergebnisse von kinetischem und Abzähltest ganz auszuschalten, wurden hierbei alle bestrahlten Proben beiden Tests unterzogen. Die effektive Dosis konnte dann für jeden Meßpunkt aus der Dosiskurve unternommen werden. Die Ergebnisse der Vergleichsmessungen sind in Abb. 1–3 zusammengefaßt. In Abb. 2 ist die im Abzähltest gefun-

Abb. 2. Rezeptorteilchenzahl pro (überlebende) Rezeptoreinheit in Abhängigkeit von der Röntgendosis.

dene Teilchenzahl/E in Abhängigkeit von der Strahlendosis aufgetragen. Unbestrahlter Rezeptor liefert im Mittel $1,1 \cdot 10^{11}$ Teilchen/E (Fußpunkt der Kurve). Man erkennt sofort, daß nach Bestrahlung stets „zuviel“ Teilchen pro (überlebende) Rezeptoreinheit gefunden werden, und zwar um so mehr, je höher die Dosis ist. Dies kann nur bedeuten, daß die Rezeptorteilchen *mehr* als ein rezeptoraktives Areal tragen. Die Kurve sollte, wenn in der bestrahlten Rezeptormenge schließlich nur noch Teilchen übrig sind, die gerade noch *ein* ungetroffenes Areal behalten haben (neben solchen, die keines mehr besitzen), abbiegen und horizontal weiterlaufen. Offenbar ist diese Region im untersuchten Dosisbereich noch nicht erreicht.

Trägt man den Prozentsatz abzählbar bleibender Rezeptorteilchen gegen die Dosis auf, so müßte sich also nach dem eben Gesagten eine Mehrtrefferkurve ergeben. In Abb. 1 sind die Meßpunkte in eine Kurvenschar eingezeichnet, die den berechneten Verlauf für $n = 2 - 5$ Rezeptor-Areale pro Teilchen wiedergibt. Die miteingezeichnete Gerade bzw. Dosiskurve stellt in diesem Zusammenhange offenbar nichts anderes dar als den Verlauf für $n = 1$, denn sie gibt die als Berechnungsgrundlage dienende Überlebenswahrscheinlichkeit wieder für ein Rezeptor-Areal überhaupt, unabhängig von seiner Kombination mit weiteren Arealen im gleichen Teilchen.

Berechnung

Wahrscheinlichkeit für:

Abzählbarbleiben eines Rez.-Teilch. mit einem Areal
 $= A$

Löschung eines Rez.-Teilch. mit einem Areal
 $= 1 - A$

Löschung eines Rez.-Teilch. mit n Arealen
 $= (1 - A)^n$

Abzählbarbleiben eines Rez.-Teilch. mit n Arealen
 $= 1 - (1 - A)^n$.

A wird im kinetischen Test gemessen und kann daher stets in die Gleichungen eingesetzt werden, unabhängig davon, ob $A = e^{-\alpha D}$, wie im geraden Anfangsteil der Dosiskurve, oder ob A eine andere Funktion darstellt, nämlich hinter dem Knick der Kurve (D = Strahlendosis, α = Neigungswinkel der Dosisgeraden).

Man sieht, die Meßpunkte liegen sämtlich oberhalb der Geraden für $n = 1$. Einer bestimmten Trefferkurve lassen sie sich nicht zuordnen, was wohl für eine gewisse Inhomogenität der Rezeptorteilchen-Population spricht. Manche Teilchen haben anscheinend eine weniger große rezeptoraktive Oberfläche als andere, oder ein Treffer inaktiviert bei manchen mehr aktive Oberfläche als bei anderen. In dieser Formulierung ist die wohl angemessenste Deutung der Versuchsserie schon vorweggenommen. Man wird keine genau definierte Anzahl von diskreten Rezeptor-Arealen auf einem Teilchen annehmen können, darf aber für erwiesen erachten, daß im allgemeinen mehr Teilchenoberfläche rezeptoraktiv ist als dem Querschnitt eines T5-„Schwanzes“ entspricht. Um die gesamte, aktive Oberfläche zu zerstören, sind durchschnittlich mehr als zwei und weniger als zehn Strahlungstreffer nötig.

Die beobachtete Inhomogenität kommt besonders gut zum Ausdruck, wenn man den log des Bruchteils nicht mehr abzählbarer Teilchen ($\log B$) gegen den log des inaktivierten Bruchteils von Einheiten aufträgt (Abb. 3). Da $\log B = n \log(1 - A)$, bilden die Trefferkurven eine Schar von Geraden mit dem Neigungswinkel n . Die Meßpunkte (A kann, wie ge-

Abb. 3. Zur besseren Veranschaulichung der Inhomogenität der Rezeptorteilchen wurde $\log B$ gegen $\log(1 - A)$ aufgetragen. Nähere Erläuterungen im Text.

sagt, stets direkt gemessen werden!) sind über den ganzen Fächer der Mehrtreffergeraden verteilt, aber systematisch in der Weise, daß sie mit steigender Inaktivierung auf Treffergeraden immer höherer Ordnung fallen, also ganz so, wie für eine Inhomogenität im oben angedeuteten Sinne zu erwarten.

Diskussion

Man kann aus der Dosiskurve unter gewissen Voraussetzungen abschätzen, wie groß die strahlenempfindliche Masse bzw. das Mol.-Gew. des Rezeptor-Areals ist^{3,4}. Nach Prof. LATARJET, der die Berechnung freundlicherweise durchführte, ergibt sich für den Fall Treffer = Erzeugung eines Ionenpaares (Zufuhr von etwa 38 eV):

$$D_{0,37} = 1,88 \cdot 10^7 \text{ r} = 1,75 \cdot 10^7 \text{ rad} \\ = 2,9 \cdot 10^{19} \text{ Ionisationen pro Gramm.}$$

Strahlenempfindliche Masse

$$P = 3,5 \cdot 10^{-20} \text{ g,}$$

$$M = 21\,000 \text{ (unter Berücksichtigung von} \\ \delta\text{-clusters } M \leq 28\,000).$$

Dieser sehr niedrige Wert paßt gut in die Vorstellungen, die man sich vom Rezeptor-Areal und seiner Funktionsweise machen muß. Die spezifische Bindung eines T 5-Phagenteilchens an das kugelförmige Rezeptorteilchen beruht auf einem Kontakt, der in der Fläche zwar ziemlich ausgedehnt ist (Querschnitt des Phagenschwanzes), aber offensichtlich keine weiter in die Tiefe des Rezeptorteilchens hineinreichenden, spezifischen Konfigurationen einbezieht – also auf einem reinen Oberflächenkontakt. Das Rezeptor-Areal muß, in Anbetracht seiner erstaunlich niedrigen strahlenempfindlichen Masse,

durch eine aus dem Rezeptorteilchen herausgeschnitten gedachte Kugelkalotte von minimaler Dicke (ca. 3 C–C-Abstände) repräsentiert werden, denn sie besitzt immerhin eine Oberfläche von schätzungsweise 6000 Å²! Eine solche Kalotte kann kaum etwas anderes sein als eine imaginäre Fläche, die eine größere Anzahl diskreter chemischer „Endgruppen“ einhüllt, welche aus der Oberfläche des Rezeptorteilchens herausragen und eigentlich die Bindung des Phagenteilchens besorgen. Trotzdem muß eine solche Vielzahl über einen weiten Bereich verteilter Endgruppen einem Strahlungstreffer gegenüber als Ganzes reagieren, wobei der entscheidende Treffer durchaus nicht unbedingt innerhalb der Kalotte zu erfolgen hätte.

Auf welche Weise es zu einer noch viel ausgedehnteren inaktivierenden Fernwirkung auf gar nicht an der Bindung des zuerst fixierten T 5-Teilchens mitwirkende Endgruppen kommen kann, so daß diese nicht noch weitere Phagenteilchen festhalten können, bleibt vorläufig ungeklärt. Da die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese Nr. 2 als gültig befunden wurde, muß man jedenfalls annehmen, daß ein solcher fernwirkender Sekundärprozeß die Reaktion eines T 5-Teilchens mit seinem Rezeptorteilchen begleitet.

Den Herren Prof. Dr. R. LATARJET und Prof. Dr. K. G. ZIMMER sind wir für die gastliche Aufnahme, die jeweils einer von uns an ihren Instituten* zur Durchführung der Experimente fand, zu großem Dank verpflichtet. Ebenso danken wir Herrn Dr. E. SIX für fruchtbare Diskussionen, den Herren Dr. A. MÜLLER, Dr. G. HOTZ, P. MORENNE und Fräulein G. HIERNAX für vielseitige Unterstützung. Einer der Autoren (H.) dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Fortbildungsstipendium.

* Institut du Radium, Paris bzw. Institut für Strahlenbiologie der Reaktorstation Karlsruhe.

³ H. EPHRUSSI-TAYLOR u. R. LATARJET, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **16**, 183 [1955].

⁴ R. LATARJET u. P. FRÉDÉRICQ, *Virology* **1**, 100 [1955].