

Mitteilung aus der Forschungsabteilung für makromolekulare Chemie
des Chemischen Laboratoriums der Universität Freiburg/Br. ¹⁾
und dem Laboratorium für Übermikroskopie der Siemens & Halske A.-G.

Versuche zur Sichtbarmachung von Glykogenmolekülen

Von E. Husemann und H. Ruska

Mit 11 Abbildungen (davon Abb. 1 im Text, Abb. 2—10 auf Taf. I—II)

(Eingegangen am 14. Mai 1940)

1. Physikalische und chemische Kennzeichnung der Moleküle

Seitdem durch die Entwicklung der Übermikroskopie²⁾ die optische Auflösungsgrenze auf einige $m\mu$ heruntergesetzt wurde, ist mehrfach der Versuch durchgeführt worden, Einzelmoleküle sichtbar zu machen. So haben Kausche, Pfankuch und Ruska³⁾ mit den stäbchenförmigen Teilchen des Tabak-Mosaik-Virusproteins die ersten Virusmoleküle abgebildet und ihre Ergebnisse mit den früher über dieses Protein gewonnenen Daten der Teilchenabmessungen verglichen. Von Ardenne⁴⁾ hat Hämocyanin in gleicher Weise elektronenoptisch aufgenommen, ohne bisher genauer auf die Molekülgröße und die Aggregatformen einzugehen. Die bildlich dargestellten Eiweiß-

¹⁾ 251. Mitteilung über makromolekulare Verbindungen; 250. Mitteilung *Kunststoffe* **30**, 157 (1940).

²⁾ E. Ruska, *Z. Physik* **87**, 580 (1934); B. v. Borries u. E. Ruska, *Wiss. Veröff. Siemens-Werken* **17**, 99 (1938); dieselben, *Naturwiss.* **27**, 577 (1939); H. Mahl, ebenda **27**, 417 u. M. v. Ardenne, ebenda **28**, 113 (1940).

³⁾ G. A. Kausche, E. Pfankuch u. H. Ruska, *Naturwiss.* **27**, 292 (1939).

⁴⁾ M. v. Ardenne, *Naturwiss.* **28**, 113 (1940).

stoffe sind durch Messungen in der quantitativen Ultrazentrifuge (The Svedberg) als einheitliche Teilchen definierter Größe bestimmt und im Falle des Virusproteins durch die besondere, bei der Spaltung verlorengehende pathogene Eigenschaft charakterisiert. Chemische Strukturaufklärungen dieser Substanzen liegen nicht vor, so daß über die Art der Bindung der Atome zum Molekül durch Haupt- oder Nebenvalenzkräfte keine sicheren Angaben gemacht werden können. Vor kurzem hat jedoch L. W. Janssen einen neuartigen Versuch unternommen, die bisher vorliegenden Daten zu einem genaueren Bild der Eiweißstruktur zu vereinigen¹⁾ und dabei die Annahme gemacht, daß die Teilchen der Proteine in sich durch Hauptvalenzbindungen gefestigt sind. In Anbetracht des leicht eintretenden Zerfalls mancher hochmolekularer Eiweißkörper ist allerdings auch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß in den physikalisch nachweisbaren Teilchen Assoziate aus mehreren kleineren Molekülen vorliegen.

Gegenüber der rein physikalischen Teilchengrößenbestimmung ist der Nachweis, daß alle Atome in einem Substanzteilchen durch Hauptvalenzen verknüpft sind, für die sichere Abgrenzung des Molekülbegriffs bei makromolekularen Verbindungen von besonderem Wert, was von H. Staudinger²⁾ häufig betont wurde. Ein solcher Nachweis ließ sich bei einer Reihe makromolekularer Verbindungen in der gleichen Weise erbringen wie bei niedermolekularen Substanzen. So ist z. B. die Tatsache, daß man Cellobiose acetylieren und aus dem Acetat durch Verseifung zurückerhalten kann, ein Beweis dafür, daß die beiden Glucosereste durch Hauptvalenzen verknüpft sind. Nach der gleichen Methode wurde bei einer Reihe von Polysacchariden³⁾ gezeigt, daß es unter gewissen Vorsichtsmaßregeln gelingt, Derivate von ganz andersartigen Löslicheitseigenschaften zu erhalten, ohne eine Änderung des Polymerisationsgrades, der Zahl der Grundmoleküle, herbeizuführen. Die

¹⁾ L. W. Janssen, *Protoplasma* **33**, 410 (1939).

²⁾ H. Staudinger, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **59**, 3019 (1926); u. Mitarbeiter, *Liebigs Ann. Chem.* **474**, 149 (1929): *Organische Kolloidchemie*, Verlag Vieweg 1940, S. 103.

³⁾ Vgl. z. B. H. Staudinger u. E. Husemann, *Liebigs Ann. Chem.* **527**, 195 (1937) u. G. Daumiller, *Liebigs Ann. Chem.* **529**, 219 (1937).

Tab. 1 zeigt derartige „polymeranaloge Umsetzungen“¹⁾ an Glykogenen. Die Bestimmung der Polymerisationsgrade erfolgte durch direkte osmotische Messungen.

Tabelle 1
Polymeranaloge Umsetzungen an Glykogenen²⁾

Durchschnittspolymerisationsgrad der		
Glykogene	Glykogentriacetate	Glykogene, aus Acetaten durch Verseifung gewonnen
410	400	410
1750	1700	1750
5000	5000	5300

Aus diesen Umsetzungen ergibt sich der Aufbau der Makromoleküle mit der gleichen Sicherheit wie derjenige der Cellobiose.

2. Die Konstitution von Glykogen

Von ausschlaggebender Bedeutung für die Möglichkeit, die Moleküle im Übermikroskop sichtbar zu machen, ist neben dem Molekulargewicht und der Dichte die Molekülgestalt. Die unverzweigten Celluloseketten, deren Länge in das Gebiet lichtmikroskopischer Sichtbarkeit hereinreicht, sind für Versuche zur Sichtbarmachung im Übermikroskop ungeeignet, da ihre beiden anderen Dimensionen nur wenige Å betragen. Die verzweigten Stärkekette sind zwar räumlich ausgedehnter, aber vermutlich zu wenig kompakt, um sichtbar gemacht werden zu können. Am günstigsten liegen die Verhältnisse beim Glykogen. Denn dieses Polysaccharid besitzt nach Endgruppenbestimmungen, osmotischen und viscosimetrischen Messungen stark verzweigte, annähernd kugelförmige Moleküle sehr hohen Polymerisationsgrades²⁾. Den Bau der Glykogenmoleküle kann man sich schematisch folgendermaßen vorstellen (Abb. 1).

Man erkennt aus der Zeichnung, daß die Moleküle nicht kompakt gebaut sind, sondern ein lockeres Gerüst darstellen, das nach außen nicht scharf abgegrenzt ist, sondern unregel-

¹⁾ Über polymeranaloge Umsetzungen vgl. H. Staudinger und V. Wiedersheim, Ber. dtsh. chem. Ges. 62, 2406 (1929); u. H. Scholz, ebendort 67, 84 (1934).

²⁾ H. Staudinger u. E. Husemann, Liebigs Ann. Chem. 530, 1 (1937).

mäßig aufhört. Daß die Packungsdichte im Glykogen niedrig ist, verglichen mit Eiweißstoffen, erkennt man aus einem Vergleich¹⁾ der spezifischen Viscositäten von Glykogen, Ovalbumin und dem theoretischen Wert der Einsteinschen Formel²⁾:

$$\frac{\eta_{sp} \cdot s}{c} = 0,0025 \cdot ^3)$$

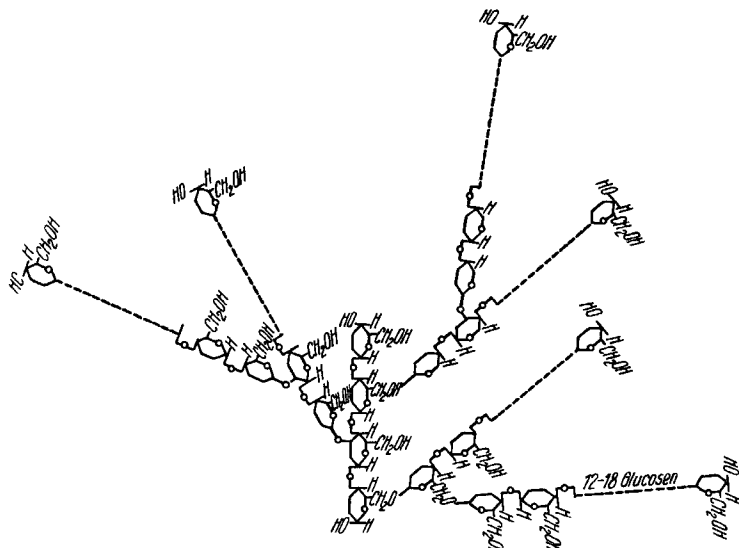


Abb. 1. Schematische Formel von Glykogen nach H. Staudinger und E. Husemann

Tabelle 2

Vergleich der spezifischen Viscosität von Glykogen mit der von kugelförmigen Eiweißstoffen

Substanz	$\frac{\eta_{sp} \cdot s}{c}$	Volumenbeanspruchung
		$\frac{\eta_{sp} \cdot s}{c \cdot 0,0025}$
Glykogen	0,013	5,2
Ovalbumin	0,003	1,2
Hämoglobin	0,0033	1,3

¹⁾ H. Staudinger u. E. Husemann, Liebigs Ann. Chem. 527, 195 (1937); H. Staudinger, Naturwiss. 25, 673 (1937).

²⁾ A. Einstein, Ann. d. Phys. 19, 289 (1906); 34, 591 (1911).

³⁾ $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$, $s =$ Dichte, $c =$ Konz. in g/Liter.

Nach der Einsteinschen Gleichung ist die spezifische Viscosität von kugelförmigen Teilchen bei gleicher Konzentration unabhängig von deren Größe, sie ist ein Maß für das von den solvatisierten Teilchen eingenommene Volumen. Man bezeichnet daher den Quotienten aus den $\frac{\eta_{sp} \cdot s}{c}$ -Werten und der theoretischen Zahl von 0,0025 als Volumenbeanspruchung¹⁾.

Nach diesen Vorstellungen über die Konstitution des Glykogens wird man für das übermikroskopische Bild keine scharf abgegrenzten kontrastreichen Punkte im Abzug der photographischen Platte erwarten dürfen, sondern Intensitätsmaxima, die allmählich abklingen oder in benachbarte übergehen.

Zur Charakterisierung der Glykogene ist noch hinzuzufügen, daß keine Teilchen einheitlicher Größe vorliegen, wie bei einer Reihe von Eiweißstoffen, sondern daß sie polymolekular sind²⁾. Ob diese Polymolekularität durch den Entstehungsmechanismus bedingt ist, oder erst durch Abbauvorgänge bei der Isolierung hervorgerufen wird, läßt sich noch nicht mit Sicherheit entscheiden.

3. Gewinnung und Charakterisierung der zu den Untersuchungen verwendeten Glykogene

Um ein möglichst hochmolekulares Glykogen zu erhalten, wurden 25 g des reinsten Glykogens von Merck in 2 Liter destilliertem Wasser gelöst und nach sorgfältigem Zentrifugieren bei 27° unter starkem Schütteln tropfenweise mit Methanol versetzt bis zur starken Trübung. Nach 24-stündigem Stehen bei 27° ließ sich die klare Lösung von der abgesetzten flüssigen Phase abdekantieren; der Rückstand wurde in Wasser gelöst und erneut durch Zugabe von Methanol etwa zur Hälfte ausgefällt. Nach 4-maliger Wiederholung wurden 3 g eines von niedermolekularen Anteilen freien Glykogens erhalten. Es wurde

¹⁾ Vgl. in Pauli-Valkó, Kolloidchemie der Eiweißkörper, Verlag Steinkopff 1933, S. 239.

²⁾ H. Staudinger, Z. angew. Chem. 42, 67 (1929); Ber. dtsh. chem. Ges. 59, 3019 (1926); G. V. Schulz, Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 44, 102 (1938).

durch Auflösen in Wasser und Zentrifugieren gereinigt und durch Eingießen in Methanol ausgefällt, mit Äther gewaschen und bei 30° i. V. getrocknet. Die in Wasser vorgenommenen osmotischen Messungen ergaben ein mittleres Molekulargewicht von 1,5 Millionen; das entspricht einem Polymerisationsgrad von etwa 9000.

Tabelle 3
Osmotische Messungen an Glykogen I im Wasser

$\frac{c}{\text{g/Liter}}$	$p \cdot 10^3$	$p/c \cdot 10^3$	Mol.-Gew.	Polym.-Grad
30	0,53	0,018	1530000 aus lim $p/c = 0,016 \cdot 10^{-3}$	9500
50	1,00	0,020		
75	1,58	0,021		

Zu den Untersuchungen wurde ferner ein stark abgebautes Glykogen II verwandt, das ein mittleres Molekulargewicht von 65000 besitzt¹⁾.

Für das Glykogen I berechnet sich unter der Annahme, daß es Würfelgestalt besitzt, ein Durchmesser von etwa 10 μ ; es müßte also sichtbar gemacht werden können; für das Glykogen II ein solcher von 3 μ ; dieser Wert liegt an der Auflösungs Grenze des Übermikroskops²⁾.

4. Präparative Einzelheiten

Als Lösungsmittel diente doppelt destilliertes Wasser, das steril aufbewahrt wurde. Zu den übermikroskopischen Aufnahmen wurden von beiden Glykogenen Konzentrationsreihen von 1 mg bis zu 0,001 mg pro ccm verwendet. Als Objektträger dienten besonders dünn hergestellte Kollodiumfilme³⁾, die, um vor Mißdeutungen sicher zu sein, jeweils vor der Beschickung mit Glykogen im Übermikroskop auf Reinheit und Strukturlosigkeit geprüft wurden. Die Lösungen brachte man,

¹⁾ Über die Messungen an dem abgebauten Glykogen vgl. H. Staudinger u. E. Husemann, Liebigs Ann. Chem. 530, 7 (1937).

²⁾ Von G. A. Kausche und M. Staudinger wurden mit einem Glykogen vom Molekulargewicht 800000 Vorversuche unternommen, die eine weitere Untersuchung aussichtsreich erscheinen ließen.

³⁾ H. Ruska, Naturwiss. 27, 287 (1939).

wie früher beschrieben¹⁾, mittels einer ausgeglühten Platinöse auf den Objektträger und ließ das Wasser, vor Staub geschützt, eindunsten.

5. Beschreibung der Aufnahmen

Die Abb. 2—8 sind an verschiedenen konz. Lösungen des Glykogens I nach dem Eintrocknen gewonnen worden. Die Massenverteilung ist nicht gleichmäßig, sondern es bilden sich verschiedenartige Eintrocknungsfiguren. Die Art und Weise, in welcher Lösungen oder Suspensionen auf dem Objektträgerfilm eintrocknen, läßt sich nicht sicher beherrschen, jedoch lassen sich bestimmte, für die jeweilig untersuchte Substanz typische Formen immer wieder erkennen. Im Umriß der Eintrocknungen treten die gleichen Figuren auf, wie im makroskopisch und lichtmikroskopisch sichtbaren Bereich auf nicht benetzbaren Unterlagen. Es finden sich mehr oder weniger rundbegrenzte Flächen (Abb. 2, 9), bandartige Einzelstreifen (Abb. 3) oder aus vielen solchen Streifen verschieden dicht, netzartig zusammenfließende Gebilde (Abb. 3, 4). Ist die auf-trocknende Substanz krystallisierbar, so kann es zur Bildung von äußerst kleinen Krystallen kommen. Besitzt sie kein Krystallisationsvermögen, so können die Einzelteilchen im Bereich der Benetzungsflächen in regelloser, lockerer Anordnung, in dichteren Anhäufungen, als zusammenhängender, nahezu homogener Film, oder in Kombinationen dieser Grundformen auf-trocknen. An Rändern größerer Tropfen kommt dabei, wie im makroskopisch sichtbaren Bereich, eine größere Dichte der Ablagerung zustande als im Tropfenzentrum. Von der Konzentration der Substanz und der Aggregationsneigung der Teilchen hängt es ab, ob sich vorwiegend einzelne Partikel oder Aggregate absetzen; von ihrer Form und Polarität, ob statistisch homogene Anordnungen oder bestimmte Strukturierungen entstehen.

Im einzelnen ist zu den Bildern folgendes zu sagen: Abb. 2 zeigt dicht gelagerte, umschriebene Aggregate einer Auftrocknung von Glykogen I, in welcher verschieden große Einzelpunkte und größere, kugelige Gebilde sichtbar sind. Zum Teil

¹⁾ H. Ruska, Naturwiss. 27, 287 (1939).

sind die Punkte untereinander nicht scharf abgegrenzt oder scheinen auf einem strukturlosen Untergrund zu liegen, der dichter ist als diejenigen Filmteile, auf denen sich keine Substanz abgesetzt hat. Besonders auffallend ist dieser strukturlose Untergrund in Abb. 3 und 4. Seine Bildung kann, wie besprochen, auf Grund der eigenartigen Form wohl als Auftrocknungserscheinung angesprochen werden. Einzelne dichtere Teilchen liegen vorwiegend auf diesem Untergrund, mitunter kommen sie jedoch auch frei auf dem Film zur Ablagerung (Abb. 5). Gehen wir davon aus, daß die Teilchendurchmesser nach der Bestimmung des Molekulargewichts um $10\text{ m}\mu$ betragen muß, so ist anzunehmen, daß nur bei den kleinsten Teilchen Einzelmoleküle vorliegen. Bei den größeren kann es sich bereits um konzentrationsbedingte Aggregationen handeln. Als solche müssen auch die flächigen Bildungen angesprochen werden. Bei der erörterten molekularen Struktur des Glykogens ist es leicht möglich, daß sich die Glykogenmoleküle so dicht zusammenlagern und untereinander vernetzen, daß die Einzelteilchen nicht mehr oder doch nicht alle mehr erkannt werden können. In Abb. 6 und 8 sind die Einzelteilchen deutlich kleiner als in den bisher erörterten Bildern und entsprechen etwa der theoretisch zu fordernden Größe, so daß sie auf Grund der indirekt ermittelten Daten als Moleküle angesprochen werden können. An einem Tropfenrand (Abb. 7), der zufällig um ein vorgebildetes Loch im Trägerfilm entstand und an dem wir sehr gleichmäßige Eintrocknungsbedingungen voraussetzen dürfen, ist die Ablagerung sehr gleichmäßig erfolgt, und zwar so, daß fast ausschließlich Einzelteilchen erkennbar sind. Die äußerste (hier konkave) Tropfenbegrenzung gleicht einer eng und fein punktierten Linie. Der Umstand, daß viele Teilchen kleiner als $10\text{ m}\mu$ sind (Abb. 8), kann sowohl mit einer starken Streuung der Teilchengröße, als auch damit in Zusammenhang gebracht werden, daß die äußeren Molekülbegrenzungen entsprechend der Molekülstruktur im Umriß unscharf und in der Dichte allmählich abnehmend sind.

Konnte somit wahrscheinlich gemacht werden, daß die kleinsten sichtbaren Einheiten Einzelmoleküle sind, so scheint uns schließlich hierfür beweisend zu sein, daß bei entsprechend hergestellten Präparaten des abgebauten Glykogens II die er-

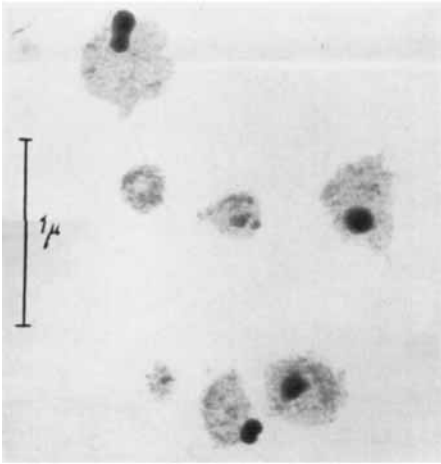


Abb. 2. Glykogen I el. opt. 24000 : 1

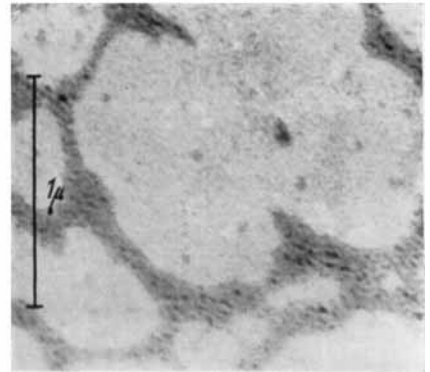


Abb. 3. Glykogen I el. opt. 30000 : 1

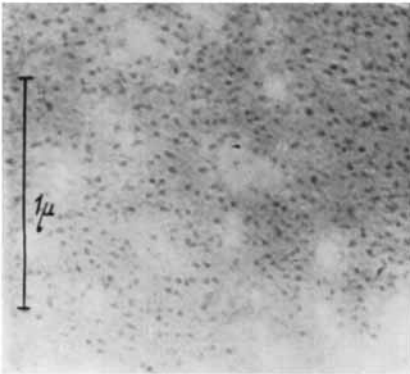


Abb. 4. Glykogen I el. opt. 30000 : 1

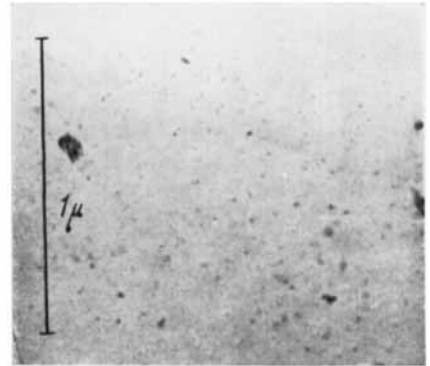


Abb. 5. Glykogen I el. opt. 38000 : 1



Abb. 6a. Glykogen I el. opt. 24000 : 1; Abb. 60000 : 1

Zu E. Husemann u. H. Ruska, Versuche zur Sichtbarmachung von Glykogenmolekülen.

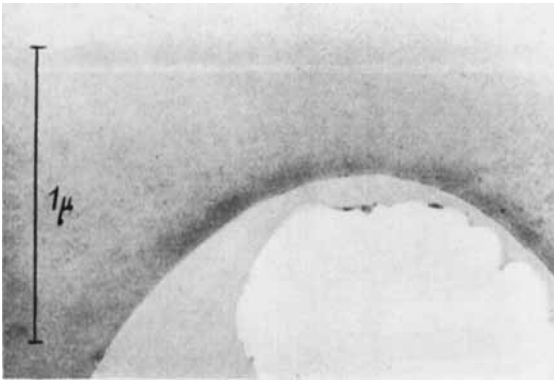


Abb. 7. Glykogen I el. opt. 38000 : 1

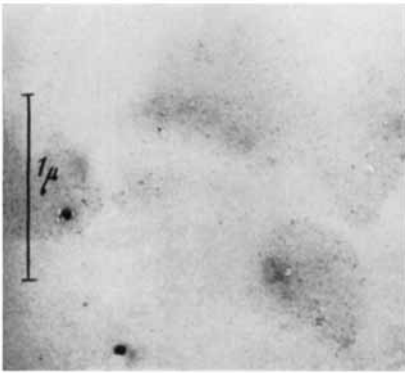


Abb. 6. Glykogen I el. opt. 24000 : 1

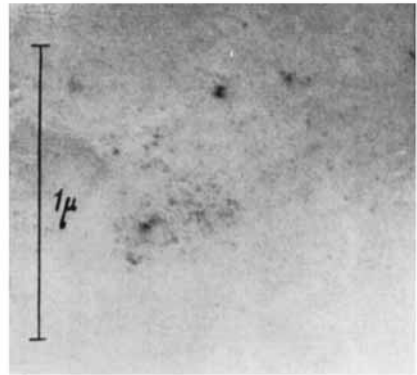


Abb. 8. Glykogen I el. opt. 38000 : 1

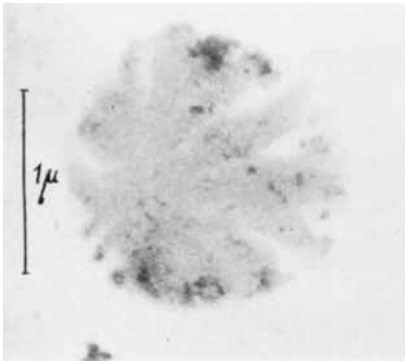


Abb. 9. Glykogen II el. opt. 24000 : 1

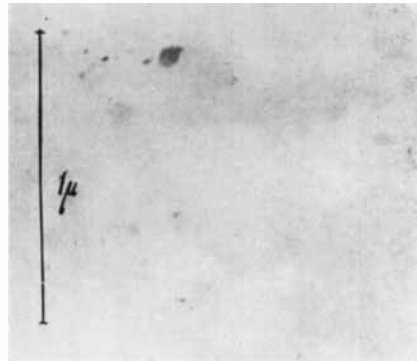


Abb. 10. Glykogen II el. opt. 38000 : 1

Zu E. Husemann u. H. Ruska, Versuche zur Sichtbarmachung von Glykogenmolekülen.

wartete Punktstruktur nach Größe und Kontrast wesentlich weniger deutlich in Erscheinung tritt. Die Abb. 9 und 10 entsprechen bezüglich der Auftrocknungserscheinung der Abb. 2 und 6.

Man muß also annehmen, daß die Einzelpunkte der Abb. 2—8 zum größten Teil einzelne Makromoleküle des Glykogens sind; die durchschnittliche Größe von 5—15 $m\mu$ stimmt mit dem berechneten Wert befriedigend überein. Der dunkle Untergrund ist vermutlich eine etwa monomolekulare Schicht von Glykogen, in der die Einzelmoleküle so dicht liegen, daß sie nicht mehr aufgelöst werden können. Daß niedermolekulare Anteile für die homogene Schwärzung verantwortlich zu machen sind, ist sehr unwahrscheinlich, da, wie oben erwähnt, eine sehr sorgfältige Fraktionierung vorgenommen wurde und sich niedermolekulare Anteile bei osmotischen Messungen bemerkbar machen müßten.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zum Unterschied von früheren Versuchen an Eiweißstoffen, mittels des Übermikroskops Einzelmoleküle sichtbar zu machen, liegen in den Glykogenen nicht physikalisch, sondern chemisch eindeutig definierte Verbindungen vor, deren molekularer Aufbau mit der gleichen Sicherheit bekannt ist, wie derjenige von niedermolekularen Verbindungen. Es ist also hier der Übergang von lichtoptisch sichtbaren Strukturen zu chemisch definierten Einzelmolekülen ermöglicht worden.

Im übrigen haben die übermikroskopischen Untersuchungen die Vorstellungen, die auf Grund viscosimetrischer und osmotischer Untersuchungen über die Konstitution des Glykogens entworfen worden waren¹⁾, in jeder Weise bestätigt. Schon die Eintrocknungsfiguren deuten auf das Vorliegen von Kugelmolekülen hin, da fadenförmige Teilchen bei dichter Auftrocknung sich zu andersartigen Gebilden anordnen, wie das Beispiel des Tabak-Mosaik-Virusproteins zeigte²⁾. Ferner stimmt die Größe der Moleküle annähernd mit dem berech-

¹⁾ H. Staudinger u. E. Husemann, Liebigs Ann. Chem. 530, 1 (1937).

²⁾ G. A. Kausche, E. Pfankuch u. H. Ruska, Naturwiss. 27, 292 (1939).

neten Wert überein. Die geringe Kontrastwirkung des Glykogens bestätigt die auf Grund der Viscositätsmessungen gemachte Annahme eines im Vergleich zu Eiweißstoffen lockeren Aufbaus. Da die Teilchengröße in der Nähe der bisherigen Auflösungsgrenze liegt, lassen sich Einzelheiten über die Molekülform nicht aussagen, wir hoffen jedoch, durch die Herstellung kontrastreicherer Glykogenverbindungen weiter in die Struktur makromolekularer Stoffe eindringen zu können.

Für die Anregung zu dieser Untersuchung danken wir Herrn Prof. Dr. H. Staudinger verbindlichst. Unser Dank gilt ferner Herrn Präsidenten Tscheulin für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.