

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für physikalische Chemie und Elektrochemie,
Berlin-Dahlem

Die Auffindung von großen Netzebenenabständen bei Känguruh-Schwanzsehne

Ein Beitrag zur molekularen Struktur der Faserproteine

Von O. Kratky und A. Sekora

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 21. Juni 1943)

Das Astburysche Strukturbild des Kollagens

Die Auffindung von großen Netzebenenabständen bei Faserproteinen durch amerikanische Forscher^{1), 2)} ließ das Bestehen von Baugesetzlichkeiten erkennen, die sich über weite Abstände erstrecken. Besonders wichtig sind die in der Faserachse auftretenden Perioden, weil sie offenbar in unmittelbarer Beziehung zum Aufbau der in dieser Richtung verlaufenden Polypeptidketten stehen. Astbury³⁾ hat diesen Gesichtspunkt besonders herausgestellt und als erster versucht, Zusammenhänge zwischen der Stöchiometrie dieser Proteine und den durch die Röntgenmessungen ermittelten Perioden herzustellen.

Bei Kollagen stützt sich Astbury dabei einerseits auf die von Wyckoff und Corey¹⁾ an Känguruh-Schwanzsehne gemessenen Perioden in der Faserachse von 2,91; 4,03; 7,21; 21,6; 24,1; 26,9; 33,6; 54,6 70,1 und 103 Å, andererseits auf die an Gelatine mit rein chemischen Methoden ermittelten analytischen Daten der Tab. 1.

Zu den da angegebenen „Frequenzen“ gelangt man auf folgendem Wege. Nach Bergmann beträgt das mittlere Molgewicht eines Aminosäurerestes in Gelatine 106. In 100 g Gelatine sind also $\frac{100}{106} = 0,96$ Aminosäurereste enthalten. Der Quotient $\frac{0,96}{0,34}$ gibt dann z. B. an, jede wievielte Aminosäure Glycin ist. Diese Größe bezeichneten Bergmann

¹⁾ R. B. Corey u. R. W. G. Wyckoff, J. biol. Chem. 114, 407 (1936); R. W. G. Wyckoff u. R. B. Corey, Proc. Soc. exp. Biol. and Medicine 34, 285 (1936); R. W. G. Wyckoff, R. B. Corey u. J. Biscoe, Science 82, 175 (1935).

²⁾ G. L. Clark, E. A. Parker, J. A. Schaad u. W. J. Warren, J. Amer. chem. Soc. 57, 1509 (1935).

³⁾ W. T. Astbury, J. internat. Soc. of Leather Trades' Chem. 24, 69 (1940).
Dort weitere Lit.

Tabelle 1

„Frequenzen“ der Aminosäuren in Gelatine, zusammengestellt von W. T. Astbury³⁾
nach Messungen von Bergmann und Niemann⁴⁾

Aminosäure	Gew.-%	Mol.-Gew.	Mol pro 100 g	Frequenzen exp.	Ideal-Frequenzen
Glycin	25,5	75	0,34	3,12	3 = 2 ⁰ 3 ¹
Prolin	19,7	115	0,17	6,24	6 = 2 ¹ 3 ¹
Oxyprolin . . .	14,4	131	0,11	9,63	9 = 2 ⁰ 3 ²
Alanin	8,7	89	0,098	10,8	9 = 2 ⁰ 3 ²
Arginin	9,1	174	0,052	20,4	18 = 2 ¹ 3 ²
Lysin	5,9	146	0,040	26,5	24 = 2 ³ 3 ¹

und Niemann als die „Frequenz“ der betreffenden Aminosäure⁶⁾. Die unmittelbar aus den Analysendaten berechneten Werte sind unganzzahlig. Die genannten Autoren halten es aber für wahrscheinlich, daß die wahren Frequenzen bei sämtlichen Eiweißstoffen in der Form $2^m 3^n$ darstellbar sind^{4), 6)} wo m und n ganze Zahlen bedeuten. Die in der letzten Spalte der Tab. 1 angegebenen „Idealfrequenzen“ entsprechen dieser Forderung und liegen den experimentellen Frequenzen ziemlich nahe. Für die bestehenden Abweichungen macht Astbury, außer den Unsicherheiten in der Gelatine-Analyse den folgenden Umstand verantwortlich: Durch die Idealfrequenzen ist ein Bauplan festgelegt, derart, daß in der regelmäßig gebauten Peptidkette jede dritte Stelle durch Glycin, jede sechste durch Prolin usw. besetzt ist. In der Art, wie nun z. B. bei den Silicaten einzelne Ionen unter Beibehaltung der ursprünglichen Krystallstruktur austauschbar sind, können sich auch bei den Polypeptidketten Aminosäurereste gegenseitig vertreten und ist daher mit Abweichungen von den streng ganzzahligen Verhältnissen zu rechnen.

Die kleinste Zahl von Aminosäureresten, aus welchen das Gelatine-molekül bestehen kann, ist bei Anerkennung der Idealfrequenzen durch deren kleinstes gemeinsames Vielfaches, also durch

$$3^2 \cdot 2^3 = 72$$

gegeben.

Bei der Kombination mit den Röntgendaten ging Astbury davon aus, daß ein Aminosäurerest eine Länge von 2,91 Å besitzt und die wahre

⁴⁾ M. Bergmann, J. biol. Chem. 110, 471 (1935); M. Bergmann u. C. Niemann, J. biol. Chem. 115, 77 (1936).

⁵⁾ Man ist leicht geneigt, unter der Frequenz eine Häufigkeit zu verstehen. Tatsächlich ist aber die oben definierte Frequenz um so höher, je seltener die betreffende Aminosäure ist, und die Häufigkeit wird durch ihren reziproken Wert gemessen.

⁶⁾ M. Bergmann u. C. Niemann, J. biol. Chem. 115, 77 (1936); 118, 301 (1937); Science 86, 187 (1937).

Faserperiode also ein Vielfaches dieses Wertes betragen muß. Zu einem bestimmten Wert kommt dann Astbury unter Berücksichtigung der folgenden beiden Bedingungen.

1. Sämtliche von Wyckoff und Corey gefundenen scheinbaren Netzebenenabstände müssen als Reflexe höherer Ordnung Bruchteile der gesuchten Grundperiode sein.

2. Die Zahl der entlang der Grundperiode angeordneten Aminosäurereste muß ein Vielfaches von 72 sein.

Die kleinste diesen Anforderungen entsprechende Grundperiode ist 838 Å lang und enthält $288 = 2^5 \cdot 3^2 = 72 \times 4$ Aminosäurereste.

Diese Interpretation bezeichnet Astbury selbst nur als einen ersten Versuch.

Die Auffindung neuer großer Netzebenenabstände

Es ist klar, daß ein weiteres Eindringen in die Kollagenstruktur nur auf einer erweiterten experimentellen Grundlage möglich ist. Zunächst schien es dringend erforderlich, durch direkte Experimente nach Netzebenenabständen zu suchen, die noch größer sind als die von Wyckoff und Corey nachgewiesenen. Der größte Abstand, den diese Forscher vermessen haben, beträgt 103 Å. Allerdings berichten Clark, Parker, Schaad und Warren²⁾ von einem bei 432 Å liegenden Reflex. Seine Realität wurde von seiten englischer Röntgenforscher angezweifelt.

Wir wendeten die Kleinwinkelmethode an, wie wir sie in einer Reihe von Untersuchungen entwickelt hatten⁷⁾. Bei der Einstellung unserer mit Spaltblenden arbeitenden Kamera war eine Vermessung des Röntgenbildes bis herunter zu einem Bragg'schen Winkel von etwa $\theta = 1,2 \cdot 10^{-3}$ möglich, entsprechend einem Netzebenenabstand von 640 Å.

Um die störende Streustrahlung zu beseitigen, welche das dem Präparat zugewendete, der Begrenzung des Primärstrahls dienende Schneidenpaar aussendet⁸⁾, war es notwendig, noch eine weitere Schneide vor dem Präparat einzuschieben. Sie mußte mit größter Sorgfalt so eingestellt werden, daß sie selbst vom Primärstrahl nicht getroffen wird, jedoch möglichst nahe — auf weniger als 0,01 mm — an den Primärstrahl herangeführt wird. Diese Maßnahme ist von entscheidender Wichtigkeit, wenn es sich um die Auffindung von Interferenzeffekten in einem dem Primärstrahl so nahen Gebiet handelt. Eine nun hergestellte Blindaufnahme zeigt keinerlei Maxima, sondern nur einen schwachen

⁷⁾ O. Kratky u. F. Schoszberger, Z. physik. Chem. (B) 39, 145 (1938); O. Kratky, A. Sekora u. R. Treer, Z. Elektrochemie 48, 587 (1942).

⁸⁾ Es liefert eine diffuse Kleinwinkelstreuung, welche offenbar mit den von der Mosaikstruktur des Metallgitters herrührenden inneren Hohlräumen zusammenhängt.

Anstieg der allgemeinen diffusen Streuung (Luftstreuung usw.) gegen den Durchstoßpunkt zu. An der Realität von Reflexen, die bei den eigentlichen Aufnahmen gefunden werden, ist also nicht zu zweifeln.

Mit diesen Apparaten haben wir von einer lufttrockenen Känguruh-Schwanzsehne Röntgenaufnahmen zur Auffindung von Meridianreflexen hergestellt, und zwar eine mit schwacher Auflösung zur Vermessung der Reflexe bis etwa 10 \AA , eine mit mittlerer (Abb. 1) und eine mit hoher

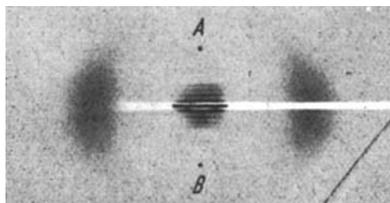


Abb. 1. Röntgenaufnahme mittlerer Auflösung einer Känguruh-Schwanzsehne. Faserachse vertikal. Abstand Präparat—Film = $104,5 \text{ mm}$

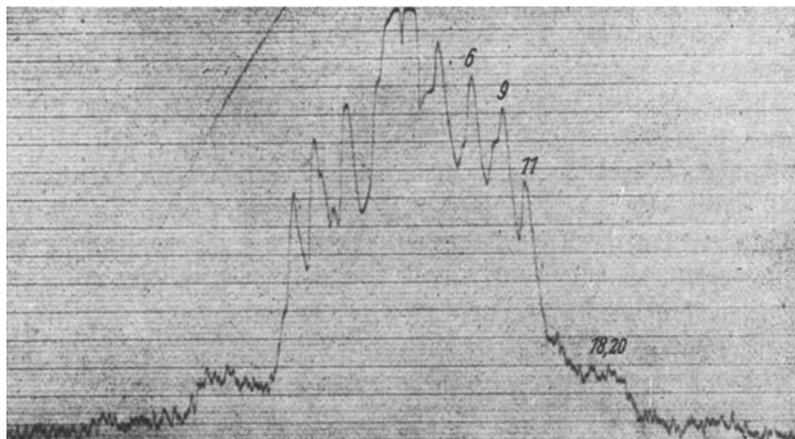


Abb. 2. Photometerkurve der in Abb. 1 wiedergegebenen Röntgenaufnahme einer Känguruh-Schwanzsehne. Übersetzungsverhältnis der Reproduktion = $5,5$. Die Ziffern bedeuten die Ordnung der Reflexe

Auflösung⁹⁾. Wir erhielten sehr ähnliche Werte wie Wyckoff und Corey und darüber hinaus die gesuchten ganz großen Netzebenenabstände zwischen 100 und 640 \AA . Es sind dies die größten Netzebenenabstände überhaupt, die bisher aufgefunden und direkt gemessen werden konnten. Sämtliche Ergebnisse sind in Tab. 2 niedergelegt. Sie wurden

⁹⁾ Auf die Wiedergabe dieser Aufnahme verzichten wir, da die eng nebeneinanderliegenden Interferenzen bei der Reproduktion nicht getrennt erscheinen. Eine viel bessere Darstellung wird in solchen Fällen durch die Photometerkurve ermöglicht (Abb. 3).

durch Vermessung der Röntgenaufnahmen mit einem Zeisschen Meßmikroskop erhalten. Außerdem stellten wir von den Aufnahmen mittlerer und hoher Auflösung Photometerkurven mit großem Übersetzungsverhältnis her (Abb. 2 und 3), deren Vermessung ebenfalls zu den D -Werten führt. Es zeigt sich indessen, daß die auf dem Umweg über die Photometerkurven erhaltenen Werte offenbar weniger genau sind, d. h. schlechter in eine sich zwanglos ergebende Zuordnung passen. Der Grund ist wohl in den durch die Korngröße

bedingten Schwankungen zu suchen, die bei der Photometrierung entlang einer bestimmten Linie (z. B. AB in Abb. 1) auftreten, während das Auge bei der mikroskopischen Vermessung über die ganze Länge der Interferenz mittelt und so genauer den Abstand der Schwerlinie der Interferenz von der Mitte der Aufnahme mißt. In Tab. 2 sind daher nur die durch mikroskopische Vermessung erhaltenen Werte wiedergegeben. Zu bemerken ist, daß der mit 642 \AA angegebene Reflex nur ungenau zu vermessen war, weil er gerade an der inneren Grenze des Röntgenbildes lag und ein

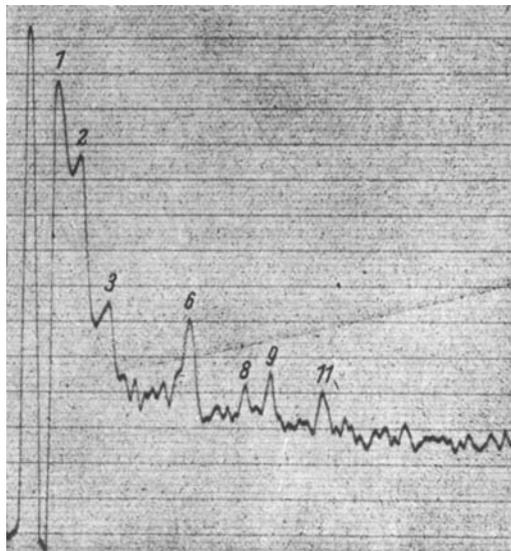


Abb. 3. Photometerkurve der Röntgenaufnahme hoher Auflösung einer Känguruh-Schwanzsehne. Übersetzungsverhältnis der Reproduktion = 9,65. Die Ziffern bedeuten die Ordnung der Reflexe

kleiner dadurch bedingter Meßfehler den D -Wert schon beträchtlich fälscht, weil die Absolutentfernung von der Bildmitte sehr klein ist. An der Existenz des Reflexes besteht keinerlei Zweifel, wie auch die Photometerkurve (Abb. 3) zeigt; lediglich der genaue Wert ist noch nicht rein experimentell festgelegt; er könnte sich in einem Bereich von etwa 630 bis 650 \AA bewegen. Wir werden also den Tatsachen besser gerecht, wenn wir den nach den anderen Netzebenenabständen zu erwartenden Wert von 642 \AA nur als mit dem Experiment. verträglich bezeichnen.

Sämtliche Reflexe lassen sich in einfachster Weise als verschiedene Ordnungen der Grundperiode von 642 \AA indizieren. Tab. 2 gibt außer den Ordnungen n die gemäß $642/n$ berechneten D -Werte an. Wir sehen,

¹⁰⁾ Möglicherweise kein Meridian, sondern Schichtlinienreflex.

Tabelle 2

<i>D</i> exp.	Ordnung <i>n</i>	$\frac{642}{n}$	Intensität	<i>D</i> exp.	Ordnung <i>n</i>	$\frac{642}{n}$	Intensität
642	1	642	s. st.	53,4	12	53,5	schw.
321	2	321	s. st.	36,6	18	35,7	schw.
214,5	3	214	s. st.	32,2	20	32,1	<i>m</i>
160,5	4	160,6	schw.	24,2	26	24,7	s. schw.
128,3	5	128,4	schw.	21,6	30	21,4	s. schw.
107,8	6	107	s. st.	(8,00)	80	(8,03) ¹⁰⁾	schw.
90,7	7	91,7	schw.	4,52	140	4,58	s. schw.
79,4	8	80,3	st.	4,00	160	4,01	schw.
70,7	9	71,3	st.	3,51	180	3,57	s. schw.
58,3	11	58,3	<i>m</i> - st.	2,88	220	2,92	st.

daß die Abweichungen gegenüber den gemessenen Werten meist unter 1% liegen. Dabei wird man die Indizierung bis zur 20. Ordnung als sicher bezeichnen dürfen, während bei den kleineren Netzebenenabständen die Meßgenauigkeit zu einer völlig sicheren Festlegung noch nicht ausreicht. Z. B. könnte für sich allein betrachtet der Reflex $D = 2,88 \text{ \AA}$ ebensogut die 222. Ordnung ($D = \frac{642}{222} = 2,89$) darstellen. Die gewählten Interpretationen sind aber, im ganzen Zusammenhang betrachtet, wohl die plausibelsten. Wenn die 11. und 20. Ordnung vor den benachbarten Ordnungen besonders ausgezeichnet ist, dann ist, um beim gewählten Beispiel zu bleiben, das Auftreten einer $11 \times 20 = 220$. Ordnung wahrscheinlicher, als das etwa der 221. oder 222.

Die *n*-Werte, welche intensiveren Reflexen (mittel bis sehr stark) entsprechen, sind, um eine bessere Übersicht zu gewinnen, unterstrichen. Außerdem enthält die letzte Spalte die roh geschätzten Intensitäten.

Der Vergleich mit den Daten von Wyckoff und Corey läßt eine sehr große Ähnlichkeit erkennen, wie die Zusammenstellung in Tab. 3 zeigt. Es entspricht unverkennbar jedem Reflex bei Wyckoff und Corey einer

Tabelle 3

Vergleich unserer *D*-Werte mit den von Wyckoff und Corey gemessenen

Wyckoff u. Corey	Kratky u. Sekora	Wyckoff u. Corey	Kratky u. Sekora
2,91	2,88	70,1	70,7
	3,51		79,4
4,03	4,00		90,7
	4,52	103	107,8
7,21	8,00		128,3
21,6	21,6		160,5
26,9	24,2		214,5
33,6	32,2		321
	36,6		642
54,6	53,4		
	58,3		

auf unseren Aufnahmen, wenn auch Unterschiede vorhanden sind, die jedenfalls zum Teil außerhalb der Unsicherheit in der Vermessung unserer Werte liegen, (107,8 gegenüber 103 usw.). Die Ursache für diese Unterschiede ist uns nicht bekannt.

Außerdem sind von uns auch im Bereich bis 107,8 Å einige bei den amerikanischen Autoren noch fehlende Reflexe festgestellt worden und schließlich jenseits dieses Bereiches die großen *D*-Werte, deren Auffindung das experimentelle Ziel der Untersuchung war.

Vorläufige Diskussion der Röntgenergebnisse im Hinblick auf die chemische Zusammensetzung

Wenn wir uns das durch frühere Untersuchungen³⁾ gesicherte Ergebnis daß der höchst indizierte Reflex von 2,88 Å der Länge eines Aminosäurerestes entspricht, zu eigen machen, so können wir die Grundperiode der Länge einer Kette von 220 Resten gleichsetzen. Die erste Frage ist nun ob wir damit die Länge des Moleküls erfaßt haben oder diese 220 Reste nur einen Ausschnitt, d. h. eine sich wiederholende Gruppierung von Aminosäureresten in einem vielleicht noch viel längeren Molekül darstellen. Dazu ist zu sagen, daß die große Intensität der ersten Ordnung jedenfalls für eine sehr deutliche Markierung der Enden dieser Gruppe spricht lediglich der Wiederbeginn eines Zyklus in der Aufeinanderfolge der Aminosäurereste einer monoton fortlaufenden Kette kann die hohe Intensität der niederen Ordnung schwerlich erklären. Wir wollen uns mit diesem Hinweis begnügen, da uns weitergehende Folgerungen verfrüht erscheinen.

Die zweite bis fünfte Ordnung stellt einen normalen Abfall der Intensität dar. Das intensive Auftreten der sechsten, achten, neunten, elften und zwanzigsten Ordnung muß besondere Gründe haben. Es liegt nahe, im Sinne von Astbury und der amerikanischen Autoren an Periodizitäten zu denken, die durch die regelmäßigen Abstände der Reste einer bestimmten Aminosäure hervorgerufen werden.

Um derartige Fragen zu prüfen, sind in Tab. 4 für die verschiedenen Aminosäuren auf Grundlage der Analysen von Bergmann und Niemann

Tabelle 4

Aminosäure	Frequenz exp.	Zähligkeit 220 = Frequenz	Aminosäure	Frequenz exp.	Zähligkeit 220 = Frequenz
Histidin	183	1,2	Alanin	10,8	20,4
Asparaginsäure	42	5,24	Oxyprolin	9,63	22,8
Lysin	26,5	8,3	Prolin	6,24	35,2
Leucin, Isoleucin	19,0	11,2	Glycin	3,12	70,5
Arginin	20,4	10,7			

die „Zähligkeiten“ berechnet, d. h. Anzahl der Reste angegeben, die auf ein „Molekül“ aus 220 Resten entfallen, also entlang der Grundperiode verteilt werden müssen. Man erhält sie sofort als Quotient aus 220 und der „Frequenz“. Natürlich sind die so berechneten Zähligkeiten mit den Analysenfehlern behaftet, und es darf eine Schlußfolgerung daher nur mit allem Vorbehalt geschehen. Immerhin fällt auf, daß zwei Aminosäuren mit großen Seitenketten, nämlich Arginin und die Leucin-Isoleucinfraktion Zähligkeiten aufweisen, die der ganzen Zahl 11 am nächsten liegen; ferner zeigt Alanin eine Zähligkeit bei 20, Lysin eine zwischen 8 und 9. Es wird damit nahegelegt, die hohe Intensität der neunten, elften und zwanzigsten Ordnung mit der regelmäßigen Wiederkehr der betreffenden Aminosäuren in der Kette in Zusammenhang zu bringen. Es scheint recht unwahrscheinlich, daß dieses Zusammenfallen der Zähligkeiten mit den intensiv auftretenden Ordnungen ein bloßer Zufall ist, und wir sind wohl zur Hoffnung berechtigt, darin eine Handhabe zu besitzen, die tiefer in die Struktur des Moleküls hineinführen wird.

Natürlich können auch Periodizitäten in der Gesamtform der Kette zu einer hohen Intensität eines Reflexes führen. Ob z. B. die sechste, so auffallend intensive Ordnung mit der wenigstens in der Nähe von 6 liegenden Zähligkeit der Asparaginsäure zusammenhängt oder die Kettenform eine Sechszähligkeit zeigt, muß dahingestellt bleiben.

Interessant ist Histidin mit seiner Zähligkeit von 1,2. In Anbetracht der Unsicherheit, mit welcher die Analyse solcher Spuren behaftet ist, könnte auch der Wert 1 zutreffen, also 1 Molekül immer einen Histidinrest enthalten.

Im Hinblick auf die Regel von Bergmann und Niemann sowie die vorhergehenden röntgenographischen Untersuchungen ist zu sagen:

1. Es erscheint von den aus den Analysenzahlen berechneten Frequenzen zumindest bei 10,8, 20,4 und 19,6 etwas gewagt, sie in Werte umzudeuten, die durch $2^m 3^n$ ausdrückbar sind, also 9, 18 und 18. Vielmehr legt das intensive Auftreten der 20. und 11. Ordnung die Frequenzen $\frac{220}{20} = 11$ und $\frac{220}{11} = 20$ nahe. Hinsichtlich der Frage, ob die Bergmann-Niemannsche Regel damit widerlegt ist, wird man sich wohl noch Zurückhaltung auferlegen müssen. Die mitgeteilten Ergebnisse sprechen aber eher gegen die Allgemeingültigkeit dieses Prinzips.

2. Die Astburysche Auffassung, daß die Grundperiode ein Vielfaches des größten von Wyckoff und Corey gefundenen Wertes sein müsse, hat sich als zutreffend erwiesen. Der von Astbury auf Grundlage der Bergmann-Niemannschen Regel versuchsweise angenommene spezielle Wert von 838 Å ist aber unrichtig.

3. Der von Clark, Parker, Schaad und Warren aufgefundene Netzebenenabstand von 432 Å konnte von uns nicht bestätigt werden.

Herr Professor Thießen hat die Entwicklung der Kleinwinkelmethode in großzügiger Weise gefördert, wofür wir ihm auch an dieser Stelle unseren ergebensten Dank sagen.

Die vorliegende Untersuchung wurde dadurch ermöglicht, daß uns von Herrn Dr. Heck, Direktor des Berliner Zoologischen Gartens und der Direktion des Zoologischen Museums Berlin ein frischer Känguruh-Schwanz überlassen werden konnte. Wir sind dafür zu großem Dank verpflichtet.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat in dankenswerter Weise einem von uns (S.) ein Stipendium verliehen und Sachbeihilfen zur Verfügung gestellt.

Bei der Präparierung des Objektes durften wir uns der wertvollen Hilfe von Herrn Dr. Friedrich-Frekša erfreuen.

Mitteilung aus dem Institut für Chemische Technik der Technischen Hochschule
Karlsruhe/Baden

Über Protopektin und Protocellulose

Von F. A. Henglein

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 26. Juni 1943)

1. Protopektin

In den Kreisen, die Pektine aus Pflanzen laboratorienmäßig oder technisch gewinnen, ist heute die einstimmige Auffassung vorhanden, daß die erhaltenen Pektine in irgendeiner Form Abbaustoffe der in der Pflanze vorhandenen Pektine sind, daß diese Abbaupektine mit der Pflanzenart variieren und daß selbst innerhalb derselben Pflanze die Pektine verschiedener Art und teilweise Abbaustoffe eines Urpektins sind, das auch als Protopektin (natives Pektin, genuines Pektin) bezeichnet wird. Die Frage nach dem chemischen Aufbau des Protopektins der Pflanze ist schon oft sowohl von Botanikern wie Chemikern gestellt worden; der Zweck dieser Abhandlung ist, ebenfalls einen Beitrag zur Beantwortung dieser Frage zu liefern und zwar unter dem Gesichtspunkte, daß die Pektine makromolekulare Stoffe sind, wie von F. A. Henglein¹⁾ und Mitarbeitern auf Grund von Nitrierungen²⁾ experimentell bewiesen wurde.

a) Das Protopektin in der Ehrlichschen Konstitutionsauffassung der Pektine³⁾

Pektin ist nach botanischer Auffassung neben Cellulose ein wesentlicher Bestandteil der Zellwandung im Nährgewebe der grünen Pflanzen