

# Röntgenkleinwinkelmessungen an Ferritin in Lösung<sup>1</sup>

Von

H.-J. Bielig, O. Kratky, H. Steiner und H. Wawra

Aus dem Institut für physikalische Chemie der Universität Graz und dem  
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg

(Eingegangen am 7. August 1963)

Das vorwiegend aus Pferdemilz kristallin isolierte, in frisch abge-  
schiedenem Zustand wasserlösliche Eisenspeicherprotein Ferritin (Fe-  
Gehalt um 20%) besteht aus der Proteinkomponente Apoferritin (Mol-  
Gew. 460 000—480 000) und Eisen(III)-oxydhydrat-Micellen<sup>2</sup>. Es läßt  
sich partialsynthetisch aus Eisen(II)-ammoniumsulfat und Apoferritin  
an Luft bei pH 7,2 darstellen<sup>3</sup>, so daß das in natürlichen Präparaten  
gefundene Phosphat<sup>4</sup> (im Mittel 1,1% P) kein integrierender Bestand-  
teil des Ferritins sein muß.

Ferritin ist schon mit verschiedenen physikalischen Methoden stu-  
diert worden, wie der Ultrazentrifuge<sup>5</sup>, dem Elektronenmikroskop<sup>6</sup> und  
auch der Röntgenkristallstrukturanalyse<sup>7</sup>.

Die vorliegende Röntgenkleinwinkelanalyse von Ferritin — soweit  
uns bekannt, die erste ihrer Art — ist vollständig, was die Bestimmung

<sup>1</sup> Ergebnisse der vorliegenden, im wesentlichen 1959—1960 ausgeführten  
Untersuchungen wurden bereits mitgeteilt bei O. Kratky, Makromol. Chem.  
35 A, 12 (1960); Angew. Chem. 72, 474 (1960); H.-J. Bielig und H. Steiner,  
Dissertation H. Steiner, Univ. Freiburg i. Br. 1961.

<sup>2</sup> Zusammenfassende Darstellungen mit ausführlichen Literaturhinweisen  
bei S. Granick, Chem. Reviews 38, 379 (1956); H.-J. Bielig und E. Bayer, in  
Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handb. physiol. u. pathol.-chem. Analyse, 10. Aufl.,  
Bd. IV, S. 714 (dort S. 732), Springer-Verlag, Heidelberg 1960.

<sup>3</sup> H.-J. Bielig und E. Bayer, Naturwissensch. 42, 125 (1955); M. W. Loewus  
und R. A. Fineberg, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] 26, 441 (1957).

<sup>4</sup> S. Granick und P. F. Hahn, J. biol. Chem. 155, 661 (1944).

<sup>5</sup> A. Rothen, J. biol. Chemistry 152, 679 (1944).

<sup>6</sup> J. L. Farrant, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] 13, 569 (1954);  
L. W. Labaw und R. W. G. Weyckoff, ebenda 25, 263 (1957).

<sup>7</sup> I. Fankuchen, J. biol. Chem. 150, 57 (1943); D. C. Hodgkin, Cold  
Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 14, 65 (1949); P. M. Harrison, J. molecu-  
l. Biol. 1, 69 (1959).

der Gestalt, des Streumassenradius des Gesamtmoleküls und des Eisenoxydhydratkerns sowie des „reduzierten“ Molekulargewichtes  $M_r$  betrifft.

### Methodik

*Ferritin-Präparat:* Es war in Anlehnung an die Angaben von *Granick* und *Michaelis*<sup>8</sup> aus frischer Pferdemilch isoliert, mehrmals mit Ammoniumsulfat (35proz. Sättigung) gefällt, in destill. Wasser gelöst, dialysiert, zentrifugiert und elektrophoretisch<sup>9</sup> auf Einheitlichkeit geprüft worden: Fe 17,7, N 11,6, S 1,0% (gefrieretrocknetes, bei 65°/12 Torr nachgetrocknetes Präparat). Die verwendete wäßrige Lösung hatte einen Gehalt von 21,4 mg Ferritin/ccm; sie wurde zu den Messungen entsprechend verdünnt.

*Röntgenkleinwinkel-Messungen:* Sie wurden mittels einer beststabilisierten Röntgenanlage durchgeführt (Röntgenröhre mit Kupferanode). Die verwendete Kamera war die bereits beschriebene, nahezu blendenstreuungsfreie Type<sup>10</sup>. Die Intensitätsmessung des monochromatischen Anteils der Streuung erfolgte mit einem Proportionalzählrohr mit Impulshöhendiskriminator. Die definierte Schwächung des Primärstrahles, wie sie für eine Absolutmessung erforderlich ist, wurde mit der „Rotatormethode“<sup>11</sup> vorgenommen.

### Ergebnisse und Diskussion

Um den interpartikulären Interferenzeffekt möglichst niedrig zu halten, untersuchten wir stark verdünnte Lösungen (Ferritin-Gehalt 0,237, 0,150 und 0,0734%). Die erhaltenen Streukurven besitzen durchweg exakt *gaußförmigen* Verlauf. Sie zeigen so, daß das *Ferritin-Molekül ein fast isometrisches Teilchen* sein muß. Als Streumassenradius ergab sich bei den angegebenen Konzentrationen:  $R = 37,7, 37,3$  und  $37,3 \text{ \AA}$ . Wir möchten danach den Wert  $R = 37,3 \text{ \AA}$  als gültig ansehen.

Um zu näheren Aussagen über die im Ferritin-Molekül enthaltenen *Eisenoxydhydrat-Micellen* zu gelangen, mußte die Röntgenkleinwinkelstreuung der Proteinkomponente (Apo ferritin) unterdrückt werden. Dies gelang durch Zugabe von Saccharose bis zu einem Gehalt von 66,65 Gew.%. Eine derartige Rohrzucker-Lösung besitzt die gleiche Elektronendichte (0,716) wie reines Apoferritin und bewirkt so, daß dessen Klein-

<sup>8</sup> *S. Granick* und *L. Michaelis*, J. biol. Chem. **147**, 91 (1943).

<sup>9</sup> *W. Keiderling* und *F. Wöhler*, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Pathol. Pharmacol.* **221**, 418 (1954).

<sup>10</sup> *O. Kratky*, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **58**, 49 (1954); **62**, 66 (1958); Kolloid-Z. **144**, 110 (1959); *O. Kratky* und *A. Sekora*, Mh. Chem. **85**, 660 (1954); *O. Kratky* und *Z. Skala*, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **62**, 73 (1958).

<sup>11</sup> *O. Kratky* und *H. Wavra*, Mh. Chem. **94**, 981 (1963); vgl. auch *O. Kratky*, Makromolek. Chem. **35 A**, 12 (1960).

winkelstreuung verschwindet. Der noch verbleibende Kleinwinkeleffekt rührt nur mehr von den im Molekül vorhandenen Eisenoxydhydrat-Micellen her. Ihre Streukurve erwies sich ebenfalls als exakte *Gaußsche* Glockenkurve. Der Streumassenradius war aber wesentlich kleiner als der des gesamten Ferritin-Moleküls, nämlich  $R = 29,4 \text{ \AA}$ . Das läßt den Schluß zu, daß der Eisen-Anteil im Inneren des Moleküls angeordnet ist, wie es auch die Deutung der elektronenmikroskopischen und der Röntgenkristallstruktur-Befunde durch *Muir*<sup>12</sup> fordert.

Als reduziertes Molekulargewicht  $M_r$  bezeichnen wir das bei der Auswertung der Absolutmessungen (Quotient von gestreuter Energie und Energie des Primärstrahls) auftretende Produkt:

$$M_r = M (z_1 - \bar{v}_1 \rho_2)^2 \quad (1)$$

In Gleichung (1) ist  $M$  das wahre Molekulargewicht,  $z_1$  die Zahl der Elektronenmole je 1 g Ferritin,  $\bar{v}_1$  dessen partielles spezif. Volumen und  $\rho_2$  die Elektronendichte des als Lösungsmittel verwendeten Wassers.

Der Klammerausdruck hängt sehr empfindlich von  $\bar{v}_1$  ab, und das wahre Molekulargewicht kann ein hohes Vielfaches des reduzierten Molekulargewichtes darstellen. Da weder die bisher angegebenen<sup>5</sup> noch die selbst gemessenen Werte für  $\bar{v}_1$  die notwendige Präzision erreichen, begnügen wir uns damit, den Ausdruck (1) entsprechend

$$M (z_1 - \bar{v}_1 \rho_2)^2 = 21,0 \frac{I_0}{P_0} \frac{a^2}{D \cdot c} \quad (2)$$

zu berechnen<sup>13</sup> und lassen die Ermittlung des wahren Molekulargewichtes selbst noch offen.

In Gleichung (2) bedeuten  $I_0$  die auf den Winkel Null extrapolierte Streuintensität bei Verwendung eines Primärstrahls von punktförmigem Querschnitt,  $P_0$  die Energie des Primärstrahls je Längeneinheit (gemessen in der Registrierebene),  $D$  die Dicke des Präparates (cm),  $c$  die Konzentration der Ferritin-Lösung ( $\text{g/cm}^3$ ) und  $a$  den Abstand Präparat—Registrierebene (cm).

Für das reduzierte Molekulargewicht ergab sich der Wert  $M_r = 20100$ .

Die Untersuchungen an Ferritinen verschiedenen Eisengehaltes und am Apoferritin werden fortgesetzt.

*O. Kratky* dankt der Rockefeller Foundation für die Förderung der Untersuchung durch Bereitstellung apparativer Behelfe.

*H. Steiner* hat der Dr.-Karl-Merck-Stiftung sehr für die Gewährung eines Stipendiums zu danken.

<sup>12</sup> *A. R. Muir*, Quart. J. exper. Physiol. **45**, 192 (1960).

<sup>13</sup> Näheres bei *O. Kratky*, *G. Porod* und *L. Kahovec*, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **55**, 53 (1951). — Die ersten Molekulargewichtsbestimmungen an Proteinen nach dieser Methode sind diejenigen von *Edestin*, *J. C. Cleemann* und *O. Kratky*, Z. Naturforsch. **15 b** 525 (1960), und von  $\alpha_2$ -Globulin, *O. Kratky* und *W. Kreuz*, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **64**, 880 (1960).