

Röntgenkleinwinkelstreuung an Hexon aus Adenovirus Typ 2*

Von

Birgit Tejg-Jensen**, B. Furugren, I. Lindqvist*** und L. Philipson †

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 1. Februar 1972)

Small Angle X-Ray Study of Adenovirus Type 2 Hexon

The small angle scattering of hexon dissolved in ammonium acetate buffer was investigated. The radius of gyration was found to be 47 Å and the radius of gyration of the cross-section 30 Å. If the molecules are cylindrical or prismatic, as indicated by the electron microscopy, the length of the molecule would be 125 Å. The results indicate that the hexon molecule in solution has the same shape as found by electron microscopy.

Die Kleinwinkelstreuung von Hexon in Ammoniumacetatpuffer wurde untersucht. Aus den Streukurven wurden der Streumassenradius zu 47 Å und der Querschnittsstreumassenradius zu 30 Å ermittelt. Wenn die Moleküle zylindrisch oder prismatisch sind, wie die Elektronenmikroskopiestudien andeuten, wäre die Länge des Moleküls 125 Å. Die Ergebnisse zeigen, daß das Hexonmolekül in Lösung dieselbe Form hat, wie mit Elektronenmikroskopie gefunden wurde.

Einleitung

Das Hexon der Adenoviren macht den Hauptanteil an Capsid-Protein dieser Klasse großer ikosaedrischer DNS-Viren aus. Das Hexon des Adenovirus Typ 2 wurde mittels verschiedener physikalischer und chemischer Methoden untersucht. Eine Zusammenfassung findet man an anderer Stelle¹. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit sind die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von besonderem Interesse^{2,3}.

* Herrn Prof. Dr. O. Kratky zum 70. Geburtstag gewidmet.

** Abteilung für Anorganische Chemie der Universität, DK-8000 Aarhus, Dänemark.

*** Abteilung für Chemie, Hochschule für Agrikultur, S-750 07, Uppsala 7, Schweden.

† Abteilung für Mikrobiologie, Universität Uppsala, S-752 37 Uppsala, Schweden.

Ziel der vorliegenden Röntgenkleinwinkeluntersuchung war es, festzustellen, ob die Hexonmoleküle in Lösung dieselbe Gestalt haben, wie es die Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop vermuten lassen.

Experimentelles zur Röntgenmethode

Die Streukurven wurden mit einer *Kratky*-Kamera aufgenommen. Die Kamera war mit einem mechanischen Schrittzähler ausgestattet und an der Breitseite des Focus einer Cu-Röntgenröhre angebracht. Die Abmessungen des Focus betragen $2 \times 12 \text{ mm}^2$. Auf diese Weise erhielten wir einen Primärstrahl „unendlicher“ Länge.

Die gestreute Strahlung wurde mit einem Proportionalzähler in Verbindung mit einem Impulshöhendiskriminator registriert. Die Proben befanden sich in *Mark*-Kapillaren, Durchmesser 0,1 cm. Die Temperatur betrug 22°C .

Es wurden zwei Reihen von Meßkurven aufgenommen: 1. Hexonkonzentration $4,0 \text{ mg/cm}^3$. Eintrittsspalt 60μ . Zählerspalt $0,0130 \cdot 1 \text{ cm}^2$. Der K_β -Beitrag zur gemessenen Intensität wurde durch ein Rechenverfahren⁴ eliminiert. Die Intensitäten im Winkelbereich unter $3 \cdot 10^{-3} \text{ rad}$ wurden mit $4 \cdot 10^4$ vorgegebenen Impulsen gemessen. Im restlichen Bereich wurden $2 \cdot 10^4$ Impulse vorgegeben.

2. Hexonkonzentration $6,6 \text{ mg/cm}^3$. Eintrittsspalt 150μ . Zählerspalt $0,0325 \cdot 1 \text{ cm}^2$. Zur Absorption der K_β -Strahlung wurde eine 20μ starke Nickelfolie in den Weg des Primärstrahls eingebracht. Zur Registrierung aller Intensitäten wurden 10^5 Impulse vorgegeben. Die Streukurven wurden viermal aufgenommen. (Die endgültigen Messungen wurden alle in Aarhus durchgeführt, die meisten Voruntersuchungen fanden hingegen in Uppsala statt.)

Bereitung der Hexonproben

Die Reinigung des Hexons erfolgte nach dem Verfahren von *Pettersson* und Mitarb.², in dem als letzter Reinigungsschritt präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet wird¹.

Auf diesem Wege hergestelltes Hexon ist nach folgenden Kriterien homogen: analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei pH 8,0 und pH 9,5; Immunelektrophorese; Ultrazentrifugierung¹ und Elektronenmikroskopie². Die Hexonpräparate wurden durch Druckdialyse auf 4 bis 6 mg/cm^3 konzentriert und 48 Stdn. gegen 0,01M-Ammonacetatpuffer, pH 6,5, dialysiert. Einige Präparate wurden zum Schutz gegen Bakterien mit 0,1% (Gew/Vol) NaN_3 versetzt.

Ergebnisse

Im folgenden werden die gemessenen Intensitäten und die aus den experimentellen Kurven abgeleiteten Größen durch einen Querstrich über dem entsprechenden Symbol gekennzeichnet.

Die Streukurve der Hexonlösung der Konzentration $6,6 \text{ mg/cm}^3$ zeigt sehr geringe Submaxima (Abb. 1). Die Kurve wurde mittels der

Programme von *Heine* und *Roppert*^{5, 6} und *Kornerup*⁷ entschmiert. Das *Guinier*-Diagramm der Streumassenquerschnittsfunktion (Abb. 2) zeigt einen linearen Bereich, der bei einem Winkel beginnt, der einem D -Ab-

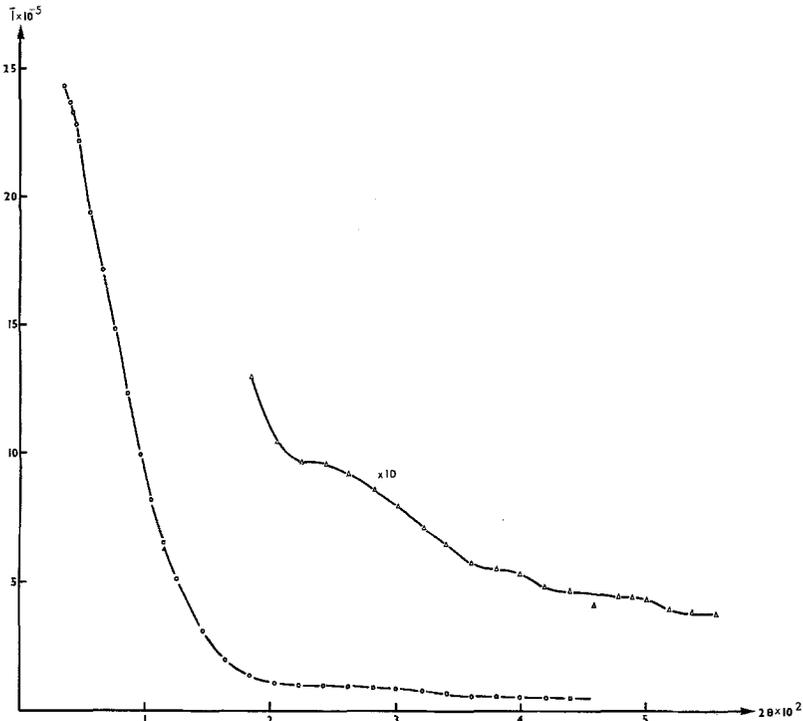


Abb. 1. Gemessene Streukurve. Konzentration $6,6 \text{ mg/cm}^3$ ○. In der mit △ bezeichneten Kurve ist der Intensitätsmaßstab auf das Zehnfache vergrößert

stand von 80 \AA entspricht. Aus der negativen Steigung p der Geraden wurde ein Querschnittsstreumassenradius R_q berechnet.

$$R_q = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{2}{0,4343} \cdot p}$$

Aus den drei Kurven berechneten wir folgende Werte:

$R_q = 29,8 \text{ \AA}$: *Heine* und *Roppert*, graphische Tangentenbestimmung.

$R_q = 30,1 \text{ \AA}$: *Heine* und *Roppert*, analytische Tangentenbestimmung.

$R_q = 29,9 \text{ \AA}$: *Kornerup*.

Aus den *Guinier*-Diagrammen der Hexonlösung mit $4,0 \text{ mg/cm}^3$ (Abb. 3) berechneten wir den Streumassenradius

$$\bar{R} = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{3}{0,4343} \cdot p}$$

p ist die negative Steigung der Geraden.

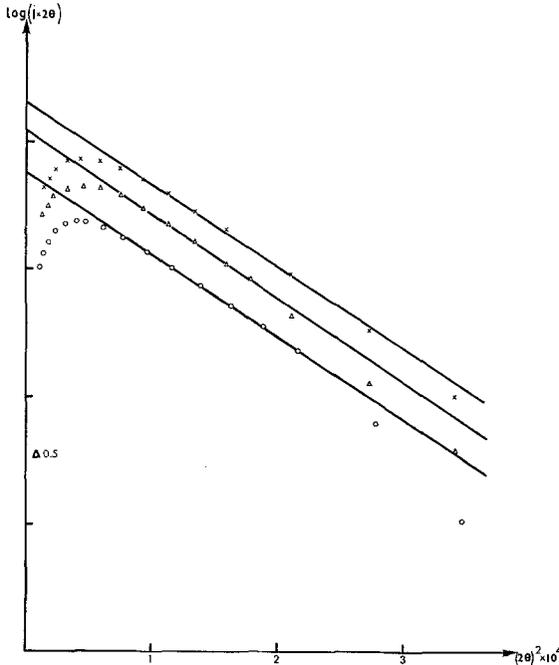


Abb. 2. *Guinier*-Diagramm der Streumassenquerschnittsfunktion. Konzentration $6,6 \text{ mg/cm}^3$. Die Kurven zeigen den Erfolg dreier Entschmierverfahren. *Heine* und *Roppert*, analytische Tangentenbestimmung \times ; *Heine* und *Roppert*, graphische Tangentenbestimmung Δ ; *P. Kornerup* und *B. T. Jensen* \circ . Die Kurven sind in Richtung der Ordinate willkürlich gegeneinander verschoben

Die abgeleiteten Größen sind:

$\bar{R} = 46,3 \text{ \AA}$ aus der gemessenen Streukurve,

$\bar{R} = 46,2 \text{ \AA}$ aus der Streukurve unter rechnerischer Berücksichtigung der β -Strahlung.

Die Abweichung vom Verlauf der Geraden im Bereich kleinster Winkel könnte durch interpartikuläre Interferenz verursacht werden.

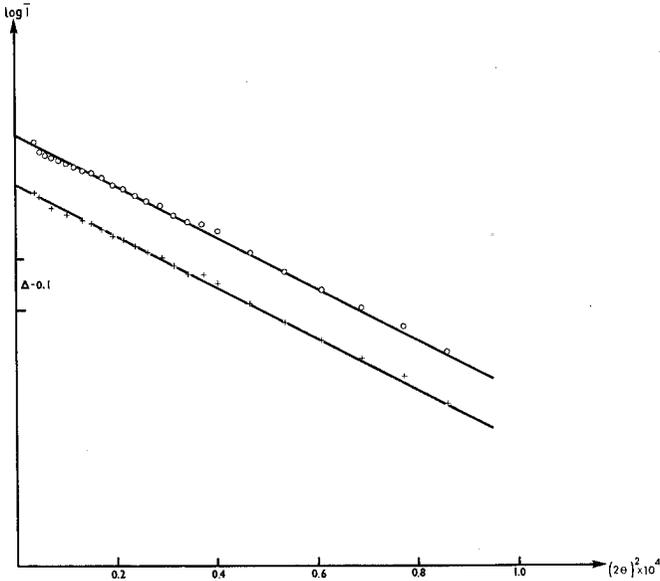


Abb. 3. *Guinier*-Diagramm der gemessenen Streukurve vor \circ und nach $+$ Monochromatisierung. Konzentration $4,0 \text{ mg/cm}^3$. Die Kurven sind in Richtung der Ordinate willkürlich verschoben

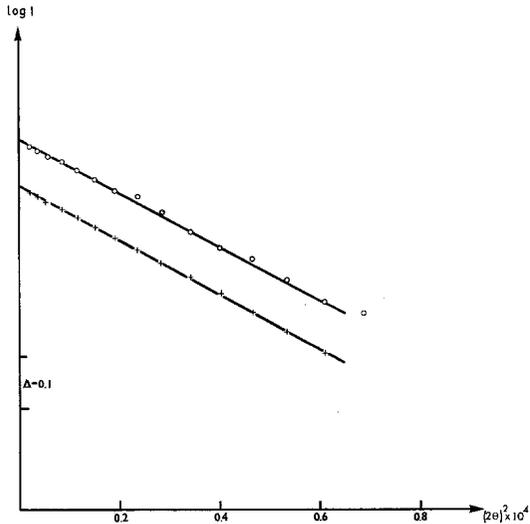


Abb. 4. *Guinier*-Diagramm der Streukurve nach Glätten, Monochromatisieren und Entschmieren \circ bzw. nach Monochromatisieren, Glätten und Entschmieren $+$. Konzentration $4,0 \text{ mg/cm}^3$. Die Kurven sind in Richtung der Ordinate willkürlich verschoben

(Die Konzentrationsabhängigkeit soll in einer folgenden Arbeit untersucht werden.)

Die Streukurven wurden mittels des Programmes von *Schmidt*⁸ entschmiert.

Aus den *Guinier*-Diagrammen berechneten wir folgende Streumassenradien (Abb. 4):

$R = 46,6 \text{ \AA}$: Glätten, Monochromatisieren und Entschmieren.

$R = 47,0 \text{ \AA}$: Monochromatisieren, Glätten und Entschmieren.

Diskussion

Der lineare Teil im *Guinier*-Diagramm der Streumassenquerschnittsfunktion zeigt, daß man die Hexonmoleküle näherungsweise als zylindrisch oder prismatisch beschreiben kann. Aus den Werten $R = 47 \text{ \AA}$ und $R_q = 30 \text{ \AA}$ berechnet sich die Länge des Moleküls zu 125 \AA .

$$L = \sqrt{(R^2 - R_q^2)/12}$$

Dieser Wert stimmt gut mit den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie überein, nach denen die längste Dimension 120 \AA beträgt. Ein Molekül von der Gestalt eines Ellipsoids müßte wesentlich länger sein und kann daher mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Das *Guinier*-Diagramm der Streumassenquerschnittsfunktion (Abb. 2) zeigt im Bereich größerer Streuwinkel eine negative Abweichung vom Verlauf der Geraden. Man kann also auf einen ziemlich regelmäßig geformten Querschnitt schließen. Im augenblicklichen Stadium unserer Untersuchungen ist es nicht möglich, zwischen verschiedenen Modellen, wie nahezu regelmäßiger Kreiszyylinder, nahezu regelmäßiger dreiseitiger Kubus oder hexagonales Prisma, zu unterscheiden. Wir können jedoch, von verschiedenen Annahmen ausgehend, einige Berechnungen anstellen. Ein voller Kreiszyylinder $R_q = 30 \text{ \AA}$ führt zu einem Radius von 42 \AA . Ein entsprechender Hohlzyylinder, dessen lichte Weite ein Drittel des Außenradius ausmachen möge, ergäbe einen Radius von 40 \AA . Offensichtlich hängt also der Außendurchmesser nicht stark von einer Höhlung des Zylinders ab ($80\text{--}84 \text{ \AA}$). Ein quadratisches Prisma würde zu geringeren Ausmaßen ($73\text{--}74 \text{ \AA}$) führen, ein hexagonales Prisma zu dazwischenliegenden Werten. Der auf elektronenmikroskopischem Weg gefundene Wert ist 80 \AA , und *Höglund*³ beschreibt die Struktur folgendermaßen: „Das Hexon sah aus wie ein Hohlprisma mit hexagonalem Umriß.“ Es ergibt sich also sehr gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie und denen der Röntgenkleinwinkelstreuung. Beide Methoden weisen darauf hin, daß Hexonmoleküle in Lösung dieselbe Gestalt haben, wie man sie unter dem Elektronenmikroskop beobachtet.

Es sei hier noch eine andere interessante Beobachtung erwähnt. Durch Gelfiltration wurde der *Stokessche* Radius des Moleküls in Lösung bestimmt¹. Das heißt, die Gelfiltration wurde mit Proteinen „geeicht“, deren *Stokessche* Radien bekannt sind, und hieraus für Hexon ein *Stokesscher* Radius von 60,3 Å ermittelt. Diesen Radius besäße das Molekül, wäre es kugelförmig. Ein derartiger Radius läßt sich auch aus dem Streumassenradius berechnen. Sein Wert wäre 61 Å. Diese Übereinstimmung ist verblüffend gut und vielleicht nur zufällig, jedoch dürfte man auf Grund dieser Ergebnisse eine in größerem Maße stattfindende äußere Hydratisierung am Hexonmolekül ausschließen.

Wir haben vor, wenn es gelingt höherkonzentrierte Lösungen herzustellen, die Streukurven genauer und im Bereich größerer Streuwinkel zu messen und hoffen, dann mehr über die Struktur dieser Moleküle zu erfahren.

Wir danken Herrn Dr. *Stefan Höglund* für die wertvollen Diskussionen beim Vergleich unserer Ergebnisse mit denen der Elektronenmikroskopie. Die Autoren möchten auch Fr. *Genomarta Ponce* für ihr technisches Geschick, mit dem sie uns half, danken. Einer von uns (*B. T. J.*) dankt Herrn Prof. *S. E. Rasmussen* für die ermutigenden Diskussionen und Ratschläge für ihre Arbeit mit der Röntgenkleinwinkelstreuung. Der Staatliche Dänische Wissenschaftsfonds hat die Kosten für die Röntgenkleinwinkelapparatur in Aarhus getragen.

Literatur

- ¹ *R. M. Franklin, U. Pettersson, K. Akervall, B. Strandberg* und *L. Philipson*, *J. Mol. Biol.* **57**, 383 (1971).
- ² *U. Pettersson, L. Philipson* und *S. Höglund*, *Virology* **33**, 575 (1967).
- ³ *S. Höglund*, *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.* **36 B**, 146 (1970).
- ⁴ *P. Zipper*, *Acta Phys. Austriaca* **30**, 143 (1969).
- ⁵ *S. Heine* und *J. Roppert*, *Acta Phys. Austriaca* **15**, 148 (1962).
- ⁶ *S. Heine*, *Acta Phys. Austriaca* **16**, 144 (1963).
- ⁷ *P. Kornerup, B. T. Jensen* und *S. E. Rasmussen*, *J. Appl. Cryst.* **4**, 421 (1971).
- ⁸ *P. W. Schmidt* und *R. Hight*, *Acta Cryst.* **13**, 480 (1960).

Eigentümer: Österreichische Akademie der Wissenschaften, Dr. Ignaz Seipel-Platz 2, A-1010 Wien. — Herausgeber: Österreichische Akademie der Wissenschaften, Dr. Ignaz Seipel-Platz 2, A-1010 Wien, und Verein Österreichischer Chemiker, Eschenbachgasse 9, A-1010 Wien. — Verlag: Springer-Verlag, Mölkerbastei 5, A-1011 Wien. — Für den Textteil verantwortlich: Prof. Dr. Friedrich Kuffner, Währinger Straße 38, A-1090 Wien. — Für den Anzeigenteil verantwortlich: Bruno Schweder, Schweizertalstraße 8-10, A-1130 Wien. — Druck: Adolf Holzhausens Nachfolger, Kandlgasse 19-21, A-1070 Wien