

## RÖNTGENKLEINWINKELUNTERSUCHUNG

### VON APOFERRITIN IN LÖSUNG

H.-J. Bielig, O. Kratky, G. Rohns und H. Wawra

Institut für physikalische Chemie der Universität Graz

und

Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für  
Chemie, Heidelberg

(Received 29 July 1964)

Der wesentliche Inhalt der Arbeit besteht in der Ermittlung des Molekulargewichtes aus der Absolutintensität und Bestimmung der radialen Dichteverteilung durch Fourier-Transformation.

Das Apoferritin war in Anlehnung an BEHRENS und TAUBERT (1) aus frischer Pferdemilz hergestellt worden. Das sechsmal mit  $\text{CdSO}_4$ -Lösung umgefällte, nicht getrocknete, kristalline Präparat (Ausbeute bis 500 mg/kg Milz) wurde durch Gelfiltration über Sephadex G 25 von anorganischen Bestandteilen befreit und seine Reinheit in der Ultrazentrifuge (2) festgestellt. Die Konzentration der wäßrigen Stammlösung (4.65 Gew.-%) wurde durch Einengen bei  $20^\circ\text{C}/0.1$  Torr über  $\text{P}_2\text{O}_5$  eingestellt.

Die verwendete Röntgenkleinwinkelkamera ist in (3) und das Verfahren der Absolutmessung in (4) und (5) beschrieben. Die gestreute Strahlung wurde mit einem Proportionalzählrohr registriert; die Aussonderung der  $\text{CuK}_\alpha$ -Linie besorgte ein Impulshöhendiskriminator.

Zur Ermittlung von Gestalt und Streumassenradius studierten wir eine Konzentrationsreihe mit  $c = 4.65, 2.22, 1.75, 1.17, 0.430, 0.173$  Gew.-%. Die Ergebnisse wurden aus den vom Kollimationseinfluß (6) vollständig befreiten Kurven abgeleitet. Im Bereich des Hauptmaximums wurde durch Extrapolation auf die Konzentration Null die "Grenzkurve" bestimmt. Es handelt sich um eine typische Korpuskelstreucurve mit langem Guinier-Bereich, die der einer Hohlkugel überaus nahekommt (Streumassenradius  $R = 56 \text{ \AA}$ ). Die Extrapolation dieser Grenzkurve auf den Winkel Null ergibt aus der absoluten Intensitätsmessung unter Zugrundelegung des von ROTHEN (7) angegebenen partiellen spezifischen Volumens ( $\bar{v}_1 = 0.747$ ) das Molekulargewicht  $M = 462\ 000$ .

Da aus dem Auftreten von Nullstellen in der Streukurve eine radialsymmetrische Massenverteilung anzunehmen war, wurde eine Fourier-Umkehrung durchgeführt. Dazu mußte außer dem Hauptmaximum der Auslauf der Kurve sehr genau ermittelt werden, wozu die 4.65-proz. Lösung verwendet wurde. Diese Kurve wies Nebenmaxima auf, deren Winkel in Bogenmaß und Intensität relativ zum Hauptmaximum (Werte in Klammern) angegeben seien:

0.0210 (0.0318), 0.0361 (0.00503), 0.0515 (0.000549).

Noch weiter außen liegende 10 Nebenmaxima wurden nicht berücksichtigt, weil sie, wie gezeigt werden kann, mit der radial-symmetrischen Massenverteilung nicht zusammenhängen; sie gehen auf Dichteänderungen in kleinen Bereichen (Sekundär- und Tertiärstruktur) zurück. Beim Winkel 0.0575, entsprechend einer Intensität von  $<10^{-5}$  relativ zur Nullintensität, wurde die Kurve daher abgebrochen.

Die mittels einer elektronischen Rechenmaschine durchgeführte Fourier-Transformation ergab eine Hohlkugel mit  $r_i = 31 \text{ \AA}$  und  $r_a = 69 \text{ \AA}$ . Die Dichteverteilung dazwischen entspricht einer glockenförmigen Kurve mit dem Maximum bei  $49 \text{ \AA}$ . Der aus dieser Dichteverteilung berechnete Streumassenradius beträgt  $R = 52 \text{ \AA}$ . Die Übereinstimmung mit dem aus der Guinier-Auftragung erhaltenen Wert von  $R = 56 \text{ \AA}$  ist in Anbetracht der Schwierigkeiten einer exakt durchzuführenden Fourier-Umkehrung befriedigend. Ersetzt man die glockenförmige Dichteverteilung durch eine Kastenkurve, welche dem gleichen Streumassenradius und der gleichen Masse entspricht, so erhält man  $r'_i = 35.5 \text{ \AA}$  und  $r'_a = 62.7 \text{ \AA}$ . Diese Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit den Ergebnissen überein, die HARRISON (8) bei der Röntgenstrukturanalyse von Apoferritinkristallen erhalten hat ( $37$  bzw.  $61 \pm 3 \text{ \AA}$ ).

Schließlich wurde das aus Nullintensität und Invariante berechnete Molekülvolumen mit dem aus der Fourier-Transformation abgeleiteten verglichen. Zur Bestimmung der Invariante ist die

gemessene Streukurve bis einschließlich dem dritten Nebenmaximum verwendet worden; der die weiteren Maxima enthaltende äussere Teil wurde durch den von der Theorie geforderten Auslauf gemäß  $1/\lambda^3$  ersetzt. Wir finden dann  $V = 825\ 000 \text{ \AA}^3$ . Die Kastenkurve, durch welche wir die glockenförmige Dichteverteilung ersetzt hatten, liefert den befriedigend übereinstimmenden Wert von  $V = 840\ 000 \text{ \AA}^3$ .

Aus diesem Volumen und dem ermittelten Molekulargewicht ergibt sich sofort eine Quellung von 0.33 g Wasser/1 g Apoferritin, ein Wert, wie er bei vielen Proteinen auftritt.

Die zentrale Einlagerung des Eisens in das Apoferritin hatte sich schon aus dem Vergleich der Streumassenradien von Ferritin und seiner Eisenoxyhydrat-Komponente ergeben (9). Sie wird durch die gefundene Hohlkugelgestalt des Apoferritins unmittelbar bewiesen. Auch die an Ferritinkristallen (10) und denaturiertem Ferritin (11) erhaltenen Röntgenergebnisse sowie elektronenmikroskopische Befunde (12) führen zur gleichen Grundvorstellung (13).

#### LITERATUR

1. M. Behrens und M. Taubert, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 290, 156 (1952).
2. Die Sedimentation konnte mit dem Gerät Beckman Modell E des Institutes für Physiologie im Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, ausgeführt werden, wofür wir Herrn Prof. Dr. H. HOFFMANN-BERLING sehr herzlich danken.

3. O.Kratky, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. 58, 49 (1954); 62, 66 (1958); O.Kratky und Z.Skala, ebenda 62, 73 (1958).
4. O.Kratky und H.Wawra, Mh. Chem. 94, 981 (1963).
5. O.Kratky, G.Porod und L.Kahovec, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. 55, 53 (1951); O.Kratky, Z. analyt. Chem. 201, 161 (1964).
6. Zusammenfassung über Kollimationsprobleme: O.Kratky, G. Porod und Z.Skala, Acta physica austriaca 13, 76 (1960).
7. A.Rothen, J. biol. Chemistry 152, 679 (1944).
8. P.M.Harrison, J. molecular Biol. 6, 404 (1963); 1, 69 (1959).
9. H.-J.Bielig, O.Kratky, H.Steiner und H.Wawra, Mh. Chem. 94, 989 (1963); vgl. auch O.Kratky, Makromolekulare Chem. 35A, 12 (1960).
10. I.Fankuchen, J. biol. Chemistry 150, 57 (1943); D.C.Hodgkin, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. 14, 65 (1949); P.M.Harrison, J. molecular Biol. 1, 69 (1959).
11. V.Kleinwächter, Arch. Biochem. Biophysics 105, 352 (1964).
12. J.L.Farrant, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 13, 569 (1954); L.W.Labaw und R.W.G.Wyckoff, ebenda 22, 263 (1957); E.L.Kuff und A.J.Dalton, J.Ultrastructure Res. 1, 62 (1957); G.W.Richter, J. biophysic. biochem. Cytol. 6, 531 (1959); E.F.J. van Bruggen, E.H.Wiebenga und M.Gruber, J.molecular Biol. 2, 81 (1960).
13. Vgl. A.R.Muir, Quart. J. exp. Physiol. 45, 192 (1960).