

# Über Chemie und Feinbau von Naturseide

Von Dr. H. SPOOR und Dr. KLAUS ZIEGLER

Deutsches Wollforschungsinstitut an der Technischen Hochschule Aachen

Diese Übersicht zeigt, welche neueren Kenntnisse in den letzten Jahren erhalten werden konnten. Nach einer Darlegung der mikroskopischen und röntgenographischen Befunde wird ausführlicher auf die Chemie des Seidenfibroins eingegangen, wobei den Aminosäure-Sequenzen im kristallinen und amorphen Teil die besondere Aufmerksamkeit gilt.

## Einleitung

Während Fasern aus synthetischen Polymeren nur aus einem oder zwei verschiedenen Bausteinen aufgebaut sind, werden tierische Fasern aus nahezu allen in der Natur vorkommenden Aminosäuren gebildet und sind wegen der ungeheuer großen Zahl der Verknüpfungsmöglichkeiten recht kompliziert zusammengesetzt. Von der Wolle z. B. weiß man bis heute nicht einmal, aus wievielen Proteinen die Faser aufgebaut ist. Seide besteht morphologisch aus zwei relativ leicht isolierbaren Teilen, dem Sericin und dem faserbildenden Fibroin, die man mit großer Wahrscheinlichkeit als einheitliche Proteine ansprechen darf. Weil Fibroin im Gegensatz zu anderen Faserproteinen zu etwa 60% aus Glycin und Alanin besteht und fast frei von schwefelhaltigen Aminosäuren ist, eignet es sich vergleichsweise am besten als Modellsubstanz für das Studium von Struktur und Eigenschaften solcher Substanzen.

## Feinbau der Naturseide

### Mikroskopische Untersuchungen

Der Kokonfaden des Seidenspinners *Bombyx mori* (von den Seidenarten sei nur diese meistverbreitete und am besten untersuchte behandelt) besteht aus einem Doppelfaden von Seidenfibroin und wird von Sericin als Kittsubstanz umgeben und verklebt. Beide Substanzen sind Proteine, die in der Spinnrüse des Seidenspinners gebildet werden. Beim Erhitzen mit Wasser im Autoklaven auf über 100 °C<sup>1)</sup> mit Seifenlösung bzw. mit einem geeigneten Netzmittel, sowie durch Einwirkung proteolytischer Enzyme<sup>2)</sup> löst sich das Sericin auf und kann abgetrennt werden.

Unter dem Mikroskop erkennt man feine Längsstreifen und kann somit auf einen fibrillären Aufbau schließen. Elektronenmikroskopisch ließ sich diese Vermutung be-

stätigen<sup>3)</sup> und die Parallelordnung der einzelnen Fibrillen zeigen<sup>4)</sup>. Die Durchmesser der feinsten Fibrillen betragen etwa 100 Å. Häufig findet man bandartige Aggregate von 200 bis 20000 Å Breite, in denen die Fibrillen parallel und gleichmäßig angeordnet sind. Größe und Anordnung der Fibrillen variiert mit den Methoden der Präpariertechnik, also der Faserzerkleinerung und der Art des verwendeten Quellungsmittels. Die Fibrillen sind strukturell einheitlich aufgebaut und durch geringe Mengen weniger orientierten Materials miteinander verknüpft<sup>5)</sup>.

### Röntgenographische Untersuchungen

Kleinste chemische Bestandteile der Fibrillen und somit auch der Seidenfaser sind die Polypeptid-Ketten, über deren räumliche Lage die Röntgenographie Aufschluß gibt. Zuerst erhielten Herzog und Janke<sup>6)</sup> ein gut ausgeprägtes Faserdiagramm, woraus auf eine gittermäßige Anordnung wenigstens eines Teiles des Seidenfibroins geschlossen werden konnte. Die Faserperiode wurde schon 1923 von Brill<sup>9)</sup>

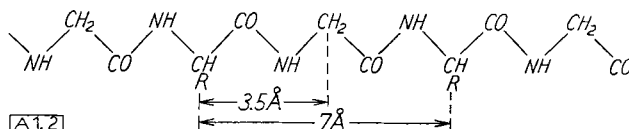


Abb. 2. Kettenstruktur des kristallisierten Anteils des Seidenfibroins (nach Meyer und Mark)

zu 7 Å bestimmt. Aus der großen Intensität der zweiten Ordnung des am Meridian auftretenden Basisreflexes folgt, daß diese Periode in zwei strukturell ähnliche Hälften von 3,5 Å unterteilt ist. Die Aufklärung des Elementarkörpers gelang ebenfalls Brill<sup>10)</sup>, nachdem Kratky und Kuriyama<sup>11)</sup> durch Veränderung der Spinnrüse der Seidenraupe ein höher orientiertes Fibroinpräparat erhalten hatten. Der

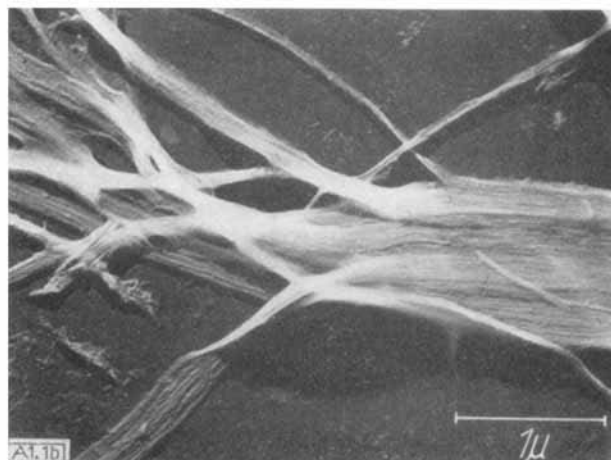
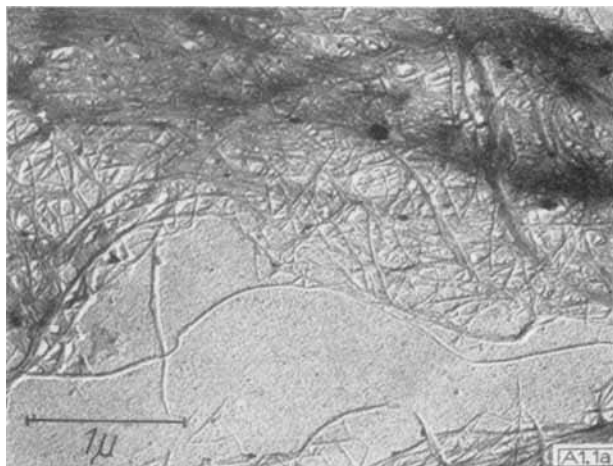


Abb. 1 a und b. Elektronenmikroskopisches Bild von im Starmix zerkleinertem, unbehandeltem Fibroin: Fibrillen 100 bis 200 Å breit (Platinbedampfung, ursprünglich  $\times 30000$ ); nach Zuber<sup>6,9)</sup>

<sup>1)</sup> M. S. Dunn, M. N. Camien, L. B. Rockland, S. Shankman u. S. C. Goldberg, J. biol. Chemistry 155, 591 [1944].

<sup>2)</sup> R. Signer u. R. Glanzmann, Makromolekulare Chem. 5, 257 [1951].

<sup>3)</sup> H. Zahn, Kolloid-Z. 112, 91 [1949].

<sup>4)</sup> R. Hegetschweiler, Makromolekulare Chem. 4, 156 [1949].

<sup>5)</sup> H. Zahn u. H. Zuber, Textil-Rdsch. 9, 119 [1954].

<sup>6)</sup> H. Zuber, Melland-Textilber. 4, 429 [1956].

<sup>7)</sup> G. Gallese, La Seta Boll. Staz. Sper. Seta, Milano 18, 98 [1957].

<sup>8)</sup> R. O. Herzog u. W. Janke, Ber. dtsh. chem. Ges. 53, 2162 [1920].

<sup>9)</sup> R. Brill, Liebigs Ann. Chem. 434, 204 [1923].

<sup>10)</sup> R. Brill, Z. physik. Chem. (B) 53, 61 [1943].

<sup>11)</sup> O. Kratky u. S. Kuriyama, Z. physik. Chem. (B) 11, 363 [1931].

Elementarkörper hat folgende Dimensionen<sup>9)</sup>:  $a = 9,64 \text{ \AA}$ ,  $b = 6,95 \text{ \AA}$  (Faserachse),  $c = 10,4 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 62,4^\circ$ .

Schon Meyer und Mark<sup>12)</sup> hatten das Gitter der Seide als Hauptvalenzgitter gedeutet, weil sich die röntgenographischen und physikalischen Eigenschaften nur durch die Annahme parallel zur Faserrichtung liegender Polypeptid-Ketten erklären ließen. Der Zusammenhalt benachbarter Ketten wird durch Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen  $-\text{CO}-$  und  $-\text{NH}-$  gewährleistet. Nachdem Astbury<sup>13)</sup> und Huggins<sup>14)</sup> auf die Möglichkeit dieser Bindungsart in Eiweiß hingewiesen hatten, konnte Brill<sup>15)</sup> durch genaue Abstandsmessungen an synthetischen Polyamiden diese Hypothese beweisen, indem er feststellte, daß der Atomabstand bei Vorliegen einer Wasserstoff-Brücke verkürzt ist. Ähnliche Verhältnisse liegen nach Nowotny und Zahn<sup>16)</sup> auch im  $\beta$ -Keratin vor.

Eine voll gestreckte Polypeptid-Kette, wie sie etwa beim Polyglycin vorliegt, ergibt eine Faserperiode von  $7,23 \text{ \AA}$  (Abb. 3), während bei Seide nur  $7,0 \text{ \AA}$  gefunden werden. Um die Verkürzung der Kette zu erklären, nehmen Pauling und Corey<sup>17)</sup> eine „pleated sheet“-Struktur an (Beispiel für eine Peptid- $\beta$ -Struktur, im Gegensatz zur  $\alpha$ -Struktur oder „Helix“, in der die Peptidketten schraubenförmig angeordnet sind).

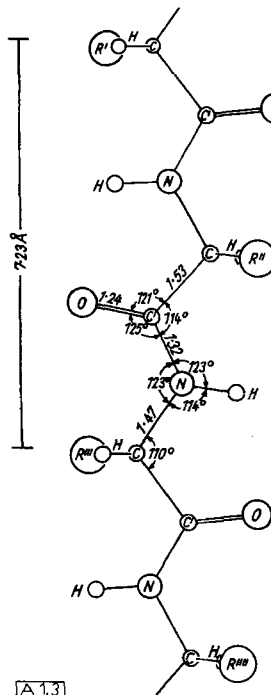


Abb. 3. Vollständig gestreckte Polypeptidkette nach Corey und Pauling unter Benützung der derzeit besten Atomradien und Valenzwinkel

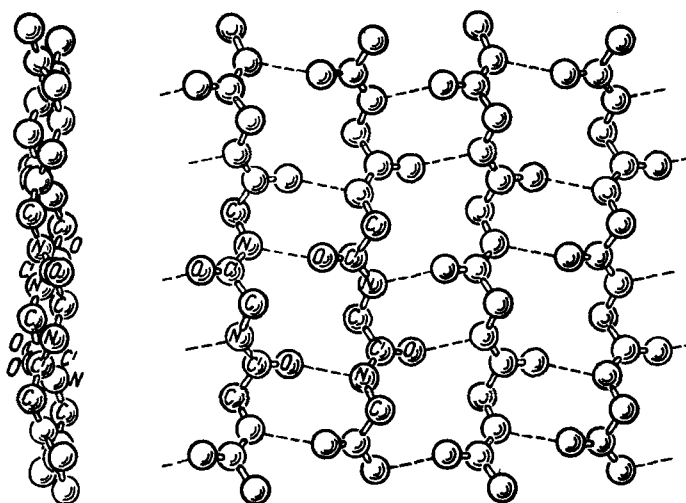


Abb. 4. „Pleated sheet“ mit antiparalleler Lage der Ketten. Links: in Schichtrichtung gesehen; rechts: Aufsicht auf die Schicht (nach L. Pauling und R. B. Corey, Proc. nat. Acad. Sci. USA 39, 253 [1953])

- <sup>12)</sup> K. H. Meyer u. H. Mark, Ber. dtsch. chem. Ges. 61, 1932 [1928].  
<sup>13)</sup> W. T. Astbury, Kolloid-Z. 69, 340 [1934]; Trans Faraday Soc. 36, 871 [1940].  
<sup>14)</sup> M. L. Huggins, J. chem. Physics 8, 598 [1940].  
<sup>15)</sup> R. Brill, Naturwissenschaften 29, 220 [1941].  
<sup>16)</sup> H. Nowotny u. H. Zahn, Z. physik. Chem. (B) 57, 265 [1942].  
<sup>17)</sup> L. Pauling u. R. B. Corey, Proc. nat. Acad. Sci. USA 37, 729 [1951].

Danach sind die Polypeptidketten in gefaltete Ebenen zusammengefaßt und die Aminosäure-Seitenketten zweier benachbarter Ebenen liegen jeweils in der gleichen Zwischenschicht. Die Faltung ist durch gegenseitige sterische Hinderung der Aminosäure-Seitenketten bedingt. Aus den Röntgenreflexen errechnen Marsh, Corey und Pauling<sup>18)</sup> die beiden Schichtebenen-Abstände zu  $3,5$  und  $5,7 \text{ \AA}$ . Die Dimensionen der dichtgepackten Kristallite (Mizellen) lassen auf einen Bau aus kleinen Aminosäuren schließen, wie Glycin, Alanin und Serin, die ja den Hauptbestandteil des Fibroins ausmachen (vgl. Tabelle 1). Ferner muß nach dieser Strukturvorstellung jeder zweite Aminosäure-Rest ein Glycyl-Rest sein, so daß für die Peptidkette eine ...Gly-X-Gly-X-Gly... Sequenz folgt (X ist eine von Glycin verschiedene Aminosäure).

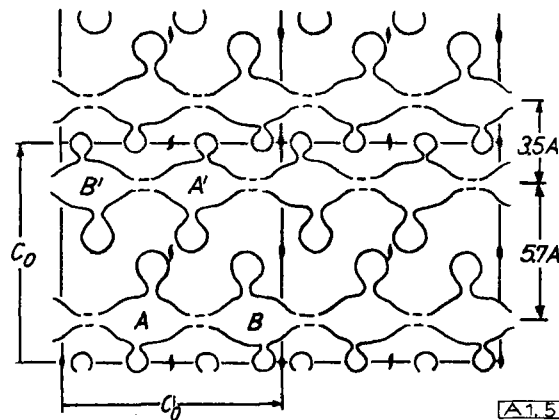


Abb. 5. Schematische Darstellung der Pseudoeinheit von Seidenfibroin. Ansicht des Basisquerschnittes (nach R. E. Marsh, R. B. Corey und L. Pauling<sup>18)</sup>)

Fikentscher und Meyer<sup>19)</sup> fanden, daß Säuren und Farbstoffe zwar in die Seide eindringen, das Gittergefüge aber unverändert lassen. Auch durch Dinitrophenylierung nach Zahn und Würz<sup>20)</sup> sowie nach Kupplung mit Diazo-Verbindungen<sup>21)</sup> ändert sich das Röntgenogramm nicht. Danach können also innerhalb der kristallinen Mizelle keine zur Salzbildung befähigten freien Amino- und Carboxy-Gruppen, also auch keine basischen und sauren Aminosäuren sowie wegen sterischer Hinderung kein Tyrosin, Phenylalanin, Leucin und Valin vorkommen. Möglicherweise liegen diese größeren Aminosäuren in einem anderen nicht-kristallinen Bereich des Fibroins vor (siehe auch<sup>21)</sup>).

Im Gegensatz zu der erwähnten Auffassung steht die Hypothese von Marsh, Corey und Pauling<sup>18)</sup>, daß die amorphen Bereiche trotz sperriger Aminosäure-Reste durchaus in demselben Gittertyp kristallisieren, wie die kristallinen Bereiche. An den durch Wasserstoff-Brücken zusammengehaltenen „pleated sheets“ ändert sich gar nichts. Auch in den amorphen Bereichen soll jeder zweite Aminosäure-Rest aus Glycin bestehen, so daß weiterhin der eine Abstand von  $3,5 \text{ \AA}$  zwischen den Schichten erhalten bleibt. An den Stellen, an welchen ein sperriger Aminosäure-Rest vorkommt, wird lediglich der andere Abstand zwischen den Schichten in den kristallinen Bereichen auf  $5,7 \text{ \AA}$  aufgeweitet. Dies führt dann zu einem durchschnittlichen Abstand von  $9 \text{ \AA}$  zwischen den Schichten, welche größere Aminosäure-Reste enthalten, ohne Rücksicht darauf, ob diese Schichten Stirn auf Stirn oder Stirn auf Rücken liegen, oder ob die großen Seitenketten-Reste auf beiden Seiten eines „pleated sheet“ herausragen. Wenn

- <sup>18)</sup> R. E. Marsh, R. B. Corey u. L. Pauling, Biochim. Biophys. Acta 16, 1 [1955].  
<sup>19)</sup> H. Fikentscher u. K. H. Meyer, Melland-Textilber. 8, 781 [1927].  
<sup>20)</sup> H. Zahn u. A. Würz, Biochem. Z. 322, 327 [1952].  
<sup>21)</sup> K. H. Meyer, M. Fuld u. O. Klemm, Helv. chim. Acta 23, 1441 [1940].

Marsh, Corey und Pauling auch die Sequenz Gly-X-Gly-X-Gly für die amorphen Peptide bevorzugen, so weisen sie doch darauf hin, daß möglicherweise mindestens kleine Bezirke vorkommen, in welchen die größeren Seitenketten von beiden Seiten einer einzelnen „pleated sheet“ herausragen. Das Wesentliche der Auffassung von Pauling besteht darin, daß eine Aufteilung des Fibroins in kristalline und amorphe Bereiche abgelehnt wird. Die neuen Röntgendaten erlauben die Unterbringung aller Aminosäure-Reste in eine einzige kristalline Phase.

Schließlich hat Kratky<sup>22)</sup> eine „Dimorphie“ der Seide festgestellt. Das ohne mechanische Einwirkung eingedampfte native Gel aus der Spinnrüse der Seidenraupe gibt ein von der Faserseide verschiedenes Röntgenogramm („Seide I“). Durch mechanische oder thermische Behandlung entsteht daraus die normale Form („Seide II“). Die Ergebnisse von Röntgenstudien führen Kratky zu dem Schluß, daß Seide I ein  $\alpha$ -(Helix-)Protein ist und erst beim Verspinnen in die stabile  $\beta$ -Form übergeht.

### Chemie des Seidenfibroins

Den Proteincharakter der Naturseide hat zuerst Fischer<sup>23)</sup> erkannt, indem er in Hydrolysaten mehrere Aminosäuren nachwies und aus Partialhydrolysaten kleinere Peptide isolierte. Die Bestimmung der quantitativen Aminosäure-Zusammensetzung des Fibroins gelang aber erst in neuerer Zeit<sup>24–27)</sup>.

Abkürzung	Aminosäuren	Gew.-%
Gly	Glycin	42,6
Ala	Alanin	34,37
Ser	Serin	15,98
Tyr	Tyrosin	11,29
Val	Valin	3,12
Asp	Asparaginsäure	2,34
Glu	Glutaminsäure	1,73
Thr	Threonin	1,49
Phe	Phenylalanin	1,32
Arg	Arginin	0,98
Ileu	Isoleucin	0,90
Leu	Leucin	0,81
Pro	Prolin	0,59
Lysin	Lysin	0,56
Try	Tryptophan	0,50
His	Histidin	0,30
Cys	Cystin?	0,18

Tabelle 1. Aminosäurezusammensetzung von Seidenfibroin (*Bombyx mori*) nach Schroeder u. a.<sup>28)</sup> (Aminosäuren in Gewichtsprozenten von 100 g Protein)

### Molekulargewicht

Das Molekulargewicht von Fibroin ist noch nicht gesichert. Entweder rühren die bisher bekannt gewordenen Molekulargewichte von physikalischen Messungen her oder stammen aus Abschätzungen, die auf Endgruppenbestimmungen oder einzelnen Aminosäureanalysen basieren.

Man kann das Protein in konzentriertem wäßrigem LiCl bzw. LiCNS<sup>29)</sup> oder in einem Kupferäthylendiamin-Reagens<sup>25)</sup> auflösen und erhält nach Dialyse eine kolloidale Fibroin-Lösung. In solchen Lösungen von denaturierter Seide bestimmten Coleman und Howitt<sup>25)</sup> osmotisch ein

Molekulargewicht von 33000. Holmes und Smith<sup>30)</sup> fanden mit Hilfe von Sedimentations- und Diffusionsmessungen Werte zwischen 60000 und 150000 bei einem Mittelwert von 84000.

Aus der quantitativen Aminosäure-Bestimmung der in geringer Menge vorhandenen Aminosäuren His, Lys und Arg im Verhältnis 2:3:5 errechneten Corfield u. a.<sup>31)</sup> ein Mindestmolekulargewicht von 84000. Mercer<sup>32)</sup> fand durch Ultrazentrifugmessungen mindestens drei in sich einheitlich sedimentierende Komponenten, deren Molekulargewichte sich in der Größenordnung von 10<sup>6</sup> bewegen.

Die Tendenz der Eiweißkörper, zu größeren Komplexen zu aggregieren, täuscht aber leicht ein zu hohes Molekulargewicht vor (vgl. die Untersuchungen am Insulin). So fand Kratky<sup>22)</sup> durch Röntgenkleinwinkelmessungen, daß frische Seidenlösungen viel kleinere Teilchen enthalten, als länger aufbewahrte, in denen eine Zusammenlagerung stattgefunden hat.

### Endgruppenbestimmungen

Exakte Endgruppenbestimmungen sind bei einem so komplexen Molekül natürlich sehr schwierig. Da man mit den Endgruppenreagenzien alle reaktionsfähigen Gruppen erfaßt, kann man wertvolle Hinweise darauf erhalten, ob und wieviel von diesen chemisch blockiert oder sterisch gehindert sind.

Nach Reaktion mit Fluor-2,4-dinitrobenzol, wodurch freie Amino- und phenolische OH-Gruppen erfaßt werden, betrug der Resttyrosin-Gehalt 2%. Das bedeutet, daß nur etwa 85% des Tyrosins sich umgesetzt hatten<sup>33,34)</sup>. Der Umsatz mit Diazomethan führte zu einem ähnlichen Ergebnis, nämlich einem Restgehalt an freiem Tyrosin von 1,6%<sup>35)</sup>. Es ist denkbar, daß ein Teil des Tyrosins in der Seide verestert ist.

Lysin reagiert nach Zahn und Würz<sup>33)</sup> ebenfalls nur zu etwa 80% mit Dinitrofluorbenzol. Aus den gleichen Dinitrophenylierungsansätzen konnten Spuren von DNP-Gly, DNP-Ala und DNP-Ser papierchromatographisch identifiziert werden.

Die Carboxyl-Endgruppen wurden von Shaw und Smith<sup>36)</sup> nach der Methode von Akabori<sup>37)</sup> bestimmt. Diese beruht darauf, daß alle Peptidbindungen von Proteinen mit wasserfreiem Hydrazin reagieren und Hydrazide ergeben, während die carboxyl-endständige Aminosäure frei bleibt. Es wurden geringe Mengen Gly und Ala sowie Spuren von Tyr, Ser, Val und Pro gefunden. Alle diese Bestimmungen sind aber wegen des verschwindend kleinen Anteils der Endgruppen am Gesamtmolekül ungenau.

### Aminosäure-Sequenzen im Fibroin

Um Aussagen über die Anordnung der Aminosäuren im Fibroin machen zu können, war es erforderlich, das Gesamtmolekül in Bruchstücke aufzutrennen bzw. eine Vorfractionierung durch verschiedene Abbaumethoden zu erreichen.

Hierzu waren geeignet: Einwirkung von Säuren und Laugen (Partialhydrolyse); enzymatischer Abbau; Umsatz von spezifisch wirkenden Reagenzien mit den funktionellen Gruppen des Gesamtmoleküls.

<sup>22)</sup> O. Kratky, Mh. Chem. 87, 269 [1956].

<sup>23)</sup> E. Fischer u. A. Skita, Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 33, 177 [1901].

<sup>24)</sup> D. Coleman u. F. O. Howitt: „Fibrous Proteins“, Soc. Dyers Colourists, Bradford, 1946, S. 144.

<sup>25)</sup> D. Coleman u. F. O. Howitt, Proc. Roy. Soc. (A) 190, 145 [1947].

<sup>26)</sup> S. R. Hoover, E. C. Kokes u. R. F. Peterson, Textile Res. J. 18, 423 [1948].

<sup>27)</sup> G. R. Tristram, Adv. Protein Chem. 5, 143 [1949].

<sup>28)</sup> W. A. Schroeder, L. M. Kay, B. Lewis u. N. Munger, J. Amer. chem. Soc. 77, 3908 [1955].

<sup>29)</sup> R. Signer u. R. Strässle, Helv. chim. Acta 30, 155 [1947].

<sup>30)</sup> F. H. Holmes u. D. I. Smith, Nature [London] 169, 193 [1952].

<sup>31)</sup> M. C. Corfield, F. O. Howitt u. A. Robson, ebenda 174, 603 [1954].

<sup>32)</sup> E. H. Mercer, Textile Res. J. 24, 135 [1954].

<sup>33)</sup> H. Zahn u. A. Würz, Biochem. Z. 322, 327 [1952].

<sup>34)</sup> E. R. Fritze, unveröffentl. Versuche.

<sup>35)</sup> H. A. Rutherford, W. J. Patterson u. M. Harris, J. Res. nat. Bur. Standards 25, 451 [1940].

<sup>36)</sup> J. T. B. Shaw u. S. G. Smith, J. Textile Inst. 45, T 939 [1954].

<sup>37)</sup> S. Akabori, K. Ohno u. K. Narita, Bull. chem. Soc. Japan 25, 214 [1952].

Um die Jahrhundertwende wurden die ersten Peptide von *Fischer* und *Abderhalden*<sup>38-40</sup>) aus sauren Partialhydrolysaten von Seidenfibroin isoliert und durch Vergleich mit den synthetischen Peptiden identifiziert (siehe Tabelle 2).

Peptid bzw. Anhydrid(\*)

Ala-Gly  
Gly-Ala  
Gly. (\*)  
Ala  
Gly. (\*)  
Tyr  
Gly-Tyr  
Ala-Gly-Tyr  
Gly-Ala-Gly-Tyr

Tabelle 2

Peptide und Anhydride aus sauren Partialhydrolysaten von Seidenfibroin isoliert

*Abderhalden* und *Bahn*<sup>41</sup>) benzoilierten ein alkalisches Partialhydrolysat von Fibroin und erhielten ein Peptid der Sequenz Gly-Ser-Pro-Tyr-Pro. Ähnlich konnte Tyr-Ser-Pro-Tyr<sup>42</sup>) identifiziert werden.

Das Vorhandensein der Peptide Gly-Ala und Ala-Gly in sauren Partialhydrolysaten wurde von *Stein*, *Moore* und *Bergmann*<sup>43</sup>) bestätigt. Zu genaueren Ergebnissen kamen *Levy* und *Slobodian*<sup>44</sup>) mit Hilfe von radioaktiven Jodbenzolsulfonyl-Derivaten, die auch das Peptid Gly-Ala-Gly bestimmten. Sie schlugen die kleinste Wiederholungseinheit X-Ala-Gly-Ala-Gly-X vor, wobei X von Gly und Ala verschiedene Aminosäuren bezeichnen soll<sup>45</sup>).

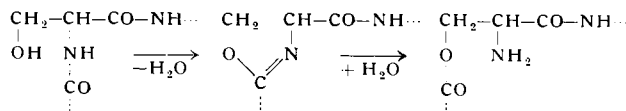
Auf kolloidale, wäßrige Fibroin-Lösungen ließen *Drucker*, *Hainsworth* und *Smith*<sup>46, 47</sup>) Trypsin bzw. Chymotrypsin einwirken und erreichten so eine spezifische Spaltung des Fibroins in einen löslichen und einen unlöslichen Teil. Als besonders interessant erwies sich die Spaltung mit Chymotrypsin, das bevorzugt Peptid-Bindungen an den Carboxyl-Enden von Tyrosin und Phenylalanin löst. Im unlöslichen Anteil wurden nach der Hydrolyse papierchromatographisch nur Gly, Ala, Ser und sehr wenig Tyr gefunden, während alle anderen Aminosäuren im löslichen Anteil vorlagen.

#### Aufklärung des kristallinen Bereiches

Für den unlöslichen Anteil, den sog. kristallinen Bereich des Seidenfibroins, der etwa 62 % des Gesamtstickstoffs enthält und 58 % des Gesamtgewichts ausmacht, fanden *Lucas*, *Shaw* und *Smith*<sup>48</sup>) die Bruttoformel Gly<sub>20</sub>Ala<sub>20</sub>Ser<sub>9</sub>Tyr<sub>1</sub>. In Partialhydrolysaten konnte keine Gly-Gly-Bindung gefunden werden. Dies sowie alle anderen analytischen Befunde führten zu dem Schluß, daß jede zweite Aminosäure Glycin ist, was auf Grund röntgenographischer Ergebnisse von *Pauling*<sup>49</sup>) für das Gesamtfibroin bereits vorhergesagt worden war. Wenn die Serin-Reste ebenfalls gleichmäßig im Molekül verteilt sind, so sollte jede sechste Stelle von Serin besetzt sein und die überwiegend vorliegende Wiederholungseinheit wäre Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly.

Diese Vermutung ließ sich in überzeugender Weise bestätigen. Läßt man auf Proteine wasserfreie Mineralsäuren

einwirken, so tritt die sog. N-O-Acyl-Wanderung<sup>49-51</sup>) auf. Die Peptidbindungen am Aminoende von Serin lagern sich in Serinester um, die anschließend hydrolytisch gespalten werden. Durch Anwendung dieser Methode gelang es *Smith*<sup>48</sup>) 36 % des Chymotrypsin-Niederschlages als



DNP-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-OH zu isolieren. Die Ausbeute wäre größer gewesen, wenn unerwünschte Spaltungs- und Rekombinationsreaktionen hätten vermieden werden können.

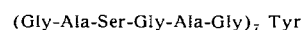
Nach Säulenchromatographie saurer Partialhydrolysate wurden lediglich die Dipeptide Ala-Gly, Gly-Ala, Ser-Gly und sehr wenig Ala-Ala gefunden. Ala-Gly und Gly-Ala standen immer im Verhältnis 2:1. Ferner wurden die Tripeptide Gly-Ala-Gly, Ala-Gly-Ala und Ser-Gly-Ala isoliert. Serin war in allen Peptiden stets amino-endständig und immer von Glycin gefolgt. Die quantitative Auswertung aller Ergebnisse führte zur Aufstellung folgender Sequenz für den chymotryptischen Niederschlag:



Hierbei ist n meist 2 und muß einen Durchschnittswert von 2 haben.

Einen Hinweis für die Richtigkeit der von *Smith*<sup>52</sup>) gefundenen Struktur konnten *Zahn* und *Schnabel*<sup>53-55</sup>) auf röntgenographischem Wege liefern. Es wurden racemisches und optisch aktives Hexapeptid Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly synthetisiert und festgestellt, daß beide Peptide die gleichen Debye-Scherrer-Aufnahmen wie Fibroin geben. Die ebenfalls dargestellten Peptide Ser-Ala-Gly-Gly-Ala-Gly und Ala-Gly-Gly-Ser-Ala-Gly<sup>56</sup>) sowie Gly-Ala-Gly-Tyr-Gly-Ala<sup>57</sup>) sind sowohl röntgenographisch wie infrarotspektroskopisch davon verschieden.

*Waldschmidt-Leitz* und *Zeiss*<sup>58</sup>) schlugen auf Grund ihrer experimentellen Befunde für den kristallinen Bereich — hier Protofibroin genannt — eine von der *Smith*schen Formel abweichende Sequenz vor:



Danach sollten 6 Gly-Gly-Bindungen pro Peptid auftreten. Da das Dipeptid Gly-Gly aber bisher noch von keinem Autor isoliert werden konnte, obwohl es ebenso stabil ist wie andere Dipeptide, scheint diese Formel fraglich.

#### Aminosäure-Sequenzen im amorphen Bereich

*Ziegler* und *Spoor*<sup>59</sup>) untersuchten saure und basische Peptide der löslichen Fraktion des Chymotrypsin-Hydrolysates von Fibroin. Die Gesamtlösung wurde nach 600-stufiger Gegenstromverteilung (0,75-proz. wäßrige Trichloressigsäure/sec. Butanol) in einer Apparatur nach *von Metzsch*<sup>60</sup>) in mehrere Fraktionen aufgeteilt. Mittels Hochspannungs-Papiererelektrophorese bei p<sub>H</sub> 6,25 konnten aus den einzelnen Fraktionen basische und saure Peptide getrennt und angereichert werden. Die Peptide waren nach der Rei-

<sup>38</sup>) E. Fischer, Chemiker-Ztg. 26, 939 [1902]; E. Fischer u. P. Bergell, Ber. dtsch. chem. Ges. 36, 2592 [1903].

<sup>39</sup>) E. Fischer u. E. Abderhalden, Ber. dtsch. chem. Ges. 39, 753 [1906]; 39, 2315 [1906]; 40, 3544 [1907].

<sup>40</sup>) E. Abderhalden, Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 62, 315 [1909]; 63, 401 [1909]; 72, 1 [1911]; 72, 13 [1911].

<sup>41</sup>) E. Abderhalden u. A. Bahn, Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 210, 246 [1932].

<sup>42</sup>) E. Abderhalden u. A. Bahn, ebenda 219, 72 [1933].

<sup>43</sup>) W. H. Stein, S. Moore u. M. Bergmann, J. biol. Chemistry 154, 191 [1944].

<sup>44</sup>) M. Levy u. E. Slobodian, J. biol. Chemistry 199, 563 [1952].

<sup>45</sup>) M. Levy u. E. Slobodian, ebenda 201, 371 [1953].

<sup>46</sup>) B. Drucker u. S. G. Smith, Nature [London] 165, 196 [1950].

<sup>47</sup>) B. Drucker, R. Hainsworth u. S. G. Smith, Shirley Inst. Mem. 26, 191 [1953].

<sup>48</sup>) F. Lucas, J. T. B. Shaw u. S. G. Smith, Nature [London] 178, 861 [1956].

<sup>49</sup>) P. Desnuelle u. A. Casal, Biochim. Biophys. Acta 2, 64 [1948].

<sup>50</sup>) P. Desnuelle u. G. Bonjour, ebenda 7, 451 [1951].

<sup>51</sup>) D. F. Elliott, Biochem. J. 50, 542 [1952].

<sup>52</sup>) F. Lucas, J. T. B. Shaw u. S. G. Smith, ebenda 66, 468 [1957].

<sup>53</sup>) H. Zahn u. E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 604, 62 [1957].

<sup>54</sup>) E. Schnabel u. H. Zahn, ebenda 614, 141 [1958].

<sup>55</sup>) E. Schnabel, Internat. Kongreß f. Biochemie, Wien, 1958.

<sup>56</sup>) E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 615, 173 [1958].

<sup>57</sup>) E. Schnabel, ebenda 615, 165 [1958].

<sup>58</sup>) E. Waldschmidt-Leitz u. O. Zeiss, Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 298, 239 [1954].

<sup>59</sup>) Klaus Ziegler u. H. Spoor, Internat. Kongreß f. Biochemie, Wien, 1958.

<sup>60</sup>) F. A. von Metzsch, Chem.-Ing.-Techn. 25, 66 [1953].

nigung durch Elektrophorese und Papierchromatographie in verschiedenen Lösungsmitteln einheitlich. Nach der Bestimmung ihrer Bruttozusammensetzung wurden die Aminosäure-Sequenzen mit der DNP-Methode, durch Desaminierung, durch stückweisen Abbau vom Amino-Ende mit Leucinamino-peptidase, vom Carboxyl-Ende mit Carboxy-peptidase sowie durch Prüfung der bei der Partialhydrolyse auftretenden Peptidbruchstücke bestimmt. Es wurden gefunden<sup>61)</sup>:

Val-Ala-Gly-Asp-Gly-Tyr sowie<sup>62)</sup> Ileu-Thr-Ala-His  
 Ser-Glu-Asp-Tyr Val-Ala-Gly-His-Gly-Tyr  
 Glu-Tyr Ser-Gly-Glu-Tyr  
 Val-Lys-Phe  
 Leu-(Glu,Lys)-Phe  
 Lys-Gly-(Arg,Glu)-Lys  
 Ala-Try

Auf Grund dieser Befunde kann der von Pauling<sup>18)</sup> postulierte -Gly-X-Gly-X-Gly-Aufbau für den amorphen Bereich des Fibroins entweder überhaupt nicht, oder nicht allgemein zutreffen.

Auch Waldschmidt-Leitz und Kirchmeier<sup>63)</sup> untersuchten den löslichen Anteil des Chymotrypsin-Hydrolysates und erhielten durch zweimalige papierchromatographische Trennung 31 Peptid-Fractionen, deren Amino- und Carboxyl-Endgruppen bestimmt wurden. Am Carboxyl-Ende traten danach wie erwartet ausschließlich Tyr und Phe auf, während am Amino-Ende Gly und Ala überwogen. Sequenzen wurden nicht bestimmt.

#### Sequenzstudien am Gesamt-Seidenfibroin

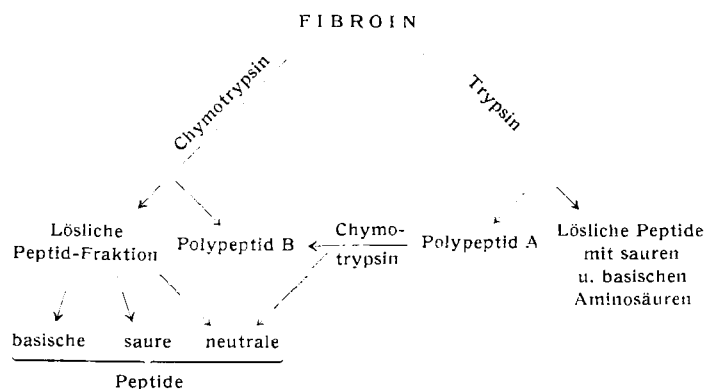
Während sich die zuvor erwähnten Arbeiten ausschließlich mit dem amorphen oder dem kristallinen Bereich von Fibroin befaßten, knüpften Kay und Schroeder<sup>64)</sup> an die Arbeiten von Levy und Slobodian<sup>44,45)</sup> an und prüften Partialhydrolysate des Gesamtfibroins mit Hilfe der Säulentechnik von Moore und Stein<sup>65)</sup>. Neben den bisher erwähnten Peptiden wurden Thr-Gly, Tyr-Gly, Phe-Gly und Gly-Val-Gly isoliert. Joffe<sup>66)</sup> untersuchte tyrosin-haltige Peptide, die als Azo-Farbstoffe aus den Hydrolysaten isoliert wurden. Auf Grund seiner Sequenzstudien folgert er, daß ein großer Teil des Seidenfibroin-Moleküls entsprechend der Formel Ala-Gly-Ala-Gly-X-Gly aufgebaut ist, wobei X eine beliebige, von Abschnitt zu Abschnitt variierende Aminosäure (außer Gly und Ala) darstellt.

Diese durch Untersuchung des Gesamtfibroins erhaltenen Ergebnisse unterscheiden sich nicht wesentlich von den am kristallinen Bereich gefundenen, der ja auch über 60% des Proteins ausmacht. Darüber hinaus dürfte aber der überwiegende Teil des Restmoleküls nach einem ähnlichen Prinzip aufgebaut sein. Eine Bestätigung hierfür liefert die Untersuchung von Zuber<sup>67)</sup>, der die durch Chymotrypsin-Einwirkung erhaltenen Peptide des amorphen Bereichs mittels Hochspannungs-Papierelektrophorese bei  $p_H$  6,25 in eine basische (3% des Gesamtstickstoffs), saure (10% des Gesamtstickstoffs) und neutrale Fraktion (25% des Gesamtstickstoffs) trennte. Durch Elektrophorese bei  $p_H$  1,9 und Papierchromatographie konnten aus der neutralen Peptid-Fraktion vier Peptide isoliert werden, deren halbquantita-

tive Aminosäure-Bestimmung etwa folgende Bruttozusammensetzung lieferte:

1. Gly<sub>10-15</sub> Ala<sub>10-15</sub> Tyr
2. Gly<sub>5</sub> Ala<sub>3</sub> Val Tyr
3. Gly<sub>4</sub> Ala<sub>3</sub> Tyr
4. Gly<sub>4</sub> Val<sub>2</sub> Tyr

Nach Verdauung des wasserlöslichen Fibroins mit Trypsin erhielt Zuber<sup>67)</sup> einen gel-artigen Niederschlag (Polypeptid A = 83% des Gesamtstickstoffs), der mit Chymotrypsin in ein Polypeptid B überführt wurde, das sich als identisch mit dem kristallinen Bereich erwies. Gelöst blieb eine neutrale Peptidfraktion, die sich in der Hauptsache aus den oben erwähnten vier Peptiden zusammensetzt. Zur Veranschaulichung diene folgendes Schema (nach Zuber<sup>67)</sup>):

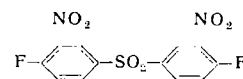


In allen bisher erwähnten Peptiden treten fast ausschließlich die Aminosäuren Gly, Ala, Ser und Val auf. Die multifunktionellen und sperrigen Aminosäuren sind in relativ kleinen Peptiden enthalten, die sowohl beim Chymotrypsin- wie beim Trypsin-Abbau gelöst bleiben, wobei natürlich die durch die Einwirkung der verschiedenen Enzyme gebildeten Peptide nicht identisch sind.

Das Hauptproblem für die Konstitutionsermittlung des Seidenfibroins ist nach der gelungenen Aufklärung des Smithschen Polypeptids nunmehr die Isolierung der amorphen Bereiche nicht wie bisher in Form von Peptidgemischen, sondern im intakten Zustand.

#### Vernetzungsreaktionen

Die Anhäufung von Tyrosin in bestimmten Bereichen des Fibroins, dem sog. amorphen Teil, konnte auch durch Vernetzungsreaktionen mit bifunktionellen Verbindungen bewiesen werden. Zahn und Zuber<sup>68-70)</sup> behandelten Fibroin mit p,p'-Difluor-m,m'-dinitrodiphenylsulfon, welches seine



reaktionsfähigen Fluor-Atome gegen die Phenol-Gruppen von Tyrosin-Resten austauscht. Die Tatsache, daß das verwendete Reagenz fast quantitativ mit den Tyrosin-Gruppen reagiert, zeigt, daß die OH-Gruppen des Tyrosins etwa einen Abstand von 10 Å haben müssen, da der Abstand F—F in dem benutzten Reagenz 10 Å beträgt. Da nur jede zwanzigste Aminosäure des Fibroins Tyrosin ist, muß dieses in bestimmten Segmenten, nämlich den amorphen Bereichen, gehäuft vorkommen, weil bei einer gleichmäßigen Verteilung der Abstand für eine Brückenbildung mit dem bifunktionellen Reagenz zu groß wäre. Das O,O'-(m,m'-Dinitro-p,p'-diphenylsulfon)-bis-tyrosin konnte aus Hydrolysaten

<sup>61)</sup> Klaus Ziegler u. H. Spoor, Biochim. Biophys. Acta 33, 138 [1959].

<sup>62)</sup> Klaus Ziegler u. N. La France, unveröffentl. Versuche.

<sup>63)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. O. Kirchmeier, Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 312, 127 [1958].

<sup>64)</sup> L. M. Kay u. W. A. Schroeder, J. Amer. chem. Soc. 76, 3564 [1954].

<sup>65)</sup> S. Moore u. W. H. Stein, J. biol. Chemistry 192, 663 [1951].

<sup>66)</sup> H. G. Joffe, Biokhimiya 19, 495 [1954].

<sup>67)</sup> H. Zuber, diese Ztschr. 70, 656 [1958].

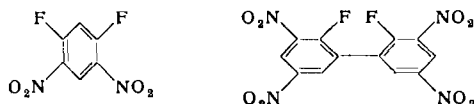
<sup>68)</sup> H. Zahn u. H. Zuber, Textil-Rdsch. 9, 119 [1954].

<sup>69)</sup> H. Zahn u. H. Zuber, Mh. Chem. 85, 759 [1954].

<sup>70)</sup> H. Zahn, H. Zuber, W. Ditscher, D. Wegerle u. J. Meienhofer, Chem. Ber. 89, 407 [1956].

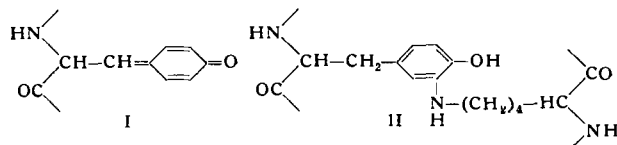
in hoher Ausbeute als schwerlösliches Dihydrochlorid isoliert und charakterisiert werden. Die faserchemischen Eigenschaften und die starke Abnahme der Löslichkeit des vernetzten Fibroins beweisen, daß die Vernetzung interchenar stattgefunden hat. Bei der Partialhydrolyse des vernetzten Seidenfibroins wurden tyrosin-haltige Peptide mit einer durchschnittlichen Länge von 3 bis 4 Aminosäuren herausgespalten, die reich an mehrfunktionellen Aminosäuren waren. Auch dieser Befund ergibt, daß jene Aminosäuren gehäuft in den amorphen Segmenten vorkommen.

Die Reaktion von Fibroin mit 1.5-Difluor-2.4-dinitrobenzol und 2.2'-Difluor-3.5.3'.5'-tetranitro-diphenyl<sup>71)</sup>



führte nur in geringerem Grade zur Vernetzung. Dies ist zweifellos eine Folge des zu kleinen F—F-Abstandes in diesen Verbindungen.

Eine Vernetzung des Fibroins ist wahrscheinlich auch die Folge einer milden Oxydation. *Earland* und *Stell*<sup>72)</sup> stellten fest, daß Seide nach Behandlung mit verd. Lösungen von Permanganat, Hypochlorit, Jod und Chlordioxyd in den normalen Solventien unlöslich wird. Aus der Abnahme des freien Tyrosins kann auf dessen Oxydation zum Chinon (I) geschlossen werden, das dann mit der freien Amino-Gruppe einer benachbarten Kette reagieren kann (II).



Schärfere Oxydation führt zum Abbau der Faser<sup>73)</sup>, was sich hauptsächlich durch Gewichtsverlust, Vermehrung der Zahl der Carboxyl-Gruppen und Abfall der Viscosität äußert.

### Probleme der Fibroin-Forschung

Abgesehen von den rein konstitutionschemischen Problemen, welche die Seidenfibroin-Gebiete bieten, verdienen auch einige makromolekulare Fragen Beachtung. So kann man die mechanischen Eigenschaften, z. B. Festigkeit und Elastizität, bemerkenswert gut mit der chemischen Zusammensetzung in Beziehung setzen. *Lucas, Shaw* und *Smith*<sup>74)</sup> haben die Aminosäure-Zusammensetzung von verschiedenen Seidenarten ermittelt und diese Seiden nach dem Verhältnis geräumiger Aminosäure-Reste in drei Hauptgruppen eingeteilt: „Anaphe Fibroine“, die zu 90% aus Glycin und Alanin bestehen, geben lineare, steile zugelastische Kurven. Die Fasern reißen bei 12,5% Dehnung. Die „Tussah-Fibroine“, welche relativ viele

sperrige Aminosäure-Reste enthalten, liefern eine sigmoide zugelastische Kurve. Daraus geht hervor, daß innerhalb der amorphen Bereiche des Moleküls Faltungen vorkommen, welche auf Zugkräfte hin leicht deformiert werden. Die Bruchdehnung beträgt 35%. Das zugelastische Verhalten der in diesem Aufsatz besprochenen „Bombyx-Seide“ liegt zwischen demjenigen von Anaphe und Tussah entsprechend der Tatsache, daß im Bombyx-Fibroin auch der Anteil sperriger Aminosäuren zwischen denen von Anaphe und Tussah liegt. Durch derartige mechano-chemische Untersuchungen kann man einen wertvollen Beitrag zu der heute viel diskutierten Frage der Tertiär-Struktur von Proteinen liefern<sup>75)</sup>.

Vom Standpunkt der Faserchemie aus ist die Frage, warum Seide vom Licht stärker angegriffen wird als jede andere Naturfaser, immer noch nicht befriedigend geklärt. Nach *Okamoto*<sup>76)</sup> werden Tyrosin, Threonin und Leucin am raschesten angegriffen. *Okamoto* und *Kimura*<sup>77)</sup> fanden, daß auch das Tryptophan bei Belichtung angegriffen wird und zur Vergilbung und Morschwerden der Faser führt. Bis heute wurde kein wirklich wirksamer Inhibitor für den photochemischen Abbau gefunden und der Mechanismus des photochemischen Abbaus ist immer noch nicht genau bekannt.

Ein weiteres interessantes Gebiet ist die chemische Modifizierung von Seide zur Erhöhung ihrer Alkalifestigkeit, da man Seide im allgemeinen mit Küpen- und Schwefelfarbstoffen, die aus stark alkalischen Lösungen angewendet werden, nicht färben kann. Wie aus dem Sammelreferat von *Lucas, Shaw* und *Smith*<sup>78)</sup> hervorgeht, haben die meisten Versuche zur Verbesserung gewisser textiler Eigenschaften von Seide durch chemische Modifizierung bisher versagt oder gleichzeitig unerwünschte Nebeneffekte ergeben. Dies beruht wohl vor allem darauf, daß die Seide im Gegensatz zur Wolle viel weniger Aminosäure-Reste enthält, welche reaktionsfähige und substituierbare funktionelle Gruppen besitzen. Dazu kommt, daß ein Teil der wenigen reaktionsfähigen Gruppen für chemische Reaktionen nicht zugänglich ist. Man kann jedoch mit Sicherheit annehmen, daß die Seidenforschung von den rapiden Fortschritten der allgemeinen Proteinchemie, die wir jetzt erleben, in der nächsten Zeit viel profitieren wird, und daß die Naturseide die erste Proteinfaser sein dürfte, deren im Ganzen hervorragende Eigenschaften durch Aufklärung ihrer primären, sekundären und tertiären Struktur einmal chemisch restlos erklärt werden können.

Für die Durchsicht des Manuskriptes und für wertvolle Anregungen danken wir Prof. Dr. H. Zahn. Dem Internationalen Wollsekretariat, London und Düsseldorf, wird für die Förderung unserer eigenen analytischen Arbeiten gedankt.

Eingegangen am 7. September 1959 [A 1]

<sup>71)</sup> H. Zahn u. H. Zuber, Chem. Ber. 86, 172 [1953].

<sup>72)</sup> C. Earland u. J. G. P. Stell, Biochim. biophysica Acta 23, 97 [1957].

<sup>73)</sup> D. A. Sitch u. S. G. Smith, Shirley Inst. Mem. 30, 47 [1957].

<sup>74)</sup> F. Lucas, J. T. B. Shaw u. S. G. Smith, J. Textile Inst. 46, T 440 [1955]; Shirley Inst. Mem. 28, 77 [1955].

<sup>75)</sup> Primäre Struktur = Aminosäuresequenz; Sekundäre Struktur = Gestalt der Peptidkette, z. B. gestreckt oder Schraube; Tertiäre Struktur = Wechselwirkung zwischen verschiedenen Ketten.

<sup>76)</sup> S. Okamoto, J. Soc. Textile Cellulose Ind. Japan 9, 284 [1953].

<sup>77)</sup> S. Okamoto u. T. Kimura, ebenda 10, 629 [1954].

<sup>78)</sup> F. Lucas, J. T. B. Shaw u. S. G. Smith, Adv. Protein Chem. 12, 107 [1958].