

Fragen der Stoffwechselregulation beantworten kann. Hier handelt es sich um Probleme von sehr allgemeiner, über das rein akademische Interesse hinausgehender Bedeutung. Zahlreiche Einflüsse aus der Umgebung, Nahrungsbestandteile sowie hormonale Faktoren ändern die Geschwindigkeit der Cholesterin-Synthese, aber unser Wissen ist noch zu gering, als daß sich sagen ließe, an welchen Stellen die physiologische Regulation am wirksamsten ist. Wenn das Prinzip der negativen Rückkoppelung, wie in so vielen Reaktionsketten, auch in der Cholesterin-Synthese auftritt, dann sollte der erste für diese Synthese spezifische Schritt geschwindigkeitsbestimmend sein und durch Cholesterin, das Endprodukt der Synthesekette, beeinflußt werden. Auf Grund dieser Überlegungen kommt besonders die Reduktion von Hydroxymethylglutaryl-CoA zu Mevalonsäure als Regelstelle in Frage. Es gibt auch experimentelle Hinweise dafür, besonders in den Arbeiten *Buchers*, die gezeigt haben, daß cholesterinreiche Nahrung, Röntgenbestrahlung oder Hunger ihre tiefgreifende Wirkung auf die Cholesterin-Synthese auf einer Stufe ausüben, die mindestens sehr in der Nähe der Mevalonsäure-Bildung liegt [76]. Diese Arbeitshypothese der homöostatischen Regulation bleibt weiterhin interessant [77], und man darf hoffen, daß die raschen Fortschritte in der Aufklärung von Regelmechanismen im allgemeinen auch zu einem besseren Verständnis der Vorgänge führen, die an der Regulation der Cholesterin-Biosynthese im speziellen beteiligt sind.

Parallel mit dem Interesse an den chemischen und enzymatischen Aspekten der Cholesterin-Biosynthese haben auch die Versuche zugenommen, die Rolle der Sterine als Zellbestandteile zu verstehen. Die bekannten Umwandlungen des Cholesterins im Stoffwechsel, die Bildung von Steroidhormonen und Gallensäuren er-

füllen sicher einen ganz speziellen Zweck, denn man findet sie nur bei Wirbeltieren. In einigen Geweben und Zellen hat das Cholesterin dagegen eindeutig keine Stoffwechselfunktion. In Organismen, welche die Sterine nicht metabolisieren, sie aber dennoch produzieren oder benötigen – und das gilt für alle mit Ausnahme der primitivsten Formen des Lebens –, müssen die Sterine irgendeine Rolle als strukturelle Zellbestandteile spielen. Die vergleichende Biochemie zeigt, welcher Art diese Rolle sein könnte: Bakterien oder blaugrüne Algen, d. h. primitiv organisierte Zellen, die keine von Membranen umgebene intrazelluläre Organellen haben, enthalten auch keine Sterine. Die Bildung von Strukturen, die mit Membranen versehen sind und spezielle Funktionen haben, gilt heute als ein Meilenstein in der evolutionären Differenzierung [78], und es scheint, daß die parallele Entwicklung der Sterin-Biosynthese ein biochemischer Ausdruck der morphologischen Veränderungen ist. Die Sterine sind in den differenzierten Zellen nicht statistisch verteilt, sondern befinden sich bevorzugt an der cytoplasmatischen Membran und ihren endoplasmatischen Erweiterungen. Wir wissen noch nicht, warum und zu welchem Zweck die Sterine in der Evolution der Organismen entstanden sind. Möglicherweise bieten sie mit der Stabilität, Ebenheit und hydrophoben Natur ihres Molekülgerüsts eine Kombination von Eigenschaften, die sie ganz besonders zur Stabilisierung der empfindlichen Membranen höher entwickelter Zellen geeignet sein ließ.

Die hier beschriebenen Untersuchungen sind von folgenden Organisationen großzügig gefördert worden: National Institute of Health, National Science Foundation, Life Insurance Medical Research Fund, Nutrition, Foundation, Eugene Higgins Trust Fund of Harvard University.

Eingegangen am 12. April 1965 [A 475]
Übersetzt von Dr. H. Grünewald, Heidelberg

[76] N. L. R. Bucher [38], S. 46.

[77] M. D. Siperstein u. V. M. Fagan: *Advances in Enzyme Regulation*. Pergamon Press, Oxford 1964, Bd. 2, S. 249.

[78] R. Y. Stanier u. C. B. van Niel, *Arch. Mikrobiol.* 42, 17 (1962).

Die Röntgenstrukturanalyse komplizierter Moleküle

Nobel-Vortrag am 12. Dezember 1964 [*]

VON PROF. DR. DOROTHY CROWFOOT-HODGKIN

LABORATORY OF CHEMICAL CRYSTALLOGRAPHY, OXFORD UNIVERSITY, OXFORD (ENGLAND)

Das Phänomen der Röntgenbeugung an Kristallen begegnete mir erstmals in einem Buch „Concerning the Nature of Things“, das W. H. Bragg 1925 für Schulkinder geschrieben hatte. In diesem Buch hieß es: „Man kann sagen, daß die Entdeckung der Röntgenstrahlen unseren Gesichtssinn mehr als 10000-mal verstärkt hat,

so daß wir jetzt sogar einzelne Atome und Moleküle „sehen“ können“. Etwa zur gleichen Zeit hörte ich auch zum ersten Male von der Biochemie, und hier erschienen mir diejenigen Moleküle, die zu „sehen“ mich am meisten verlangte. Als Chemiestudentin in Oxford mit *Robinson* und *Hinshelwood* unter meinen Lehrern faszinierten mich die Gebäude, welche die Chemiker mit Hilfe von Experiment und Imagination errichtet hatten – aber die Frage ließ mich nicht los, ob es nicht besser

[*] © 1965. The Nobel Foundation. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

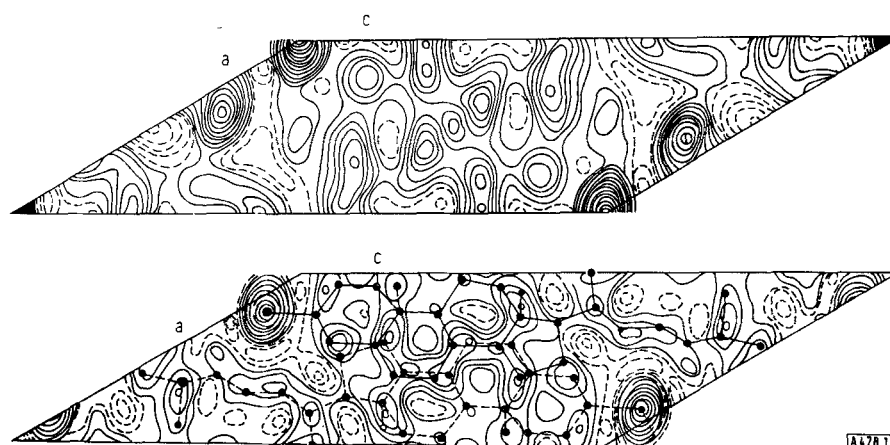
wäre, wenn man tatsächlich „sehen“ könnte, ob sich so komplizierte Moleküle wie die Sterine oder das Strychnin wirklich so verhalten, wie es das Experiment zeigte. Der Versuch, mit Röntgenstrahlen zu „sehen“, war bei diesen Molekülen sicher wesentlich schwieriger, als es die frühe Lektüre des Braggschen Buches vielleicht hatte vermuten lassen. Mit einigem Zögern begann ich gemeinsam mit *H. M. Powell* meine erste Untersuchung an Dialkylthallium-halogeniden. Diese Substanzen standen meinen späteren Forschungsobjekten zwar fern, waren aber dennoch auf merkwürdige Weise mit ihnen verbunden.

Eine Reihe glücklicher Zufälle (so etwa das unvorhergesehene Zusammentreffen mit Dr. *A. F. Joseph*, einem alten Freund von mir, und Prof. *Lowry* in der Eisenbahn) brachte mich 1932 zu *J. D. Bernal* nach Cambridge. Dort kannte unsere wissenschaftliche Welt keine Grenzen. In einer Unterabteilung für Mineralogie, die sich während meines Aufenthaltes in eine Unterabteilung für Physik verwandelte, erforschten wir die Kristallographie zahlreicher Naturstoffe, die Struktur der Flüssigkeiten und insbesondere des Wassers, wir beschäftigten uns mit dem Kaliumnatriumtritat, mit dem isomorphen Ersatz und der Phasenbestimmung, mit Metall-Kristallen und Pepsin-Kristallen, und wir spekulierten über die Muskelkontraktion. Biologen und Biochemiker waren unsere engsten Freunde. Nur ungern verließ ich Cambridge, um zu versuchen, eine akademische Laufbahn zu beginnen und eines oder zwei der vielen Probleme zu lösen, die wir uns gestellt hatten.

Ich brauche hier nicht im einzelnen auf die Theorie der Röntgenstrukturanalyse von Kristallen einzugehen, denn dies haben vor langer Zeit *W. L. Bragg* [1] und vor 2 Jahren abermals in vorzüglicher Weise *Perutz* und *Kendrew* [2] getan. Die benötigten experimentellen Daten sind Röntgendiagramme, die gewöhnlich photographisch aufgenommen werden, und ihre visuell geschätzten Intensitäten. Jedes Röntgendiagramm entspricht einer Reihe harmonischer Glieder, deren Rekombina-

des Röntgendiagramms beschreiben. Beide hängen von der Lage der Atome im Kristall ab, aber nur die Amplituden lassen sich leicht messen. *Perutz* und *Kendrew* haben dargelegt, daß die Einführung schwerer Atome an definierten Stellen des untersuchten Kristalls die Möglichkeit zur direkten Berechnung der Phasenwinkel aus den beobachteten Amplituden in den Röntgendiagrammen isomorpher Kristalle gibt. Man ist damit in der Lage, nach einer ausreichenden Zahl von Messungen die Elektronendichte zu ermitteln und damit die gesamte Struktur des Kristalls vor seinen Augen ausgebreitet zu sehen. Die vor zwei Jahren von *Perutz* und *Kendrew* beschriebenen Berechnungen waren eine erstaunliche Leistung. Viele zehntausend Reflexe mußten für fünf oder sechs Kristalle gemessen werden, um die Verteilung der Elektronendichte im Myoglobin und Hämoglobin zu erhalten. In vielen anderen Fällen sind die Voraussetzungen für eine direkte Berechnung der Elektronendichte aber nicht gegeben, und man kann sich der endgültigen Antwort dann nur schrittweise nähern. Wenn sich die Orte einiger Atome, besonders der schwereren, finden lassen, so kann man von diesen Punkten aus mit der Berechnung der Elektronendichte beginnen, die zwar zunächst unvollständig ist, aber neue Gebiete im Kristall erschließt. Man wiederholt die Berechnung dann so lange, bis die gesamte Atomverteilung klargeworden ist.

Als ich am Anfang meiner Untersuchungen stand, wurden zwei wesentliche Hilfsmittel verfügbar: die Patterson-Synthese und die Beevers-und-Lipson-Streifen. *Patterson* zeigte, daß eine erste, direkt aus den Grunddaten berechnete Fourier-Synthese, der also noch keine Information über den Phasenwinkel zugrundeliegt, die Länge und Orientierung der interatomaren Vektoren im Kristall ergibt [3]. Damit konnte man in einfachen Strukturen die gesamte Atomanordnung erhalten, und in komplizierteren Fällen wenigstens die Lage der schweren Atome. Beevers-und-Lipson-Streifen [4] gaben einem armen Kristallographen die Möglich-



tion eine Darstellung des röntgenbeugenden Materials im Kristall, d. h. der Elektronendichte, gibt. Die Berechnung verlangt die Summation einer Fourier-Reihe, deren Glieder die Amplituden und Phasen der Reflexe

Abb. 1. Erste Stufen der Röntgenanalyse von Cholesteryljodid. Oben: Patterson-Projektion längs der b-Achse. Die stärksten Maxima entsprechen Jod-Jod-Vektoren. — Unten: Projektion der Elektronendichte-Verteilung, berechnet mit Hilfe der aus den Jod-Beiträgen ermittelten Phasenwinkel. Die Umrisse zweier Sterinmoleküle, die durch eine zweizählige Schraubenachse in Beziehung stehen, sind eingezeichnet.

[1] *W. L. Bragg*: Les Prix Nobel 1921.

[2] *M. F. Perutz*, *Angew. Chem.* 75, 589 (1963); *J. C. Kendrew*, *ibid.* 75, 595 (1963).

[3] *A. L. Patterson*, *Z. Krist. A*, 90, 517 (1935).

[4] *C. A. Beevers* u. *H. Lipson*, *Proc. physic. Soc.* 48, 772 (1936)

keit, mit seinen Rechnungen zu beginnen, denn jeder Streifen zeigt eine wellenförmige Verteilung, die einem Glied einer Fourier-Reihe entspricht. Ich habe noch heute den Brief von *Beevers* und *Lipson*, in dem sie mir einen Kasten solcher Streifen für 5 £ anboten – ich habe den Kasten dann gekauft.

Unsere frühen Versuche zur Strukturanalyse erscheinen heute recht primitiv. Cholesterylchlorid und Cholesterylbromid erwiesen sich als nicht genügend isomorph, als daß sich ihre Kristallstrukturen durch direkte Phasenbestimmung hätten lösen lassen. Wir gingen daher zum Cholesteryljodid über, dessen schweres Atom im Kristall mit Hilfe der Patterson-Synthese leichter zu lokalisieren war (Abb. 1) und gleichzeitig stärker zur Streuung der Röntgenstrahlen beitrug [5]. *Harry Carlisle* zeigte, daß man die Lage der Atome in drei Dimensionen angeben konnte, wenn man Abschnitte und Linien in der dreidimensionalen Elektronendichteverteilung mit Hilfe von Phasen berechnete, die anfangs allein aus den Beiträgen des Jod-Atoms zur Röntgenbeugung ermittelt wurden. Er brauchte mit *Beevers-Lipson*-Streifen Monate für diese Berechnungen, die man heute in wenigen Stunden erledigen könnte. Die gefundene Atomverteilung bestätigte die nach *Bernal*s erster Röntgenanalyse modifizierte Sterinformel von *Rosenheim* und *King* und von *Wieland* und *Dane* [6]. Wir suchten daher nach einer Verbindung, deren Struktur etwas unbekannter war.

Chain und *Abraham* überredeten uns, das Penicillin zu untersuchen, noch bevor die Substanz kristallisiert worden war. Ich züchtete Kristalle dieses Antibiotikums für die Röntgenanalyse aus drei Milligramm des Natriumsalzes, das während des Krieges vom Squibb Research Institute zu *Sir Henry Dale* geflogen worden war. Ich tat dies unter der wachsamen Aufsicht von *Kathleen Lonsdale*, die mir die Substanz aus London gebracht hatte. Später züchteten wir auch Kristalle des Kalium- und Rubidium-benzylpenicillins, und hofften, so eine isomorphe Reihe zu erhalten. Aber das Natriumsalz war mit den beiden anderen Salzen nicht isomorph, und die Kalium- und Rubidium-Ionen befanden sich in Lagen, in denen sie nur zur wenigen Reflexen beitragen konnten. Ein Vergleich der sehr unvollständigen Elektronendichteverteilungen, die für beide Reihen berechnet worden waren, gab schließlich die Lösung. Aber die Methoden, mit deren Hilfe die Elektronendichteverteilungen ermittelt wurden, bestanden angesichts unserer geringen Rechenmöglichkeiten mehr im Einfallsreichtum meiner Mitarbeiter, *Charles Bunn* und *Barbara Low*, als in einem allgemeinen, für die heutige Strukturermittlung brauchbaren Verfahren [7]. Die Struktur des verhältnismäßig kleinen Penicillin-Moleküls würde man heute ganz anders untersuchen, nämlich mit Hilfe der Methode des schweren Atoms, für die eine einzige kristalline Form genügt. Beispielsweise ist es einfach, mit Hilfe biosynthetischer Verfahren ein schweres Atom,

etwa Brom, in das Molekül einzuführen. Die dreidimensionale Lage dieses Atoms läßt sich eindeutig mit Hilfe einer Patterson-Synthese berechnen. Die anderen Atomlagen ergeben sich dann ohne jede Schwierigkeit aus der

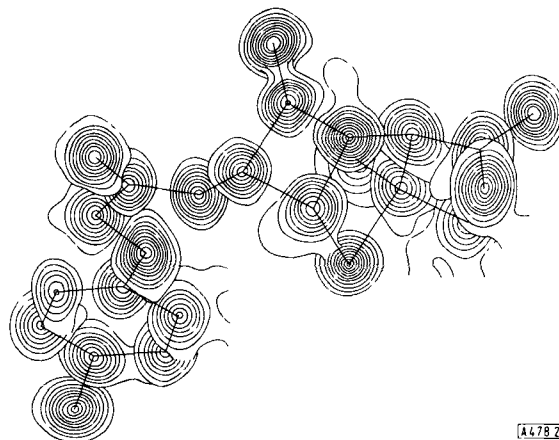
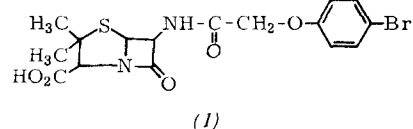


Abb. 2. p-Bromphenoxymethylpenicillin. Elektronendichte in der Umgebung der Atomschwerpunkte in Projektion auf die c-Ebene. Die Abstände zwischen den Linien betragen $1e/\text{\AA}^3$ (K. J. Watson).

anschließend berechneten dreidimensionalen Elektronendichteverteilung und erscheinen bei der Verfeinerung in vorzüglicher Klarheit. In Abbildung 2 ist die Elektronendichteverteilung des p-Bromphenoxymethylpenicillins (1) [8] wiedergegeben, das Dr. *Margreiter* herstellte.



Eigentlich ist es nicht einmal nötig, in Moleküle dieser Art ein schweres Atom einzuführen. Das in ihnen enthaltene Schwefelatom ist bereits schwer genug und erfüllt seinen Zweck bei der Strukturanalyse etwa des Natriumbenzylpenicillins fast ebenso gut wie ein Brom-Atom. *Maslen* und *Abrahamsson* haben am Penicillin V [9] und am Cephalosporin C [10] gezeigt, daß man mit etwas Mühe das Schwefel-Atom in der Kristallstruktur eindeutig lokalisieren kann, und daß sich die restlichen Atome dann aus der Vektor-Verteilung relativ zum Schwefel-Atom finden lassen. Abbildung 3 zeigt die

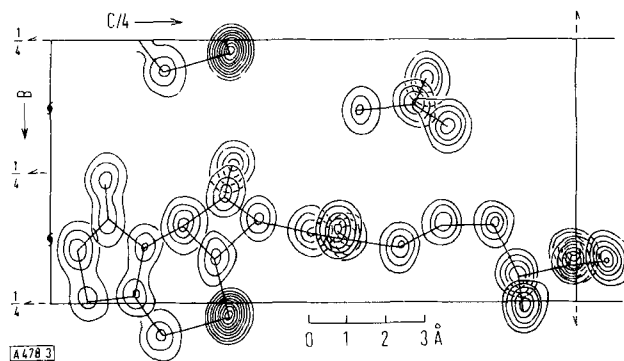


Abb. 3. Cephalosporin Cc. Projektion der Elektronendichte in der Umgebung der Atomschwerpunkte längs der Achse a. Die Abstände zwischen den Linien betragen $2e/\text{\AA}^3$ (R. Diamond).

[8] K. J. Watson, unveröffentlicht.

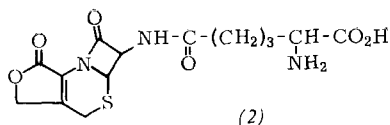
[9] S. Abrahamsson, D. C. Hodgkin u. E. N. Maslen, *Biochem. J.* 86, 514 (1963).

[10] D. C. Hodgkin u. E. N. Maslen, *Biochem. J.* 79, 393 (1961).

[5] C. H. Carlisle u. D. Crowfoot, *Proc. Roy. Soc. (London)* A, 184, 64 (1945).

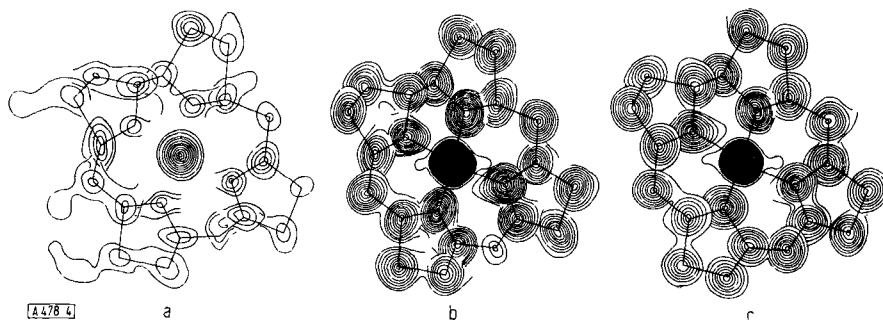
[6] J. D. Bernal, *Nature* (London) 129, 277 (1932).

[7] D. Crowfoot, C. W. Bunn, B. W. Rogers-Low u. A. Turner Jones: *The Chemistry of Penicillin*. Princeton University Press 1949, S. 310.

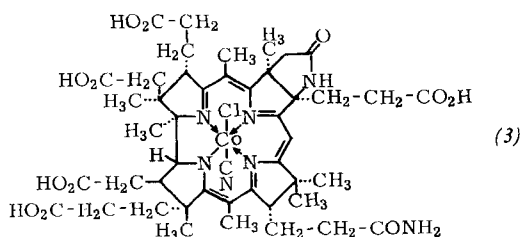


Elektronendichteverteilung im Kristall des Cephalosporins Cc (2), eines besonders interessanten Antibiotikums, das *Abraham* und *Newton* herstellten. Man erkennt aus der Abbildung mit Leichtigkeit die chemische Struktur der Verbindung: Ein viergliedriger β -Lactamring ist an einen sechsgliedrigen schwefelhaltigen Ring gebunden. Cephalosporin Cc kristallisiert mit einem Molekül Essigsäure, die im Kristall zwischen den langen Ketten liegt [11].

Das Schwefel-Atom im Cephalosporin C trägt zur Röntgenbeugung etwa soviel bei wie ein Sechstel des restlichen Moleküls. Das Verhältnis ist damit ungefähr das gleiche wie beim Kobalt im Vitamin B₁₂, d. h. im



Cyanocobalamin. Als uns Dr. *Lester Smith* die ersten Kristalle dieses gegen die pernicioöse Anämie wirksamen Faktors bald nach seiner Isolierung durch Dr. *Folkers* und seine Mitarbeiter brachte, wußten wir über dieses Molekül absolut nichts. Zwei über Nacht aufgenommene Röntgendiagramme zeigten, daß das Molekulargewicht in der Größenordnung von 1500 liegen mußte. Die Verbindung ist so kompliziert, daß selbst ihre Summenformel am besten mit Hilfe einer Röntgenanalyse ermittelt wird. In ihren Umrissen nahm die Röntgenstrukturanalyse den gewohnten Gang: dreidimensionale Patterson-Synthese, dreidimensionale Fourier-Synthese und Ermittlung der Atomlagen durch immer neue Rechnungscyclen, doch kann diese äußerliche Beschreibung kaum einen Eindruck davon vermitteln, durch welche Stadien verwirrten Halbwissens wir uns zu kämpfen hatten. Wiederum spielte es eine große Rolle, daß wir das Corrin-Gerüst, welches das Kobalt-Atom umgibt, in sehr verschiedenen Kristallen analysieren konnten [12]. Uns standen Cyanocobalamin-Kristalle zur Verfügung



[11] R. D. Diamond, Dissertation, Oxford 1963.

[12] D. C. Hodgkin, J. Kamper, J. Lindsey, M. Mackay, J. Pickworth, J. H. Robertson, C. B. Shoemaker, J. G. White, R. J. Prosen u. K. N. Trueblood, Proc. Roy. Soc. (London) A, 242, 228 (1957).

und einige, oder vielleicht besser: ein Kristall einer Hexacarbonsäure (3), die *Canon, Johnson* und *Todd* durch Abbau aus dem Cyanocobalamin gewonnen hatten.

Hilfe gewährten uns auch Freunde, die über elektronische Rechenmaschinen verfügten. Es war ein besonders glücklicher Tag, als *Kenneth Trueblood* bei einem sommerlichen Besuch in Oxford in unser Laboratorium kam und uns anbot, Berechnungen mit einer schnell arbeitenden elektronischen Rechenmaschine in Californien ausführen zu lassen – kostenlos und mit herrlicher Genauigkeit. Diese Berechnungen gehören noch heute zu den besten Beispielen dafür, wie die Atomlagen im Verlauf der Ermittlung der Elektronendichteverteilung allmählich deutlicher und deutlicher hervortreten [13]. Beispiele zeigt die Abbildung 4.

Als bester Beweis für die Struktur des Corrin-Gerüsts im Vitamin B₁₂ darf das Ergebnis der Röntgenanalyse der Cobyrssäure (4) gelten. Diese Verbindung (Faktor V_{1a}) bildet orange-rote Kristalle. Sie wurde in sehr kleinen Mengen von *Bernhauer, Wagner* und *Wahl* [14] aus

Abb. 4. Elektronendichteverteilung im Corrin-Gerüst der Hexacarbon säure (3) auf verschiedenen Stufen der Berechnung. Die Phasenwinkel wurden ermittelt a) allein aus den Beiträgen für Kobalt, b) aus den Beiträgen für Kobalt und das Corrin-Gerüst mit Ausnahme des Kohlenstoffatoms 10, c) aus den Beiträgen für Kobalt und sämtliche Atome des Corrin-Gerüsts. Außer beim Kobaltatom betragen die Abstände zwischen den Linien $1e/\text{\AA}^3$.

Klärschlamm isoliert. Die Röntgenanalyse gelang mit Hilfe eines Verfahrens, das mir noch heute als bemerkenswert erscheint.

Die Kristalle sind monoklin, Raumgruppe P2₁, sie enthalten zwei Moleküle in der Elementarzelle, und Röntgenaufnahmen mit Kupfer-K α -Strahlung zeigen deutlich den Einfluß einer anomalen Dispersion (Abbildung 5, $F_{hkl} \neq F_{\bar{h}\bar{k}l}$). Diese Ungleichheit in den Intensitäten kommt zustande durch eine kleine Phasenänderung bei der Beugung am Co-Atom,

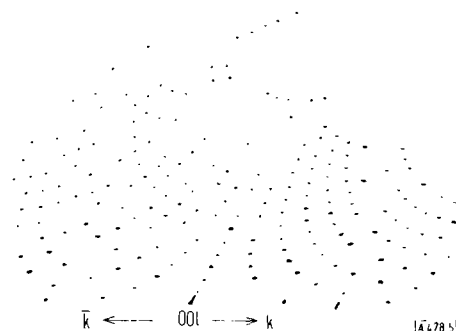


Abb. 5. okl-Reflexe von einer Probe des Faktors V_{1a}. Die Asymmetrie zu beiden Seiten der durch Pfeile gekennzeichneten Linie ist deutlich zu erkennen.

[13] D. C. Hodgkin, J. Pickworth, J. H. Robertson, R. J. Prosen R. A. Sparks u. K. N. Trueblood, Proc. Roy. Soc. (London) A, 251, 306 (1959).

[14] K. Bernhauer, F. Wagner u. D. Wahl, Biochem. Z. 334, 279 (1961).

das in der Nähe der Wellenlänge der Cu-K α -Strahlung eine Absorptionskante hat. Dadurch wird es möglich, zur Bestimmung des Phasenwinkels ein Verfahren zu benutzen, das zuerst *Bijvoet*, *Ramachandran* und andere [15, 16] vorgeschlagen haben und das in Abbildung 6 skizziert ist. Durch Mes-

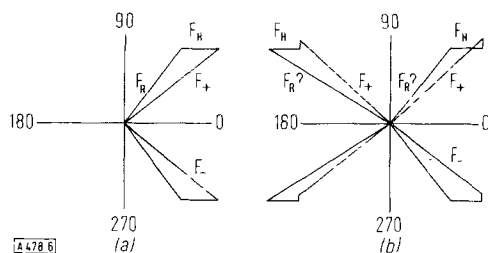


Abb. 6. Phasenbestimmung in einem monoklinen Kristall, Beispiel: Cobyrssäure.

a) In einem Paar isomorpher Kristalle. Hier können F-Werte für den substituierten und unsubstituierten Kristall sowie für die schweren Atome (F_H , F_R und F_+) ermittelt werden, aber die Bestimmung des Phasenwinkels ist zweideutig an der Linie 0–180 im Argand-Diagramm (Spiegelung).

b) In einem Einkristall, der ein anomal streuendes Atom enthält, können F_{Hkl} und $F_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}$ sowie F_+ und F_- unterschieden werden, aber F_R ist im allgemeinen unbekannt, und der Phasenwinkel ist in Bezug auf die Linie 90–270 unbestimmt. Bei der Untersuchung der Cobyrssäure wählen wir den näher an F_H gelegenen Phasenwinkel.

sung der Intensitäten der F_{Hkl} - und $F_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}$ -Reflexe konnten *Dale* und *Venkatesan* 1994 Reflexen, das ist etwa der Hälfte aller beobachteten Reflexe, verhältnismäßig genaue Phasenwinkel zuordnen. Die Berechnung setzt voraus, daß man den Ort des Kobaltatoms kennt, doch läßt sich dieser durch eine Patterson-Synthese leicht finden.

Die erste mit Hilfe dieser 1994 Reflexe berechnete Elektronendichteverteilung zeigte das gesamte Molekül und seine Kristallstruktur. Die Formel der Cobyrssäure (4) hätte sich daraus ohne weiteres ableiten lassen, obwohl diese Elektronendichteverteilung genau genommen von

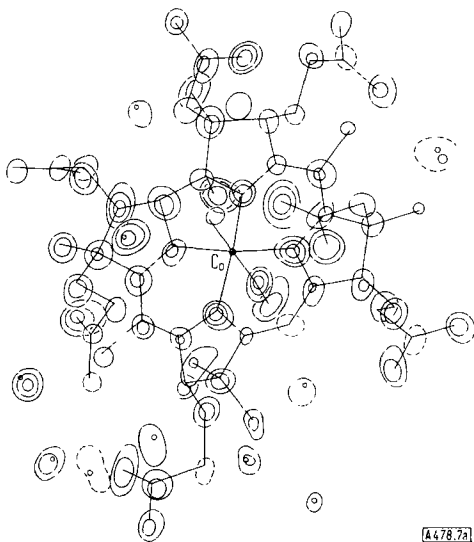
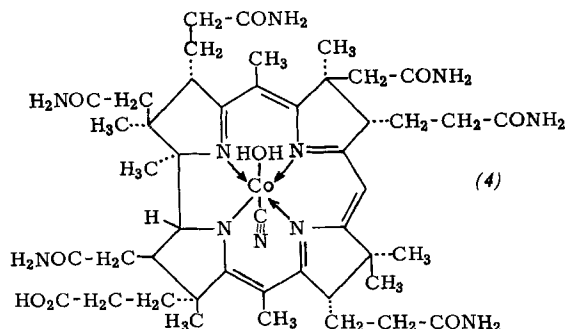


Abb. 7a. Für Cobyrssäure (Faktor V_{1a}) aus $p1$ berechnete Elektronendichteverteilung. Beginnend mit der Zwei-Elektronen-Linie beträgt der Abstand zwischen den Linien $1e/\text{\AA}^3$. An einigen Stellen ist punktiert die Ein-Elektronen-Linie eingezeichnet worden, um eine Atomlage zu markieren.

[15] A. F. Peerdeman u. J. M. Bijvoet, Acta crystallogr. 9, 1012 (1956).

[16] G. N. Ramachandran u. S. Raman, Current Sci. 25, 348 (1956); S. Raman, Proc. Indian Acad. Sci. 47, 1 (1958).

jedem Atom nur einen Teil zeigt (Abb. 7a). Weitere Berechnungszyklen ergaben dann die volle Elektronendichteverteilung. In dieser sind, wie aus Abbildung 7b zu erkennen ist, sogar die Positionen einiger Wasserstoffatome sichtbar. Das Molekül liegt in der Form



eines Aquo- oder Hydroxy-cyanids vor, wobei die Cyanid-gruppe den im Cyanocobalamin vorhandenen Nucleotidrest und das Wassermolekül die im Cyanocobalamin vorhandene Cyanidgruppe ersetzt [17].

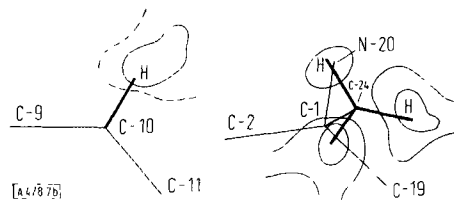
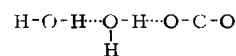


Abb. 7b. Ausschnitt aus der Differenzkarte $\Delta\rho$, die für Cobyrssäure berechnet wurde. Man erkennt die Wasserstoffatome an C-24 und C-10.

Einzelheiten der Kristallstruktur des Faktors V_{1a} sind für das chemische Verhalten dieser Verbindung von Bedeutung (Abb. 8). So sind die Amidgruppen an der Peripherie des Moleküls durch Wasserstoffbrücken mit den Amidgruppen benachbarter Moleküle entweder direkt oder über Wassermoleküle verknüpft. Eine Ausnahme macht lediglich die Amidgruppe am Ende der Seitenkette an C-7, die ins Innere des Moleküls gewendet ist und mit dem Wassermolekül am Kobaltatom eine Wasserstoffbrücke bildet. Die dabei auftretenden Kräfte reichen aus, um die Lage des Kohlenstoffatoms 7 zu verzerren. Gleichzeitig gelangt die Amidgruppe in die Nähe des C-Atoms 8, mit der sie in der Hexacarbonsäure (3) einen Lactamring bildet. Das am Kobaltatom stehende Sauerstoffatom muß Teil eines Wassermoleküls und nicht Teil einer Hydroxygruppe sein, denn die orange-roten Kristalle der Verbindung fallen bei sauren pH-Werten aus (vgl. das Verhalten von Hämoglobin und Myoglobin). Im Kristall ist dieses Sauerstoffatom über ein weiteres Wassermolekül mit der Carboxygruppe eines benachbarten Moleküls verknüpft. Es müßte leicht sein, das System



[17] D. Dale, D. C. Hodgkin u. K. Venkatesan: Crystallography and Crystal Perfection. Academic Press, London 1963, S. 237.

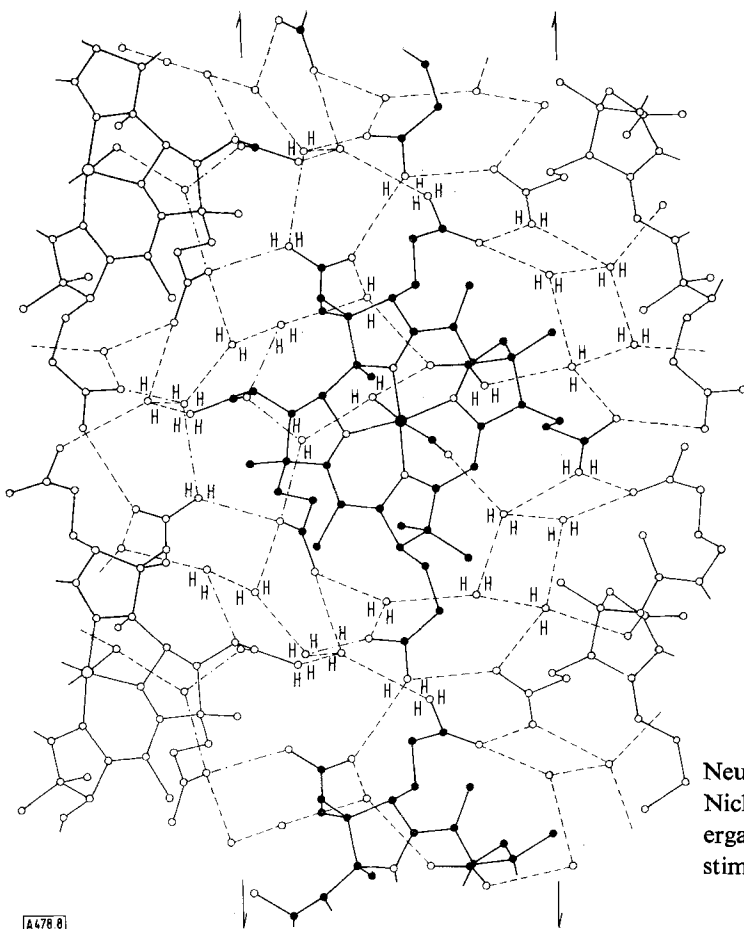
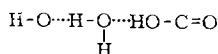


Abb. 8. Kristallstruktur der Cobysäure in einer Projektion längs der a-Achse. Moleküle mit Schwerpunkt bei x sind durch kräftige Linien, Moleküle mit Schwerpunkt bei \bar{x} durch schwächere Linien gekennzeichnet. Punktierte Linien bedeuten Wasserstoffbrücken.

durch die Verschiebung von zwei Wasserstoffatomen innerhalb des Kristalls in das System



umzuwandeln, und es wäre interessant zu prüfen, ob diese Verschiebung zweier Wasserstoffatome wie im Kaliumnatriumtartrat unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes eintritt.

Die Atomabstände im Corrin-Gerüst des Faktors V_{1a} entsprechen einer Struktur mit 6 in Resonanz befindlichen Doppelbindungen [12]. Diese Entsprechung ist so genau (Abb. 9), daß es an der Formel (4) kaum einen Zweifel geben kann. Es war für mich ein bedeutendes Erlebnis, als J. D. Dunitz im letzten Sommer vor der Royal Society berichtete, daß er bei der Röntgenanalyse des von Eschenmoser und Mitarbeitern [18] im gleichen Jahr synthetisierten Nickel-Corrin-Derivates (5) zu ganz ähnlichen Resultaten gekommen ist. Das Molekül ist zwar insgesamt kleiner (Abb. 10), aber die Identität seines Kohlenstoffgerüsts mit dem der Cobysäure ist sicher.

[18] E. Bertele, H. Boos, J. D. Dunitz, F. Elsinger, A. Eschenmoser, I. Felner, H. P. Gribi, H. Gschwend, E. F. Meyer, M. Pesaro u. R. Scheffold, Angew. Chem. 76, 393 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 490 (1964).

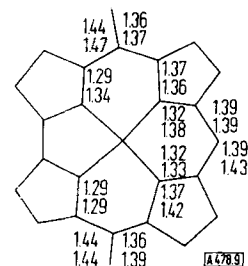


Abb. 9. Atomabstände, die für Cobysäure aus ρ_6 ermittelt wurden (untere Zahlen), und Werte, die für ein System mit sechs in Resonanz befindlichen Doppelbindungen errechnet wurden (obere Zahlen).

Neuerdings haben Dunitz und Meyer die Struktur des Nickel-Corrins über mehrere Stufen verfeinert. Dabei ergaben sich Atomabstände (Abb. 11), deren Übereinstimmung mit theoretisch berechneten Werten so gut ist,

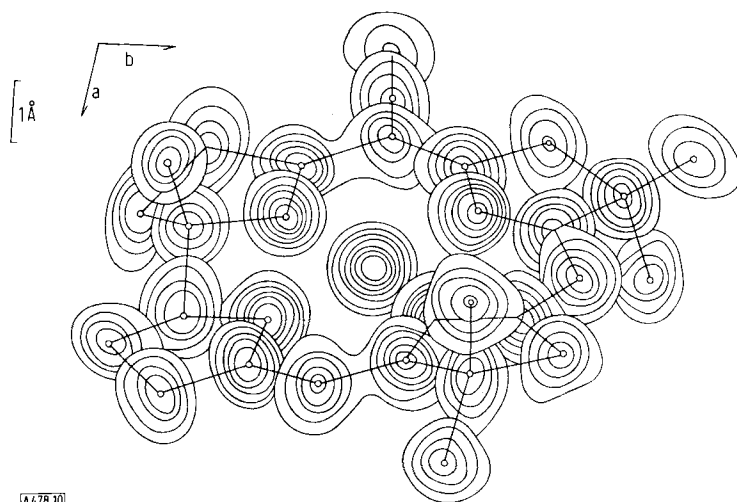
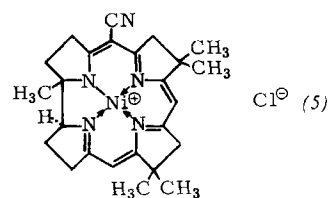
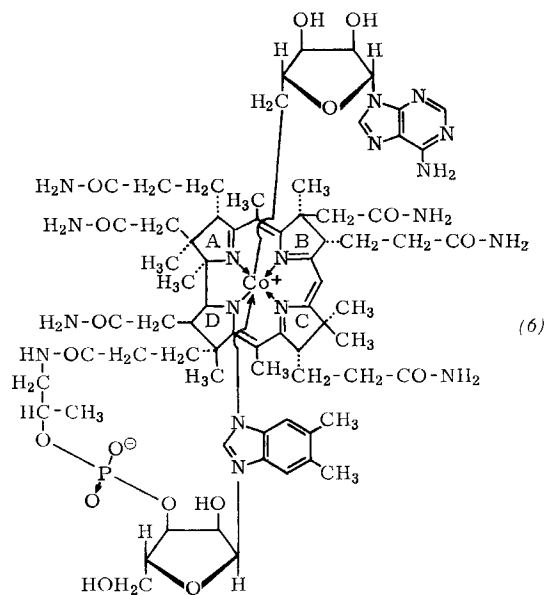
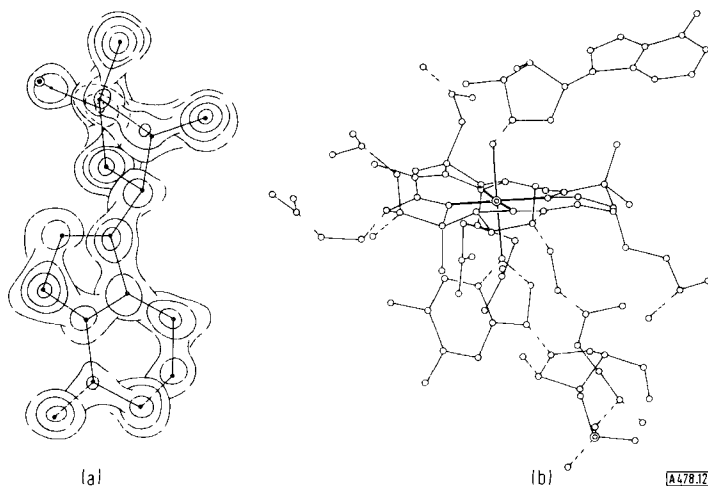


Abb. 10. Elektronendichteverteilung in der Umgebung der Atome im Nickel-Corrin-Derivat (5) (Dunitz und Meyer).

daß man geneigt ist, die noch bestehenden kleinen Abweichungen für real zu halten, beispielsweise bei den Abständen C(9)-N(21) und C(11)-N(22). Auch in der Reihe



der natürlich vorkommenden Corrine besteht an diesen Stellen eine Tendenz zu größeren Atomabständen als von der Theorie ermittelt.

[illegible]

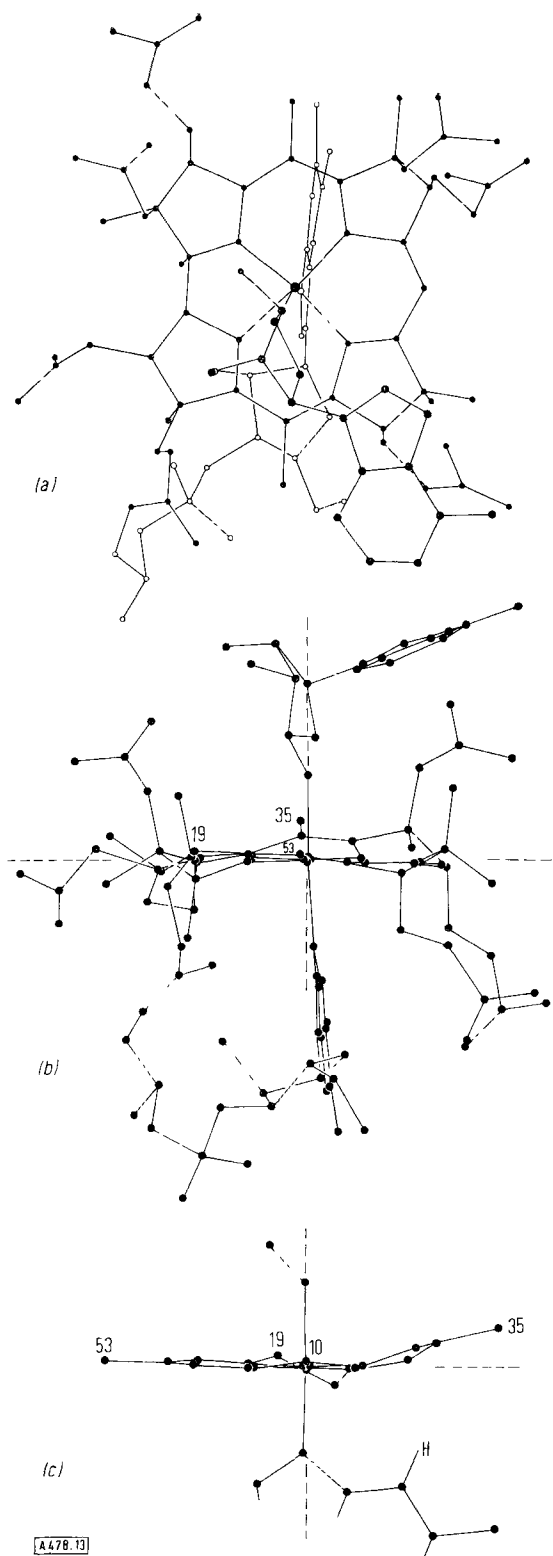


Abb. 13. Atomorte im Vitamin B₁₂ a) projiziert auf die Ebene der kleinsten Quadrate, die durch das Kobaltatom und die vier inneren Stickstoffatome läuft, b) in einer Projektion längs dieser Ebene in der Richtung C(5)–C(15), c) in einer Projektion längs dieser Ebene in der Richtung C(10)–Co.

tät des Moleküls im Licht und in Gegenwart von Cyanid-Ionen, die dazu geführt hat, daß man bei früheren Untersuchungen die Existenz dieser Verbindung nicht erkannte und statt ihrer das Cyanocobalamin isolierte.

Die Geometrie des Coenzym-Moleküls ist in ihrer Kompliziertheit faszinierend. Die Form des Corrin-Gerüsts mit der direkten Bindung zwischen den Ringen

A und D⁺ und die Stellung der Methylgruppe C-24 [*] führen dazu, daß sich Ober- und Unterseite des Corrin-Gerüsts stereochemisch stark unterscheiden. Durch die Stellungen der Methylgruppe und der Acetamid- und Propionamid-Seitenketten werden diese Unterschiede noch verstärkt (vgl. Abb. 13). Von der Unterseite her ist das Kobaltatom durch die Methylgruppe C-24 abgeschirmt, und alle auf dieser Seite an das Kobaltatom gebundenen Gruppen sind leicht zu substituieren. Dagegen können von der Oberseite her sehr verschiedenartige Liganden an das Kobaltatom gebunden werden.

Befinden sie sich einmal in dieser Stellung, so werden sie von nicht-polaren Gruppen eingeschlossen, da die Methylgruppen und Seitenketten zum Teil auf der Ebene des Corrin-Gerüsts senkrecht stehen. So sind die an der Oberseite des Moleküls gebundenen Liganden gegen Reaktionen mit dem umgebenden Medium geschützt, bis sie für biochemische Umwandlungen benötigt werden. Von daher läßt sich die Funktion der Cobalamine verstehen, beispielsweise die Rolle, die sie bei der Übertragung von Methylgruppen spielen. Im Laboratorium wird Methylcobalamin synthetisiert, indem man Aquocobalamin reduziert, vermutlich zum Cobalaminhydrid, das mit Diazomethan oder Methylsulfat leicht eine Methylgruppe austauscht. Auch in der Natur scheint die Übertragung einer Methylgruppe die vorherige Reduktion des Moleküls vorauszusetzen. Untersuchungen von D. D. Woods und Mitarbeitern sprechen dafür, daß Methylcobalamin als Zwischenprodukt auf einem derjenigen Stoffwechselwege auftritt, auf denen Methylgruppen von der Methyltetrahydrofolsäure zum Homocystein unter Bildung von Methionin übertragen werden [20]. Andere Wirkungen der Vitamin-B₁₂-Coenzyme lassen sich im einzelnen noch nicht erklären; dies gilt besonders für die Beteiligung an Isomerisierungen, die zu ihrer Entdeckung führte. Wie ein so komplexes System in eine so einfach erscheinende Umwandlung wie die des Methylmalonates zur Bernsteinsäure eingreift, ist noch immer eine offene Frage. Möglicherweise sind hier die Fähigkeit des Kobaltatoms, seine Wertigkeit zu ändern, Abwandlungen im Corrin-Gerüst und die leicht eintretende homolytische Öffnung der Kobalt-Kohlenstoffbindung von Bedeutung [21]. Um Klarheit über den Reaktionsverlauf und über eventuell auftretende instabile Zwischenprodukte zu gewinnen, wird es nötig sein, die Wirkungsweise des Moleküls besonders in Gegenwart des „zuständigen“ Enzyms zu beobachten.

Die Kenntnis der Struktur der hier genannten Verbindungen hat auch zu einigen praktischen Resultaten geführt. So konnten Sheehan und Henery-Logan [22] Penicillin V synthetisieren. Vitamin B₁₂-Coenzym, noch vor einigen Jahren nur mit Schwierigkeiten in mg-Mengen zugänglich, läßt sich heute leicht aus Cyanocobalamin gewinnen. Dr. Lester Smith hat Kristalle hergestellt, die

[*] Numerierung siehe Abb. 11.

[20] M. A. Foster, M. J. Dilworth u. D. D. Woods, Nature (London) 201, 39 (1964).

[21] K. Bernhauer, O. Müller u. F. Wagner, Angew. Chem. 75, 1145 (1964).

[22] J. C. Sheehan u. K. R. Henery-Logan, J. Amer. chem. Soc. 81, 3089 (1959).

einen Durchmesser von 0,5 cm haben. Sicher wird es *R. B. Woodward* bald (und ohne Zweifel in höchst eleganter Weise) gelingen, auch das Cyanocobalamin selbst zu synthetisieren. Die Synthese von Molekülen dieser Größenordnung geht Mikroorganismen aber sehr viel leichter, von der Hand“ als dem Chemiker, und daher werden sie auch weiterhin die wichtigste Quelle für diese Verbindungen bleiben. Die Kenntnis der Struktur und die Synthese dieser Verbindungen sollten aber dazu führen, daß wir ihre Biogenese und die Rolle, die sie im Stoffwechsel spielen, verstehen können. Das sollte uns die Möglichkeit geben, die chemischen Vorgänge im Körper zu regulieren, wenn sie aus irgendwelchen Gründen in Unordnung geraten.

Ich möchte hier nicht den Eindruck hervorrufen, daß sich alle Strukturfragen mit Hilfe der Röntgenanalyse lösen ließen oder daß alle Kristallstrukturen leicht aufzuklären wären. Wahrscheinlich habe ich selbst mehr Zeit mit erfolglosen als mit gelungenen Arbeiten verbracht. Ich möchte daher an Hand unserer Versuche zur Röntgenanalyse des Insulins einige der Schwierigkeiten andeuten, mit denen man zu kämpfen hat.

Insulin ist ein Molekül, dessen Molekulargewicht etwa 6000 beträgt, ein sehr großes Molekül also, aber klein, wenn man es als Protein betrachtet und beispielsweise mit Myoglobin und Hämoglobin vergleicht. Obwohl man seine chemische Struktur seit den Arbeiten von *Sanger* [23] kennt, weiß man noch immer nicht, was eigentlich das Molekül so lebenswichtig macht. Nach dem oben Gesagten hoffen wir, daß man seine Wirkung vielleicht verstehen und beeinflussen kann, wenn man die molekulare Geometrie kennt und weiß, wie sich die Peptidketten im Molekül und die Moleküle im Kristall zusammenfügen. Insulin kristallisiert in mehreren Modifikationen, und die sehr verschiedenen Grade der Kompliziertheit dieser Formen scheinen signifikant zu sein. In sauren Insulinsalzen ist das Molekül offenbar dimer, wobei die beiden Insulin-Moleküle durch eine zweizählige Symmetrieachse miteinander in Beziehung stehen [24]. Zweizählige kristallographische Achsen setzen auch die Insulin-Moleküle in einer metallfreien kubischen Form des Insulins in Beziehung, die *Abel* 1927 entdeckte [25]. Bisher sind diese Kristalle nur als äußerst kleine rhombische Dodekaeder erhalten worden. Kristallform und Symmetrie lassen vermuten, daß hier sechs Insulin-Dimere zu einem größeren Aggregat mit der Symmetrie 23 zusammengefaßt sind, was an die Struktur kleiner Viren erinnert [26]. Es ist aber schwierig, von diesen Kristallen ausreichende Röntgendiagramme zu bekommen, um diese Hypothese zu prüfen. In allen Insulin-Kristallen und in Lösungen, die genügend Zink oder andere ähnliche zweiwertige Metallionen enthalten, treten definierte Aggregate von sechs Insulin-Molekülen auf. Diese haben das Molekulargewicht 36000, das

Svedberg erstmals 1935 bestimmt hat [27]. Das Insulin-Hexamer entspricht der Elementarzelle in den rhomboedrischen Kristallen, und es ist die unsymmetrische Einheit in der monoklinen Form, die in Gegenwart von Phenol auftritt. Das Verhältnis von Zink zu Insulin-Molekülen beträgt 2:6, und die Symmetriebeziehungen lassen vermuten, daß das Zink auf einer dreizähligen Achse liegt, um die herum die Insulin-Moleküle so angeordnet sind, daß sie untereinander durch zwei- und dreizählige Achsen in Beziehung stehen. Die Symmetrieverhältnisse sind mit Hilfe von Funktionen ermittelt worden, die *Rossmann* und *Blow* beschrieben haben [28]. In Gegenwart von Halogeniden tritt eine andersartige Packung auf, in der das Verhältnis von Zink zu Insulin-Molekülen 4:6 beträgt. Alle diese Kristalle geben vorzügliche Röntgendiagramme, und es sollte möglich sein, daraus die Struktur bis zu atomarer Auflösung abzuleiten. Allerdings ist das Zink zu leicht, als daß es sich ähnlich dem Kobalt im Vitamin B₁₂ zur Phasenbestimmung nutzen ließe (es trägt zur Beugung der Röntgenstrahlen nur etwa soviel bei wie 1/100 des restlichen Kristalls). Man muß daher zusätzliche schwere Atome in die Kristalle einführen. Sie in großer Zahl einzuführen, bietet keine Schwierigkeit. Pro Insulin-Molekül dürfte aber nur ein schweres Atom aufgenommen werden, dessen Ort sich dann röntgenanalytisch leicht feststellen lassen sollte, und eben diese Begrenzung der Menge dürfte mit den von *Kendrew* und *Perutz* angewendeten Methoden der chemischen Reaktion oder der Cokristallisation kaum zu erreichen sein. Entweder also müssen wir versuchen, die Verteilung der schweren Atome im Kristall zu bestimmen, was ein schwieriges Problem ist, oder wir müssen uns eingehender mit der Chemie des Insulins befassen in der Hoffnung, daß sich Methoden finden lassen, mit denen sich nur ein schweres Atom an jedes Insulin-Molekül binden läßt. Wahrscheinlich werden wir beide Wege beschreiten. Unsere gegenwärtigen Versuche sind durchaus ermutigend – einige unserer Kristalle, die schwere Atome enthalten, zeigen sehr ausgeprägte anomale Absorptionen, die einen Ausgangspunkt für die Phasenbestimmung bieten. Die Elektronendichteverteilungen, die wir bisher berechnet haben, sind aber noch zu unvollständig und zu schwierig zu deuten, als daß ich heute schon darüber berichten könnte [29].

Aus allem, was ich hier gesagt habe, sollte deutlich geworden sein, daß ich mit meinen Arbeiten tief in der Schuld anderer stehe. Viele Ideen, die ich genutzt habe, und zahlreiche Beispiele ähnlicher Analysen stammen von meinen Kollegen, und ohne den Geist, die Hände und die Augen meiner Mitarbeiter wäre wenig zu erreichen gewesen. Ich möchte auch die vielen Freunde nicht vergessen, deren ermutigender Unterstützung ich so vieles verdanke. Von ihnen seien drei namentlich genannt: W.T. Astbury, I. Fankuchen und K. Linderström-Lang, denn sie hätten sich dieses Tages gewiß erfreut.

Eingegangen am 5. Februar 1965 [A 478]

[23] A. P. Ryle, F. Sanger, L. F. Smith u. R. Kitai, *Biochem. J.* 60, 541 (1955).

[24] B. W. Low and J. R. Einstein, *Nature (London)* 186, 470 (1960).

[25] J. J. Abel, E. M. K. Geiling, C. A. Rouiller, F. K. Bell u. O. Wintersteiner, *J. Pharmacol. exp. Therapeut.* 31, 65 (1927).

[26] M. M. Harding, D. C. Hodgkin, A. F. Kennedy, A. O'Connor u. P. D. J. Weitzmann, unveröffentlicht.

[27] K. Marcker, *Acta chem. scand.* 14, 2071 (1960).

[28] M. G. Rossmann u. D. M. Blow, *Acta crystallogr.* 15, 24 (1962); E. Collier, M. M. Harding, D. C. Hodgkin u. M. G. Rossmann, unveröffentlicht.

[29] Neuerdings zeigte es sich, daß diese Elektronendichtekarten gar nicht so unvollkommen sind, wie ich zunächst angenommen hatte, und daß sie sich auch interpretieren lassen.