

- [86] W. Erb, Dissertation, Technische Hochschule Aachen 1974, Inzwischen ist es gelungen, das Cycloaddukt von (2) an 1,2-Dimethyl-1-cyclohexen zum 1,6-Dimethylbicyclo[4.2.0]octan-7,8-dion zu hydrolysieren.
- [87] Siehe auch [84], [82] und [85].
- [88] H. G. Heine, Bayer AG, Uerdingen-Krefeld, persönliche Mitteilung.
- [89] C. K. Ingold, S. Sako u. J. F. Thorpe, J. Chem. Soc. 121, 177 (1922).
- [90] J. Knops, Diplomarbeit, Technische Hochschule Aachen 1972.
- [91] Im Gegensatz dazu beobachteten Kuhn und Gollnik bei thermischen und photochemischen Diensynthesen mit Thiophen Folgeprodukte der primär entstandenen [4+2]-Addukte. H. J. Kuhn u. K. Gollnik, Tetrahedron Lett. 1972, 1909; Chem. Ber. 106, 674 (1973).
- [92] J. C. Hinshaw, Chem. Commun. 1971, 630.
- [93] H. D. Scharf u. H. Seidler, Chem. Ber. 104, 2995 (1971).
- [94] A. T. Blomquist u. R. A. Vierling, Tetrahedron Lett. 1961, 655; US-Pat. 3 169 147 (1965); Chem. Abstr. 62, 16081 (1965).
- [95] Alternativsynthese siehe: E. V. Dehmlow, Chem. Ber. 100, 3892 (1967).
- [96] H. J. F. Angus u. D. Bryce-Smith, Proc. Chem. Soc. 1959, 326.
- [97] G. O. Schenck u. R. Steinmetz, Tetrahedron Lett. 1960, Nr. 21, S. 1.
- [98] E. Groenstein, jr., D. V. Rao u. J. W. Taylor, J. Amer. Chem. Soc. 83, 1705 (1961).
- [99] Zusammenfassung siehe D. Bryce-Smith, Pure Appl. Chem. 16, 47 (1968); 2. IUPAC Symposium on Organic Photochemistry, Enschede 1967.
- [100] W. M. Hardham u. G. S. Hammond, J. Amer. Chem. Soc. 89, 3200 (1967).
- [101] D. Bryce-Smith, Pure Appl. Chem. 34, 193 (1973).
- [102] N. C. Yang u. J. Libman, Tetrahedron Lett. 1973, 1409.
- [103] K. E. Wilzbach u. L. Kaplan, J. Amer. Chem. Soc. 93, 2073 (1971).
- [104] N. C. Yang, J. Libman u. M. F. Saritzky, J. Amer. Chem. Soc. 94, 9226 (1972).
- [105] N. C. Yang u. J. Libman, J. Amer. Chem. Soc. 94, 9228 (1972).
- [106] J. J. McCullough, C. Calvo u. C. W. Huang, Chem. Commun. 1968, 1176.
- [107] R. M. Bowman u. J. J. McCullough, Chem. Commun. 1970, 948.
- [108] D. R. Arnold, L. B. Gillis u. E. B. Whipple, Chem. Commun. 1969, 918.
- [109] D. Bryce-Smith, Chem. Commun. 1969, 806.
- [110] P. Lechtken u. G. Hesse, Liebigs Ann. Chem. 754, 1 (1971).
- [111] H. D. Scharf u. R. Klar, Tetrahedron Lett. 1971, 517.
- [112] H. D. Scharf u. R. Klar, Chem. Ber. 105, 575 (1972).
- [113] G. Hesse u. P. Lechtken, Angew. Chem. 83, 143 (1971); Angew. Chem. internat. Edit. 10, 133 (1971).
- [114] S. Yunkelerich u. B. Fuchs, Tetrahedron Lett. 1967, 4945.
- [115] J. Aretz, Dissertation, Technische Hochschule Aachen 1973; Chem. Ber., im Druck.
- [116] Die Besetzung des Naphthalin-Triplets auf dem Wege des „intersystem crossing“ (isc) beträgt $\Phi_{isc} = 0.39$. J. G. Calvert u. J. N. Pitts: Photochemistry. Wiley, New York 1966, S. 309.
- [117] $F_p = 163^\circ\text{C}$ (Zers.). IR (KBr): ν_{CO} : 1890, 1800, 1740 cm^{-1} ; ν_{OH} : 2800 bis 2200 cm^{-1} ; ν_{C-H} : 3150 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (15 mg (62)/0.5 ml $[\text{D}_6]\text{-Aceton}$): $\tau = 1.19$ (1 H, s), 2.53 (1 H, s). MG (MS): 98. UV $[\text{Äther}; \text{nm}(\epsilon)]$: 213 (16404), 231 (8154), 308.5 (23.7), 371 (14.5); UV $[\text{H}_2\text{O}, 1.98 \cdot 10^{-5} \text{ M}; \text{nm}(\epsilon)]$: 257.5 (8283), 227 (28636); $[\text{H}_2\text{O}, 9.9 \cdot 10^{-3} \text{ M}; \text{nm}(\epsilon)]$: 382 (9.4).
- [118] Die „Semiquadratsäure“ (62) wurde von R. W. Hoffmann, U. Bressel, I. Gehlhaus u. H. Häuser, Chem. Ber. 104, 873 (1971), auf anderem Wege dargestellt.
- [119] R. I. Cole, I. W. Kirksey, H. G. Cutler, B. L. Donpink u. I. C. Peckham, Science 179, 1324 (1973).
- [120] I. P. Springer, I. Clardy, R. I. Cole, I. W. Kirksey, R. K. Hill, R. M. Carbon u. I. L. Isidor, J. Amer. Chem. Soc. 96, 2267 (1974).

Die Quervernetzung über Isopeptidbindungen – ihr Vorkommen und ihre Bedeutung beim Proteinaufbau

Von R. S. Asquith, M. S. Otterburn und W. J. Sinclair^[*]

Als Isopeptidbindungen bezeichnet man Bindungen zwischen der ϵ -Aminogruppe des Lysins und der seitenständigen Carboxygruppe der Glutaminsäure oder der Asparaginsäure. Solche kovalenten Querbrücken, die ohne Zweifel in einigen Nahrungsproteinen vorkommen und deren biologische Wertigkeit herabsetzen, sind außerdem am Fibrinogen-Fibrin-Übergang beteiligt und tragen zur Stabilisierung der Struktur von Keratinen bei. Isopeptidbindungen bilden sich auch während einer Hitzebehandlung von globulären Proteinen und Faserproteinen, wobei das Ausmaß von der Intensität der Behandlung abhängt. Die Bildungsweise und die Bedeutung dieser Brücken sind noch nicht völlig geklärt.

1. Einleitung

Proteine sind Biopolymere, deren Molekulargewicht aufgrund willkürlicher Festsetzung größer als 5000 ist. Sie sind verantwortlich für viele wichtige Funktionen im Zellgefüge, wie Katalyse, Regulierung des Stoffwechsels und Kontraktilität. Ferner spielen sie bei immunologischen Schutz- und Abwehrvorgängen der Lebewesen eine Rolle.

Proteinketten bestehen aus α -Aminosäuren, die durch Amidbindungen (Peptidbindungen) zwischen α -Amino- und α -Carboxygruppen benachbarter Aminosäurereste miteinander verknüpft sind. Viele der Proteineigenschaften hängen jedoch nicht nur von der Reihenfolge der Aminosäurereste in der Polypeptidkette ab (Primärstruktur), sondern auch von der Kettenkonformation (Sekundärstruktur) und der räumlichen Anordnung der Ketten zueinander (Tertiärstruktur). Eine Vielzahl von interchenaren Kräften und Querbrücken ist für die Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur verantwortlich. Zu ihnen zählen: salzartige Bindungen, die aufgrund von Coulomb-Kräften zwischen entgegengesetzt geladenen sauren und

[*] Prof. Dr. R. S. Asquith, Dr. M. S. Otterburn und W. J. Sinclair
Department of Industrial Chemistry
The Queen's University of Belfast
Belfast BT9 5AG (Nordirland)

basischen Seitenketten zustande kommen und zuerst von *Speakman* und *Hirst*^[1] 1931 postuliert worden sind, sowie Wasserstoffbrückenbindungen, von denen bekannt ist, daß sie nicht nur eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der normalerweise als α -Helix ausgebildeten Sekundärstruktur spielen, sondern auch als interchenare Bindungen in der Tertiärstruktur vorkommen^[2,3]. Die Bedeutung von Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Resten in globulären Proteinen wurde frühzeitig erkannt^[4]. Diese Erkenntnisse sind inzwischen durch die Einbeziehung von Faserproteinen erweitert worden^[5,6].

Eine bedeutende, natürlich vorkommende Quervernetzungs-komponente ist die Aminosäure Cystin, die insbesondere in den Keratinen auftritt und zwei Peptidketten über eine Disulfidbrücke verbindet. Wegen ihrer leichten Oxidierbarkeit, Reduzierbarkeit und Abbaubarkeit und der damit zusammenhängenden Veränderungen des Wollkeratins ist die Reaktivität der Disulfidbrücke besonders intensiv untersucht worden^[6-8]. Diese Arbeiten hatten die Postulierung und die anschließende Isolierung weiterer Querbrücken aus abgebauten Proteinen zum Ergebnis, wie Lanthionin^[9,10], Lysinoalanin^[11-13] und Ornithinoalanin^[14], die alle in alkalibehandelten, in ihrer nativen Form Lysin enthaltenden Proteinen auftreten. Der Bildung dieser Brücken liegt eine β -Eliminierung eines Protons in β -Stellung zur Disulfidbindung zugrunde, wobei als reaktives Zwischenprodukt Dehydroalanin auftritt (Abb. 1).

Ein sicherer Beweis für dieses Reaktionsschema wurde kürzlich durch die Isolierung des Dehydroalanyl-Peptides γ -Glutamyl-dehydroalanyl-glycin aus alkalibehandeltem Glutathion erbracht^[15,16]. Das so gebildete Dehydroalanin kann dann mit benachbarten Aminosäureresten reagieren, wodurch neue inter- und intramolekulare kovalente Bindungen entstehen. Durch eine Vielzahl von Untersuchungen ist belegt, daß durch Bildung derartiger neuer Bindungen Proteine stärker stabilisiert werden. Über diese Arbeiten hat *Zahn*^[17] einen umfassenden Überblick gegeben.

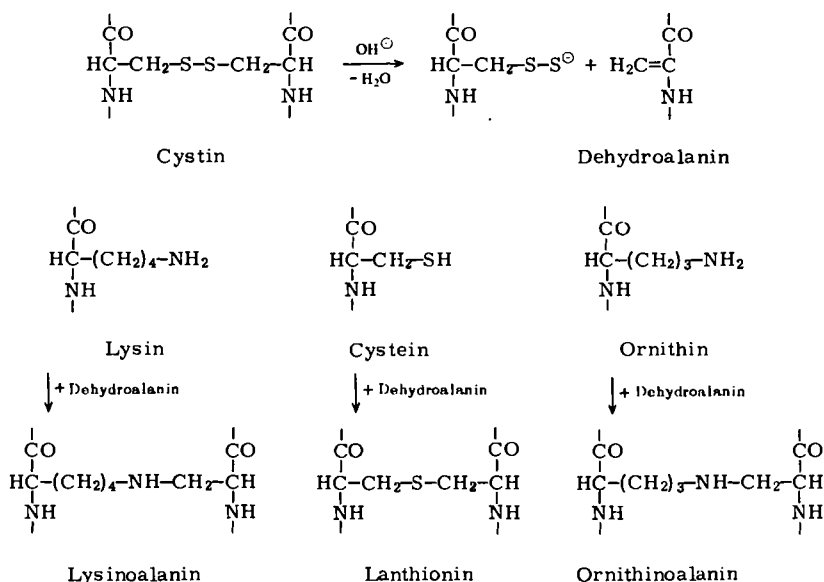
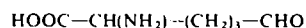


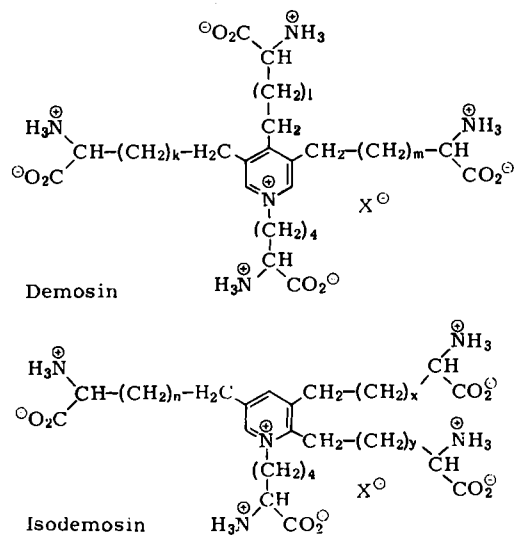
Abb. 1. Bildung von Dehydroalanin bei der Alkalibehandlung von Cystin im Proteinverband; Umsetzung von Dehydroalanin zu Lysinoalanin, Lanthionin und Ornithinoalanin.

Gallop et al.^[18] haben die Beschaffenheit der in Kollagen und Elastin vorkommenden Querbrücken in einem Übersichts-

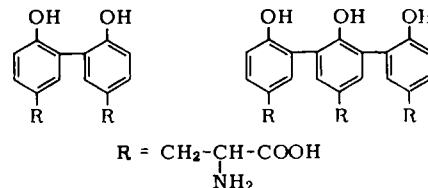
artikel dargestellt. Vornehmlich die Aminosäure Lysin ist an solchen Quervernetzungen beteiligt. Diese Aminosäure wird enzymatisch oxidiert und desaminiert, wobei sich 2-Aminoadipinaldehydsäure



bildet. Diese Verbindung ist ein Vorläufer der verhältnismäßig einfach gebauten Querbrücken in Kollagen und der komplizierteren im Elastin, wie Demosin und Isodemosin.



Für das elastische Protein Resilin, das *Weis-Foyh*^[19] aus der Cuticula von Insekten isolierte, wurde nachgewiesen, daß es Querbrücken aus dimerem und trimerem Tyrosin enthält^[20].



Die Bildung dieser Oligomeren soll durch eine Peroxidase initiiert werden. Dieses Enzym katalysiert die oxidative Kuppelung der Tyrosinreste in 3-Stellung des aromatischen Ringes. Die so gebildeten dimeren und trimeren Tyrosine vernetzen die Polypeptidkette.

Raven et al.^[21] geben einige Hinweise, daß Dityrosin im Tus-sah-Seidenfibroin und Wollkeratin vorkommt. Die Autoren lassen allerdings offen, ob diese Verbindung an einer Quer-brücke beteiligt ist.

Es ist offenkundig, daß weitere kovalente Querbrücken durch die Reaktion zwischen der ϵ -Aminogruppe des Lysins und den seitenständigen Carboxygruppen der Glutaminsäure und Asparaginsäure gebildet werden könnten. Die Abspaltung von Wasser würde zu einer ω - ϵ -Amidquerbrücke führen (Abb. 2). Man nennt heute eine derartige Brücke Isopeptidbindung, um sie von der normalen Peptidbindung zu unterscheiden.

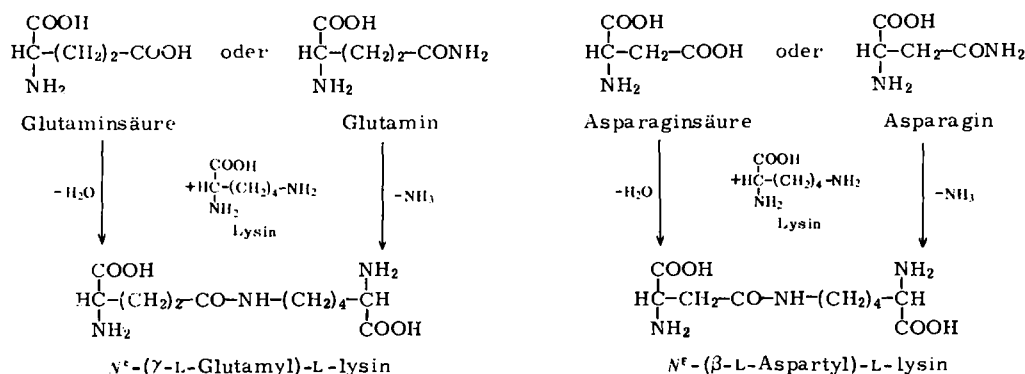


Abb. 2. Postulierte Bildungsreaktionen für Isopeptidbindungen.

Obleich solche Querbrücken oft postuliert wurden, ist der Beweis ihrer Existenz als wohldefinierte chemische Gruppierungen doch erst kürzlich gelungen. Damit wird es erforderlich, eine Vielzahl von Proteinen erneut zu untersuchen, bei denen ein mögliches Vorkommen dieser Querbrücken außer acht gelassen wurde. Im folgenden werden einige der neueren Befunde über die Isopeptidbindung zusammengefaßt.

2. Geschichte der Isopeptidbindung

Die bereits seit 1931 bekannte Tatsache, daß zwischen seitenständigen Carboxy- und Aminogruppen Salzbindungen auftreten, legte den Schluß nahe, daß diese Gruppen einander genügend nahe sind, um auch die Bildung einer kovalenten Bindung zuzulassen. Als Erster äußerte Astbury^[22] 1934 die Vermutung, daß eine derartige Bindung im Keratinmolekül auftritt. Dieses Postulat schien durch spätere Befunde infrage gestellt, denen zufolge Lysin mit Abbauprodukten des Cystins reagiert. Trotzdem behaupteten Pauling und Niemann^[23] 1939 erneut, daß Isopeptidquerbrücken vorkommen können. Bei Untersuchungen der Hitzeeinwirkung auf Proteine häuften sich indirekte Beweise für die Bildung von Isopeptidquerbrücken. So unterwarfen Mecham und Olcott^[24] eine Reihe von Proteinen einer Trockenhitzebehandlung und beobachteten, daß die Produkte verringerte Löslichkeit und ein vermindertes Wasseraufnahmevermögen zeigten. Außerdem nahm die Zugänglichkeit der basischen und sauren Gruppen für Farbstoffe im Vergleich zum unbehandelten Material ab, obgleich sich im Hydrolysat keine Änderung des Gehaltes an basischen oder sauren Aminosäuren feststellen ließ. Mecham und Olcott deuteten ihre Ergebnisse als Abnahme dieser polaren Gruppen durch eine mögliche innere Ester- oder Amidbildung.

Zweifelloos stützte auch die Arbeit von Beuk et al.^[25] die Annahme, daß irgendeine Art von Isopeptidbrücken vorkommen

muß. Diese Autoren zeigten, daß der enzymatische Abbau von Proteinen im gleichen Maße abnimmt wie das Ausmaß der Hitzebehandlung zunimmt. Ferner wurde gefunden, daß manche Gelatineproben durch Erhitzen unlöslich werden. Auch dies wurde der Bildung von Isopeptidbindungen zugeschrieben^[26], ebenso wie die Unlöslichkeit von wasserfreier Gelatine^[27].

3. Zugänglichkeit von Lysin

Durch Fütterungsversuche weiß man längst, daß Lysin eine essentielle Aminosäure ist. Daher ist es durchaus üblich, die

freie Aminosäure eiweißhaltigen Nahrungsmitteln zuzusetzen, die von Natur aus einen Lysinmangel aufweisen, um so den Nährwert des Proteins zu erhöhen.

Eine Hitzesterilisierung kann den Nährwert eines Nahrungsmittels mindern, ohne daß notwendigerweise sein Lysingehalt sinkt. Da viele Nahrungsmittel neben Proteinen Kohlenhydrate enthalten, kann bei Anwesenheit von reduzierenden Zuckern die ϵ -Aminogruppe des Lysins eine Maillard-Reaktion eingehen, d. h. die Aldehydgruppe des reduzierenden Zuckers und die ϵ -Aminogruppe des Lysins können miteinander kondensieren, wodurch diese Gruppe blockiert und das Lysin für die Ernährung wertlos gemacht wird. Daraus wurde die allgemeine und richtige Schlußfolgerung gezogen, daß dieser Reaktionstyp für die Abnahme des Nährwertes von hitzebehandelten Nahrungsmitteln, z. B. Trockenmilch, verantwortlich sei und auch zum Teil der Farbänderung zugrundeliegt, die man während einer Hitzebehandlung von Nahrungsmitteln beobachtet.

Carpenter^[28] und andere Forscher^[29, 30] arbeiteten Methoden aus, um in Nahrungsmitteln den Anteil an ϵ -Aminogruppen des Lysins zu bestimmen, die frei und reaktionsfähig vorliegen und damit den Nährwert bestimmen. Diese Methoden beruhen auf einer Reaktion der freien Aminogruppen des Lysins mit einem Reagens wie 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (FDNB). Indem man die Menge an N^ϵ -(2,4-Dinitrophenyl)lysin im Hydrolysat des Proteins bestimmt und vom gesamten Lysingehalt subtrahiert, erhält man den Betrag an „gebundenem“, d. h. für eine Reaktion mit FDNB nicht verfügbarem Lysin. Natürlich kann die ϵ -Aminogruppe des Lysins auch durch Reaktionen blockiert sein, aus deren Produkten es erst während der Hydrolyse des Proteins freigesetzt wird. Bei der Blockierung der ϵ -Aminogruppe können aber auch säurestabile Produkte wie Lysinoalanin entstehen. In dieser Weise gebundenes Lysin wird bei der Hydrolyse des Proteins nicht wieder freigesetzt und kann deshalb bei der Aminosäureanalyse des Hydrolysats nur schwierig nachgewiesen werden.

Obgleich jede Blockierung der ϵ -Aminogruppen die biologische Wertigkeit des Proteins herabsetzen kann, ist es doch manchmal wünschenswert, zwischen säurelabilen und säurestabilen Querbrücken zu differenzieren. Asquith et al.^[31] haben eine Methode ausgearbeitet, die eine direkte Erfassung des in hydrolyseempfindliche Brücken eingebauten Lysins gestattet. Bei dieser Methode wird zunächst das verfügbare (freie) Lysin chemisch blockiert und das Protein anschließend hydrolysiert. Das dabei erhaltene freie Lysin muß Bestandteil säurelabiler Querbrücken gewesen sein. Die zuletzt genannten Autoren haben allerdings keine Nahrungsmittel untersucht, sondern den Einfluß von Trockenhitze auf das kohlenhydratfreie Protein Keratin, einen Bestandteil der Wolle. Bei Anwendung dieser Methode auf hitzebehandeltes Keratin ergab sich, daß das für die Reaktion mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol nicht verfügbare, aber durch Hydrolyse regenerierbare Lysin im gleichen Maße wie der Grad der Hitzebehandlung zunimmt^[32]. Hieraus folgt eindeutig, daß im Keratin während der Hitzebehandlung säurelabile Bindungen gebildet werden. Von den Keratinen ist bekannt^[6], daß eine selektive Spaltung der Disulfidbrücken durch Oxidation mit organischen Peroxysäuren (z. B. Perameisensäure) zu einem Material führt, daß durch ionische Ausfällung in drei Fraktionen zerlegt werden kann. Diese Fraktionen werden als α -Keratose (löslich in Alkali, unlöslich in Säure), β -Keratose (unlöslich in Säure und Alkali) und γ -Keratose (löslich in Säure und Alkali bei allen pH-Werten) bezeichnet. Die Spaltung der Disulfidbindungen erhöht demzufolge die Löslichkeit von Keratin in geeigneten wäßrigen Systemen.

Eine Zunahme der Löslichkeit durch Verminderung des interchenaren Vernetzungsgrades ist ein in der Polymerchemie häufiges Phänomen. Auch wenn man annimmt, daß diese Fraktionen bei unbehandelter Wolle bestimmten histologischen Bereichen der Fasern entsprechen, kann eine Abnahme der Löslichkeit doch als Maß für eine verstärkte Vernetzung^[33] durch peroxysäurestabile Querbrücken dienen. So führt eine Hitzevorbehandlung der Wolle zu einer Zunahme der unlöslichen Fraktion (modifizierte β -Keratose) und einer entsprechenden Abnahme der löslichen Fraktion. Je länger und intensiver die Hitzebehandlung ist, desto größer wird der nicht mehr in Lösung zu bringende Anteil des Proteins. Das weist deutlich auf die fortschreitende Zunahme einer wie auch immer gearteten Vernetzung durch die Hitzebehandlung hin.

Eine Untersuchung der Fraktionen von mehreren Wollen zeigte, daß der Gehalt an gebundenem Lysin in der unlöslichen β -Keratose am größten ist, was auch für unbehandelte Wolle gilt. Ferner steigt der Gehalt an gebundenem Lysin mit der Stärke der Hitzeeinwirkung (Abb. 3). Sein Anteil in der besser löslichen α -Keratose-Fraktion bleibt zwar gleich – unabhängig von den Bedingungen der Hitzeeinwirkung^[32] – doch nimmt die Menge dieser Fraktion mit zunehmender Hitzebehandlung deutlich ab. Das läßt vermuten, daß diese Fraktion unlöslich in Ammoniak wird, wenn die Quervernetzung durch Lysin ein gewisses Maß übersteigt. Die am besten lösliche Fraktion (γ -Keratose) enthält einen vernachlässigbar kleinen Anteil an gebundenem Lysin, der durch die Hitzebehandlung nicht verändert wird, obwohl sich die Menge der Fraktion selbst ändert. Diese Ergebnisse zeigen nicht nur eindeutig, daß im Keratin durch die Reaktion des Lysins mit einigen anderen Aminosäuren eine säurelabile Bindung gebildet wird, sondern auch, daß das Produkt dieser Reaktion eine interchenare Querbrücke

ist. Beim hitzebehandelten Keratin wird dieses Resultat noch dadurch erhärtet, daß eine direkte Korrelation zwischen der Menge an unlöslicher β -Keratose-Fraktion und der Konzentration an gebundenem Lysin besteht (Abb. 4). Auch die β -Ke-

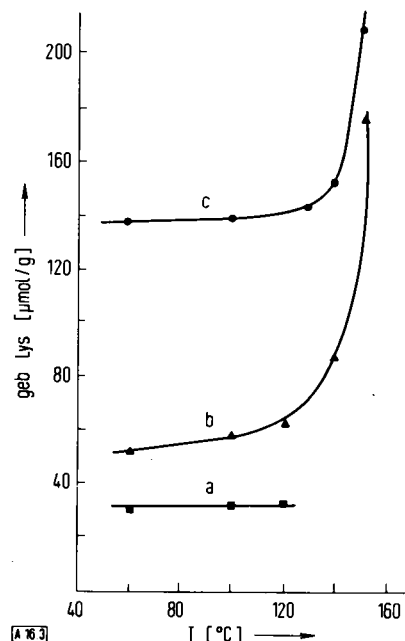


Abb. 3. Anteil des gebundenen Lysins in Keratin (b) sowie in α - (a) und β -Keratose (c) in Abhängigkeit von der Erhitzungstemperatur. Die Erhitzungszeit betrug 48 h.

ratose-Fraktion aus nativer Wolle enthält einen beträchtlich größeren Anteil an gebundenem Lysin als jede ihrer anderen Fraktionen. Aufgrund dieser Ergebnisse nahmen Asquith und Otterburn^[32] an, daß die säurelabilen Querbrücken Isopeptidbindungen sein könnten. Weiterhin wiesen Bjarnason und Carpenter^[34, 35] bei reinen Nahrungsproteinen nach, daß nach einer Hitzebehandlung der Gehalt an frei zugänglichem Lysin

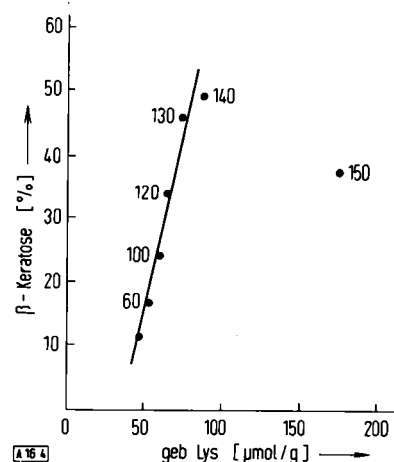


Abb. 4. Anteil der unlöslichen β -Keratose-Fraktion in Abhängigkeit von der Konzentration an gebundenem Lysin. Die Zahlen [°C] geben die Temperaturen bei der Hitzebehandlung an. Der unterste Punkt entspricht einer Kontrollprobe.

abnahm, und vertraten die Meinung, daß das Auftreten von Isopeptidbindungen hierfür verantwortlich sei. Trotz dieser zahlreichen Postulate war es schwierig, schlüssige Beweise für die Existenz derartiger Isopeptidbindungen zu erhalten.

4. Isopeptidbindungen im Fibrin

Auf diesem Forschungsgebiet gelang der erste Durchbruch zur Identifizierung der Isopeptidbindung. Frühere Bearbeiter der Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung hatten vermutet, daß die freien Endgruppen des Glycins mit Glutaminsäure unter Bildung von γ -Glutamyl-glycin-Bindungen reagieren, was die Unlöslichkeit des Fibrinogens bewirken sollte^[36]. Diese Reaktion sollte durch eine Transglutaminase katalysiert werden. 1966 postulierte jedoch *Lorand*^[37] – ebenso wie *Fuller* und *Dolittle*^[38] – die Bildung eines N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-lysin-Isopeptids, um die Unlöslichkeit des Fibrins zu erklären.

Der größte Unterschied zwischen diesen Arbeiten und denjenigen über hitzebehandelte Proteine besteht in der vorgeschlagenen Bildungsweise der Isopeptidbindung. Bei hitzebehandelten Proteinen vermutete man nämlich, daß die Bindung durch eine Kondensationsreaktion zwischen der freien Carboxygruppe der Glutaminsäure und der ϵ -Aminogruppe des Lysins unter Abspaltung von Wasser zustande käme. Für den Fibrinogen-Fibrin-Übergang ist aber eine derartige Dehydratisierung in vivo weniger wahrscheinlich. Darum wurde eine Umamidierung zwischen Glutamin und der ϵ -Aminogruppe des Lysins angenommen, eine Reaktion, die vorzugsweise unter den Bedingungen der enzymatischen Katalyse ablaufen sollte.

Erst 1968 gelang es drei Arbeitsgruppen, genauere Beweise für die Existenz von N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-lysin-Querbrücken im polymerisierten Fibrin zu erbringen^[39–41]. Demnach bildeten sich die Querbrücken beim Fibrinogen-Fibrin-Übergang durch eine komplizierte Folge von Reaktionen. Zunächst bewirkt Thrombin eine Abspaltung der Fibrinpeptide A und B vom Fibrinogen, wodurch sich ein Fibrin-Gel bildet, das dann durch neuentstandene Isopeptid-Querbrücken verstärkt wird. In vivo wird diese Reaktion durch das Enzym Transglutaminase katalysiert. Die gleichen Autoren untersuchten auch, ob möglicherweise N^{ϵ} -(β -Aspartyl)-lysin-Isopeptid-Querbrücken vorhanden sind. Dieses Isopeptid scheint jedoch im Fibrin nicht vorzukommen.

5. Isopeptidbindungen in nativer Wolle

Die Hauptschwierigkeiten bei der Identifizierung und Isolierung einer Polymereinheit wie der Isopeptidbrücke des Keratins besteht darin, daß sie nicht durch saure Hydrolyse abgetrennt werden kann. Auch eine enzymatische Hydrolyse des Keratins ist schwierig, da der hohe Cystingehalt die Matrix unlöslich macht und eine einfache Durchdringung durch das Enzym verhindert. Ein Nachweis von Isopeptiden war deshalb erst möglich, als ein geeignetes System für die enzymatische Totalhydrolyse des Keratins gefunden worden war. 1969 wurde eine solche Methode von der WIRA (Wool Industries Research Association) entwickelt^[42]. Diese Methode besteht darin, daß im ersten Schritt die Cystingruppen mit Tributylphosphan reduziert und die so gebildeten Thiolgruppen mit Acrylnitril blockiert werden, um eine Reoxidation zu verhindern. Das Faserprotein wird dadurch so weit aufgelockert, daß es enzymatisch angegriffen werden kann. Durch Behandlung mit Pepsin, Pronase, Aminopeptidase M und Prolidase^[43] erreicht man eine vollständige Spaltung in die Aminosäuren. Eine Kombination dieser Enzyme katalysiert die Hydrolyse aller normalen, in der Polymerkette befindlichen Peptidbindungen. Die primären Amidgruppen von Asparagin und Glutamin

sowie die Isopeptidbindungen im N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-lysin und N^{ϵ} -(β -Aspartyl)-lysin werden hingegen nicht angegriffen. Vor der Veröffentlichung dieser Arbeiten war es *Asquith* und *Ottoburn* in einer gemeinsamen Untersuchung mit der WIRA-Gruppe gelungen, N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-lysin im Keratin nativer Wolle nachzuweisen und es zu isolieren^[44].

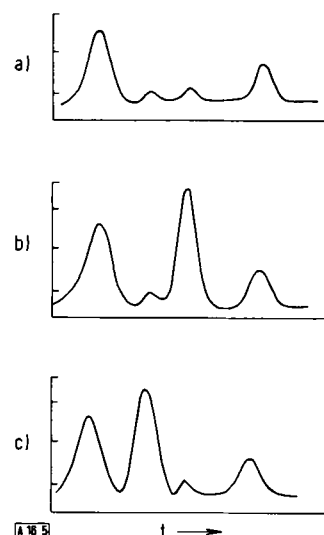


Abb. 5. Chromatogramme von a) enzymatisch hydrolysiertem Wollkeratin, b) unter Zusatz von synthetischem N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-lysin und c) unter Zusatz von synthetischem N^{ϵ} -(β -Aspartyl)-lysin.

Während bei Arbeiten über andere Proteine die Isopeptideinheit nur durch Vergleich des enzymatisch erhaltenen Hydrolysates mit synthetischem N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-lysin nachgewiesen werden konnte, war dies das erste Mal, daß das Isopeptid N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-lysin eindeutig identifiziert wurde. Die Aminosäureanalyse des enzymatisch erhaltenen Hydrolysats von nativer Wolle ergab zwei Maxima im Bereich zwischen Leucin und Tyrosin, von denen eines aufgrund seines Erscheinungszeitpunktes N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-lysin entsprechen mußte (Abb. 5).

Durch präparative Ionenaustauschchromatographie wurde eine breite Fraktion gesammelt, die Leucin, Tyrosin und die beiden unbekannten Verbindungen enthielt. Nach Entsalzung und Anreicherung wurde diese Fraktion papierchromatographisch aufgetrennt, wobei synthetisches N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-lysin als Vergleichssubstanz diente. Die dem Isopeptid entsprechende Bande wurde herausgeschnitten und mit destilliertem Wasser eluiert. Das Eluat wurde in zwei Portionen aufgeteilt und eine davon sauer hydrolysiert. Im Hydrolysat fanden sich nicht nur Glutaminsäure und Lysin, sondern auch Asparaginsäure.

Die andere Portion wurde mit 5-Dimethylamino-1-naphthylsulfonylchlorid (DNS) behandelt. Die anschließende saure Hydrolyse lieferte α -DNS-Asp, α -DNS-Glu und α -DNS-Lys. Das Vorkommen von α -DNS-Lys zeigt, daß die ϵ -Aminogruppe im Ausgangsmaterial in blockierter Form vorgelegen haben muß. Das Vorkommen von α -DNS-Asp und α -DNS-Glu deutet dagegen darauf hin, daß ihre Aminogruppen nicht an der Bildung von Peptidbindungen beteiligt waren. Auf diese Weise ist die Anwesenheit der beiden Isopeptidbindungen schlüssig nachgewiesen worden^[45].

Bei diesen Untersuchungen wie auch in der Arbeit von *Milligan* et al.^[46] ergab sich, daß der Gehalt an N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-lysin

in nativer Wolle sehr gering ist. *Harding* und *Rodgers*^[47] fanden dagegen beträchtlich größere Isopeptidgehalte in den Keratinstacheln von Säugetieren. *Loewy* et al.^[48] berichten von N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)-lysin in Kulturen von Hühnerbrustmuskel und L-Zellmembran. Die Untersuchung des oxidierten Wollkeratins durch *Asquith* et al.^[49] ergab, daß die unlösliche Fraktion (β -Keratose), von der man annimmt, daß sie aus der intercuticulären Membran stammt^[33], den höchsten Gehalt an Isopeptidbindungen aufweist. Das Helixmaterial (α -Keratose) enthält weniger und die amorphe γ -Keratose gar keine Isopeptidbindungen.

Diese Befunde geben Anlaß zur Diskussion über die Bedeutung der Isopeptidbindung für die physikalischen Eigenschaften von Strukturproteinen. Während beim Fibrinogen-Fibrin-Übergang und den Muskelproteinen die Funktion der Isopeptidbindung darin liegen dürfte, das Fibrin bzw. Muskelprotein unlöslich zu machen, ist ihre Bedeutung für Faserproteine weniger eindeutig, denn es ist sicher, daß nach der Keratinisierung die Keratine bereits durch die Disulfidbindungen physikalisch stabilisiert sind. Die Isopeptidbindungen sind daher vielleicht nur zufällig als Ergebnis von Stoffwechselprozessen vorhanden, die der Faserbildung vorangehen. *Otterburn*^[50] hat aber darauf hingewiesen, daß die Bildung von Disulfidbrücken, d. h. also die Keratinisierung, auf einer relativ späten Stufe der Faserbildung erfolgt. Er schlug deshalb vor, daß die Isopeptidbrücken – trotz ihrer geringen Zahl – das Protein vor der Keratinisierung durch die Überführung in eine weniger bewegliche und weniger lösliche Form stabilisieren. Vielleicht erleichtern sie die Ausrichtung des Materials während des Austritts in den Follikel, wobei die Mercaptogruppen in eine Position gebracht würden, die für die Oxidation zu Disulfidbindungen günstig ist.

Zahn^[51] verweist in seinem sehr guten Übersichtsartikel über die Bedeutung von Querbrücken im Proteinaufbau auf den etwas unterschiedlichen Standpunkt von *Harding* und *Rodgers*^[47]. Aus ihren Studien über den Isopeptidgehalt von Säugetierfasern (u. a. auch foetale Lammwolle) geht hervor, daß Fasern, die einen hohen Markgehalt besitzen, auch einen hohen Isopeptidgehalt aufzuweisen pflegen. Die Autoren vermuten deshalb, daß für die Stabilisierung der Cortex die Disulfidbindungen von größter Bedeutung seien, während für die Stabilisierung der Markproteine die Isopeptidbindungen wichtiger seien. Derartige Annahmen können allerdings nur als Versuch einer Interpretation des derzeitigen Wissensstandes gelten.

6. Isopeptidbildung in hitzebehandelter Wolle

Asquith und *Otterburn* konnten zeigen, daß durch eine Trockenhitzebehandlung der Isopeptidgehalt in Wolle beträchtlich ansteigt (Tabelle 1)^[49]. Während in nativer Wolle nur geringe Mengen an N^{ϵ} -(β -Aspartyl)-lysin auftreten, verdoppelt sich der Gehalt nach einer Hitzebehandlung (48 h, 120°C). Während der Hitzeeinwirkung werden offensichtlich beide Arten von Isopeptidbindungen gebildet. Die Abspaltung von Ammoniak deutet darauf hin, daß sie außer durch Dehydratisierung auch durch Umamidierung entstehen können (vgl. Abb. 2). Die Autoren berichten weiterhin, daß Wollkeratin nach einer längeren Hitzebehandlung oberhalb 140°C unter den von ihnen gewählten Bedingungen selbst dann nicht mehr enzymatisch abgebaut werden kann, wenn sämtliche Disulfidbindun-

gen reduziert sind. Die gleichen Autoren^[31] hatten schon früher beobachtet, daß sich in solchen Proben mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol ein hoher Gehalt an gebundenem Lysin nachweisen läßt. Aus diesem Ergebnis konnten sie nur schließen, daß eine beträchtliche Quervernetzung über Isopeptidbindungen eingetreten war, welche die enzymatische Hydrolyse verhinderte.

Tabelle 1. Isopeptidgehalt [$\mu\text{mol/g}$] von erhitztem Wollkeratin. Der Lysingehalt beträgt 220 $\mu\text{mol/g}$, die Erhitzungszeit 48 h.

T [°C]	gebund. Lys.	N^{ϵ} -(γ -Glu)-Lys	N^{ϵ} -(β -Asp)-Lys
—	45	15	13
60	50	17	17
100	55	20	20
120	60	25	20
140	90	40	35

Die Hemmung der Hydrolyse könnte aber auch dadurch bedingt sein, daß die Kristallinität des Proteins zunimmt und damit das Eindringen von Enzymen verhindert wird. Untersuchungen der Veränderungen im Röntgenogramm hitzebehandelter Wolle bestätigen eine solche Hypothese allerdings nicht^[52]. Die geordneten Bereiche des Keratins, die im Röntgenogramm als α -Reflexe auftreten, beginnen bei Material, das auf über 140°C erhitzt wurde, zu verschwinden; die Reflexe werden undeutlicher, und schließlich bildet sich ein total amorphes Material. Man sollte daher erwarten, daß diese Strukturauflöschung das Eindringen von Enzymen eher erleichtert als erschwert, also die enzymatische Hydrolyse begünstigt. Somit kann nur der hohe Vernetzungsgrad durch Isopeptidbrücken für die Hydrolysebeständigkeit verantwortlich sein. Das während der Hitzebehandlung gebildete dreidimensionale Polymere macht es vermutlich durch einen Siebporen-Effekt unmöglich, daß sich die Enzymmoleküle den an sich spaltbaren Peptidbindungen nähern.

Solche Befunde sind allerdings nur von akademischer Bedeutung für die Strukturänderungen an Wollkeratinen, die tatsächlich eine Absolutbestimmung des Isopeptidgehaltes von stark hitzebehandelter Wolle unmöglich machen. Eine derartige Beständigkeit gegen enzymatische Hydrolyse könnte jedoch hinsichtlich der Verdaubarkeit von Nahrungsproteinen von praktischer Bedeutung sein. Es erscheint unwahrscheinlich, daß ein Protein schlagartig aus einem leicht hydrolysierbaren, wenig vernetzten Zustand in eine gegen enzymatische Hydrolyse völlig beständige, stark vernetzte Form übergeht. Vielmehr ist anzunehmen, daß die Beständigkeit gegen enzymatische Hydrolyse sukzessiv mit dem Vernetzungsgrad zunimmt, bis schließlich keine Hydrolyse mehr möglich ist. Die Bedeutung dieser Tatsachen für Ernährungsfragen wird im folgenden diskutiert.

7. Bedeutung von Isopeptiden für die Ernährung

Es steht heute zweifelsfrei fest, daß während der Hitzesterilisation die biologische Wertigkeit von Nahrungsmitteln auf Proteingrundlage abnimmt. Da *Carpenter*^[53] und andere Forscher^[54, 55] nunmehr mit der 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol-Technik schlüssig nachgewiesen haben, daß diese Abnahme mit dem Absinken an freien ϵ -Aminogruppen des Lysins korreliert, steht fest, daß die ϵ -Aminogruppe für die Metabolisierung von Nahrungsproteinen essentiell ist. Eine einfache Blockie-

rung der Lysinseitenkette durch Acetylierung reicht aber nicht aus, um die Abnahme des Nährwertes von lysinhaltigen Nahrungsmitteln zu erklären, denn Bjarnason und Carpenter^[34] zeigten, daß *N*^ε-Acetyl-L-lysin dieselbe Wachstumsförderung wie die äquivalente Menge an L-Lysin bewirkt, wenn es mit einer Lysinmangel-Diät an junge Ratten verfüttert wird. Ferner verringert eine vollständige Acetylierung der ε-Aminogruppen des Lysins in einem Proteinnahrungsmittel die Wachstumsförderung nicht so sehr wie die Abwesenheit von Lysin. Die Verfütterung von hitzebehandeltem Proteinfutter äußert sich auch in einem starken Ansteigen des Lysingehaltes in Fäces.

In einer Studie über die Effekte der Hitzeschädigung von Proteinen schließen Bjarnason und Carpenter^[35], daß eine Reaktion zwischen der ε-Aminogruppe des Lysins und der γ- bzw. β-Carboxygruppe der Glutamin- bzw. Asparaginsäure unter den in der Praxis verwendeten Trocknungsbedingungen stattfinden kann. Sie vermuten daher, daß Lysin in Isopeptidbindungen oder von den Zersetzungsprodukten des Cystins gebunden werden könnte. Diese zweite Reaktionsmöglichkeit würde zur Bildung von Lanthionin und Lysinoalanin führen, wie bei anderen Proteinen gezeigt wurde^[56].

Kürzlich haben Waible und Carpenter^[57] den Einfluß von *N*^ε-(γ-Glutamyl)-lysin auf das Wachstum von Küken untersucht. Sie konnten zweifelsfrei nachweisen, daß das freie Isopeptid metabolisiert wird und das Wachstum fördert. Im Urin konnte es nicht nachgewiesen werden, im Plasma dagegen wurde ein geringer Teil gefunden, was bedeutet, daß das Isopeptid durch die Darmwand aufgenommen werden kann.

Weitere Arbeiten verdeutlichen die Vielschichtigkeit dieses Problems. So wurde beim Muskelprotein von Hühnern gezeigt, daß während der Sterilisierung der Gehalt an nicht zugänglichem Lysin zunimmt und die biologische Wertigkeit sinkt. Da der Cystingehalt des Hühnermuskels klein ist, kann es kaum überraschen, daß weder Lysinoalanin noch Lanthionin im sauren Hydrolysat nachweisbar sind. Eine anschließende Analyse auf Isopeptide bewies aber, daß diese im hitzebehandelten Material vorhanden waren. Die Mengen des gebildeten Isopeptids und des verfügbaren Lysins waren umgekehrt proportional^[58].

Eine Bestimmung des Gehaltes an Isopeptidbrücken in den Fäces und im Urin von Ratten, die mit diesem sterilisierten Protein gefüttert worden waren, ergab, daß weder im Urin noch in niedermolekularen Peptiden im Urin Verbindungen mit Isopeptidbrücken auftraten. Aus den Fäcesproteinen lassen sich dagegen zwar durch enzymatische Hydrolyse *N*^ε-(γ-Glutamyl)-lysin und *N*^ε-(β-Aspartyl)-lysin freisetzen; die gefundenen Mengen sind aber beträchtlich geringer als in den verfütterten Proteinen. Das weist eindeutig darauf hin, daß ein Abbau der Isopeptidbindung im Verdauungstrakt stattfinden kann.

Die rein chemische Fixierung der ε-Aminogruppe des Lysins kann deshalb nicht der einzige Grund für den Verlust an Nährwert bei diesem Protein sein. Vielmehr scheint die Bildung der Querbrücken auszureichen, um den enzymatischen Abbau so weit zu verzögern, daß zumindest ein Teil des Proteins über den Bereich des Verdauungstrakts hinausgelangt, in dem eine leichte Absorption in den Blutkreislauf möglich ist. (Eine derartige Hemmung des enzymatischen Abbaus wurde ja bereits bei hitzebehandelter Wolle gefunden.) Analysen haben zwar gezeigt, daß der Gehalt an Isopeptid-Querbrücken in

Nahrungsmitteln abgenommen hat, wenn das Material den Krummdarm erreicht, doch ist diese Abnahme beträchtlich kleiner als diejenige beim Übergang des Materials vom Krummdarm in den Dickdarm^[59]. Der letztgenannte Abbau des Proteins und der Isopeptidbindungen dürfte durch Gärungsvorgänge im hinteren Darmabschnitt erfolgen; dort ist jedoch die Absorption soweit verringert, daß sich insgesamt ein Verlust an Nährwert ergibt. An der weiteren Untermauerung dieser Theorie wird gearbeitet.

Eingegangen am 24. September 1973 [A 16]

Übersetzt von Dr. D. Nissen und Dr. V. Rosshach, Aachen

- [1] J. B. Speakman u. M. C. Hirst, *Nature* 128, 1073 (1931).
- [2] A. E. Mirsky u. L. Pauling, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 22, 439 (1936).
- [3] G. C. Pimentel u. A. L. McClellan: *The Hydrogen Bond*. San Francisco 1960.
- [4] I. M. Klotz, *Brookhaven Symp. Biol.* 13, 25 (1960).
- [5] H. Zahn, *Paletto* 21, 19 (1965).
- [6] W. G. Crewther, R. D. B. Fraser, F. G. Lennox u. H. Lindley, *Advan. Protein Chem.* 20, 191 (1965).
- [7] P. Alexander, R. F. Hudson u. C. Earland: *Wool. It's Chemistry and Physics*. Chapman and Hall, London 1963.
- [8] R. Cecil u. J. R. McPhee, *Advan. Protein Chem.* 14, 255 (1959).
- [9] J. B. Speakman u. C. S. Whewell, *J. Soc. Dyers Colour.* 52, 380 (1936).
- [10] M. J. Horn, B. B. Jones u. S. J. Ringel, *J. Biol. Chem.* 138, 141 (1941).
- [11] Z. Bohak, *J. Biol. Chem.* 239, 2878 (1964).
- [12] A. Patchornik u. M. Sokolovsky, *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 1860 (1964).
- [13] K. Ziegler, *J. Biol. Chem.* 239, P. C. 2713 (1964).
- [14] K. Ziegler, *Nature* 214, 404 (1967).
- [15] R. S. Asquith u. P. Carthew, *Biochim. Biophys. Acta* 278, 346 (1972).
- [16] R. S. Asquith u. P. Carthew, *Tetrahedron* 28, 4769 (1972).
- [17] H. Zahn, H. Beyer, M. M. Hammoudeh u. A. Schalla, *Melliand Textilber.* 50, 1391 (1969).
- [18] P. M. Gallop, O. O. Blumenfeld u. S. Seifter, *Annu. Rev. Biochem.* 41, 617 (1972).
- [19] T. Weis-Fogh, *J. Exp. Biol.* 37, 889 (1960).
- [20] S. O. Andersen, *Biochim. Biophys. Acta* 93, 213 (1964).
- [21] D. J. Ruven, C. Earland u. M. Little, *Biochim. Biophys. Acta* 251, 96 (1971).
- [22] W. T. Astbury u. H. J. Woods, *Phil. Trans. Roy. Soc. London A* 232, 333 (1934).
- [23] L. Pauling u. C. Niemann, *J. Amer. Chem. Soc.* 61, 1860 (1939).
- [24] D. K. Mecham u. H. S. Olcott, *Ind. Eng. Chem.* 39, 1023 (1947).
- [25] J. F. Benk, F. W. Chornock u. E. E. Rice, *J. Biol. Chem.* 60, 291 (1948).
- [26] J. Bello u. H. Riese-Bello, *Sci. Ind. Photogr.* 29, 361 (1958).
- [27] I. V. Yannus u. A. V. Tobolsky, *Nature* 215, 507 (1967).
- [28] K. J. Carpenter, *Biochem. J.* 77, 604 (1960).
- [29] S. R. Rao, F. L. Carter u. V. L. Frampton, *Anal. Chem.* 35, 1927 (1963).
- [30] L. Blom, P. Hendricks u. J. Caris, *Anal. Biochem.* 21, 491 (1967).
- [31] R. S. Asquith, D. Chan u. M. S. Otterburn, *J. Chromatogr.* 43, 312 (1969).
- [32] R. S. Asquith u. M. S. Otterburn, *J. Text. Inst.* 61, 569 (1970).
- [33] R. S. Asquith u. D. C. Parkinson, *Text. Res. J.* 34, 1064 (1966).
- [34] J. Bjarnason u. K. J. Carpenter, *Brit. J. Nutr.* 23, 859 (1969).
- [35] J. Bjarnason u. K. J. Carpenter, *Brit. J. Nutr.* 24, 313 (1970).
- [36] L. Lorand, K. Konishi u. A. Jacobsen, *Nature* 194, 1148 (1962).
- [37] L. Lorand, H. H. Ong, B. Lipinski, N. G. Rule, J. Downey u. A. Jacobsen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 629 (1966).
- [38] G. M. Fuller u. R. F. Doolittle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 694 (1966).
- [39] S. Maticic u. A. G. Loewy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 356 (1968).
- [40] J. J. Pisano, J. S. Finlayson u. M. P. Peyton, *Science* 160, 892 (1968).
- [41] L. Lorand, J. Downey, T. Goto, A. Jacobsen u. S. Tokura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 22 (1968).
- [42] J. C. Fletcher, persönliche Mitteilung (Jan. 1969).
- [43] M. Cole, J. C. Fletcher, K. L. Gardner u. M. C. Corfield, *Appl. Polym. Symp.* 18, 147 (1971).

- [44] R. S. Asquith, M. S. Otterburn, J. H. Buchanan, M. Cole, J. C. Fletcher u. K. L. Gardner, *Biochim. Biophys. Acta* 207, 342 (1970).
 [45] R. S. Asquith, M. S. Otterburn u. K. L. Gardner, *Experientia* 27, 1388 (1971).
 [46] B. Milligan, L. A. Holt u. J. B. Caldwell, *Appl. Polym. Symp.* 18, 113 (1971).
 [47] H. W. H. Harding u. G. E. Rodgers, *Biochim. Biophys. Acta* 257, 37 (1972).
 [48] A. G. Loewy, S. S. Matulis u. M. Showe, *Fed. Proc.* 30 (Part 2), 1299 (1971).
 [49] R. S. Asquith u. M. S. Otterburn, *Appl. Polym. Symp.* 18, 277 (1971).

- [50] M. S. Otterburn, Ph. D. Thesis, University of Bradford (England) 1970.
 [51] H. Zahn, *Paletten* 42, 29 (1973).
 [52] R. S. Asquith, M. S. Otterburn u. J. A. Swift, *J. Text. Inst.* 63, 544 (1972).
 [53] K. J. Carpenter, *Nutr. Soc. Eng. and Scot.* 17, 91 (1958).
 [54] C. H. Lea u. R. S. Hannah, *Biochim. Biophys. Acta* 4, 1950 (1950).
 [55] K. M. Henry u. S. K. Kon, *Biochim. Biophys. Acta* 5, 455 (1950).
 [56] R. S. Asquith u. M. S. Otterburn, *J. Text. Inst.* 60, 208 (1969).
 [57] P. E. Waible u. K. J. Carpenter, *Brit. J. Nutr.* 27, 509 (1972).
 [58] R. S. Asquith, M. S. Otterburn, W. J. Sinclair, K. J. Carpenter u. R. Hurrell, unveröffentlichte Ergebnisse.

ZUSCHRIFTEN

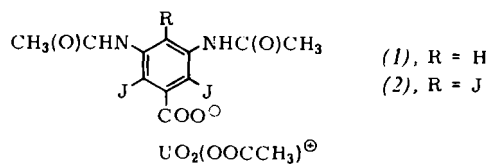
Strukturanalyse durch direkte Beobachtung von Atomen mit Dunkelfeld-Transmissionselektronenmikroskopie^[**]

Von Robert F. Whiting, F. Peter Ottensmeyer und Frederick C. Nachod^[*]

Die optimale Methode zur Bestimmung der Struktur chemischer Verbindungen wäre natürlich die direkte Sichtbarmachung der Atome. Die zur genauen Wiedergabe der Atompositionen in einem Molekül geeignete Technik der Röntgen-Strukturanalyse erscheint für Routineuntersuchungen zu aufwendig. Die üblichen chemischen sowie spektrometrischen Verfahren – obwohl hochentwickelt – sind im Prinzip indirekt, ihre Ergebnisse daher nicht immer zweifelsfrei.

In den letzten Jahren ist es gelungen, einzelne Schweratome elektronenmikroskopisch abzubilden^[1]. So konnten z. B. in unserem Laboratorium Atome der Ordnungszahl 46 (Pd) bis 92 (U) an einer Reihe von Verbindungen im Dunkelfeld-Elektronenmikroskop betrachtet werden^[2]. Das Auflösungsvermögen des Geräts (besser als 3 Å!) erreicht die Abstände der größeren Atome in einem Molekül, was uns bewog, nun auch der Möglichkeit zur Strukturaufklärung entsprechender Verbindungen nachzugehen. Im folgenden berichten wir über die Anwendung hochauflösender Dunkelfeld-Elektronenmikroskopie zur Bestätigung der Struktur eines Dijodbenzoesäure-Derivats.

Auf der Suche nach Kontrastmitteln für die Urographie, synthetisierten Larson et al.^[3] eine 3,5-Bis(acetamido)dijodbenzoesäure, der sie aufgrund chemischer Analogie die Struktur des



2,6-Dijod-Isomers zuordnen; andere Daten, z. B. NMR-Befunde, waren nicht eindeutig.

[*] R. F. Whiting und Dr. F. P. Ottensmeyer
 Department of Medical Biophysics
 University of Toronto
 Toronto M4X 1K9, 500 Sherbourne Street (Canada)
 Dr. F. C. Nachod
 Sterling-Winthrop Research Institute
 Rensselaer, New York 12144 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde vom Medical Research Council of Canada, Grant MA-3763, unterstützt.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung haben wir diese Säure sowie, zum Vergleich, 3,5-Bis(acetamido)-2,4,6-trijodbenzoesäure zum „Anfärben“ der Carboxy-Gruppe in die Acetatouranyl(vi)-Salze (1) bzw. (2) überführt [12 h Rühren mit 0,05 N Uranylacetat in 0,05 N HCl (pH = 3,5), Filtration (0,22 µm Porenöffnung)].

Die Salzlösungen wurden auf einem vorbehandelten 10–20 Å dicken Kohlenstoff-Film in das Dunkelfeld-Elektronenmikroskop (Philips EM 300; 80 kV, Vergrößerung $10^5 \times$)^[2] gebracht. Die Aufnahmen von (1) und (2) (Abb. 1) zeigen die relative Position der Jodatome (hellere Flecke) gegenüber dem Uranatom (dunkler Fleck). Nur die schweren Atome sind beobachtbar; die geringe Elektronenstreuung der leichten Atome wie Kohlenstoff verschwindet im „Rauschen“ des Untergrundes. Die in solchen Bildern allgemein auftretenden kleinen Geometrieunterschiede sind wahrscheinlich auf leichte Verschiebungen der Atome unter der Einwirkung des intensiven Elektronenbombardements während der „Belichtungszeit“ zurückzuführen. Jedoch bleiben Anzahl, Anordnung und Abstände der Flecken in völliger Übereinstimmung mit der zugrundeliegenden Molekülstruktur (vgl. insbesondere Abb. 1b).

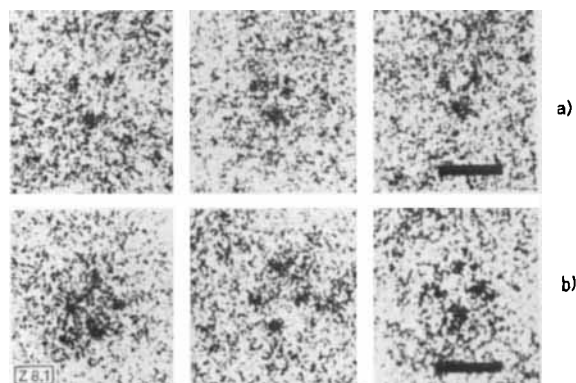


Abb. 1. Dunkelfeld-elektronenmikroskopische Aufnahmen von uranymarkierter a) 3,5-Bis(acetamido)-2,6-dijodbenzoesäure (1) und b) 3,5-Bis(acetamido)-2,4,6-trijodbenzoesäure (2). In jedem Bild sind nur die zwei bzw. drei Jodatome sowie das Uranatom (unten) sichtbar. Die Balken (rechts) repräsentieren 10 Å.

Wie dieses Beispiel demonstrieren soll, ermöglicht die Dunkelfeld-Elektronenmikroskopie, Strukturprobleme in vielen Fällen eindeutig und rasch (innerhalb eines halben Tages!) zu klären. Die Anwendbarkeit dieser einfachen Methode ist zur Zeit noch auf Verbindungen beschränkt, die schwere Atome zur Positionsmarkierung enthalten. Unter Verwendung solcher Markierungsatome können jedoch sogar schon so leichte