

Strukturuntersuchungen an Plastiden

IV. Über das zweidimensionale Gitter in der Proteinlamelle

Von WERNER KREUTZ *

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln
(Z. Naturforsch. **18 b**, 567—571 [1963]; eingegangen am 20. November 1962)

Die Analyse der Röntgenkleinwinkel-Streuung isolierter Chloroplasten von *Antirrhinum majus* und von lebenden Chlorellazellen führt zur Annahme eines zweidimensionalen Gitters in der Proteinschicht der Lipoproteidlamelle. Die Gitterordnung erstreckt sich jedoch nicht zusammenhängend über die gesamte Lamellenfläche. Man hat sich die Proteinschicht vielmehr als eine lockere Aneinanderfügung von zweidimensionalen Kristalliten vorzustellen oder aus amorphen und kristallinen Bereichen zusammengesetzt zu denken. Jeder Kristallit besteht aus etwa 30 Proteinpartikeln. Die beste Angleichung an die experimentelle Streukurve erhielt man bei Annahme eines quadratischen Gitters in den kristallinen Bereichen. Der Mittelpunktsabstand zweier benachbarter Partikel beträgt dann 36,5 Å-Einheiten.

Eine Analyse der Röntgenkleinwinkel-Streuung von Chloroplasten wurde zum ersten Mal von KRATKY, MENKE und Mitarb.¹ versucht. Im Anschluß an diese Arbeit wurde von KREUTZ und MENKE² eine eingehendere Untersuchung des Proteins in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten vorgenommen. Es ergab sich, daß nach Entfernung der Lipide und löslichen Eiweißarten, das verbleibende Lamellensystem der Chloroplasten aus 48 Å dicken Proteinlamellen besteht. Die Lamellen wurden als kompakte Schichten interpretiert. Wenn man die Streukurven wasserfreier Chloroplasten mit den Streudiagrammen von Chloroplastenlipiden vergleicht³, so zeigt sich, daß ein diffuser Reflex, der einem Bragg'schen Abstand von 36 Å entspricht, sehr schwer den Lipiden der Chloroplasten zuzuordnen ist; denn er wird auch noch von Präparaten gegeben, die erschöpfend mit organischen Lösungsmitteln extrahiert worden sind. Dieser Reflex blieb ferner bei lipidhaltigen Chloroplasten, die durch An trocknen orientiert worden waren, als einziger unorientiert³. Prinzipiell könnte eine solche Interferenz sowohl durch die Stapelung der Proteinlamellen als auch durch eine Gitterordnung innerhalb der Lamellenebene zustande kommen. Da die Dicke der Proteinlamellen 48 Å beträgt, kann der oben erwähnte diffuse Reflex, der einem Netzebenenabstand

von 36 Å entspricht, nicht durch die Stapelung der Proteinlamellen erklärt werden. Er kann daher nur durch eine Periode innerhalb der Ebene der Proteinlamelle hervorgerufen werden. Auch die Auswertung der Röntgenstreuung von wasserhaltigen isolierten Chloroplasten und lebenden Chlorellazellen führt, wie im folgenden gezeigt wird, zur Annahme eines zweidimensionalen Gitters in der Proteinlamelle. Diese Röntgendiagramme lassen sich nämlich nicht vollständig durch die Streuung der Lamellenstapelung deuten. Eliminiert man diesen Streuanteil durch Subtraktion aus der experimentellen Streukurve, so bleibt eine Reststreukurve. Das Intensitätsmaximum dieser Kurve ist asymmetrisch ausgebildet. Ihre Intensität verläuft umgekehrt proportional dem Quadrat des Streuwinkels ϑ . Somit verhält sich der Verlauf dieser Kurve im wesentlichen wie die Streuung eines zweidimensionalen Gitters⁴. Die quantitative Auswertung der Reststreukurve wird in dieser Arbeit durchgeführt.

Die Auswertung soll am Beispiel einer Aufnahme von lebenden Chlorellazellen gezeigt werden. Das Röntgenkleinwinkel-Diagramm einer Suspension von Chlorellazellen in Nährösung (I) ist in Abb. 1 a wiedergegeben. Die Aufnahme wurde mit einer KRATKY-Kamera⁵ bei einem Abstand Präparat-Film von $r = 11,95$ cm und einer Belichtungs-

* Neue Adresse: Max-Volmer-Institut, Physikalisch-Chemisches Institut der Technischen Universität Berlin.

¹ O. KRATKY, W. MENKE, A. SEKORA, B. PALETTA u. M. BISCHOF, Z. Naturforsch. **14 b**, 307 [1959].

² W. KREUTZ u. W. MENKE, Z. Naturforsch. **15 b**, 402 [1960].

³ W. KREUTZ u. W. MENKE, Z. Naturforsch. **15 b**, 483 [1960].

⁴ O. KRATKY, Mh. Chem. **76**, 325 [1947]. A. J. WILSON, Acta crystallogr. [London] **2**, 245 [1949]. B. E. WARREN, Physic. Rev. **59**, 693 [1941].

⁵ O. KRATKY, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **62**, 66 [1958]; **58**, 49 [1954]. O. KRATKY u. Z. SKALA, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **62**, 73 [1958].

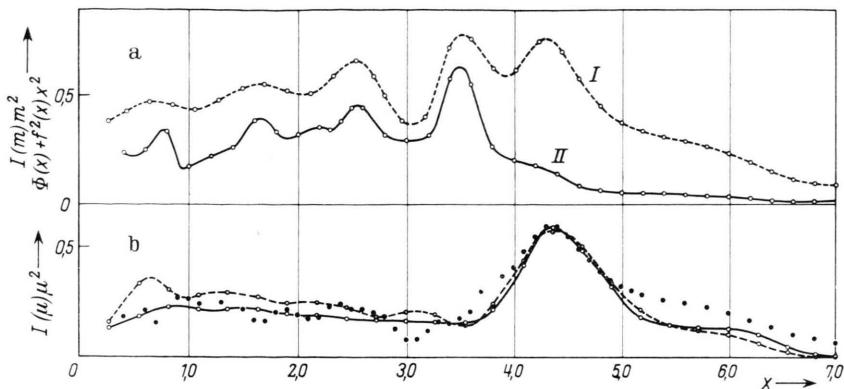


Abb. 1 a. —○—○— (I) Experimentelle Streukurve $I(m) m^2$ einer Suspension von *Chlorella pyrenoidosa* in Nährösung. —○—○— (II) Theoretische Streufunktion $\Phi(x) + f^2(x) x^2$.

Abb. 1 b. ····· Reststreukurve, die durch Subtraktion der Funktion II von Funktion I in Abb. 1 a entsteht. —○—○— Theoretische Streukurve eines Blättchens aus 25 Kugeln in quadratischer Gitterordnung. —○—○— Theoretische Streukurve eines Blättchens aus 37 Kugeln in quadratischer Gitterordnung.

zeit von 5,5 Stdn. erhalten. Photometriert wurde mit dem Übersetzungsfaktor $p = 20$. Der Primärstrahl hatte strichförmigen Querschnitt. Die Länge des Querschnitts war so gewählt, daß sie für die Auswertung als unendlich lang angesehen werden konnte. Durch diese Form des Primärstrahls tritt im Streudiagramm ein Kollimationsfehler auf. Dieser Fehler wurde entfernt, indem man die Streuintensität so umrechnete als wäre sie von einem Primärstrahl mit punktförmigem Querschnitt erhalten worden. Diesen Umrechnungsprozeß bezeichnet man als Entschmierung⁶. Nach der Entschmierung wurde die Strukurve vom sogenannten Blättchen- oder Lorentz-Faktor⁷ befreit, der im vorliegenden Winkelbereich als proportional $1/m^2$ angesehen werden kann. In der Ordinate der experimentellen Streukurve (I) in Abb. 1 a ist deshalb $I(m) m^2$ aufgetragen. Die experimentelle Abszissenstrecke $m = 2 \vartheta rp$ ist in dieser Abbildung bereits um den Faktor $m/x = 2,36$ gestaucht, um die Streukurve mit der theoretischen Streufunktion besser vergleichen zu können. Die theoretische Streufunktion (II), die für den Kurvenvergleich ebenfalls in Abb. 1 a wiedergegeben ist, setzt sich additiv aus der Streuung der Lamellenstapelung und der Streuung der übrigen Zelle zusammen. Der Streufunktion der Lamellenstapelung liegen die Strukturvorstellungen der III. Mit-

teilung⁸ zugrunde. Danach ist die aus Proteinen und Lipiden bestehende Thylakoidmembran asymmetrisch aufgebaut. Sie besteht aus einer Protein- und einer Lipidschicht. Der Proteinschicht entspricht im Modell eine Lamelle, die durch Aneinanderfügung von Kugeln zustande kommt, während die Lipidschicht als eine kompakte Platte angesehen wird. Je zwei solcher asymmetrischer Lipoproteidlamellen liegen spiegelsymmetrisch angeordnet. Durch Übereinanderschichtung solcher Symmetrieinheiten kommt die Lamellenstapelung der Chloroplasten zustande. Jeder Symmetrieinheit entspricht ein Thylakoid. Für die Streuung der übrigen Zelle wurde als erste Näherung die Streuung einer verdünnten Körperteilung eingesetzt. Nähere Einzelheiten können aus der III. Mitteilung⁸ entnommen werden.

Subtrahiert man die theoretische Streufunktion (II) von der experimentellen Streukurve (I), so erhält man die schon erwähnte Reststreukurve. Ihr Intensitätsverlauf ist in Abb. 1 b durch Punkte markiert. Sie muß, wenn tatsächlich ein zweidimensionales Gitter vorliegt, mit theoretischen Streufunktionen solcher Gitter angenähert werden können. Dazu kann man sich der Debye'schen Streuformel⁹ bedienen. Sie besagt, daß man die Streuung einer Aggregation aus n gleichen Kugeln mit dem Formfak-

⁶ Zusammenfassende Darstellung: O. KRATKY, G. POROD u. Z. SKALA, Acta physica austriaca **13**, 76 [1960].

⁷ G. POROD, Acta physica austriaca **3**, 66 [1949]; Kolloid-Z. **2**, 83 [1951]. O. KRATKY, Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges.

physik. Chem. **60**, 245 [1956]; Naturwissenschaften **42**, 237 [1955].

⁸ W. KREUTZ u. W. MENKE, Z. Naturforsch. **17b**, 675 [1962].

⁹ P. DEBYE, Ann. Phys. [Leipzig] **46**, 809 [1915].

tor F erhält, wenn man F^2 mit der Summe

$$\sum_{i,k=1}^n \frac{\sin h l_{ik}}{h l_{ik}}$$

multipliziert. Hierin ist $h = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \vartheta$, wobei λ die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung und ϑ den Streuwinkel bedeutet. l_{ik} ist der Mittelpunktsabstand der Partikel i von den Partikeln k in der Kugelaggregation. Durch Einführung eines Faktors $1/n^2$ wird die Streufunktion so normiert, daß für $h=0$, $I(0)=1$ wird. Der Streuanteil pro Partikel in dem aus Kugeln aufgebauten Blättchen wird dann:

$$I(h) = \frac{F^2}{n^2} \sum_{i,k=1}^n \frac{\sin h l_{ik}}{h l_{ik}}$$

Für die Festlegung der Abstände der Kugeln innerhalb der Kristallite wird als Bezugslänge $2r$ gewählt. $2r$ soll der Mittelpunktsabstand l_{ik} zweier benachbarter Kugeln sein. Dem Abstand $2r$ entspricht die Phase 2μ , wobei μ für $h r$ eingeführt wird. Der Formfaktor F der Kugel¹⁰, der in die Debye'sche Formel einzusetzen ist, ergibt sich aus der Anpassung des theoretischen an den experimentellen Intensitätsverlauf. Entscheidend ist vor allem die Lage des Intensitätsminimums bei $x=7,0-7,1$ in der experimentellen Streukurve. Für $x>7,0$ ändert sich die Streuintensität nicht mehr wesentlich. Dem Abszissenwert $x=7,0$ entspricht bei der Berechnung der Wert des ersten Minimums der Kugelfunktion. Dies geht aus einer kurzen Betrachtung

der Streufunktion der Kugel hervor. Die Streufunktion $F^2(c\mu)$ einer Kugel ist proportional dem Quadrat der Bessel-Funktion $J_{3/2}(c\mu)$ und dem Faktor $1/\mu^3$. c ist eine Konstante, die eine Variation des Radius r ermöglicht. Die Intensität der Kugelfunktion sinkt zwischen dem Maximum bei $c\mu=0$ und dem nächstfolgenden Maximum bei $c\mu=5,765$ von $F^2(0)=1$ auf $F^2(5,765)=0,00742$ ab. Da diese Funktion als Faktor in der Debye'schen Formel enthalten ist, hat man eine merkliche Streuung nur zwischen $c\mu=0$ und $c\mu=4,49$, dem ersten Minimum der Bessel-Funktion $J_{3/2}(c\mu)$ zu erwarten. Um die berechneten Streukurven der zweidimensionalen Kristallite mit der Reststreukurve vergleichen zu können, wird die μ -Abszisse in die x -Abszisse transformiert. Dazu ist beim quadratischen Gitter ein Dehnungsfaktor $x/\mu=1,36$, beim hexagonalen Gitter $x/\mu=1,17$ erforderlich. Das erste Minimum muß also beim quadratischen Gitter bei $\mu=5,2$ und beim hexagonalen Gitter bei $\mu=6,0$ liegen. Das entspricht den Kugelfunktionen $F^2(0,86\mu)$ bzw. $F^2(0,74\mu)$. Daraus folgt, daß sich im Blättchenmodell die Kugeln nicht berühren dürfen. In diesem Fall wäre nämlich $c=1$ also $F^2(\mu)$ zu setzen.

Für Scheibchen aus 9, 16, 25 und 37 Kugeln in quadratischer Gitterordnung, wie sie Abb. 3 zeigt, ergeben sich nach der Debye'schen Streuformel folgende Ansätze:

a) $n = 9$

$$I(\mu) = \frac{F^2(0,86\mu)}{9^2} \left[9 + 24 \frac{\sin 2\mu}{2\mu} + 12 \frac{\sin 4\mu}{4\mu} + 16 \frac{\sin 2\sqrt{2}\mu}{2\sqrt{2}\mu} + 4 \frac{\sin 4\sqrt{2}\mu}{4\sqrt{2}\mu} + 16 \frac{\sin 2\sqrt{5}\mu}{2\sqrt{5}\mu} \right].$$

b) $n = 16$

$$I(\mu) = \frac{F^2(0,86\mu)}{16^2} \left[16 + 48 \frac{\sin 2\mu}{2\mu} + 32 \frac{\sin 4\mu}{4\mu} + 16 \frac{\sin 6\mu}{6\mu} + 36 \frac{\sin 2\sqrt{2}\mu}{2\sqrt{2}\mu} + 16 \frac{\sin 4\sqrt{2}\mu}{4\sqrt{2}\mu} + 4 \frac{\sin 6\sqrt{2}\mu}{6\sqrt{2}\mu} + 48 \frac{\sin 2\sqrt{5}\mu}{2\sqrt{5}\mu} + 24 \frac{\sin 2\sqrt{10}\mu}{2\sqrt{10}\mu} + 16 \frac{\sin 2\sqrt{13}\mu}{2\sqrt{13}\mu} \right].$$

c) $n = 25$

$$I(\mu) = \frac{F^2(0,86\mu)}{25^2} \left[25 + 80 \frac{\sin 2\mu}{2\mu} + 60 \frac{\sin 4\mu}{4\mu} + 40 \frac{\sin 6\mu}{6\mu} + 20 \frac{\sin 8\mu}{8\mu} + 16 \frac{\sin 10\mu}{10\mu} + 64 \frac{\sin 2\sqrt{2}\mu}{2\sqrt{2}\mu} + 36 \frac{\sin 4\sqrt{2}\mu}{4\sqrt{2}\mu} + 4 \frac{\sin 8\sqrt{2}\mu}{8\sqrt{2}\mu} + 96 \frac{\sin 2\sqrt{5}\mu}{2\sqrt{5}\mu} + 24 \frac{\sin 4\sqrt{5}\mu}{4\sqrt{5}\mu} + 64 \frac{\sin 2\sqrt{10}\mu}{2\sqrt{10}\mu} + 16 \frac{\sin 6\sqrt{2}\mu}{6\sqrt{2}\mu} + 48 \frac{\sin 2\sqrt{13}\mu}{2\sqrt{13}\mu} + 32 \frac{\sin 2\sqrt{17}\mu}{2\sqrt{17}\mu} \right].$$

¹⁰ Lord RAYLEIGH, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. A **90**, 219 [1914].

d) $n = 37$

$$I(\mu) = \frac{F^2(0,86 \mu)}{37^2} \left[37 + 120 \frac{\sin 2 \mu}{2 \mu} + 92 \frac{\sin 4 \mu}{4 \mu} + 64 \frac{\sin 6 \mu}{6 \mu} + 44 \frac{\sin 8 \mu}{8 \mu} + 72 \frac{\sin 10 \mu}{10 \mu} \right. \\ + 12 \frac{\sin 12 \mu}{12 \mu} + 112 \frac{\sin 2\sqrt{2} \mu}{2\sqrt{2} \mu} + 76 \frac{\sin 4\sqrt{2} \mu}{4\sqrt{2} \mu} + 40 \frac{\sin 6\sqrt{2} \mu}{6\sqrt{2} \mu} + 12 \frac{\sin 8\sqrt{2} \mu}{8\sqrt{2} \mu} \\ + 176 \frac{\sin 2\sqrt{5} \mu}{2\sqrt{5} \mu} + 72 \frac{\sin 4\sqrt{5} \mu}{4\sqrt{5} \mu} + 128 \frac{\sin 2\sqrt{10} \mu}{2\sqrt{10} \mu} + 8 \frac{\sin 4\sqrt{10} \mu}{4\sqrt{10} \mu} + 112 \frac{\sin 2\sqrt{13} \mu}{2\sqrt{13} \mu} \\ \left. + 80 \frac{\sin 2\sqrt{17} \mu}{2\sqrt{17} \mu} + 48 \frac{\sin 2\sqrt{26} \mu}{2\sqrt{26} \mu} + 32 \frac{\sin 2\sqrt{29} \mu}{2\sqrt{29} \mu} + 16 \frac{\sin 2\sqrt{34} \mu}{2\sqrt{34} \mu} + 16 \frac{\sin 2\sqrt{37} \mu}{2\sqrt{37} \mu} \right].$$

Für Scheibchen aus 7, 13 und 19 Kugeln in hexagonaler Gitterordnung finden sich Ansätze in einer

Arbeit von KRATKY⁴. Für 30 Kugeln in dieser Gitterordnung erhält man:

e) $n = 30$

$$I(\mu) = \frac{F^2(0,86 \mu)}{30^2} \left[30 + 142 \frac{\sin 2 \mu}{2 \mu} + 104 \frac{\sin 4 \mu}{4 \mu} + 66 \frac{\sin 6 \mu}{6 \mu} + 32 \frac{\sin 8 \mu}{8 \mu} + 10 \frac{\sin 10 \mu}{10 \mu} \right. \\ + 110 \frac{\sin 2\sqrt{3} \mu}{2\sqrt{3} \mu} + 52 \frac{\sin 4\sqrt{3} \mu}{4\sqrt{3} \mu} + 6 \frac{\sin 6\sqrt{3} \mu}{6\sqrt{3} \mu} + 152 \frac{\sin 2\sqrt{7} \mu}{2\sqrt{7} \mu} + 8 \frac{\sin 4\sqrt{7} \mu}{4\sqrt{7} \mu} \\ \left. + 92 \frac{\sin 2\sqrt{13} \mu}{2\sqrt{13} \mu} + 54 \frac{\sin 2\sqrt{19} \mu}{2\sqrt{19} \mu} + 38 \frac{\sin 2\sqrt{21} \mu}{2\sqrt{21} \mu} + 4 \frac{\sin 2\sqrt{31} \mu}{2\sqrt{31} \mu} \right].$$

Eliminiert man aus diesen Streufunktionen den Blättchenfaktor⁷, indem man $I(\mu)$ mit μ^2 multipliziert, so erhält man die Streufunktionen der Abb. 2 a und 2 b. Diese Funktionen sind, wie bereits erwähnt, zum Vergleich mit der Reststreukurve von der Abszissenkala μ mit der Bezugslänge $2r$ in die x -Abszisse mit der Bezugslänge d transformiert. Aus dem Absolutwert 49,7 Å für die Bezugslänge d aus der vorhergehenden Arbeit⁸ und den Zuordnungsfaktoren 1,36 und 1,17 ergeben sich für den Mittelpunktsabstand $2r$ zweier benachbarter Kugeln im

quadratischen Gitter 36,5 Å und für das hexagonale Gitter 42,4 Å-Einheiten. Aus $2r = 36,5 \text{ \AA}$ und $F^2(0,86 \mu)$ bzw. $2r = 42,4 \text{ \AA}$ und $F^2(0,74 \mu)$ findet man für den Durchmesser der Kugeln in beiden Gittern einen Wert von 31,4 Å-Einheiten. Dies bedeutet nicht, daß man sich die realen Partikel in der Proteinlamelle als Kugeln von diesem Durchmesser vorzustellen hat. Der Wert besagt nur, daß Kugeln von 31,4 Å Durchmesser den Proteinpartikeln streuäquivalent sind, wenn die Strahlensymmetrale in der Flächenebene liegt.

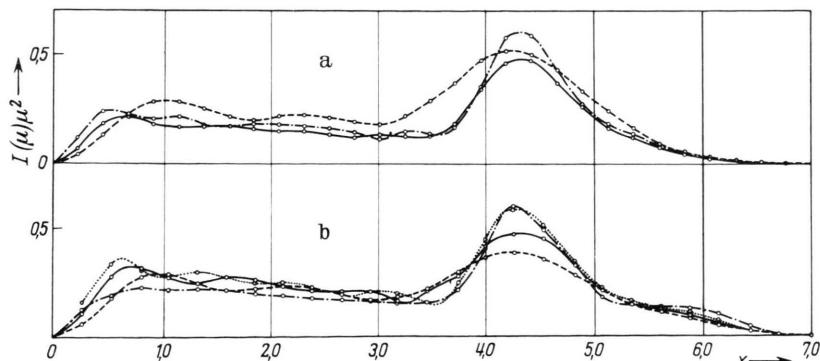


Abb. 2 a. Theoretische Streufunktionen zweidimensionaler Kristallite $I(\mu) \mu^2$ aus n Kugeln in hexagonaler Gitterordnung. $- \circ - \circ -$ $n = 13$, $- \circ - \circ -$ $n = 19$, $- \circ - \cdot - \circ -$ $n = 30$.

Abb. 2 b. Theoretische Streufunktionen zweidimensionaler Kristallite $I(\mu) \mu^2$ aus n Kugeln mit quadratischer Gitterordnung. $- \circ - \circ -$ $n = 9$, $- \circ - \circ -$ $n = 16$, $\cdots \circ \cdots \circ \cdots$ $n = 25$, $- \circ - \cdot - \circ -$ $n = 37$.

Die theoretischen Streukurven in den Abb. 2 a und 2 b unterscheiden sich charakteristisch lediglich zwischen $x = 4,5 - 7,0$ im Intensitätsverlauf. Die Streukurven des quadratischen Gitters besitzen im Gegensatz zum hexagonalen in diesem Winkelbereich ein zweites, schwach ausgeprägtes Maximum. Diesen schwachen Wiederanstieg der Intensität zeigt auch die experimentelle Streukurve. Der Streukurvenvergleich spricht demnach zugunsten des quadratischen Gitters.

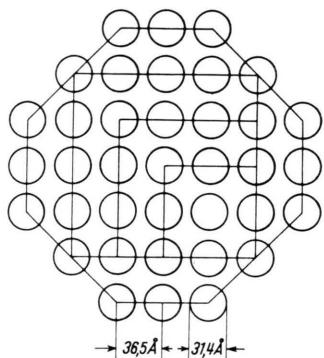


Abb. 3. Schematische Zeichnung der Blättchen mit quadratischer Gitterordnung, die den Streufunktionen in Abb. 2 b zugrunde liegen.

Die beste Übereinstimmung geben Kristallite aus 25 und 37 Kugeln in quadratischer Gitterordnung.

Die Streukurven dieser beiden Blättchen, die in Abb. 1 b nochmals mit der Reststreukurve zusammen aufgetragen sind, erlauben eine ungefähre Festlegung der Partikelzahl in den zweidimensionalen Kristalliten. So stellt die Streufunktion des Blättchens aus 37 Kugeln zweifellos die obere Grenze dar, da der Anstieg des Intensitätsmaximums eindeutig zu steil ist. Bei Anordnungen aus 25 Partikeln ist die Streuintensität in diesem Winkelbereich schon etwas zu niedrig. Die Kristallite dürften deshalb kaum mehr als 37, jedoch auch nicht weniger als 25 Partikel enthalten. Große Schwankungen der Abstände zwischen den Partikeln können, wie das Verhältnis 36,5/31,4 zeigt, innerhalb der Kristallite nicht möglich sein. Demnach besteht die Proteinlamelle entweder aus locker aneinandergelagerten Kristalliten oder aus kristallinen und amorphen Bereichen.

Dem Ministerium für Wissenschaftliche Forschung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für die Bereitstellung der Apparaturen und für finanzielle Förderung der Arbeit zu Dank verpflichtet. Herzlichen Dank sagen möchte sich auch Herrn Professor MENKE für sein stetiges Interesse an der Arbeit und für zahlreiche anregende Diskussionen. Großen Dank schulde ich auch Herrn G. M. MANUSCHEWSKI für seine technische Mitarbeit.