

Anwendung der röntgenographischen Methoden zur Charakterisierung von Peptiden

Von H. ZAHN

Deutsches Wolforschungsinstitut an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

Das vorliegende Referat will den präparativen Peptidchemiker an die mannigfaltigen Möglichkeiten erinnern, welche schon einfache Anwendungen der Röntgenstrahlbeugung bieten, die ohne besondere Schulung routinemäßig ausgeführt werden können.

Die theoretischen Grundlagen der Röntgenbeugung (Erzeugung von Röntgenstrahlen, Interferenzerscheinungen bei der Streuung an Kristallen, Beugungsgitter, Braggsche Gleichung) dürfen hier ebenso vorausgesetzt werden wie die wichtigeren Geräte (Röntgenapparate, Röntgenkammern nach DEBYE-SCHERRER, KRATKY u. a.) und Aufnahmemethoden (photographischer Film bzw. Zählrohrgoniometer). Für ausführliche Angaben über die Handhabung der Röntgenmethoden im Laboratorium und Zitate der wichtigsten einschlägigen Lehr- und Handbücher sei auf das Kapitel «X-Ray Diffraction» von H. ZAHN und H. DIETRICH in dem demnächst erscheinenden Band II von *Analytical Methods of Protein Chemistry* (herausgegeben von P. ALEXANDER und R. R. BLOCK, Pergamon Press Ltd.) verwiesen.

1. Unterscheidung mikrokristallin-amorph

Leider kristallisieren bei weitem nicht alle Peptide oder Peptidderivate. Vielfach erhält man Substanzen, die auch unter dem Mikroskop betrachtet keine Kristalle erkennen lassen. Eine einfache Pulveraufnahme in der Debye-Scherrer-Kammer erlaubt die Feststellung, ob es sich um eine wirklich amorphe oder immerhin um eine mikrokristalline Verbindung handelt. Im ersten Fall enthält die Röntgenaufnahme nur einen oder wenige diffuse sogenannte Flüssigkeitshalos, etwa wie das Debye-

ogramm des bei 85° über P₂O₅ im Vakuum getrockneten Hexapeptides von EUGEN SCHNABEL¹:

Gly-DL-Ala-Gly-L-Tyr-Gly-DL-Ala

Das Peptid lieferte vor der Trocknung ein linienreiches Debyeogramm und ist daher eindeutig röntgenkristallin. Beim Entzug des Kristallwassers bricht wie bei vielen kristallinen Proteinen das Gitter zusammen.

2. Identifizierung von Peptiden durch Debye-Scherrer- sowie Kratky-Röntgenogramme

Chemisch sehr ähnliche Moleküle unterscheiden sich im wesentlichen in sterischer Hinsicht, und gerade sterische Einzelheiten beeinflussen besonders stark die Beugung der Röntgenstrahlen. Schon in einer einfachen Debye-Scherrer-Aufnahme sind die Lagen der Linien und ihre relativen Intensitäten durch so viele voneinander unabhängige Parameter festgelegt, daß eine solche Aufnahme eine Art «Fingerabdruck» der Substanz darstellt. Der einfache visuelle Vergleich von Pulverdiagrammen gestattet daher eine sehr sichere Identifizierung von Substanzen. An Vorteilen gegenüber chemischen Methoden sind der geringe Zeit- und Substanzbedarf für eine Aufnahme und der Umstand zu nennen, daß die Substanz bei der Aufnahme nicht zerstört wird. Abb. 1 zeigt z. B. Strichdiagramme von Pulveraufnahmen von zwei diastereomeren Racematen ein und desselben Hexapeptides Ser-Ala-Gly-Gly-Ala-Gly, welche

¹ E. SCHNABEL, *Liebigs Ann. Chem.* 615 (1958) 165.

durch ihre R_f -Werte und ihren Schmelzpunkt nicht zu unterscheiden sind.



Abb. 1. Strichzeichnungen der Debyeogramme von Seryl-alanyl-glycyl-glycyl-alanyl-glycin². Oben: Racemat A, unten: Racemat B

Eine zusätzliche elegante Identifizierungsmöglichkeit für Peptide stellen Kratky-Aufnahmen dar. Das kommt daher, daß langgestreckte Gebilde wie die Peptidmoleküle im Kristall im allgemeinen parallel ausgerichtet und in Schichten angeordnet sind, wie dies von Paraffinen und ihren Derivaten am längsten bekannt ist. Die Moleküle liegen dabei mit ihrer Längsachse senkrecht oder geneigt zur Basisebene, so daß der Netzebenenabstand gleich der Moleküllänge plus zwischenmolekularem Abstand ist, je nach Neigungswinkel, kleiner als diese, jedoch meist groß gegen die seitlichen Abstände innerhalb der Schichten. Die von den Basisebenen stammenden Reflexe (gewöhnlich erster und zweiter, oft auch dritter Ordnung) treten daher bei kleinen Abbeugungswinkeln weit entfernt von den anderen Reflexen auf und stehen in enger Beziehung zur Moleküllänge. Bei den Paraffinen und ihren Derivaten zeigte sich, daß in einer homologen Reihe von Molekülen mit steigender Kettenlänge auch der Basisabstand stetig wächst, so daß man fehlende Glieder ohne Referenzaufnahme auf Grund ihrer Langperiode identifizieren kann. Von uns gemessene Langperiodenreflexe an einigen Tri-, Tetra-, Penta- und Hexapeptiden sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Langperiodenreflexe einiger Peptide (ausschließlich L-Aminosäuren)

Peptid	Å
Gly-Phe-Phe	19,5
Gly-Tyr-Gly	14,6
Gly-Tyr-Leu	15,5
Gly-Tyr-Asp	19,5
Gly-Tyr-Glu	15,9
Tyr-Leu-Val	21,7
Gly-Phe-Phe-Tyr	16,7
Ala-Leu-Tyr-Leu-Val	26,7
Gly-Arg-Gly-Ala-Gly	37,8
	16,5
Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly	25,0
H·(Ala) ₆ ·OH	25,6

Aber auch schon die Zwischenprodukte der Peptidsynthese, besonders die Carboxyderivate von Peptiden, liefern schöne Kratky-Diagramme. Einige Meßergebnisse an solchen Verbindungen sind in Tabelle 2 aufgenommen.

² E. SCHNABEL, *Liebigs Ann. Chem.* 615 (1958) 173.

Tabelle 2: Langperioden N-acylierter Peptidderivate (ausschließlich L-Aminosäuren)

Peptidderivat	Å
Z·Asp(NH ₂)-Glu(OÄt)·OH	15,6
Z·Leu-Tyr·NHNH ₂	26,7
	13,5
Z·Lys(Tos)-Ala·OMe	35,0
	17,4
Z·Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys(Tos)-Ala·OMe	41,4
	21,3
Z·Gly-Phe-Phe-Tyr·OBz	16,0
	13,1
	11,4
Z·Tyr-Leu-Val-Tyr-Leu-Val·OBz	31,5
	11,8
Z·(Ala) ₄ ·OH	46,6
	25,7
Z·(Ala) ₅ ·OH	29,1
Z·(Ala) ₆ ·OH	32,7
Z·(Ala) ₇ ·OH	36,7
Ac·Gly-Lys(Z)-Gly-Glu-Gly·NHCH ₃	26,9
	14,2
	11,6

Bei Röntgenuntersuchungen ist stets zu beachten, daß manche Substanzen je nach den Versuchsbedingungen beim Umkristallisieren in mehreren Modifikationen kristallisieren können. Es ist daher erforderlich, stets das Lösungsmittel anzugeben, aus dem die aufgenommene Substanz umkristallisiert worden ist.

3. Prüfung von Präparaten auf Reinheit

Verunreinigungen lassen sich leicht röntgenographisch nachweisen, wenn diese mindestens 5 Gew.-% ausmachen. Man bedient sich hier der stärksten Debye-Scherrer-Linie der Verunreinigung als Indikator und reinigt die Substanz so lange, bis in ihrem Pulverdiagramm der stärkste Reflex der Verunreinigung nicht mehr nachweisbar ist. Zum Beispiel prüfen wir Zwischenprodukte der Peptidsynthese beim Carbodiimidverfahren röntgenographisch auf das Vorkommen von Dicyclohexylharnstoff, der im Röntgenogramm starke Reflexe, entsprechend Netzebenenabständen von 5,12, 4,39 und 4,07 Å, liefert.

4. Feststellung von β -Strukturen

Nach den Arbeiten von BRILL, K. H. MEYER, MARK, ASTBURY u. a. sind die β -Formen natürlicher und synthetischer Polypeptide aus nahezu völlig gestreckten Ketten von Aminosäureresten aufgebaut. Die Carbonyl- und die NH-Gruppen ragen bei einer gestreckten Peptidkette abwechselnd seitlich heraus, so daß die Ketten durch Wasserstoffbrücken zu einem Kettenrost zusammengehalten werden könnten. Die sterische Hinderung durch die Seitenketten der Aminosäuren erzwingt aber eine Verdrehung der Amidgruppen gegeneinander, wodurch sich das *pleated sheet* von PAULING

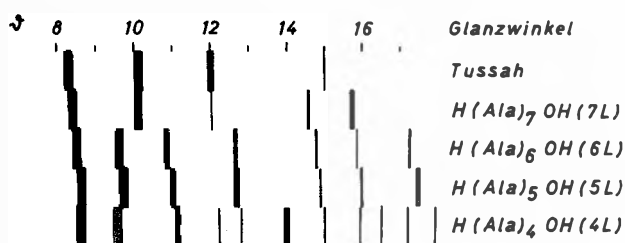
und COREY³ ergibt. Wenn darin benachbarte Ketten parallel liegen, beträgt der Abstand aufeinanderfolgender Peptidgruppen in Richtung der Kettenachse 3,25 Å. Diese Anordnung wird für β -Keratin vorgeschlagen. Bei antiparalleler Lage benachbarter Ketten ist der entsprechende Abstand 3,5 Å. Diese Struktur diskutiert man für Seidenfibroin.

Durch van der Waalsche Kräfte zusammengehalten, bauen die *pleated sheets* – aufeinander geschichtet – die vollständige β -Keratin-Struktur auf.

Röntgendiagramme solcher β -Strukturen sind charakterisiert durch Äquatorreflexe, die von der Packung der Peptidketten abhängen, und durch Meridianreflexe, die auf die regelmäßige Aufeinanderfolge der Peptidgruppen längs der Kette zurückzuführen sind. Man beobachtet demnach beim *parallel pleated sheet* einen Meridianreflex, der einem Netzebenenabstand von 3,25 Å entspricht, beim *antiparallel pleated sheet* einen von 3,5 Å.

Von den Äquatorreflexen fallen besonders diejenigen zwei auf, die dem Abstand zwischen den Ketten und dem der *pleated sheets* voneinander entsprechen. Die Abstände zwischen den *pleated sheets* und damit die Lage der Äquatorreflexe hängen stark von der Größe der Seitenketten ab. Man findet bei Polyglycin 3,44 Å, bei β -Polyalanin und Tussah-Seide 5,35 Å, bei Bombyx-Seide 4,3 Å und bei β -Keratin 9,8 Å. Dagegen verändert sich der Abstand der Ketten in den *pleated sheets* nur wenig mit der Größe der Seitenketten. Die zugehörigen Äquatorreflexe liegen daher mit Ausnahme des Polyglycins (4,36 Å) im allgemeinen zwischen 4,6 und 4,8 Å.

Entsprechende Reflexe treten auch in den Pulverdiagrammen von Peptiden auf. Man kann hier beispielsweise die nach der Kratky-Methode bestimmte Langperiode mit der aus der Synthese bekannten Moleküllänge vergleichen. Beim Seryl-glycyl-alanyl-glycyl-alanyl-glycin (3L) konnten SCHNABEL und ZAHN⁴ die Reflexe erster und zweiter Ordnung einer Langperiode von 25 Å auffinden. Sie stimmt zufriedenstellend mit der Moleküllänge von 25,6 Å überein, die man für das Peptid in der gestreckten Form eines β -Peptids berechnet. Im Debyeogramm liegen die intensivsten Reflexe bei 4,61 und 4,14 Å.



Die Strichdicke entspricht der Intensität der Reflexe

Abb. 2. Lage und Intensität der Reflexe in den Debyeogrammen von Alaninpeptiden und Tussah-Fibroin-Pulver

³ L. PAULING und R. B. COREY, *Proc. Nat. Acad. Sci. [USA]* 39 (1953) 253.

⁴ E. SCHNABEL und H. ZAHN, *Liebigs Ann. Chem.* 614 (1958) 141.

Ein weiteres Beispiel liefert das mit ASTRID MEISSNER synthetisierte Penta-alanyl-alanin (6L). Dieses Hexapeptid ist im Kristall gestreckt angeordnet, da die gefundene Langperiode in guter Übereinstimmung mit der Rechnung 25,6 Å beträgt. Das vermutete Auftreten der für β -Polyalanin bzw. Tussah-Seide charakteristischen Äquatorreflexe wurde jedoch erst beim Heptapeptid Hexaalanyl-alanin (7L) verwirklicht⁵ (Abb. 2).

Beim Tussah-Fibroin fanden wir in Übereinstimmung mit der Literatur Netzebenenabstände von $5,35 \pm 0,10$ und $4,35 \pm 0,08$ für (002) und (201). Das Heptapeptid liefert als stärkste Reflexe 5,27 und 4,33 Å.

Unser bisher größtes Peptidderivat, das von JOACHIM KUNDE synthetisierte Insulinpeptid B₂₃₋₃₀ Carbobenz-oxy-glycyl-phenylalanyl-phenylalanyl-tyrosyl-threonyl-propyl- ϵ -tosyl-lysyl-alanin-methylester, ergibt die erste, zweite und dritte Ordnung einer allerdings diffusen Langperiode von 41 Å. Man berechnet für dieses Peptidderivat eine Länge im gestreckten Zustand von

$$8 \cdot 3,6 = 28,8 \text{ \AA}$$

$$\text{dazu } 8,5 \text{ für den Carbobenzoyrest}$$

$$\text{dazu } 3 \text{ für den zwischenmolekularen}$$

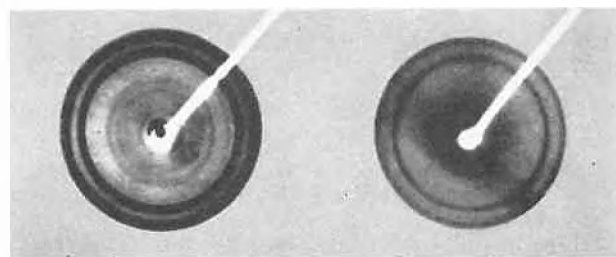
Damit ergibt sich 40,3 Å. Abstand.

Demnach liegt auch hier ein β -Peptidderivat vor.

Es darf hier mit Genugtuung betont werden, daß es gelungen ist, niedermolekulare, einheitliche Modellverbindungen für die β -Proteine aufgefunden zu haben, ohne Einkristalle oder wenigstens orientierte Präparate zur Verfügung zu haben. Lediglich die einfache Technik der Pulveraufnahmen und Kratky-Diagramme ermöglichte die eindeutige Feststellung einer β -Struktur.

Die Fragestellung ergab sich schon 1953, als es mit dem früheren, leider inzwischen verstorbenen Mitarbeiter, PETER RATHGEBER, gelungen war, zu zeigen, daß bereits das niedermolekulare «Nylonpeptid» aus einem Molekül Adipinsäure, flankiert von zwei Molekülen Hexamethyldiamin, $H \cdot (B-A)_1 B \cdot H$ in der Nomenklatur BRANDS ausgedrückt, die für Polyamide bekannten paratropen Röntgenreflexe liefert (vgl. Abb. 3).

Die systematische Verfolgung derartiger kristallchemischer Analogien in den Oligomerenreihen vom Perlon-



Adipoyl-bis-hexamethyldiamin

Perlon unverstreckt⁶

Abb. 3

⁵ H. ZAHN und A. MEISSNER, *Liebigs Ann. Chem.* 636 (1960) 132.

⁶ H. ZAHN und P. RATHGEBER, *Melliand Textilber.* 34 (1953) 749.

Rilsan-, Polyurethan- und Terylentyp erwies sich als ein besonders fruchtbares und interessantes Teilgebiet der Oligomerenchemie.

Als Beispiel sei auf den Zusammenhang zwischen Molekulargewicht, ausgedrückt durch die Zahl der Grundeinheiten im Oligomerenmolekül, und der Langperiode in den beiden Reihen der Benzylester und Benzyläther der Dicarbonsäuren bzw. Diöle vom Terylentyp aus den Arbeiten mit B. SEIDEL und C. BORSTLAP hingewiesen (Abb. 4).

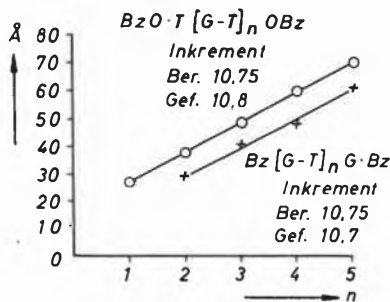


Abb. 4. Lineare Abhängigkeit der Langperioden der Dibenzylester sowie der Dibenzyläther von der Zahl n der sich wiederholenden Glykolterephthalat-Einheiten⁷

5. Nachweis von α -Strukturen

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, daß das charakteristische gemeinsame Strukturmerkmal der α -Proteine und α -Polypeptide die von PAULING⁸ auf Grund systematischer Überlegungen abgeleitete α -Helix ist. Letztere basiert auf der Planarität der Amidgruppen infolge des durch Resonanz bedingten Doppelbindungscharakters [der Amid-C—N-Bindung, auf der Bildung

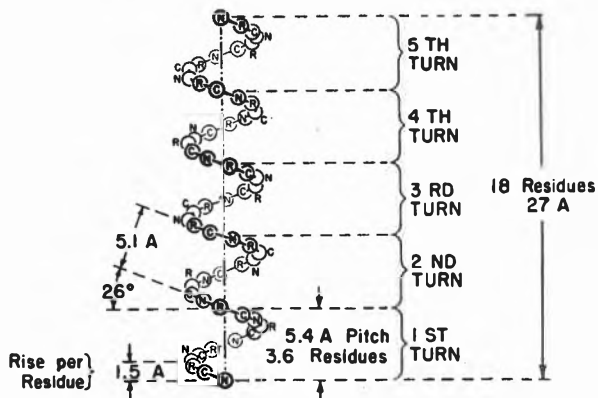


Abb. 5. Dimensionen einer α -Helix mit 3,6 Resten pro Windung⁹

⁷ H. ZAHN, IUPAC-Symposium über Makromoleküle, Wiesbaden, 12. bis 17. Oktober 1959, Kurzmitt. I/B8, Verlag Chemie, Weinheim 1959.

⁸ L. PAULING und R. B. COREY, Proc. Nat. Acad. Sci. [USA] 37 (1951) 235.

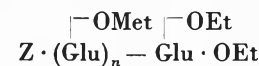
⁹ Aus R. B. COREY und L. PAULING, Proc. Int. Wool Textile Res. Conf., Australia 1955, B 249.

intrachenarer Wasserstoffbrücken zwischen den Windungen der spiralförmigen Peptidkette und auf der Äquivalenz aller Aminosäurereste. Auf jede Windung kommen 3,6 Aminosäurereste mit einer axialen Verschiebung von 1,5 Å pro Rest. Die axiale Höhe einer Windung beträgt daher 5,4 Å, die lichte Weite zwischen den Windungen 5,15 Å.

Für den röntgenographischen Nachweis von α -Strukturen eignet sich hauptsächlich der für die α -Helix selbst sehr charakteristische Meridianreflex bei 1,5 Å, welcher dem Höhenunterschied aufeinanderfolgender Peptidgruppen entspricht und bei orientierten Präparaten durch Schwenkaufnahmen aufgenommen werden kann. Er wurde in allen bisher untersuchten α -Proteinen und α -Polypeptiden nachgewiesen und hat eine recht konstante Lage.

Nach Ansicht des Referenten lohnt es sich, mikrokristalline Peptide aus mindestens sechs Aminosäuren aus solchen Lösungsmitteln umzukristallisieren, die das Einrollen der Ketten zur Schraubenform begünstigen, und röntgenographisch zu prüfen. Außer dem charakteristischen 1,5-Å-Reflex wird der Vergleich zwischen gefundener und berechneter Moleküllänge empfohlen. In einem α -Peptid ist eine Verkürzung der Moleküllänge auf weniger als die Hälfte (Zahl der Aminosäuren mal 1,5 Å gegenüber der Zahl der Aminosäurereste mal 3,5 Å) zu erwarten.

Daß diese Hoffnung begründet ist, zeigen die Arbeiten von M. GOODMAN und E. E. SCHMITT¹⁰ an Carbobenzoyloligo- γ -methyl-glutamyl-glutaminsäurediäthylester, $n = 0$ bis 7.



Die optischen Drehungen der Verbindungen wurden in Dichloressigsäure¹¹ und in Dioxan aufgenommen. Vom pentameren Peptid ab wurde eine plötzliche Verschiebung der zunächst negativen Drehung in Dioxan ins Positive beobachtet, die bei hochmolekularen Glutaminsäureestern auf Übergang der statistischen Knäuel in helicale Strukturen zurückgeführt wird.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß sich unter den von den hier anwesenden Kollegen synthetisierten Dek- und höheren Peptiden bereits ein α -Peptid versteckt. Wenn dieses Referat dazu anregen würde, diese Peptide röntgenographisch zu prüfen und dabei, neben neuen Beispielen für β -Peptide, auch das erste im kristallinen Zustand als Helix-Peptid zu identifizierende Peptid aufzufinden, so wäre der Zweck dieser Ausführungen auf das schönste erfüllt.

¹⁰ M. GOODMAN und E. E. SCHMITT, J. Amer. Chem. Soc. 81 (1959) 5507.

¹¹ Statistisches Knäuel in Dichloressigsäure von P. DOTY entdeckt, vgl. z. B. J. Amer. Chem. Soc. 78 (1956) 498.