Intermediatfilamente im Cytoskelett und Struktur der Wolle**

Helmut Zahn*

«From the hairs on our head to the soles of our feet, our bodies are composed of cells rich in intracellular fibrous proteins called intermediate filaments (IF): a complex group of 30 or so keratins of 40–70 kd in epithelia; a single protein desmin of 52 kd in muscle; a single protein vimentin of 53 kd in cells of mesenchymal origin; glial fibrillary acidic protein (GFAP), a single protein of 50 kd in astroglia; and a triplet of neurofilament proteins, NF-L, NF-M, NF-H in neuronal cells». This introduction to the review «The Molecular Biology of Intermediate Filaments» written 1985 by Steinert et al. [1a], *starts with the hairs on our head, but hair and sheep wool, so-called «hard keratins», were only recently accepted as full members of the IF-family, although decisive criteria for the membership such as diameter of the filaments (7–11 nm), supercoiled α-helical structure, and molecular weight of the proteins subunits have been fulfilled by wool and other keratin fibres. When α-keratins were finally recognized by sequence comparison as intermediate filaments in 1982 by Geisler and Weber* [2a] *the lack of reconstitution of isolated microfibrillar proteins from wool in filaments in vitro posed a special problem as all other proteins of this family readily form filaments. By adopting a new procedure for preparing wool proteins and hair proteins without carboxymethyl groups, it was possible to achieve polymerization in vitro in dilute solutions into filaments that have the same structure as the in situ keratin filaments in wool and hair. These results open the way for a more sophisticated analysis of the chemical quality of wool and hair by assessing the yield and geometry of reconstituted filaments.*



Helmut Zahn: Geboren 1916 in Erlangen, Bayern. Studium der Chemie an der Technischen Hochschule Karlsruhe; Dr.-Ing. 1940. Forschungsassistent (1940–1949) in Heidelberg und Badenweiler; Habilitation 1948 in Heidelberg; 1949–1957 Privatdozent und ausserplanmässiger Professor am Chemischen Institut der Universität Heidelberg. 1957–1984 Professor für Textilchemie und Makromolekulare Chemie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) in Aachen; 1952–1985 Direktor des Deutschen Wollforschungsinstituts in Aachen. – Zahlreiche Publikationen auf dem Gebiet der Textilchemie von Wolle, Seide und synthetischen Fasern; über chemische Modifizierung und «cross-linking» von Proteinen; Synthese von Peptiden und Proteinen (Insulin, Proinsulin).

1. Einführung

Was könnte einen Chemiker dazu veranlassen, sich mit Fragestellungen der heutigen Zellbiologie vertraut zu machen, die ausserhalb der stürmischen Entwicklung der DNA-Rekombination liegen? Vielleicht sind es die Moleküle des Zellskeletts und unter ihnen die erst vor wenigen Jahren identifizierten Intermediatfilamente, die gegenwärtig nicht nur von Zellbiologen, sondern auch von Medizinern und Proteinchemikern intensiv erforscht werden.

Im folgenden werden zunächst das Cytoskelett und seine drei Fasersysteme, besonders die Intermediatfilamente, vorgestellt. Danach wird die Frage beantwortet, was die Intermediatfilamente im Cytoskelett der lebenden Zelle mit den fibrillären Proteinstrukturen in den ausgetrockneten, verhornten Cortexzellen der Schafwolle und des Menschenhaars zu tun haben. Schliesslich wird gefordert, dass altvertraute Modellvorstellungen und die zugehörige Nomenklatur revidiert werden.

* *Korrespondenz:* Prof. Dr. H. Zahn
Deutsches Wollforschungsinstitut
an der RWTH Aachen
Veltmanplatz 8
D-5100 Aachen
(Bundesrepublik Deutschland)

** Nach einem Vortrag an der ETH Zürich beim Festcolloquium anlässlich des Rücktritts von Prof. Dr. Heinrich Zollinger am 27. März 1987.

2. Die Intermediatfilamente (IF), eine neue Familie von Strukturproteinen im Cytoskelett

Die Begriffe Cytoskelett und seine fibrillären Proteinstrukturen wurden von *Koszka* [1] wie folgt erklärt: «Früher stellte man sich das Cytoplasma als amorphe, kolloidale Lösung vor, in welcher der Zellkern und die Zellorganellen frei beweglich suspendiert sein sollten. Diese Vorstellung musste von der modernen Zellbiologie aufgegeben werden. Man weiss heute, dass eine eukaryotische Zelle eine ganz spezifische Architektur hat und von hochgeordneten Proteinfibrillen durchzogen ist. Diese strukturieren das Cytoplasma, indem sie den Aufenthaltsort des Zellkerns und vieler Organellen bestimmen. Als Stützelemente verleihen sie der Zelle zusätzlich ihre charakteristische Gestalt. Diese fibrillären Proteinstrukturen stehen miteinander in dynamischer Wechselwirkung und bilden ein – ständigen Veränderungen unterworfenes – Netzwerk, das sogenannte Cytoskelett. Nach der klassi-

schen Definition gehören zum Cytoskelett diejenigen Proteinstrukturen einer Zelle, die mit Detergentien nicht extrahierbar sind. Heute unterscheidet man drei Hauptelemente: die Mikrotubuli, die intermediären Filamente und die Mikrofilamente oder Actinfilamente. Sie sind Polymere, die aus Proteinuntereinheiten gebildet werden und die ihren Polymerisationsgrad und ihre Vernetzung untereinander und mit anderen Zellstrukturen auf ein entsprechendes Signal hin verändern können. Auf diese Weise werden durch das Cytoskelett die verschiedenen Formen der Zellbewegung einschliesslich der Mitose, der cytoplasmatischen Strömung, der Organellenbewegung, der Cytokinese, Phagocytose und Sekretion gesteuert. Der Begriff Cytoskelett wird heute sowohl für Muskel- als auch Nichtmuskelzellen verwendet und schliesst sämtliche Proteine ein, die am Aufbau des cytoplasmatischen Netzwerkes beteiligt sein können.»

Intermediat-Filamente hat man in so gut wie allen Zelltypen von Wirbeltieren gefunden. Aufgrund ihrer biochemischen und immunologischen Eigenschaften werden sie in sechs Gruppen eingeteilt (Tabelle 1).

Gemeinsam ist den intermediären Filamenten eine ähnliche Morphologie. Im Elektronenmikroskop erscheinen sie als lange, unverzweigte Strukturen mit Durchmessern zwischen 7 und 11 nm. Daher leitet sich auch der Name «10nm-Filamente» ab. Weiters gehören zu den gemeinsamen charakteristischen Eigenschaften die Unlöslichkeit in höher konzentrierten Salzlösungen und in nicht-denaturierenden Tensidlösungen. Extrahiert man mit denaturierenden Mitteln, z.B. Harnstofflösungen, gegebenenfalls unter Zusatz von disulfidspaltenden Agentien, dann depolymerisieren die Filamente über Zwischenstufen bis zu den löslichen monomeren Proteinuntereinheiten. Aus den Lösungen polymerisieren die Untereinheiten, wenn man den Extraktionspuffer verdünnt und optimale Reaktionsbedingungen einstellt. Man nennt diese zu Filamenten führende Polymerisation auch Selbstorganisation, Self-assembly, Rekonstitution, Fibrillenkristallisation.

Obwohl die Proteinuntereinheiten der intermediären Filamente im Molekulargewicht und in der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) von Zelltyp zu Zelltyp verschieden sind, enthalten alle eine zentrale stäbchenförmige Domäne mit α-Helixstruktur (Sekundärstruktur), die in Kettenlänge und Aminosäuresequenz einen hohen Homologiegrad aufweist. Die chemischen Unterschiede sind hauptsächlich in den nicht-helicalen C- und N-terminalen Domänen lokalisiert (vgl. Fig. 1).

Aus der α-helicalen Struktur der zentralen Stäbchen resultiert eine weitere gemeinsame Eigenschaft der Proteinuntereinheiten, die Dimerisierung zu einem zweisträngigen superhelicalen («coiled coil») Seil (vgl. Fig. 2).

Nach dem Homologiegrad innerhalb

Tabelle 1. Intermediatfilamente (IF) und ihre Proteinuntereinheiten[2].

Name	Zelluläre Herkunft	Proteinuntereinheiten Anzahl	Molekulargewicht in Kilodalton (kd)	Unterfamilie (Typ)
Cytokeratin-Filamente	Epithelzellen	19	40–70	I, II
Keratin-Filamente	Wolle, Haare, Nägel	8	40–70	I, II
Desmin-Filamente	Muskelzellen	1	53	III
Vimentin-Filamente	Mesenchymzellen	1	57	III
Neuro-Filamente	Neuronen	3	70–210	IV
Glia-Filamente	Gliazellen	1	55	III
Lamin-Filamente	Zellkern	3	60–70	

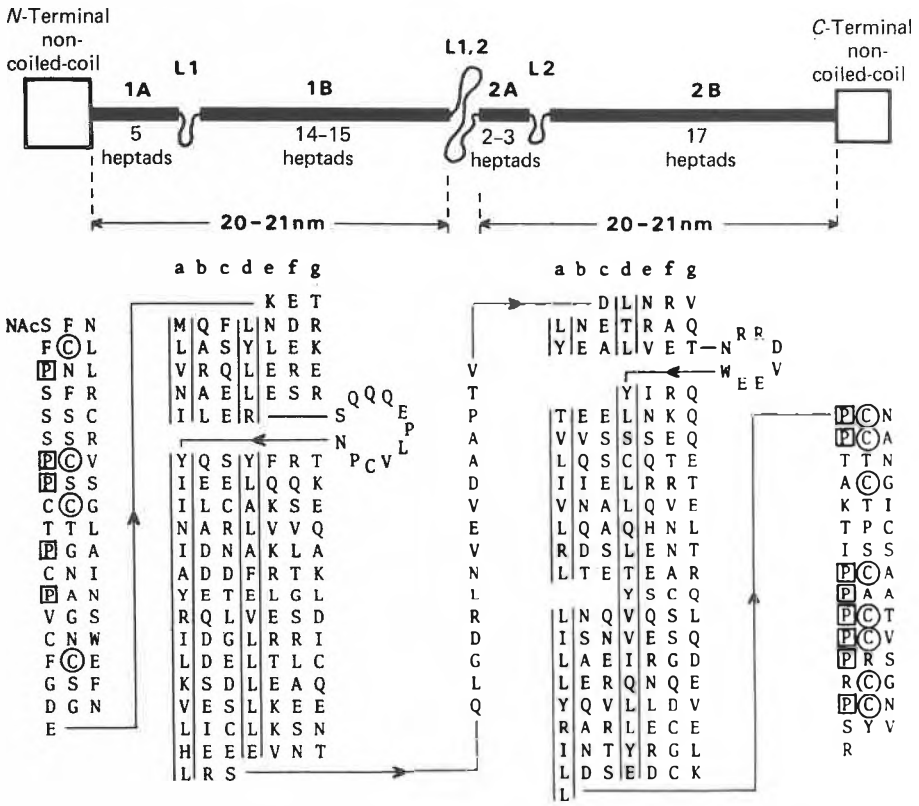


Fig. 1. Primärstruktur und postulierte Sekundärstruktur einer einzelnen Proteinuntereinheit eines Intermediat-Filaments am Beispiel des Wollproteins 8c-1. Die superhelicalen Segmente (1A, 1B, 2A, 2B) sind durch dicke Linien gekennzeichnet, die terminalen cystin- und prolinreichen Segmente sind als Quadrate wiedergegeben. Unregelmässige Linien bezeichnen den Verlauf der Proteinkette in den Linker-Segmenten L1, L12, L2. In den terminalen nicht-helicalen Segmenten sind die Prolin- und Cystinreste durch Quadrate bzw. Kreise gekennzeichnet. Die Aminosäurereste in den zentralen superhelicalen Stäbchen, welche in den Positionen a und d angeordnet sind (Heptadensequenz), werden von geraden Linien flankiert. (Nach Dowling et al.[3], reprinted by permission of the Biochemical Society, London).

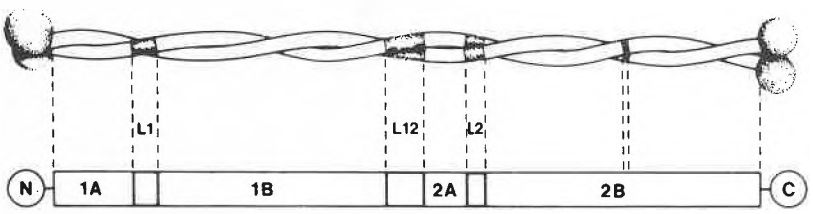


Fig. 2. Schematische Darstellung eines «Moleküls» aus zwei Proteinuntereinheiten eines Intermediat-Filaments. Die endständigen nicht-helicalen Domänen am N- und am C-Terminus sind als schattierte Kugeln wiedergegeben. Dazwischen befindet sich eine stäbchenförmige Domäne aus vier superhelicalen Segmenten (1A, 1B, 2A und 2B). Jedes Segment besteht aus einem linksgängigen, zweisträngigen Superhelix-Seil. Die Segmente L1, L12 und L2 unterbrechen die regelmässige Superhelix und verbinden die superhelicalen Segmente. Im Zentrum von Segment 2B ist die Heptadensequenz unterbrochen, weshalb es zu einer Störung der Seilstruktur kommen muss. (Nach Parry et al.[4], reproduced by permission of Butterworth & Co Ltd.).

der Stäbchendomäne lassen sich die einzelnen IF-Proteinketten in vier Klassen einteilen, die man als Typ I, II, III und IV bezeichnet: Cytokeratin-Filamente enthalten sowohl «saure» Typ I-Ketten (pI < 5.5) als auch «neutral-basische» Typ II-Ketten (pI > 6); Desmin-Vimentin- und Glia-Filamente bestehen nur aus Typ III-Ketten; Neuro-Filamente enthalten nur Typ IV-Ketten (vgl. Tabelle 1).

Gemeinsam ist allen IF-Proteinketten eine hochkonservierte Aminosäuresequenz im Segment 1A und eine andere am C-terminalen Ende des Segments 2B. Ausserdem enthalten Segment 1B und Segment 2 (= 2A + L2 + 2B) eine hochsignifikante Periode von 9.55 und 9.84 Aminosäureresten in der Reihenfolge von anionischen sowie kationischen Seitenkettenresten. So können sich periodische Salzbrücken zwischen kationischen und anionischen Seitenketten bilden; derartige regelmässig angeordnete Salzbrücken stabilisieren die Aggregate aus den Molekülen und führen zu spezifischen axialen räumlichen Beziehungen zwischen den Molekülen[5].

Dass sich zwei «Moleküle», also die Dimere von Fig. 2, zu Tetrameren aggregieren, haben als erste *Ahmadi* und *Speakman*[6] mit der Methode der covalenten Verbrückung der Einzelketten in den Kettenaggregaten nachgewiesen.

Aber die Frage, wie diese Tetramere im einzelnen aufgebaut sind, ist ebensowenig geklärt wie die Struktur eines kompletten, aus vielen tausend Tetrameren zusammengesetzten Intermediatfilaments. Im Querschnitt kommen auf ein Filament wahrscheinlich 8 Tetramere oder 16 Dimere oder 32 Proteinketten. Ein IF mit einer Länge von z.B. 40000 nm[16] müsste sodann aus ca. 6400 Tetrameren bestehen, wenn man als Länge eines Tetramers 50 nm annimmt.

3. Eingliederung der Mikrofibrillen der Wolle als Untergruppe der Cytokeratine in die IF-Familie

Die Cytokeratine bilden die grösste Gruppe in der IF-Familie (Tabelle 1). Warum hat man die Faserkeratine in Wolle und Humanhaar nicht der IF-Familie zugeordnet, obschon die seit 1941 bekannten[7] Mikrofibrillen folgende Kriterien für Intermediatfilamente erfüllen:

- Der *Durchmesser* der Mikrofibrillen in der Wolle beträgt etwa 7 nm[8].
- Wolle, Haare und andere harte keratinisierte Gewebe liefern ein charakteristisches *α-Röntgenogramm*[9]. Schon 1950 erkannten *Pauling* und *Corey*[10], dass eine helicale Anordnung der Aminosäurereste, später *α-Helix* genannt, im α-Keratin vorliegt.
- Um den Röntgenreflex auf dem Meridian von α-Keratinaufnahmen von 0.515 nm zu erklären, wurde eine zusätzliche Verschraubung der Helices unter Bildung einer Superhelix («coiled coil») von *Crick*[11] sowie *Pauling* und *Corey*[10] vorgeschlagen.
- Auch das *zweisträngige α-Helixseil* wurde bereits damals als Modell für die Quartärstruktur der Proteinuntereinheiten in Wolle diskutiert: Ein Paar (Dimer) von «coiled coils» ist so positioniert, dass sich eine «Buckel-Loch» (knob-hole)-Packung der Seitenketten der Proteinkette ergibt. Aus der «coiled-coil»-Geometrie ergibt sich, dass jeder Aminosäurerest dieselbe Umgebung hat wie der siebente Rest vor ihm und der siebente Rest nach ihm[12]. In α-helicalen Regionen zeigen daher *Heptapeptid*-Pseudowiederholungen $(a\text{-}b\text{-}d\text{-}d\text{-}e\text{-}f\text{-}g)_n$, das Vorliegen einer «coiled-coil»-Seilstruktur an, wobei die Positionen a und d von apolaren Aminosäureresten eingenommen werden.
- Schliesslich war schon lange bekannt[13], dass die Molekulargewichte der Proteinuntereinheiten, deren Herkunft den Mikrofibrillen (sogenannte schwefelarme Wollproteine) zugeordnet wurde, mit 45000–50000 im Bereich der Molekulargewichte der Cytokeratine liegen.

Die Übereinstimmung der Mikrofibrillen der Wolle mit den Intermediatfilamenten in lebenden Zellen nach Durchmesser, helicaler Struktur und Zusammensetzung aus verwandten Proteinuntereinheiten reichte für eine Eingliederung in die IF-Familie lange nicht aus, weil unter anderem folgende Argumente für grundlegende Unterschiede[14–16] sprachen:

- Die Mikrofibrillen der Wolle und anderer Haare sind in toten, keratinisierten, ausgetrockneten, nur noch Zellkernreste enthaltenden, deformierten früheren Keratinocyten enthalten.
- Die «harten» Keratine von Wolle und Humanhaar sind unter Bedingungen, unter welchen sich «weiche» Keratine extrahieren lassen – z.B. 1proz. 2-Mercaptoethanollösung in «Tris»-Hydrochloridpuffer pH 7.4 («Tris» = tris-(hydroxymethyl)aminomethan) – nahezu vollständig unlöslich.

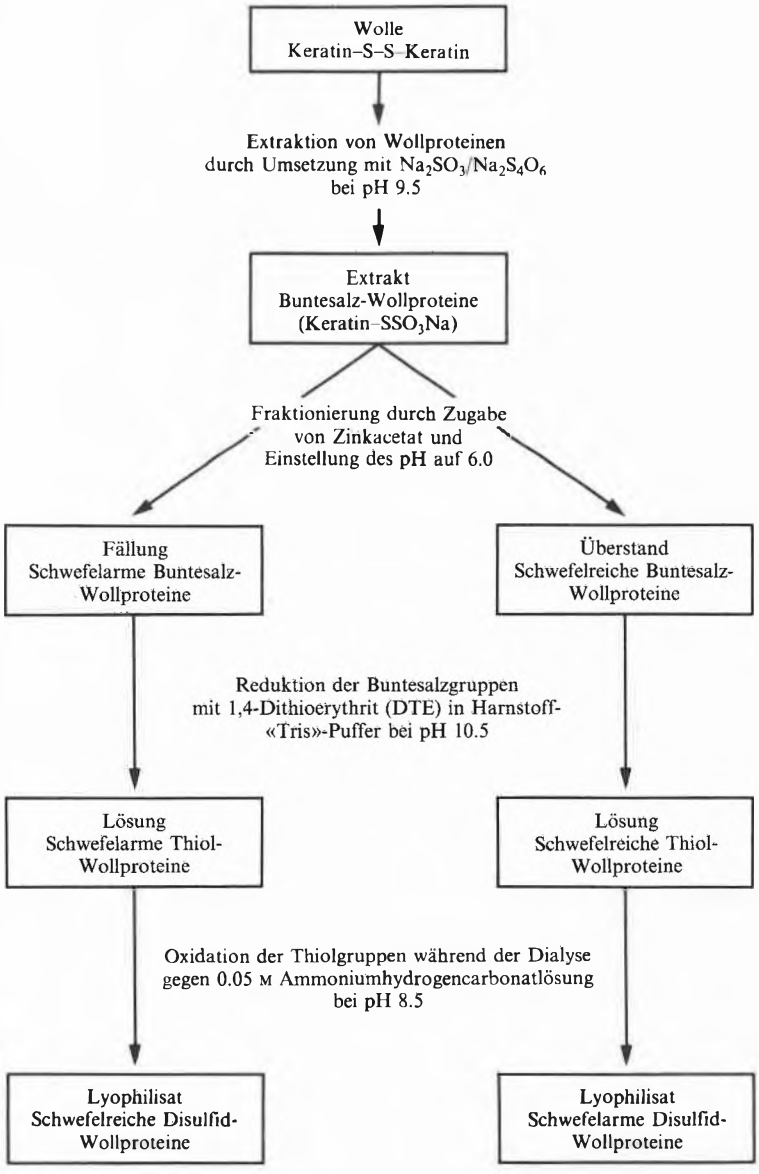


Fig. 3. Gewinnung von schwefelarmen und schwefelreichen Wollproteinen aus Wolle durch oxidative Sulfitolyse, Abspaltung der Sulfonatgruppen und Oxidation der Thiolgruppen. (Nach Thomas und Spei[19].)

- Diese Unlöslichkeit hat zu der seit langem üblichen Praxis der Solubilisierung der «harten» Keratine entweder durch proteolytische Digestion oder durch Mercaptolyse der Disulfidbrücken unter alkalischen Bedingungen und anschliessende Carboxymethylierung der dabei gebildeten Thiolgruppen des Keratincysteins geführt. Derartige covalente Modifikationen machen es schwierig, biochemische und immunologische Eigenschaften von «harten» und «weichen» Keratinen zu vergleichen, weil die letzteren ohne solche Modifikationen charakterisiert wurden.
- Obwohl schon 1964 *Matoltsy* [17] aus Epidermisextrakten Fasern und einzelne Filamente in vitro rekonstituieren konnte, war dies im Falle der Wolle, der Haare oder anderer Hartkeratinfasern offenbar vor 1985 niemandem gelungen.

Einen Wendepunkt in der Argumentation für oder gegen eine Eingliederung brachten Publikationen wie die von *Geisler* und *Weber* [2a]. Nachdem die Göttinger Zellbiologen am Muskeldesmin die erste vollständige Aminosäuresequenz eines IF-Proteins bestimmen konnten, fanden sie beim Vergleich mit bereits veröffentlichten Partialsequenzformeln für Vimentin, Gliaprotein, Neurofilamentprotein 68000 und zwei Wollproteine 7 und 8 sowie für ein epidermales Protein, dass alle sieben Proteine extensive Sequenzhomologien aufweisen und daher eine komplexe Multigen-Familie, die Intermediatfilament-Proteine bilden. Die «harten» Keratine der Wolle und Haare wurden daher als eine spezielle Untergruppe der Cytokeratine in die Familie der Intermediatfilamente aufgenommen.

Die entscheidende Sequenzhomologie bezieht sich allerdings nur auf den zentralen helicalen Stab, nicht jedoch auf die N- und C-terminalen Domänen; hier unterscheiden sich auch die Hartkeratine von den Cytokeratinen.

4. Selbstorganisation von Filamenten aus Wollproteinen

Etwa zur gleichen Zeit, in der *Geisler* und *Weber* [2a] die Wolle- und Haarkeratine als Untergruppe der Cytokeratine in die IF-Familie eingliederten, begründete *Speit* [18] sein Forschungsvorhaben, Wollproteine in der Disulfidform herzustellen, mit der Aussage, dass die seit Jahrzehnten gebräuchliche Extraktions- und Carboxymethylierungsmethode zu Wollproteinderivaten führt, welche aufgrund der zusätzlich eingeführten ionogenen Carboxymethylgruppen nicht mehr als Modellsubstanzen zur physikalischen Charakterisierung des Mikrofibrillen-Matrix-Komplexes der Wolle geeignet sind. Dieser Nachteil sollte nun dadurch überwunden werden, dass die Proteine aus Wolle durch oxidative Sulfitolyse extrahiert und als *S*-Sulfonate («Buntesalze») in Matrix- und in Mikrofibrillenproteine fraktioniert werden. Die *S*-Sulfonatgruppen der getrennten Wollproteine sollten dann zur Thiolstufe reduziert und die Thiol-Wollproteine durch Oxidation in Disulfid-Wollproteine umgewandelt werden. An den isolierten, fremdgruppenfreien Wollproteinen sollten Studien über die Wasserdampf- und Tensidsorption sowie thermoanalytische Untersuchungen durchgeführt werden.

Dieses Forschungsprojekt führte zum Erfolg. Bei der oxidativen Sulfitolyse der Cystinbrücken in Wolle bewährte sich Natriumtetrathionat als Oxidationsmittel. Die dabei erhaltenen, in löslicher Form extrahierten *S*-Sulfoproteine liessen sich wie die «klassischen» *S*-Carboxymethylkeratine durch isoelektrische Fällung oder durch Aussalzen mit Zinkacetat bei pH 6 in schwefelarme Buntesalz-Wollproteine als Niederschlag und schwefelreiche Buntesalz-Wollproteine als löslich gebliebener Überstand fraktionieren. Fig. 3 gibt die wichtigsten Arbeitsgänge von der Extraktion aus Wolle, über die Fraktionierung der Buntesalz-Proteine bis zur Gewinnung der Disulfid-Wollproteine wieder [19].

Die auf dem «Buntesalzweg» erhaltenen schwefelarmen Disulfid-Wollproteine besitzen nach Röntgenogramm, NMR-Spektrum und DSC-Kurven eine α-helicale Struktur, während die schwefelreichen Disulfid-Wollproteine überwiegend β-Strukturen zu enthalten scheinen [20].

Ausgehend von erfolgreichen Versuchen zur Rekonstitution in vitro von Keratin-IF der menschlichen Hornhaut [28] lag es nahe, die schwefelarmen helicalen Buntesalz-Wollproteine für die Präparation von fremdgruppenfreien Proteinuntereinheiten in der Thiolform einzusetzen und zu prüfen, ob sich aus Lösungen dieser Thiolproteine Wolle-Mikrofibrillen mit 10 nm-Durchmessern auf dem Wege der Selbstorganisation erhalten lassen. Die optimale Bedingung für eine solche Rekonstitution von Intermediatfilamenten in vitro ist die Dialyse der Proteine in einem reduzierendem Puffer mit geringer Ionenstärke [21]. 1985 führten diese Versuche zum Erfolg [22]. Fig. 4 zählt die Arbeitsgänge auf, welche ausgehend von einem Präparat schwefelarmer Buntesalz-Wollproteine über schwefelarme Thiol-Wollproteine schliesslich Wollkeratin-Filamente ergeben. Die Filamente waren 8–10 nm breit und teilweise umeinander gewunden. Vereinzelt wurde eine Substruktur erkannt, auch wurden Filamente von 4 nm Durchmesser gefunden. Als kritische Einflussgrösse erwies sich die Dialysedauer: Nach 16 Stunden konnten lediglich kurze Teilstücke von 4nm-Subfilamenten beobachtet werden. Nach 24 Stunden Dialyse war die Selbstorganisation weiter fortgeschritten, und es waren 10nm-Filamente entstanden (Fig. 5).

Weiters wurde gefunden, dass sich aus «klassischem» *S*-Carboxymethylkeratin (SCMK-A) aus Wolle keine Filamente herstellen lassen, während *S*-carboxymethylierte Hautproteine Filamente bilden. Offenbar stört die mit 4.2 mol% recht hohe Konzentration zusätzlich eingeführter anionischer Gruppen im Falle von SCMK-A die Rekonstruktion bei den sogenannten schwefelarmen Wollproteinen,

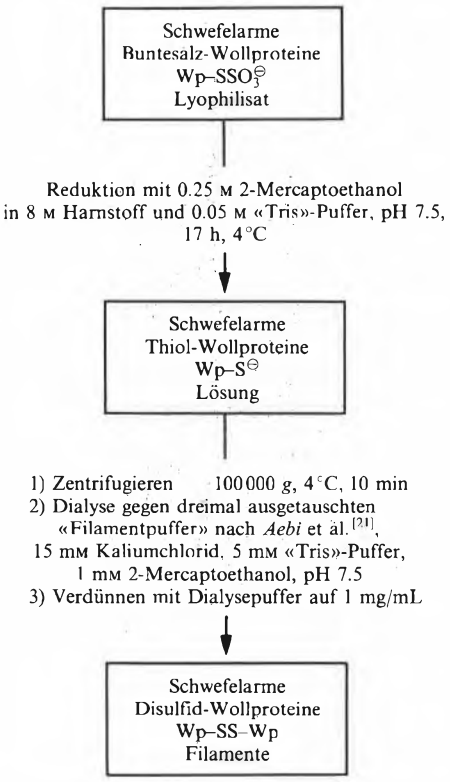


Fig. 4. Rekonstitution in vitro von Filamenten durch Reduktion schwefelarmer Buntesalz-Wollproteine zu Thiol-Wollproteinen und Dialyse. (Nach van de Löcht [23].)

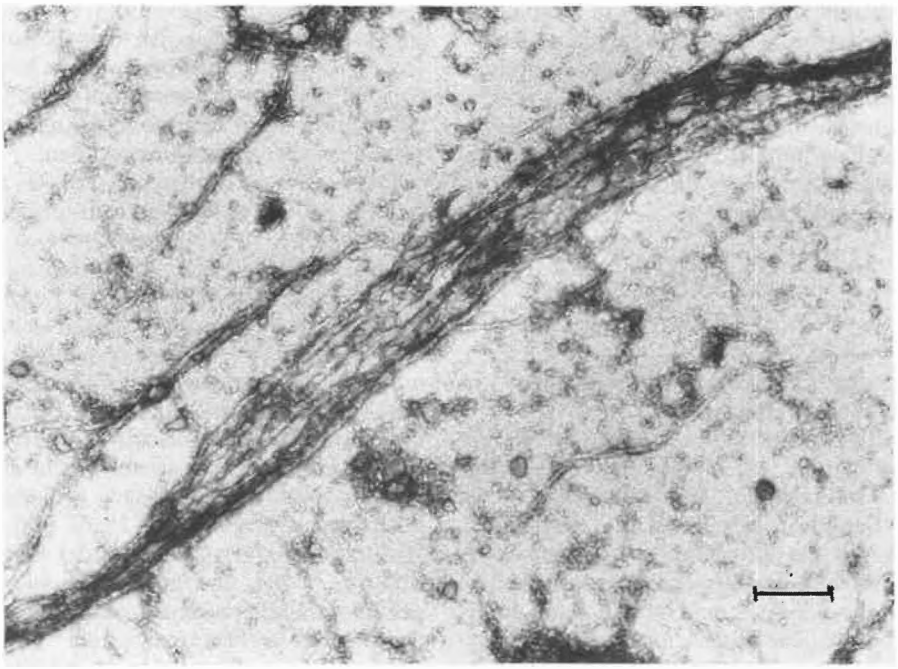


Fig. 5. Elektronenmikroskopische Aufnahme von rekonstituierten Mikrofibrillen aus schwefelarmen Wollproteinen in der Thiolform[22, 23]. *Nach Spaltung der S-Sulfonatgruppen in den schwefelarmen Buntesalz-Wollproteinen wurde bei 100000 g zentrifugiert und der Überstand zuerst gegen einen 4 M Harnstoffpuffer und dann gegen den Puffer 10 mM «Tris»-HCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.5, dialysiert. Die dabei rekonstruierten langen Filamente zeigen den Durchmesserbereich 7–11 nm, der für Intermediatfilamente typisch ist. Vergrösserung 50600 × ; Balkenlänge 200 nm.*

während die Hautproteine nur 1.1 mol% *S*-Carboxymethylgruppen enthalten und somit eine relativ geringe Beladung mit $COO^{\ominus}$-Gruppen aufweisen.

Zusammenfassend ist die Aussage begründet, dass man aus Wolle Filamente rekonstruieren kann, wenn man von reinen, nicht substituierten mikrofibrillären Wollproteinen ausgeht und bei der Aufarbeitung Abbaureaktionen an der Peptidkette vermeidet. Ist hingegen das in den Wollproteinen enthaltene Cystein durch *S*-Carboxymethylgruppen substituiert, findet keine Aggregation zu Filamenten statt.

Wenngleich diese Versuche nur als Anfang von breiter angelegten Programmen etwa nach dem Vorbild der Arbeit von *Steinert* et al.[24] an Epidermisproteinen angesehen werden dürfen, so wird doch der Anspruch erhoben, dass es erstmalig gelungen ist, in vitro 10 nm feine Keratin-Filamente aus schwefelarmen Wollproteinen zu rekonstruieren und damit ein weiteres Kriterium für die Einordnung der Mikrofibrillen der Wolle als Untergruppe der Cytokeratine in der IF-Familie beizusteuern[2a].

Über die Bedeutung dieser Ergebnisse schrieb *Weber* (persönliche Mitteilung in einem Brief vom 26. November 1985): «Attempts to reconstitute wool keratin into filaments *in vitro* have been made for nearly 40 years and they were always negative. This has led to speculations that this structure relatively well characterized by X-ray diffraction patterns, relies *in vivo* on the presence of matrix proteins made at the same time. When α-keratins were finally recognized by sequence comparison as intermediate filaments in 1982 the lack of reconstitution posed a special problem as all other proteins of this family readily form filaments *in vitro*».

5. Rekonstitution von Mikrofibrillen aus extrahierten Humanhaarproteinen

Die erfolgreiche Rekonstitution von Mikrofibrillen aus Wollproteinen regte zu analogen Versuchen mit Haarproteinen an. Allerdings erschweren die aus bis zu zehn Schichten bestehende Cuticula und der extrem hohe Cystinbrückengehalt der Haarkeratine die Extraktion von Proteinen. Die Cuticula wurde durch Schütteln der Haare in Wasser/Propanol mit Korund-Schleifpulver entfernt und das dabei erhaltene Cortexpräparat mit einem Reduktionsmittel aus 0.05M 1,4-Dithioerythrit (pH 9.45) in 0.05M «Tris» und 8 M Harnstoff 12 Stunden bei 4°C extrahiert[21]. Die dabei abgetrennten Haarproteine lagen in der Thiolform vor und wurden durch Zugabe von Natriumsulfit und Natriumtetrathionat (je 0.2M) in 12 Stunden bei 4°C in die Buntesalzderivate umgewandelt. Die einzelnen Operationen bis zum gefriergetrockneten Buntesalz-Haarprotein zeigt Fig. 6.

Das hier angewendete Verfahren via reduktive Extraktion und nachträgliche Einführung der *S*-Sulfonatgruppen lieferte Haarproteine in Ausbeuten zwischen 25 und 50% vom Haarcortex.

Die Fraktionierung der Buntesalz-Haarproteine in schwefelarme, der den Mikrofibrillen zugeordnete Anteil, und schwefelreiche, der aus der Matrix stammende Anteil, gelang in Anlehnung an die Erfahrungen bei der Trennung der Buntesalz-Wollproteine durch Fällung der schwefelarmen Proteine mit Zinkacetat bei pH 5.8–6.0 (vgl. Fig. 7).

Die Reinheit der Fraktionen wurde mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese

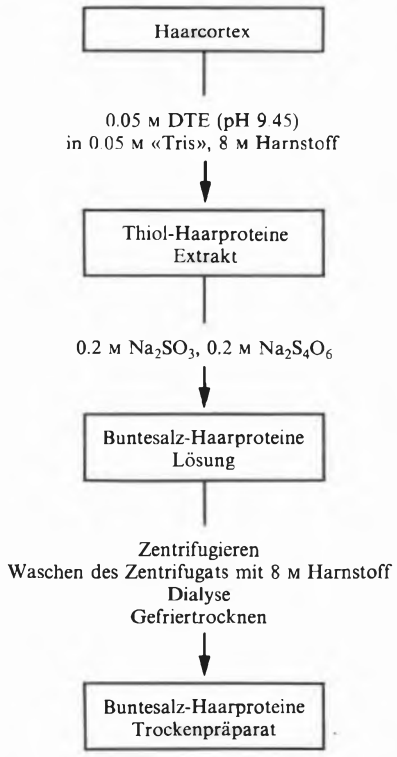


Fig. 6. Isolierung von Proteinen aus Haarcortex und Umwandlung in die Buntesalz-Haarproteine. (Nach Hüsken[25]*.)*

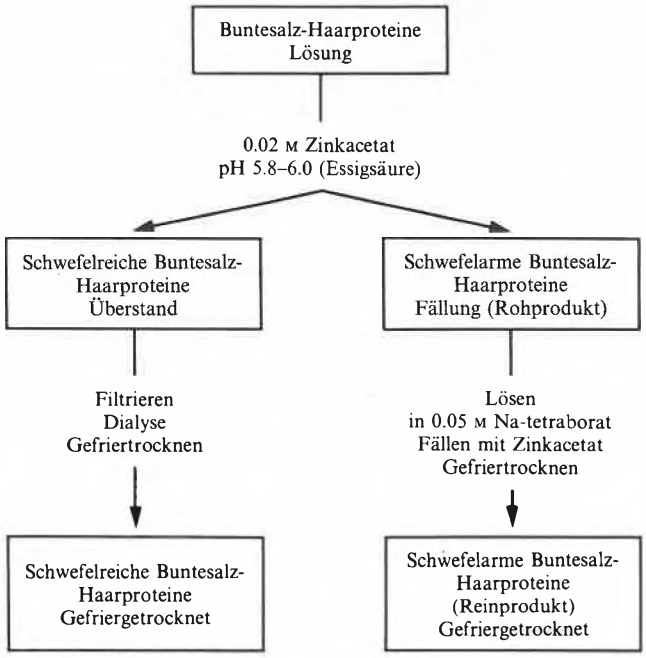


Fig. 7. Fraktionierung der Buntesalz-Haarproteine in schwefelarme und schwefelreiche. (Nach Hüsken [25].)

und Aminosäureanalysen überprüft. Die Analysendaten der schwefelarmen Haarproteine stimmten im allgemeinen gut mit Literaturwerten überein.

Zur Rekonstitution von Filamenten aus den schwefelarmen Haarproteinen wurden die bei den Versuchen mit Wollproteinen [22] entwickelten Methoden übernommen (vgl. Fig. 8).

Die auf solche Weise erhaltenen Filamente wiesen einen Durchmesser von 8 nm auf (vgl. Fig. 9). Die schwefelarmen Haarproteine bestehen nach elektrophoretischer Analyse aus zwei Gruppen von Proteinen mit Molekulargewichten von 62 und 61 sowie 47 und 45 kd. Die beiden grösseren Proteinmoleküle besitzen isoelektrische Punkte im neutral-basischen, die kleineren im sauren Gebiet. Dies spricht dafür, dass die rekonstituierten Filamente wie die der Humanhaut durch Aggregation jeweils eines kleineren «sauren» Typ I-Proteins mit einem grösseren «basischen» Typ II-Protein gebildet werden. Doch stehen detaillierte Untersuchungen über die Proteinzusammensetzung der rekonstituierten Filamente noch aus.

6. Die morphologischen Komponenten und chemischen Konstituenten der Wolle und Haare sollen neu benannt werden

Aus der Eingliederung der Mikrofibrillen der Wolle in die IF-Familie und die Zuordnung der einzelnen Proteinuntereinheiten als Faserkeratine in der Gruppe der Cytokeratine ergeben sich Anstösse zum Überdenken der Nomenklatur. Besonders schwierig ist der Keratinbegriff. Am klarsten hat dies *Matoltsy* [26] schon 1969 erkannt: «In current literature the word "keratin" may refer to the entire hardened portion of a keratinizing tissue, such as the wool fiber ("keratin" or "keratin fiber" or "hard keratin"), the stratum corneum of the epidermis ("keratin" or "soft keratin" or "keratin layer"), or to constituents, such as filaments ("keratin filament"). Furthermore, fibrous proteins revealing either an alpha or beta type of X-ray diffraction pattern are also referred to as keratin ("α-keratin", "β-keratin"). It is apparent, then, that the word "keratin" currently refers to constituents of keratinizing tissues at various organizational levels, extending practically, from molecules to multicellular tissue fragments.»

Was verstehen Zellbiologen heute unter Keratin? Nach *Knapp* et al. [27] bilden die Keratine eine komplexe Multigen-Familie von über 20 verwandten Proteinen, welche imstande sind, 10 nm cytoplasmatische Filamente in nahezu allen Zellen epithelialen Ursprungs zu bilden. Auch *Lynch* et al. [14] verwenden den Namen Keratin nur für die schwefelarmen Haarproteine: «The emerged hair fiber is composed primarily of cortical cells filled with 10 nm keratin filaments. Biochemical studies of wool filaments and their associated matrix material have led to the realization that there are three major classes of hair proteins: the "low-sulfur keratins" (40–60000), the "high-sulfur proteins" (10–25000), and the "high-glycine/tyrosine proteins" (6000–9000). It is believed that the low-sulfur keratins form the 10 nm filaments and the latter two groups of proteins form interfilamentous matrix».

Eine neue Nomenklatur für die Mikrofibrillen und die Matrix sollte sich den Begriffen anpassen, welche für die Benennung sowohl der im Elektronenmikroskop sichtbaren Strukturen als auch der löslich gemachten Proteinuntereinheiten in der Zellbiologie gebräuchlich sind. Daraus leiten sich die in Tabelle 2 formulierten Vorschläge ab.

Der Name «Matrix» sollte aus der Liste von Begriffen für mikroskopisch und elektronenmikroskopisch sichtbare Strukturen verschwinden und der Materialwissenschaft vorbehalten bleiben. Hier hatte *Feughelman* [29] den Übergang der mechanischen Eigenschaften einer Wollfaser von einem isotropen Material im trockenen Zustand zu einem stark anisotropen Material im nassen Zustand mit seinem Zweiphasen-Modell erklären können. In diesem Modell wird die Wollfaser als eine

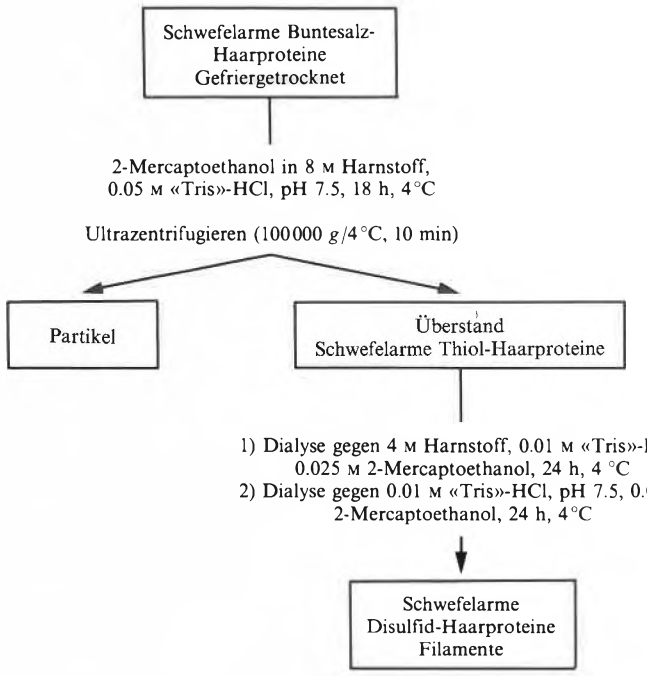


Fig. 8. Rekonstitution von Filamenten aus schwefelarmen Buntesalz-Haarproteinen durch Reduktion und Dialyse. (Nach Hüsken [25].)

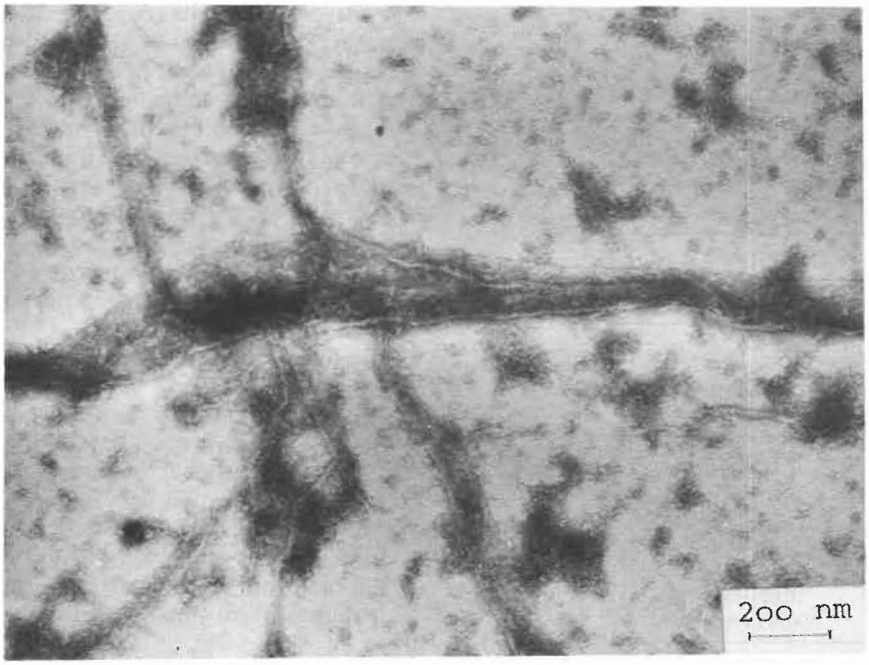


Fig. 9. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Filamenten, die nach langsamer Reoxidation von schwefelarmen Thiol-Haarproteinen entstanden sind. Die bei der Dialyse der schwefelarmen Thiol-Haarproteine gebildete Filamentsuspension wurde auf eine Konzentration von 1mg/mL verdünnt und ein Tropfen mit einem kohlenstoffbedampften Gitter in Kontakt gebracht. Negativ-Kontrastierung mit 1proz. Uranylacetatlösung. (Nach Hüsken [25].)

Verbundstruktur aus zwei Phasen, Wasser nicht absorbierenden Zylindern C und einer Wasser absorbierenden Matrix M, in welche die Zylinder eingebettet sind, aufgefasst. In Termini der Keratinstruktur wurde die Phase C mit den im Elektronenmikroskop sichtbaren Mikrofibrillen identifiziert. Die Mikrofibrillen sind in eine weniger ausgerichtete Matrix eingebettet, welche im Zweiphasen-Modell der Komponente M entspricht. Diese Identifizierung von Termini der Verbundstrukturwissenschaft (Fibrille/Matrix) mit elektronenmikroskopisch sichtbaren Mikrofibrillen und dem diese umgebenden Material in Wolle hat sich in der Literatur weitgehend durchgesetzt, obwohl schon lange bekannt war, dass die Mikrofibrillen (Wolle-IF) nur zu 50% aus helicalen, also kristallinen Domänen bestehen und zu 50% aus nicht-helicalen Domänen, welche Wasser absorbieren und eher die physikalischen Kriterien der «Matrix» erfüllen. Auch gibt es Hinweise dafür, dass die «Matrix» oder das Interfilament-Material (Tabelle 2) mindestens im Nahbereich geordnete Domänen enthält.

Daher hat *Wortmann* [30] für mechanische Eigenschaften von Lincolnwolle das Composite-Prinzip mit zwei Phasen wie folgt präzisiert:

1. Phase: Die α-Helices als kristalline Phase in den Protofibrillen (Subfilamenten) als Aggregatform, welche kontinuierliche Filamente in Faserrichtung bilden.

2. Phase: Die Matrix, zu der alles übrige nicht-kristalline Material gehört, d.h. sowohl das elektronenmikroskopisch sichtbare Interfilament-Material (bisher Matrix genannt) als auch das intraprotofibrilläre nicht-helicale Material, das etwa 50% der Mikrofibrillen ausmacht.

Auch *Feughelman* [31] definiert neu: «The mechanical "microfibril" does not necessarily correspond completely with the microfibril visible under the electron microscope.»

Die nun in Tabelle 2 vorgeschlagenen Namen tragen nicht nur der bei den übrigen Intermediatfilamenten eingeführten Nomenklatur Rechnung, sondern sie schaffen auch das semantische Problem der Verwechslung von mechanischen mit elektronenmikroskopischen Begriffen aus der Welt. Der Terminus «Intermediatfilament» dürfte sich leicht einbürgern, während für das «Interfilament-Material» etwas «Griffigeres» gefunden werden sollte. Man könnte sich den Terminus «Filaggrin» für die Filamentassoziierten Proteine der Epidermis [32] zum Vorbild nehmen. Da jedes Intermediatfilament je nach Zelltyp von charakteristisch unterschiedlichen assoziierten Proteinen (IFAP) umgeben ist und in Humanhaar die IFASP mengenmässig den Filamenten entsprechen, mag das Interesse an einer Erforschung von Struktur und Disulfidvernetzung mit den Filamenten zunehmen. 1965 veröffentlichte *Crewther* [33] ein Modell für mögliche Disulfidbrücken innerhalb der «Matrix» und zwischen «Matrix» und Mikrofibrillen der Wolle. Das anschauliche Bild ist leider bis heute Arbeitshypothese geblieben (Fig. 10).

Fig. 11 zeigt schematisch, wie man sich heute die strukturellen Komponenten von Wolle und Haaren von der 200 nm breiten Makrofibrille bis zur einzelnen helicalen Proteinkette vorstellen könnte. Diese Darstellung stützt sich auf das Wollmodell von *Fraser* et al. [34] und modifiziert dieses entsprechend den neuesten Erkenntnissen. So wird angenommen, dass ein Intermediatfilament (früher Mikrofibrille) aus acht tetrameren Protofilament-Einheiten besteht und jedes Tetramer aus zwei doppelsträngigen Superhelices. Ein Filament enthält demnach im Querschnitt 32 einzelne Proteinmoleküle.

Tabelle 2. Neue Namen für die Mikrofibrillen und die Matrix in Wolle und Haaren sowie deren Proteinuntereinheiten.

Im Elektronenmikroskop sichtbare Strukturen		Proteinuntereinheiten
Bisher:	Mikrofibrille	Schwefelarme Wollproteine
Neu:	*Keratin-Intermediatfilament* (Keratin-IF)	Keratinfilament-Proteine (Keratine)
Bisher:	Matrix	Schwefelreiche Wollproteine und Tyrosin-glycinreiche Wollproteine
Neu:	*Interfilament-Material*	Keratinfilament-assoziierte Proteine (IFAP)

7. Textilchemische Anwendungen und Perspektiven

Was nützen detaillierte Kenntnisse der Feinstruktur der einzelnen Wollfaser der Praxis? Kritisch wurden vor 30 Jahren bereits die Bemühungen der Wollforscher von der Wirtschaft aufgenommen, als es um die Einführung objektiver, darunter auch proteinchemischer Analysenmethoden in den Katalog der offiziellen Standardmethoden der International Wool Textile Organization (IWTO) [35] ging. Inzwischen haben sich die Analysen des Cystin- und Cystein-Säuregehalts zur Beurteilung der chemischen Qualität von Wolle nicht nur bei den Farbstoff- und Hilfsmittelherstellern und den Wolle verarbeitenden Betrieben, sondern sogar im Handel durchgesetzt. Neue Färbemethoden auf der Basis einer optimalen Erhaltung eben dieser chemischen Wollqualität wurden entwickelt.

Wenn in hoffentlich nicht zu ferner Zukunft ein komplettes Modell der Feinstruktur der Wollfaser, also besonders der Filamente und des Interfilament-Materials, ihrer Aminosäuresequenz und gegenseitigen Wechselwirkungen erarbeitet sein wird, dann kann das Färben, Bleichen, Fixieren und die Stabilisierung der Wolle durch Einbau synthetischer Brükken den chemischen, physikalischen und strukturellen Daten genauer angepasst werden.

Schon heute beginnen Forschungsinstitute, sich die neuen Methoden der Molekularen Textiltechnologie zunutze zu machen: Will man z.B. Färbeverfahren darauf prüfen, ob sie die für die mechanische Festigkeit entscheidenden Filamente an-

greifen und partiell abbauen, so kann man jetzt Rekonstitutionsversuche mit Proteinen aus gefärbter Wolle durchführen. Isoliert man schwefelarme Wollproteine aus einer bei pH 4.5 schonend gefärbten Wolle, so lassen sich Intermediatfilamente wie aus unbehandelter Wolle rekonstituieren. Wiederholt man den Versuch mit einer bei pH 2.0 30 min bei 98 °C gefärbten Wolle, so kann man zwar wieder schwefelarme Wollproteine extrahieren, die sich jedoch nicht zu intakten Filamenten in vitro zurückbilden lassen. Man erhält nur noch kurze Filamentbruchstücke. Während des Färbens im stark sauren Bad sind die Peptidketten der Filamentproteine partiell hydrolysiert worden. Verkürzte Peptidketten sind aber nicht mehr zur Bildung von intakten Filamenten fähig[36].

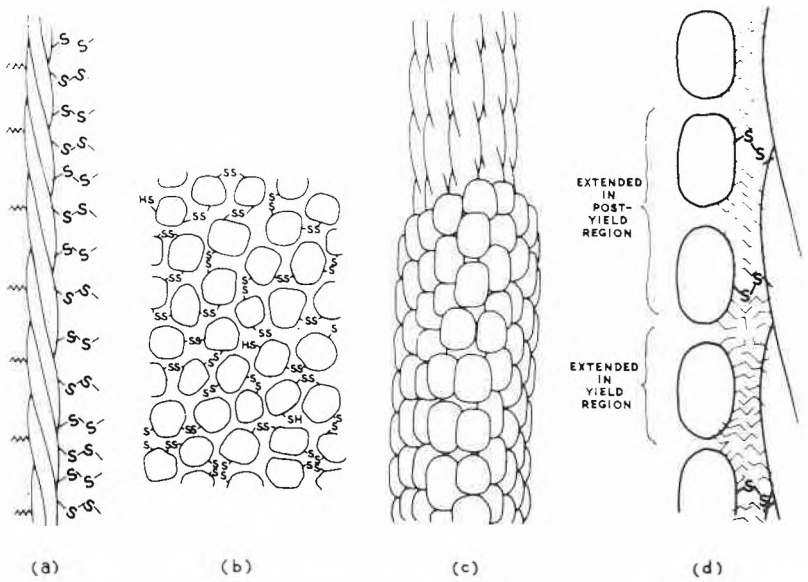


Fig. 10. Schematische Darstellung von möglichen Strukturen in den Cortexzellen von Wolle: a) Eine Protofibrille mit säurelabilen (Wellenlinie) Querbrücken und Disulfidbindungen; b) Matrix mit zwischenmolekularen Disulfidbrücken; c) eine Mikrofibrille umgeben von «Matrix»-Molekülen; d) Mikrofibrillen und Matrixmoleküle üben gegenseitig Wechselwirkungen über ihre Seitenketten inklusive Disulfidbrücken aus. (Nach Crewther[33], reproduced by permission of the journals editor).

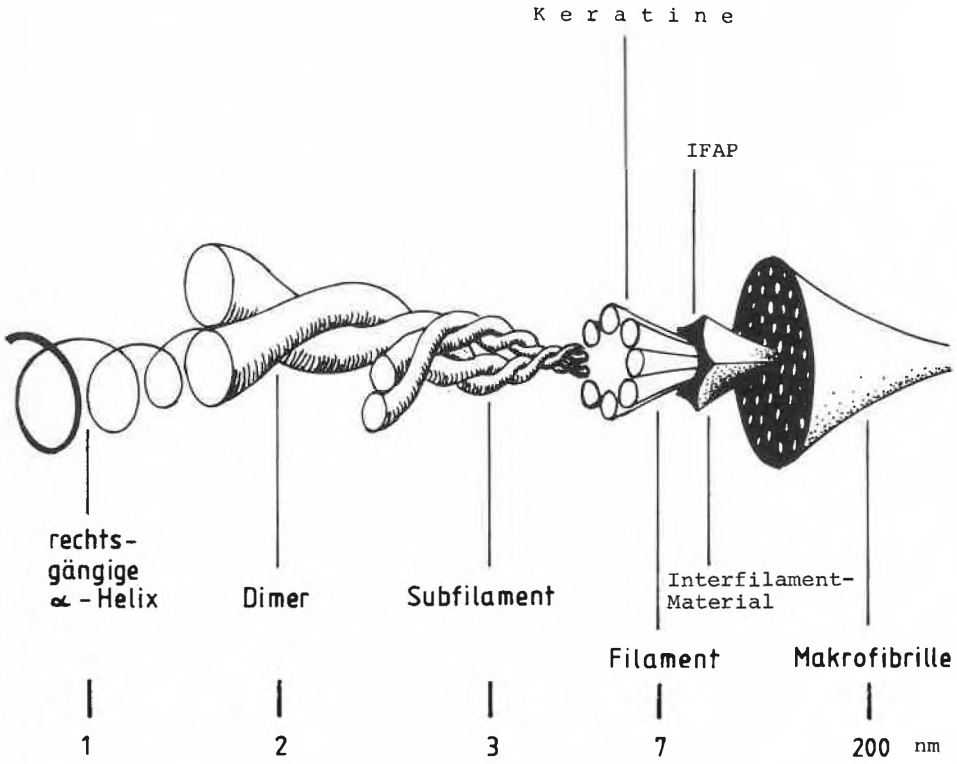


Fig. 11. Feinbau einer Makrofibrille in Wolle oder Humanhaar, modifizierte Darstellung in Anlehnung an das Wollmodell von Fraser et al.[34]. Eine Makrofibrille besteht aus Intermediatfilamenten und Interfilament-Material (früher Matrix genannt). Jedes Filament (früher Mikrofibrille genannt) ist aus acht Subfilamenten (früher Protofibrille genannt) zusammengesetzt. Jedes Subfilament besteht aus zwei Dimeren. Ein Dimer entsteht durch Assoziierung eines Wollproteins vom Typ I mit einem Wollprotein vom Typ II. Die Wollproteine im Filament heissen Keratine und sind zu einem hohen Anteil α-helical. Die Wollproteine im Interfilament-Material heissen IFAP (IF-assoziierte Proteine) und sind reich an Cystin oder Tyrosin und Glycin.

Der Autor dankt herzlich Andrea Conrads, Helga Thomas, Kim-Ho Phan, Monika van de Löcht und Petra Hüsken für die erfolgreiche Durchführung der Arbeiten zur Selbstassoziation von Intermediatfilamenten aus isolierten Proteinunterheiten in Schafwolle und Menschenhaar. Für die Erlaubnis, aus Publikationen bzw. einer persönlichen Mitteilung wörtlich zu zitieren, danke ich Dr. Christiane Koszka, Dr. Peter Steinert und Prof. Dr. Klaus Weber.

Eingegangen am 3. Juli 1988 [FR 56].

[1] a) P. M. Steinert, A. C. Steven, D. R. Roop, *Cell 42* (1985) 411; – b) C. Koszka, *Chem. Unserer Zeit 20* (1986) 19.
[2] a) N. Geisler, K. Weber, *EMBO J. 1* (1982) 1649; K. Weber, N. Geisler, *ibid. 1* (1982) 1155; – b) K. Weber, M. Osborn, *Spektrum Wissenschaft* (1985) 102; E. Lazarides, *Nature (London) 283* (1980) 249; *Annu. Rev. Biochem. 51* (1982) 219; H. Kleinig, P. Sitte: *Zellbiologie*, Gustav Fischer Verlag (1984); T.T. Sun, R. Eichner, W.G. Nelson, S.C.G. Tseng, R.A. Weiss, M. Jarvinen, J. Woodcock-Mitchell, *J. Invest. Dermatol. 81* (1983) 109; R.A. Quinlan, D.L. Schiller, M. Hatzfeld, T. Achtstätter, R. Moll, J.L. Jorcano, T.M. Magin, W.W. Franke, *Ann. N.Y. Acad. Sci. 455* (1985) 282; V. Romano, M. Hatzfeld, T.M. Magin, R. Zimbelmann, W.W. Franke, *Differentiation 30* (1986) 244.
[3] L.M. Dowling, W.G. Crewther, D.A.D. Parry, *Biochem. J. 236* (1986) 705.
[4] D.A.D. Parry, R.D.B. Fraser, *Int. J. Biol. Macromol. 7* (1985) 203.
[5] D.A.D. Parry, J.F. Conway, P.M. Steinert, *Biochem. J. 238* (1986) 305.
[6] B. Ahmadi, P.T. Speakman, *FEBS Lett. 94* (1978) 365; B. Ahmadi, N.M. Boston, M.G. Dobb, P.T. Speakman, in D.A.D. Parry, L.K. Creamer (Ed.): *Fibrous Proteins: Scientific, Industrial, and Medical Aspects*, Academic Press, New York (1980), p. 161.
[7] H. Zahn, *Melliand Textilber. 22* (1941) 305; *23* (1942) 577.
[8] G.E. Rogers, *Ann. N.Y. Acad. Sci. 83* (1959) 378.
[9] W.T. Astbury, A. Street, *Philos. Trans. R. Soc. London 230 A* (1931) 75; W.T. Astbury, H.J. Woods, *ibid. 232 A* (1933) 333.
[10] L. Pauling, R.B. Corey, *J. Am. Chem. Soc. 72* (1950) 5349; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37* (1951) 261; *Nature (London) 171* (1953) 59.
[11] F.H.C. Crick, *Acta Crystallogr. 6* (1953) 689.
[12] R.D.B. Fraser, T.P. MacRae, G.E. Rogers: *Keratins – Their Compositions, Structure, and Biosynthesis*, Thomas, Springfield, IL (1972), p. 93.
[13] I.J. O'Donnell, E.F. Woods, *J. Polym. Sci. 21* (1956) 397.
[14] M.H. Lynch, W.M. O'Guin, C. Hardy, L. Mak, T.T. Sun, *J. Cell Biol. 103* (1986) 2593.
[15] L.D. Lee, H.P. Baden, J. Kubilus, B.F. Fleming, *J. Invest. Dermatol. 67* (1976) 521.
[16] H.P. Baden, N. McGiluray, L.D. Lee, L. Baden, J. Kubilus, *J. Invest. Dermatol. 75* (1980) 311.
[17] A.G. Matoltsy, *Nature (London) 201* (1964) 1130.
[18] M. Spei, persönliche Mitteilung (1981).
[19] H. Thomas, R. Greven, M. Spei, *Melliand Textilber. 64* (1983) 297; H. Thomas, M. Spei, *ibid. 65* (1984) 208.

[20] H. R. Kricheldorf, D. Müller, *Macromolecules 16* (1983) 615.
[21] U. Aebi, W. E. Fowler, P. Rew, T. T. Sun, *J. Cell. Biol. 97* (1983) 1131; R. C. Marshall, *Textile Res. J. 51* (1981) 106.
[22] H. Thomas, A. Conrads, K. H. Phan, M. van de Löcht, H. Zahn, *Int. J. Biol. Macromol. 8* (1986) 258.
[23] M. van de Löcht, *Melliand Textilber. 68* (1987) 780.
[24] P. M. Steinert, W. W. Idler, S. B. Zimmerman, *J. Mol. Biol. 108* (1976) 547.
[25] P. Hüsken, *Parfuem. Kosmet. 67* (1986) 434, 440, 491, 496, 548, 552.
[26] A. G. Matoltsy, *Adv. Biol. Skin 9* (1969) 559.
[27] B. Knapp, M. Rentrop, J. Schweizer, H. Winter, *J. Biol. Chem. 262* (1987) 938.
[28] A. Conrads, «Zur Wechselwirkung von Natriumdodecylsulfat mit den Proteinen im Human-Stratum Corneum», Dissertation, RWTH Aachen (1986); A. Conrads, H. Zahn, *Int. J. Cosmet. Sci. 9* (1987) 29.
[29] M. Feughelman, *Text. Res. J. 29* (1959) 223; E. G. Bendit, M. Feughelman, in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Vol. *8*, Wiley, New York (1964), p. 1.
[30] F.-J. Wortmann, «Der Einfluss von Wasser und niedrigen aliphatischen Alkoholen auf die rheologischen und feinstrukturellen Eigenschaften einzelner Lincolnfasern», Dissertation, RWTH Aachen (1981).
[31] M. Feughelman, *J. Soc. Cosmet. Chem. 33* (1982) 385.
[32] B. A. Dale, B. Vadlamudi, L. W. DeLap, I. A. Bernstein, *Biochim. Biophys. Acta 668* (1981) 98.
[33] W. G. Crewther, *Text. Res. J. 35* (1965) 867.
[34] R. D. B. Fraser, J. M. Gillespie, T. P. MacRae, R. C. Marshall, *Internal Report of CSIRO Division of Protein Chemistry*, Parkville, Vic. (1981).
[35] *Prüfmethoden der Internationalen Wollvereinigung*, herausgegeben vom Internationalen Wollsekretariat London-Düsseldorf; vgl. Tabelle in H. Zahn, U. Altenhofen, F. J. Wortmann, *Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie, Vol. 24* (1983) 489, Verlag Chemie, Weinheim.
[36] H. Thomas, unveröffentlichte Versuche (1985 und 1986).