

Lichtabsorption von Eiweißstoffen I.

Von

E. Schauenstein.

Aus dem Institut für theoretische und physikalische Chemie der
Universität Graz.

Mit 9 Abbildungen.

(Eingelangt am 20. Mai 1949. Vorgelegt in der Sitzung am 9. Juni 1949.)

Eine Besprechung der Lichtabsorptionserscheinungen an hochmolekularen Eiweißstoffen gliedert sich zunächst grundsätzlich in die Behandlung zweier Effekte:

1. Lichtabsorption im eigentlichen Sinne, das heißt Übergang des Moleküls in angeregte Zustände.

2. Schwächung des durch das Untersuchungsmedium tretenden Lichtstrahles durch Streuung (*Tyndall*-Effekt).

Beide Erscheinungen stehen insofern in Beziehung, als beispielsweise chemische Eingriffe sowohl die Eigenabsorption, als auch die Streustrahlung von Proteinen beeinflussen können (vgl. später II. Teil). Für eine Diskussion absorptionspektrographischer Meßergebnisse ist daher eine exakte Trennung der beiden Effekte unerläßliche Voraussetzung.

„Echte“ Lichtabsorption im ultravioletten Spektralgebiet. Additivität der Proteinspektren; quantitative Bestimmungen.

Zieht man von der Gesamtabsorption eines Proteins, das entweder kolloid gelöst oder fest — als Kristall, Folie oder Faden — zur Untersuchung vorliegen kann, die *Tyndall*-Absorption ab, so läßt eine im mittleren Quarz-UV. zwischen 3200 und 4200 mm^{-1} auftretende Absorption auf die Anwesenheit von aromatischen Aminosäuren, wie Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin oder auch von Histidin, schließen, während Aminosäuren mit aliphatischem Rest nur Grenzabsorption von zirka 4300 mm^{-1} an erkennen lassen¹. Vor allem die zuerst genannten

¹ M. Pestemer, Z. Elektrochem. 47, 20 (1940).

Aminosäuren besitzen charakteristische Absorptionsspektren mit scharfen Haupt- und Teilbanden, so daß das Spektrum im Gebiete zwischen 3200 und zirka 4200 mm^{-1} zur qualitativen Analyse eines Eiweißstoffes mit Erfolg herangezogen werden kann.

Voraussetzung hierfür ist, daß einerseits die im Protein vorhandene Peptidbindung keine wesentliche Änderung des Spektrums der freien Aminosäuren hervorruft und daß sich andererseits das Proteinspektrum additiv aus den Einzelabsorptionen der darin als Bauelemente anwesenden Aminosäuren zusammensetzt.

Die erste Frage ist bereits ausführlich experimentell untersucht worden. Nach Messungen von *Asahina* und *Shibata*² an Phenylalanin, bzw. Angaben von *Frankenburger*³ und *Abderhalden*⁴ bezüglich des Tyrosins, sowie von *de Gouveia*⁵ über aromatische Aminosäuren im allgemeinen läßt eine peptidartige Verknüpfung dieser Aminosäuren das Absorptionsmaximum unverändert. In gleiche Richtung weisen auch die Untersuchungen von *Holiday*⁶, *Guthmann*⁷ und *Arnold*⁸. Die Peptidbindung bewirkt lediglich meist geringfügige Rotverschiebungen des kurzwelligen Kurvenastes¹. Der Beitrag der Carbonylchromophore selbst zur Gesamtabsorption von Proteinen mit aromatischen Aminosäuren wird von *Holiday*⁹ im Gebiete von etwa 4200 mm^{-1} nur zu rund 17% angegeben und fällt daher bei derartigen Eiweißstoffen nicht wesentlich ins Gewicht.

Die Beobachtung, daß beispielsweise die Absorption von Seidenfibrin zwischen 3300 und 4100 mm^{-1} praktisch identisch ist mit der Absorption einer wäßrigen Lösung von l-Tyrosin von entsprechendem pH, erscheint somit durchaus verständlich und erwartungsgemäß¹⁰. Eine Eigenabsorption der Peptidbindung, wie sie von *Anslow* und *Nassar*¹¹ bei $\sim 3570 \nu'$ angegeben wird, konnte von uns an keinem der bisher untersuchten Proteine festgestellt werden. Auch bei Gegenwart mehrerer, im erwähnten Gebiete charakteristisch absorbierender Aminosäuren ist Additivität der Absorption zu erwarten, da die chromophoren Aminosäuren im Eiweißmolekül, durch aliphatische Kohlenstoffatome getrennt, zu den CO-Gruppen in isolierter Stellung liegen.

² *T. Asahina* und *Y. Shibata*, Bull. chem. Soc. Japan **2**, 324 (1926).

³ *W. Frankenburger*, Naturwiss. **21**, 116 (1933).

⁴ *E. Abderhalden* und *R. Haas*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **166**, 78 (1927).

⁵ *A. J. A. de Gouveia*, *F. P. Coelho* und *K. Schön*, Rev. Ciencias, Univ. Coimbra **6**, 391 (1937).

⁶ *E. R. Holiday*, Biochemic. J. **30**, 1798 (1936).

⁷ *H. Guthmann*, *K. Schwerin* und *F. Stähler*, Strahlentherap. **39**, 401 (1931).

⁸ *L. B. Arnold* und *B. Kistiakowsky*, J. Amer. chem. Soc. **54**, 1713 (1932).

⁹ *E. R. Holiday*, Nature (London) **143**, 895 (1939).

¹⁰ *E. Schauenstein*, *J. Fixl* und *O. Kratky*, Mh. Chem. **80**, 143 (1949).

¹¹ *G. A. Anslow* und *S. C. Nassar*, J. opt. Soc. America **31**, 118 (1941).

Damit erscheinen die Grundlagen für quantitative Untersuchungen über den Gehalt von Eiweißkörpern an den erwähnten Aminosäuren gegeben. Solche Bestimmungen wurden auch bereits durchgeführt, wobei auf die Messungen von *Scheibe* am Tabakmosaikvirus¹², *Freudenberg*, *Dirscherl* und *Eyer* am Insulin¹³, *Bergmann* und *Niemann*¹⁴, bzw. *Schauenstein* und *Fixl*¹⁵ am Seidenfibroin hinzuweisen ist. Besonders hervorzuheben sind die grundlegenden Versuche von *Holiday*⁶, der unter Ausnützung der charakteristisch verschiedenen pH-Abhängigkeit der Spektren von Tyrosin und Tryptophan eine exakte Bestimmungsmethodik für beide Aminosäuren nebeneinander ausgearbeitet und erfolgreich an einer Reihe von Eiweißstoffen angewendet hat. In eigenen Messungen wurde diese Methodik ferner zur Analyse von Aktomyosin verwendet¹⁶. Die Vorteile des optischen Verfahrens liegen vor allem darin, daß das Eiweiß in nur geringfügig verändertem Zustand, ohne Gefahr von Verlusten oder von sekundären Umwandlungen durch chemische Eingriffe, untersucht wird und außerdem nur kleinste Mengen benötigt werden.

Es erscheint verständlich, daß die auf chemischem Wege ermittelten Prozentgehalte fast durchwegs etwas tiefer liegen als die spektrographisch bestimmten, worauf auch *Scheibe*¹² bei Tabakmosaikvirusaufnahmen hingewiesen hat.

Tabelle 1. Vergleich der optisch und chemisch bestimmten l-Tyrosin- bzw. l-Tryptophangehalte in Eiweißstoffen.

Protein	l-Tyrosin %		l-Tryptophan %		
	spektrographisch	chemisch	spektrographisch	chemisch	
Seidenfibroin	11,1	10,0	—	—	} nach Messungen von <i>Holiday</i> ⁶
Pferdeserumglobulin ..	7,7	6,9	2,3	2,1	
Caseinogen	6,95	6,2	—	—	
Insulin	12,7	12,0	—	—	

Erkennung diketopiperazinartiger Strukturen.

In den folgenden Abschnitten soll nunmehr auf eine weitere Anwendungsmöglichkeit des ultravioletten Absorptionsspektrums näher eingegangen werden. Es handelt sich hierbei um eine speziellere Art

¹² *A. Butenandt* und *G. Scheibe*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **274**, 276 (1942).

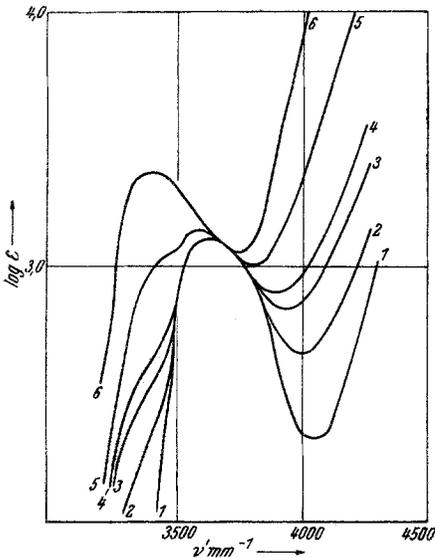
¹³ *K. Freudenberg*, *W. Dirscherl* und *H. Eyer*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **187**, 89 (1930).

¹⁴ *M. Bergmann* und *C. Niemann*, J. biol. Chemistry **122**, 577 (1937/38).

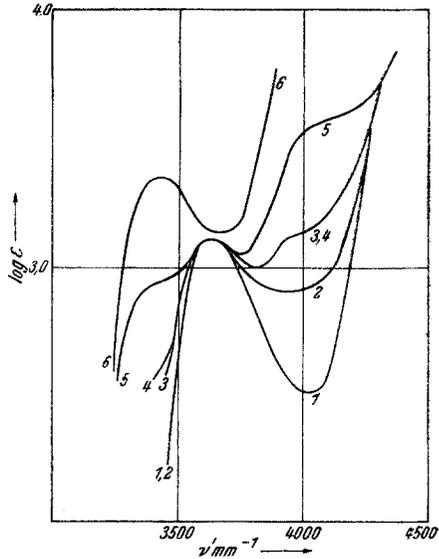
¹⁵ *J. Fixl*, Dissertation Universität Graz, 1949.

¹⁶ *E. Schauenstein* und *E. Treiber*, J. polymer. Sci. (im Druck).

der Strukturuntersuchung, die zunächst an zwei Faserproteinen, dem Seidenfibroin und dem Aktomyosin, durchgeführt wurde. Die Voraussetzung für eine solche Untersuchung besteht darin, daß, gemäß dem oben begründeten Additivitätsprinzip der Lichtabsorption von Proteinen, charakteristisch absorbierende Strukturelemente spektral nachzuweisen sein müssen. Hier handelt es sich um das häufig diskutierte Vorkommen von Diketopiperazinstrukturen in Eiweißkörpern¹⁷⁻¹⁹. Das Seidenfibroin

Abb. 1. l-Tyrosin, 10^{-4} m/l in Puffer.

pH ≤ 6 ... (1)	pH $\leq 9,0$... (4)
„ 8,4... (2)	„ 9,6 ... (5)
„ 8,8... (3)	„ 11—13... (6)

Abb. 2. Glycyl-l-tyrosinanhydrid, 10^{-4} m/l in Puffer.

pH ≤ 6 ... (1)	pH $\leq 9,0$... (4)
„ 8,4... (2)	„ 9,5 ... (5)
„ 8,8... (3)	„ 11—13... (6)

stellt für solche Messungen insofern eine besonders geeignete Modellsubstanz dar, als es l-Tyrosin als einzige zwischen 3300 und 4200 mm^{-1} charakteristisch absorbierende Aminosäure in beträchtlicher Menge (vgl. S. 822) enthält. Weist nun eine Diketopiperazin-Tyrosinverbindung eine charakteristische Absorption auf, bzw. bewirkt die Einführung des Ringes eine typische Veränderung der Absorption des Tyrosinchromophors, so lassen sich über die Anwesenheit solcher Strukturen konkrete Aussagen machen. Da die Untersuchung keinerlei chemische Eingriffe in das Proteingefüge erfordert, eröffnet die Methodik die Möglichkeit, die

¹⁷ E. Aberhalden, Lehrbuch der physiologischen Chemie. Wien: Urban u. Schwarzenberg. 1944.

¹⁸ N. Gawrilow und E. Stachefewa, Biochem. Z. 238, 53 (1931).

¹⁹ A. Blanchetiere, C. R. Acad. Sci. Paris 191, 1479 (1930).

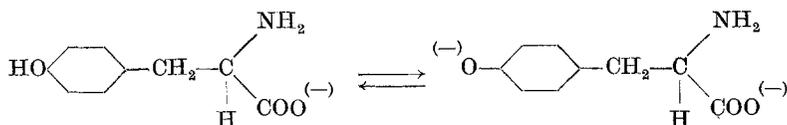
besprochene Fragestellung erstmalig unter sicherem Ausschluß einer sekundären Bildung solcher Ringsysteme zu untersuchen.

Das Spektrum von *Tyrosindiketopiperazinen* wurde zwar schon von *Asahina* und *Shibata*²⁰ sowie *Abderhalden*⁴ ausgemessen. Die mitgeteilten Daten zeigen jedoch keine befriedigende Übereinstimmung und werden auch nicht erschöpfend diskutiert, so daß eine Wiederholung dieser Messungen unerläßlich erschien. Die Abb. 1 und 2 stellen die in Untersuchungen mit *E. Treiber* bzw. *E. Bürgermeister* aufgenommenen Absorptionskurven von Tyrosin und Glycyltyrosinanhydrid^{21, 22} in Abhängigkeit vom pH-Wert einander gegenüber.

Tabelle 2. Extinktionskoeffizient im Maximum der Absorption ($\nu' = 3400 \text{ mm}^{-1}$) von wäßrigen 1-Tyrosinlösungen, in Abhängigkeit vom pH.

pH	log ϵ_{max}	ϵ_{max}	pH	log ϵ_{max}	ϵ_{max}
6,0	1,94	87,1	9,6	2,96	912
7,0	1,94	87,1	10,2	3,14	1380
8,4	2,30	200	10,6	3,25	1780
8,8	2,48	302	11,0	3,32	2100
9,0	2,60	398	13,0	3,35	2240
9,4	2,81	646			

Die pH-Funktion der Tyrosinabsorptionsbande (vgl. Tabelle 2) wird lediglich durch das phenolische Dissoziationsgleichgewicht



bestimmt²³⁻²⁶ und folgt der Dissoziationsfunktion

$$\alpha = K/(K + 10^{-\text{pH}}) \quad (\text{Michaelis}^{26}),$$

worin α den Dissoziationsgrad und K die phenolische Dissoziationskonstante von Tyrosin ($1,3 \cdot 10^{-10}$) bedeutet. Der gemeinsame Kurven-

²⁰ *T. Asahina*, Bull. chem. Soc. Japan **4**, 202 (1929).

²¹ *E. Treiber*, Dissertation Universität Graz, 1948.

²² *E. Bürgermeister*, Dissertation Universität Graz, 1949.

²³ *P. A. Kober*, J. biol. Chemistry **22**, 441 (1915).

²⁴ *G. Florence*, *J. Enselme* und *F. Pozzi*, Bull. Soc. Chim. biol. **17**, 283 (1935).

²⁵ *W. F. Ross*, J. biol. Chemistry **104**, 531 (1934).

²⁶ *L. Michaelis*, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin: Springer-Verlag. 1922.

schnittpunkt in Abb. 1 läßt ein echtes Umwandlungsgleichgewicht ohne Auftreten von Zwischenformen erkennen²⁷.

Demgegenüber zeigt das *Glycyltyrosinanhydrid* wesentliche Unterschiede (Abb. 2). In den beiden Grenzstadien der Dissoziation (pH 6 bis 7 bzw. 11 bis 13) bewirkt die Einführung des Diketopiperazinringes lediglich eine Extinktionserhöhung des kurzwelligen Kurvenstückes und könnte etwa mit dem Effekt der auf S. 821 erwähnten Säureamidbildung verglichen werden. Von pH zirka 8,8 bis 9,5 tritt im Bereich von etwa 4000 mm⁻¹ eine deutliche Inflexion auf²⁸, der — wie eine Subtraktion der entsprechenden reinen Tyrosinabsorption ergibt — ein recht scharfes Differenzmaximum bei 3950 mm⁻¹ zugrunde liegt:

Tabelle 3. Differenzspektrum von Glycyltyrosinanhydrid gegen l-Tyrosin bei pH = 8,8.

ν	$\log \epsilon_{\text{Tyrosin}}$	$\log \epsilon_{\text{Anhydrid}}$	$\epsilon_{\text{Tyrosin}}$	$\epsilon_{\text{Anhydrid}}$	$\Delta\epsilon$
3700	3,07	3,07	1175	1175	—
3800	2,94	3,01	872	1023	151
3960	2,84	3,07	693	1175	482
3950	2,83	3,12	676	1320	644
4000	2,87	3,14	742	1380	638
4050	2,93	3,17	852	1480	628
4100	3,02	3,22	1048	1660	612
4150	3,12	3,30	1320	2000	680
4200	3,23	3,39	1700	2460	760
4250	3,36	3,52	2290	3310	1020

Tabelle 4. Differenzspektrum von Glycyltyrosinanhydrid gegen l-Tyrosin bei pH = 9.

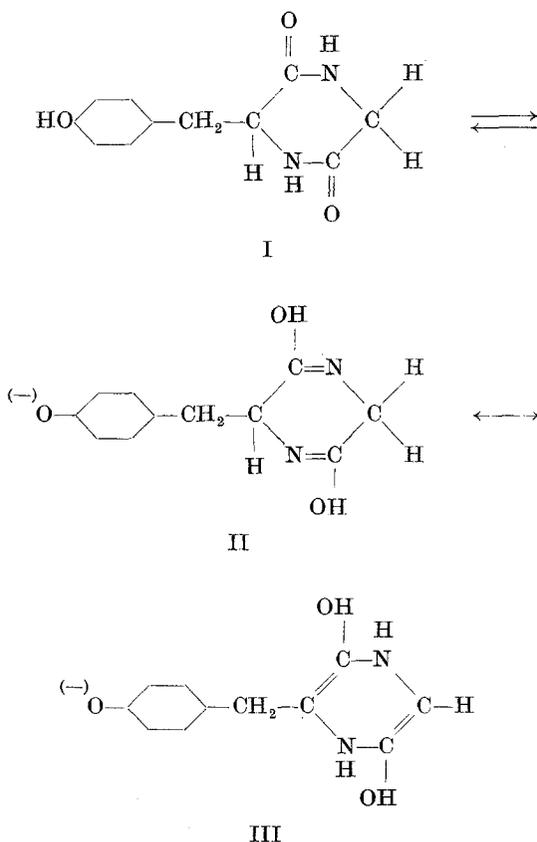
ν	$\log \epsilon_{\text{Tyrosin}}$	$\log \epsilon_{\text{Anhydrid}}$	$\epsilon_{\text{Tyrosin}}$	$\epsilon_{\text{Anhydrid}}$	$\Delta\epsilon$
3700	3,07	3,07	1175	1175	—
3800	2,95	3,01	891	1023	132
3900	2,90	3,07	795	1175	380
3950	2,91	3,12	813	1320	507
4000	2,98	3,14	955	1380	425
4050	3,06	3,17	1149	1480	331
4100	3,17	3,22	1480	1660	180
4150	3,28	3,30	1906	2000	94

Die Durchführung der Subtraktion erscheint in diesem Falle zulässig, da etwaige bei der Enolisierung entstehende zusätzliche chromophore Gruppen jedenfalls in isolierter Stellung zum Tyrosinchromophor an-

²⁷ E. Schauenstein, Mh. Chem. 80, 70 (1949).

²⁸ Der Effekt ist erwartungsgemäß exakt reversibel!

genommen werden dürfen. Zu einer Diskussion dieser Differenzbande sind zunächst die bei pH-Erhöhungen denkbaren Änderungen der chromophoren Struktur des Moleküls zu betrachten und daraus an Hand von entsprechendem Vergleichsmaterial die wahrscheinlichste herauszugreifen:

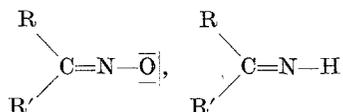


Bringt man die zu erwartende Enolisierung des Diketorings in Zusammenhang mit dem Auftreten der Differenzbande, so erscheint die Form III sehr unwahrscheinlich, da die isoliert stehenden $\text{C}=\text{C}$ -Bindungen erst bei Wellenzahlen von oberhalb 5000 mm^{-1} ein Maximum erwarten lassen. Wie das folgende Vergleichsmaterial zeigt, erscheint es möglich, daß an der Bande im Gebiete von 4000 mm^{-1} eine $\text{C}=\text{N}$ -Absorption mitbeteiligt ist. Für die Existenz einer Tautomerie des Systems spricht sehr überzeugend der von *P. Karrer* aus dem 2,5-Dioxopiperazin gewonnene O,O' -Dibenzylester.

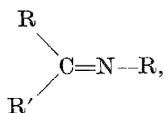
Tabelle 5.

Verbindung	ν_{\max}	
$C_2H_5-N=C=N-C_2H_5$	$\sim 3900 \text{ mm}^{-1}$	<i>Mohler</i> ²⁹
$\begin{array}{c} H_3C \\ \diagdown \\ C=N-O \text{ (—)} \\ \diagup \\ H_3C \end{array}$	$\sim 3900 \text{ mm}^{-1}$	<i>Kortüm</i> ³⁰
$\begin{array}{c} H_3C \\ \diagdown \\ C=N-O \text{ (—)} \\ \diagup \\ H \end{array}$	$\sim 3900 \text{ mm}^{-1}$	} <i>Ley und Wingchen</i> ³¹
$\begin{array}{c} H \\ \diagdown \\ C=N-O \text{ (—)} \\ \diagup \\ H \end{array}$	$\sim 3900 \text{ mm}^{-1}$	

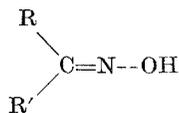
Interessanterweise erwies sich die Azomethingruppe nur dann als chromophor, wenn sie entweder als



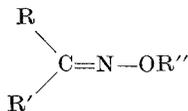
oder



nicht aber als



oder

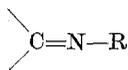


²⁹ *H. Mohler*, Das Absorptionsspektrum der chemischen Bindung. Jena: G. Fischer. 1943.

³⁰ *G. Kortüm*, Z. physik. Chem., Abt. B **43**, 281 (1939).

³¹ *H. Ley und H. Wingchen*, Ber. deutsch. chem. Ges. **67**, 501 (1934).

vorliegt³². Da im hier untersuchten Falle nur die Gruppierung



in Frage kommt, erscheint eine Übertragung der Ergebnisse von *Meisenheimer* und *Dorner* wohl gerechtfertigt. Auch die Ergebnisse der Untersuchungen von *Hertel* und Mitarbeitern³³ weisen in dieselbe Richtung, sowie die Angabe *Abderhaldens*³⁴, der bei Versuchen, die Enolform des 2,5-Dioxopiperazins zu isolieren, auf eine Rotverschiebung der bei 4500 mm⁻¹ liegenden Grenzabsorption der Ketoform aufmerksam gemacht hat. Wir können demnach in der Tat mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit annehmen, daß im Spektrum des Glycyltyrosinanhydrids im pH-Gebiet oberhalb 8,8 die chromophoren C=N-Gruppen die Absorption bei 4100 mm⁻¹ mitbeeinflussen dürften. Beim Vergleich mit den Spektren der Abb. 1 zeigte sich nun, daß das Absorptionsspektrum von nativem Seidenfibroin (Folienpräparat von 5 bis 7 μ Dicke) zwischen 3400 und 3900 ν' quantitativ übereinstimmt mit dem Lösungsspektrum von l-Tyrosin bei pH 8,4. Die Rotverschiebung des kurzwelligen Kurvenanstieges um 100 ν' ist sicherlich auf den Einfluß der Peptidbindungen zurückzuführen (vgl. S. 821). Nachdem auch eine potentiometrische, unter Luftabschluß durchgeführte pH-Messung mittels Glaselektrode an der Hämolymphe der Seidenraupe Werte von 7,3 bis 8,4 ergab³⁵, ermöglicht das Absorptionsspektrum in Anbetracht der charakteristischen Unterschiede zwischen Kurve 2, Abb. 1 und Kurve 2, Abb. 2 die Aussage, daß im nativen Seidenfibroin *keine* nennenswerten Mengen von Diketopiperazinringen vorhanden sind. Diese Erkenntnis bezieht sich sinngemäß natürlich zunächst nur auf Diketopiperazinringe in Verbindung mit Tyrosin. Läßt man aber 0,5%ige Natronlauge bei Temperaturen oberhalb 40° C auf Seidenfibroin einwirken, so *erhält*

³² *J. Meisenheimer* und *O. Dorner*, Liebigs Ann. Chem. **502**, 156 (1933).

³³ *E. Hertel*, Z. Elektrochem. **47**, 29 (1941); Z. physik. Chem., Abt. B **48**, 298 (1941); **50**, 382 (1941).

³⁴ *E. Abderhalden* und *R. Haas*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **155**, 195 (1926).

³⁵ Es muß hier auf pH-Messungen an der Hämolymphe von *Bombyx Mori* verwiesen werden, die von *S. Demjonowsky*, *R. Galzowa* und *W. Roshdestwenka*, Biochem. Z. **247**, 386 (1932), mittels der Chinhydronelektrode ausgeführt wurden. Bemerkenswerterweise fanden die Autoren jedoch nie höhere pH-Werte als maximal 7. Da ein Meßfehler bei der von uns benützten, höchst empfindlichen Meßmethodik, ferner auf Grund der Absorptionskurve und außerdem an Hand der eindeutigen Färbung von Indikatorpapier außer Betracht bleiben muß, wäre nachzuprüfen, ob die von *Z. Kuwana*, Jap. J. Zool. **9**, 127 (1940), nachgewiesene Anwesenheit luftoxydationsempfindlicher Stoffe in der die Drüse unmittelbar umgebenden Flüssigkeit Chinhydrone-messungen nicht beeinflussen könnte.

man, wie J. O. Fixl zeigen konnte³⁶, nunmehr quantitativ das Spektrum des Glycyltyrosinanhydrids bei pH 13.

Tabelle 6. Vergleich der Spektren von Seidenfibroin, Glycyltyrosinanhydrid und l-Tyrosin im alkalischen Bereich.

	Seidenfibroin, mit 0,5% NaOH bei 60° behandelt	Glycyltyrosinanhydrid, pH 13-	l-Tyrosin, pH 13
$\log m_{\max} - \log m_{\min} \dots$	0,22	0,20	0,30
$\nu'_{\max} \dots \dots \dots$	3430	3440	3400
$\nu'_{\min} \dots \dots \dots$	3670	3660	3720

Daß es sich hierbei tatsächlich um die sicher nicht vollständig reversible Bildung eines neuen Bindungschromophors handelt, geht aus den folgenden Versuchen hervor: Nach Entfernung der Lauge durch Auswässern und nach neuerlichem Quellen in Phosphatpuffer von pH 8,8 erhält man nicht mehr die reine Tyrosinbande, sondern Kurven, die sich aus einer Überlagerung der Absorptionen von Tyrosin, Glycyltyrosinanhydrid und C=N-Gruppen bei pH 7 bzw. 8,8 ergeben. Dies schließt die Annahme aus, daß der beobachtete Effekt auf die Peptidbindung des Tyrosins zurückgehen könnte.

Somit ist die sekundäre Bildung von Diketopiperazinen im Seidenfibroin unter dem Einfluß von Alkali wohl überzeugend nachgewiesen worden und es erscheint verständlich, daß solche Diketopiperazine (Glycylalaninanhydrid, Glycyltyrosinanhydrid, Alanylserinanhydrid) von *Abderhalden* beim Alkaliabbau von Seidenfibroin auch chemisch isoliert worden sind³⁷. Eine Anwesenheit solcher Ringe (unter Beteiligung des Tyrosins!) a priori ist jedoch nach unseren Untersuchungen im Gegensatz zu der Ansicht *Abderhaldens* nicht anzunehmen. Die Frage nach der Bildungsweise derartiger Dioxopiperazinringe unter dem Einfluß des Alkalis kann zunächst noch nicht experimentell beantwortet werden. Auch ist es noch nicht sicher geklärt, ob es sich um Ringstrukturen innerhalb einer Peptidkette oder um intermolekulare Ringe handelt. Diese Fragen sind sicher nicht einfach zu behandeln, da eigene Versuche ergaben, daß die wichtigste physikalische Strukturuntersuchungsmethode, die Röntgenographie, auf die Ringbildung nicht eindeutig anspricht. —

Als zweites Beispiel sei das kontraktile Eiweiß der quergestreiften Muskulatur, das Aktomyosin³⁸, hier erwähnt. Es zeigt, in Phosphat-

³⁶ J. Fixl und E. Schauenstein, Mh. Chem. **80**, 143 (1949).

³⁷ E. Abderhalden, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **265**, 23 (1940).

³⁸ Die in dieser Arbeit erwähnten Spektrogramme von Aktomyosin beziehen sich stets auf Kaninchenaktomyosin, das nach den Vorschriften von *Szent-Györgyi*, Chemistry of Musc. Contr. New York, 1947, gewonnen wurde und durch Einspritzen aus Flachdüsen in destilliertes Wasser oder

puffer von pH 6 bis 7,3 gelöst, oder als etwa 7μ dicker Film die in Abb. 3 mit 1 bezifferte Absorptionskurve. Ermittelt man nach der eingangs erwähnten Methode nach *Holiday*⁶ den Gehalt des Aktomyosins an Tyrosin und Tryptophan (8,0% Tyrosin, 1,3% Tryptophan), so kann man sich zur Kontrolle der erhaltenen Werte eine entsprechend zusammengesetzte „Modelllösung I“ herstellen, der man auch die weiteren, im Aktomyosin gefundenen, chromophoren Aminosäuren Phenylalanin und

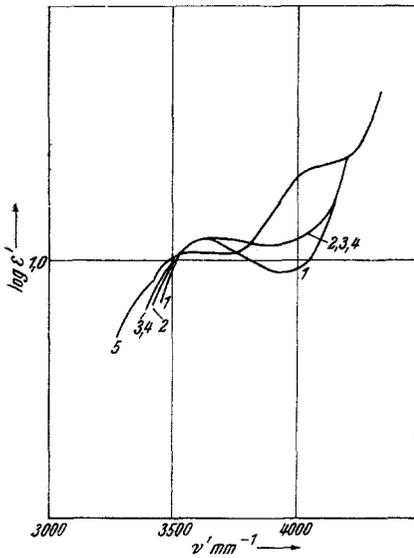


Abb. 3. Aktomyosin-Lösungsspektrum.
 1... pH 6—7,3 4... pH 9,55
 2... „ 8,4 5... „ 11—13
 3... „ 9,0

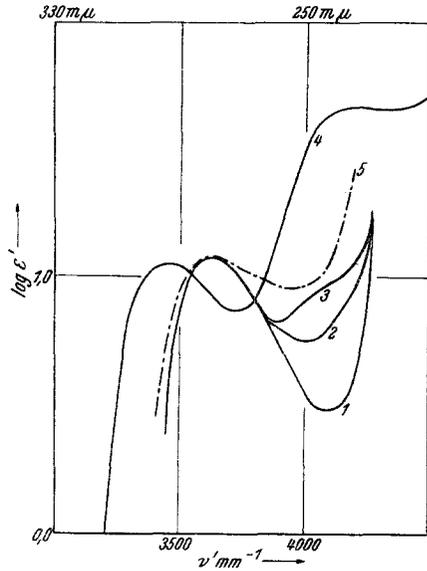


Abb. 4. 1—4: Modelllösung „I“, pH 6,3... (1)
 8,4... (2)
 9,0... (3)
 12,2... (4)
 Aktomyosin, pH 6,3... (5)

Histidin zusetzen kann¹⁶. Nach dem auf S. 820 und 821 Gesagten ergibt dann das Spektrum dieser Lösung einen Maßstab für die Zusammensetzung des Proteins: Kurve 1, Abb. 4. Man erkennt sogleich zweierlei:

1. Die Intensitäten der Maxima von Kurve 1, Abb. 3 und Kurve 1, Abb. 4 stimmen quantitativ miteinander überein, wodurch der spektrographisch ermittelte Tyrosin- bzw. Tryptophangehalt belegt wird³⁹.

2. Im kurzwelligeren Spektralgebiet, bereits ab 3700 mm^{-1} , tritt jedoch eine erhebliche Divergenz zwischen Protein- und Modellspektrum

sehr verdünnte KCl-Lösungen in Form von optisch klaren Filmen erhalten werden konnte (siehe Anm. 16, 21).

³⁹ Auch die chemische Analyse ergibt für ein analog dargestelltes Aktomyosin einen Tryptophangehalt von 1,3% [*H. H. Weber*, Naturwiss. 27, 33 (1933)]; ein Tyrosinwert ist nicht publiziert.

auf; da die in Abb. 3 wiedergegebene Proteinkurve bereits exakt um die Intensität der ultravioletten Streustrahlung korrigiert ist, scheidet der *Tyndall*-Effekt als Erklärungsmöglichkeit aus.

Es kann ferner ein Einfluß der Peptidbindung nach dem auf S. 821 Gesagten für so beträchtliche Divergenzen nicht verantwortlich sein. Auf Grund der bis jetzt bekannten Zusammensetzung von Aktomyosin kommt eine zusätzliche absorbierende Aminosäure gleichfalls nicht in Betracht.

So gelangt man zu der Annahme, daß im Aktomyosin unter Umständen bereits a priori chromophore Diketopiperazinstrukturen, bzw. C=N-Chromophore anwesend sein könnten.

Zu einer Prüfung dieser zunächst als reine Arbeitshypothese anzusehenden Annahme ist allgemein zu sagen, daß es sich dabei in Anbetracht der Vielfalt der möglichen Bindungskombination naturgemäß stets um grobe Näherungsmethoden handeln kann. Das experimentelle Kriterium der vorstehenden hypothetischen Annahme gliedert sich in folgende Abschnitte: Behandlung des Aktomyosins mit Stoffen, die erfahrungsgemäß einen Abbau des Proteins unter Erhaltung der schließlich freigesetzten Aminosäuren herbeiführen.

Spektralaufnahme einer Modelllösung „II“, die die chromophoren Aminosäuren an Diketopiperazinringe gebunden enthält. Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Modellspektrums II. Untersuchung über eine Beeinflußbarkeit der angenommenen Ringsysteme durch äußere mechanische Eingriffe.

Abbauversuche.

Versuche mit *E. Bürgermeister*⁴⁰ ergaben, daß die Absorptionsbande von Aktomyosin völlig unverändert bleibt, wenn das Protein mit 0,1 n HCl bei 18°, mit 50%iger Schwefelsäure bei etwa 40° und mit 10%iger NaOH 6 bis 8 Stunden lang gekocht wird. Spektrale Veränderungen, wie sie *Hicks* und *Holden*⁴¹ bei der Säuredenaturierung von Serumweiß und Eialbumin beobachtet haben, können somit bei Aktomyosin nicht bestätigt werden.

⁴⁰ *E. Bürgermeister* und *E. Schauenstein*, Mh. Chem. **80**, 310 (1949).

⁴¹ *C. S. Hicks* und *H. F. Holden*, Chem. Zbl. **1935 I**, 1893.

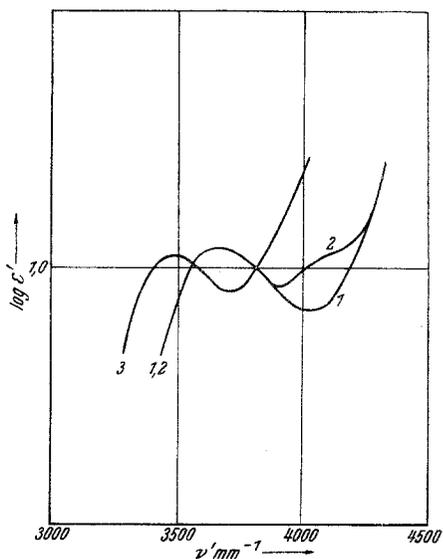


Abb. 5. Aktomyosin, 6h m. Pankreatin
abgebaut, pH 7,8... (1)
,, 9,0... (2)
,, 13,0... (3)

Setzt man jedoch Aktomyosin 4 bis 6 Stunden lang der Einwirkung von Pankreatin bei pH 7,8 und einer Temp. von 37° aus, so resultiert das Spektrum 1 der Abb. 5⁴². Bringt man die so behandelte Proteinlösung auf pH 9 und sodann auf pH 13, so erhält man die Spektren 2 und 3 der Abb. 5. Ein Vergleich mit den Absorptionsspektren der Modellösung I (Abb. 4) zeigt bereits bei oberflächlicher Betrachtung, daß die Einwirkung des Ferments das Proteinspektrum weitgehend dem Spektrum einer Lösung der freien Aminosäuren angenähert hat. Die Durchführung des Versuches bei verschiedenen pH-Werten erlaubt nun auch die Feststellung, daß beim Fermentabbau die Tyrosin- bzw. Tryptophanbande (als die im wesentlichen die Absorption bestimmenden Komponenten), sowie auch ihre charakteristische pH-Abhängigkeit keine Veränderungen erfahren haben. Dies berechtigt zu der Annahme, daß der fermentative Abbau die Eigenabsorption von Tyrosin und Tryptophan nicht beeinflußt bzw. daß die gemessenen Veränderungen im Proteinspektrum in der Tat ein Verschwinden der ursprünglich vorhandenen zusätzlichen Chromophore anzeigen. In diesem Zusammenhang ist zu sagen, daß *Holiday*⁹ — leider ohne quantitative Daten mitzuteilen — darauf aufmerksam gemacht hat, daß spektrale Veränderungen beim Serumglobulin während des Fermentabbaues (vgl. Messungen von *Haurowitz* und *Astrup*⁴³) auf eine Veränderung der Eigenabsorption von Tyrosin und Tryptophan zurückzuführen seien. In Anbetracht dessen hielten wir es für notwendig, einen Verdauungsversuch mit den freien Aminosäuren durchzuführen, der, wie die folgende Tabelle 7 zeigt, eindeutig ergab, daß die Absorption der aromatischen Aminosäuren durch die Einwirkung von Pankreatin *quantitativ unverändert* bleibt.

Tabelle 7. Konstanz der Lichtabsorption aromatischer Aminosäuren gegenüber Pankreatinbehandlung. Modellösung I, pH 7,7.

ν' mm ⁻¹	Unmittelbar nach Zusatz von Pankreatin log ϵ'	6 Stunden bei 37° mit Pankreatin behandelt log ϵ'	
3450	0,50	0,55	Fehlergrenze: ± 0,03 in log ϵ'
3500	0,83	0,85	
3540	1,08 (max.)	1,08 (max.)	
3800	0,87	0,90	
3900	0,67	0,67	
4050	0,49 (min.)	0,46 (min.)	
4200	0,74	0,70	
4250	0,94	0,96	

Tabelle 8.

	pH 7,7	pH 9,0	pH 13
Prozent abgebaute Zusatzabsorption	50	70	80 (Mittelwerte)

⁴² In die Vergleichsküvette wurde eine gleichkonzentrierte Pankreatinlösung von pH 7,8 gefüllt.

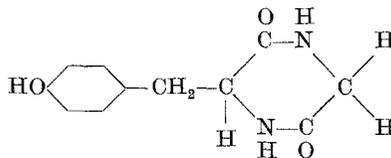
⁴³ *F. Haurowitz* und *T. Astrup*, Nature (London) **143**, 118 (1939).

Eine Auswertung der Kurven 1, 2, 3 der Abb. 5 zeigt, daß der Abbau im Mittel mehr als 60% der Zusatzabsorption erfaßt hat. Ein vollständiger fermentativer Abbau würde in vivo ohne Zweifel zu beobachten sein, ist aber in vitro grundsätzlich nie zu erwarten, worauf schon *Abderhalden*¹⁷ aufmerksam gemacht hat. Nähmen wir aber an, daß der ganze Effekt nur auf eine Aufspaltung der normalen Peptidbindung zurückginge, so würde dies bedeuten, daß auch die bei pH 6 bis 7 beobachtete größte Differenz zwischen Protein- und Modellspektrum I dem Einfluß der Peptidbindung zuzuschreiben wäre; diese Differenz würde verringert, wenn man dem Aktomyosin ein höheres „Eigen-pH“ als zirka 7 zuschreiben würde. Da aber hierfür Werte oberhalb 8,4 nicht in Frage kommen (vgl. Abb. 3, Kurven 1 und 2), so bleibt auch dann die Differenz so beträchtlich, daß sie durch den Einfluß der Peptidbindung (CO-Absorption) allein niemals erklärbar würde. Außerdem sprechen die durch mechanische Eingriffe bewirkten spektralen Veränderungen (S. 820) eindeutig gegen eine solche Auffassung.

Gegenstand weiterer Untersuchungen mußte es daher sein, die Art dieser Bindungen näher zu untersuchen.

Herstellung der Modellösung „II“.

Stellt man sich eine Modellösung nun dadurch her, indem man zu einer Mischung der freien chromophoren Aminosäuren des Aktomyosins die Tyrosinkomponente, gebunden an einen Diketopiperazinring, zusetzt, so erhält man bei pH 7,3 ein Spektrum, das beim Vergleich mit dem Proteinspektrum bei diesem pH-Wert (Kurve 1, Abb. 3) zeigt, daß die diketopiperazinartige Bindung lediglich der Tyrosinkomponente als Glycyltyrosinanhydrid



noch nicht die Absorptionskurve des Aktomyosins ergibt. Da nun einerseits eine solche Bindung im Hinblick auf die Mannigfaltigkeit derartiger Bindungsmöglichkeiten in Eiweiß nur als sehr grobe modellmäßige Vereinfachung angesehen werden darf und andererseits über die Dissoziationsverhältnisse im Aktomyosinteilchen nichts Sicheres bekannt ist⁴⁴, erscheint die noch vorhandene Diskrepanz nicht so wesentlich, wie die Frage, wie sich die pH-Funktionen von Modellspektren II und Proteinspektrum zueinander verhalten.

Zunächst sei hier die pH-Abhängigkeit des Aktomyosinspektrums näher behandelt. Die Kurven der Abb. 3 zeigen, daß das Aktomyosin bei Änderungen des pH-Wertes im wesentlichen nur *drei typische Absorptionskurven* aufweist: Das flache Maximum bis pH zirka 7,3, den praktisch geradlinigen Kurventyp, der zwischen pH 8,4 bis gegen 10 im wesentlichen unverändert erhalten bleibt, und den alkalischen Typ mit bathochromer Verschiebung der Gesamt-

⁴⁴ *Frankenburger* schließt beispielsweise auf eine beträchtliche phenolische Dissoziation des in der Haut anwesenden Tyrosins, deren Ausmaß einem weitaus höheren pH-Wert als 7 entsprechen müßte (siehe Anm. 3).

bande. Demgegenüber zeigt die Modellösung I, wie Abb. 4 veranschaulicht, eine wesentlich differenzierte pH-Abhängigkeit ihres Absorptionsspektrums, in der die charakteristische pH-Funktion des Tyrosinchromophors, streng additiv überlagert von der Tryptophankomponente, charakteristisch zum Ausdruck kommt. Man entnimmt der Abb. 4 sofort, daß die drei Grundtypen der Aktomyosinabsorption in diesen Kurven überhaupt nicht auftreten.

Tabelle 9. pH-Abhängigkeit von Modellspektrum II.

pH	Aktomyosin			Modell „II“		
	$\Delta \log m$	ν'_{\max}	ν'_{\min}	ν'_{\min}	ν'_{\max}	$\Delta \log m$
7,3	0,14	3630	3980	4000	3630	0,35
8,4	0,05	3630	3900	4000	3630	0,16
8,6	0,03	3630	3900	3950	3630	0,14
9,0	0,03	3630	3900	3900	3630	0,04
11,0	0,03	3500	3700	3700	3500	0,04
13,0	0,03	3500	3700	3700	3500	0,04

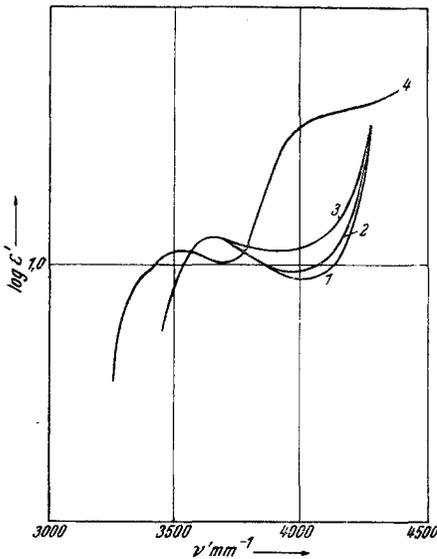


Abb. 6. Modellösung „II“.

pH	8,4(1)
„	8,6(2)
„	8,8 u.	} ... (3)
„	9,0	} ... (3)
„	11—13(4)

Ein grundsätzlich anderes Bild ergibt jedoch die pH-Abhängigkeit der Modellösung II, wie sie in Abb. 6 dargestellt ist. Hier sehen wir die drei Grundtypen der Aktomyosinabsorption bereits in guter Annäherung vertreten. Aufschlußreich ist auch der Vergleich von Kurve 4, Abb. 6, und 5, Abb. 3, der zeigt, daß die für das anhydridgebundene Tyrosin typische Bande bei 4000 mm^{-1} im Modellspektrum II merklich höher liegt als im Proteinspektrum. Man kann daher annehmen, daß im Aktomyosin nur ein Teil aller Tyrosinmoleküle an Ringstrukturen gebunden ist und die bei einer entsprechend zusammengesetzten Modellösung bei niedrigerem pH auftretende Differenz auf das Proteinspektrum durch ein drittes Absorptionsinkrement bei 4000 mm^{-1} auszugleichen sein wird. Dieses soll — zunächst als Arbeitshypothese — C=N-Chromophoren innerhalb der Peptidketten zugeschrieben werden.

Tabelle 10 führt in der letzten Spalte die bei der Alkalisierung von Aktomyosin (pH 7 auf 8,6) sich ergebende Differenzabsorption an, die

bei 3950 mm^{-1} ein scharfes Maximum aufweist.

Zur weiteren Klarstellung der vorhin hypothetisch angenommenen Diketopiperazinstrukturen sei folgende Realisierungsmöglichkeit hiermit zur Diskussion gestellt:

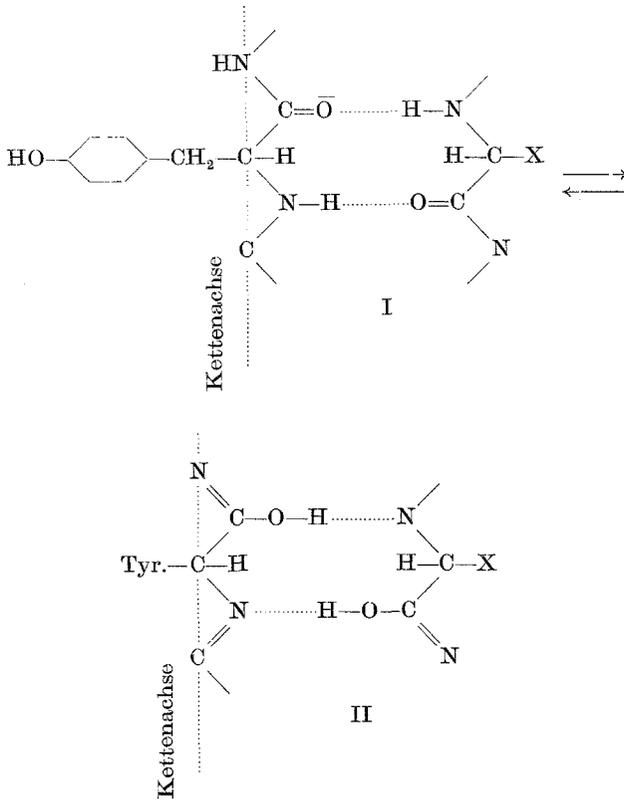


Tabelle 10. Alkalisierungseffekt bei Aktomyosinlösung:
pH 7,0 → 8,6.

ν' [mm ⁻¹]	$\log \epsilon'_{\text{pH } 7}$	$\log \epsilon'_{\text{pH } 8,6}$	$\epsilon'_{\text{pH } 7}$	$\epsilon'_{\text{pH } 8,4}$	$\Delta \epsilon'$
3670	1,08	1,08	12,0	12,0	0,0
3700	1,08	1,08	12,0	12,0	0,0
3800	1,03	1,08	10,7	12,0	1,3
3900	0,97	1,08	9,3	12,0	2,7
3950	0,95	1,08	8,9	12,0	3,1
4000	0,96	1,08	9,1	12,0	2,9
4050	1,01	1,11	10,2	12,9	2,7
4100	1,08	1,17	12,0	14,8	2,8
4150	1,20	1,26	15,8	18,2	2,4
4200	1,40	1,40	25,1	25,1	0,0

Hier würde II bezüglich der Stellung der $\text{C}=\text{N}$ -Gruppen zum Tyrosinchromophor mit II, S. 826, durchaus vergleichbar sein.

Es würde sich also nicht um „echte“ Diketopiperazinringe handeln, sondern um durch Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidketten realisierte „Pseudo“-Diketopiperazinringe.

Für eine derartige Interpretation spricht vor allem der Umstand, daß das Vorliegen richtiger Diketopiperazine in Eiweißstoffen zu schwer zu vereinbarenden Widersprüchen mit den aktuellen Ergebnissen der röntgenographischen Strukturuntersuchung führen würde. Ferner spricht für eine derartige Deutung die gesicherte Anwesenheit von Wasserstoffbrücken in Faserproteinen, wobei hauptsächlich auf Spektraluntersuchungen im Ultrarot hinzuweisen ist⁴⁵; außerdem das Verhalten des Aktomyosins gegenüber Säuren und Basen (vgl. S. 831), das mit den chemischen Eigenschaften echter Dioxopiperazine nicht in Einklang steht.

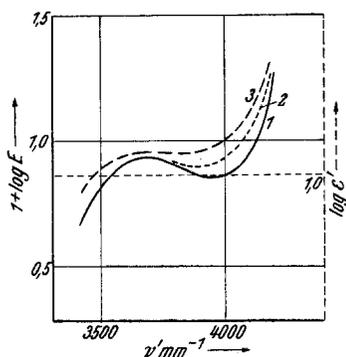


Abb. 7. Spektrum von Aktomyosinfilmen, in Wasser gequollen:

- 1: ungedehnt;
- 2: 2% gedehnt;
- 3: > 5% gedehnt.

Die Kurvenschar der Abb. 3 zeigt, daß die Lichtabsorption von Aktomyosin wesentlich unempfindlicher gegen pH-Änderungen ist, als das Spektrum der Modellösung I. Möglicherweise hängt diese mit der den Eiweißkörpern eigenen Pufferwirkung insofern auch zusammen, als die Enolisierung der Bindungssysteme eine beträchtliche Alkalität des Mediums zu kompensieren vermag.

Einflüsse mechanischer Eingriffe auf die Absorption.

Wird ein bis zur Volumkonstanz bei Zimmertemperatur in destilliertem Wasser gequollener Aktomyosinfilmen im Quellungsmittel gedehnt, so tritt im Absorptionsspektrum der in Abb. 7 dargestellte Effekt auf: Etwa innerhalb der ersten 10 Dehnungsprozente verändert sich die Kurve in gleicher Weise, wie wenn man bei ungedehnten gequollenen Filmen den pH-Wert des Quellungsmittels von zirka 7,3 auf 8,4 erhöht, oder wie wenn man die gleiche pH-Erhöhung an einer Lösung von Aktomyosin in Phosphatpuffer vornimmt. Tabelle II ergibt die Differenzabsorptionskurve zwischen ungedehnten und gedehnten Aktomyosinfilmen mit dem charakteristischen Maximum bei zirka 4000 mm^{-1} . Während aber der durch die pH-Änderung bewirkte spektrale Effekt erwartungsgemäß exakt reversibel ist, zeigte es sich, daß die durch die schwache Dehnung hervorgerufene Veränderung des Absorptionsspektrums gegen eine Erniedrigung des pH-Wertes bis auf Werte von 1 bis 2 vollständig unempfindlich ist.

Nachdem im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, daß die Absorptionsänderung des Aktomyosins bei einer Alkalisierung auf das Entstehen einer Enolform von diketopiperazinartigen Ringen unter Ausbildung chromo-

⁴⁵ A. M. Buswell, W. H. Rodebush und M. F. Roy, J. Amer. chem. Soc. 60, 2444 (1938).

phorer $\left. \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \right\} \text{C=N-Bindungen schließen läßt, legt der oben erwähnte Dehnungs-}$
effekt die Annahme nahe, daß auch bei einer Dehnung ein analoger Vorgang
stattfinden müsse.

Tabelle 11. Dehnungseffekt bei Aktomyosinfilmen pH 6 bis 7,
in Wasser gequollen.

ν' mm ⁻¹	log ϵ'_{unged}	log ϵ'_{ged}	ϵ'_{unged}	ϵ'_{ged}	$\Delta\epsilon'$
3700	1,08	1,09	12,0	12,3	0
3800	1,05	1,09	11,2	12,3	1,1
3900	1,00	1,09	10,0	12,3	2,3
3950	0,99	1,12	9,8	13,2	3,4
4000	1,00	1,14	10,0	13,8	3,8
4050	1,03	1,19	10,7	15,5	4,8
4100	1,09	1,24	12,0	17,4	5,4
4150	1,16	1,34	14,5	21,9	7,4
4200	1,40	1,43	25,1	26,9	1,8
4220	1,54	1,54	34,7	34,7	0

Mißt man nun das Volumen gequollener Filme während der Dehnung,
so ergeben sich die Kurven der Abb. 8, die erkennen lassen, daß das auf das

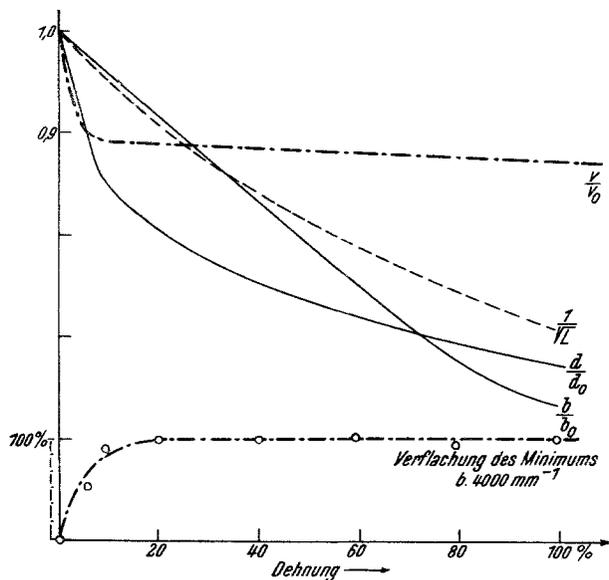


Abb. 8. Änderung der Breite, Dicke, des Volumens und Absorptionsspektrums in Wasser ge-
quollener Myosinfilme bei Dehnung.

Ausgangsvolumen V_0 bezogene Volumen V/V_0 genau in jenem Bereich
geringer Dehnung sprunghaft abnimmt, in dem das Spektrum die Ver-
flachung zeigt. Wie die Längen-, Breiten- und Dickenmessungen ergaben,
erfolgt der Volumeneffekt praktisch ausschließlich auf Grund einer sprung-

haften Abnahme der relativen Filmdicke D/D_0 , die sich ab $\sim 10\%$ Dehnung nach den Gesetzen der isotropen Dehnung (also nach $1/\sqrt{L}$) ändert und von $\sim 60\%$ ab gegen einen konstanten Endwert konvergiert, das heißt also, daß die Dehnung schließlich anisotrop wird. In diesem Stadium darf dann angenommen werden, daß sich die Teilchen im wesentlichen nur mehr in der Filmebene gegeneinander verschieben und die Filmlänge nur mehr auf Kosten der Breite zunimmt. Nun sinkt beim Eintrocknen der ursprünglich in Wasser gefällten, hochgequollenen Filme die Dicke um etwa das Zwanzigfache, während die Länge und Breite sich nur unwesentlich verändern. Quillt man solche Filme nun neuerlich in destilliertem Wasser, so werden folgende Quellungsfaktoren gemessen:

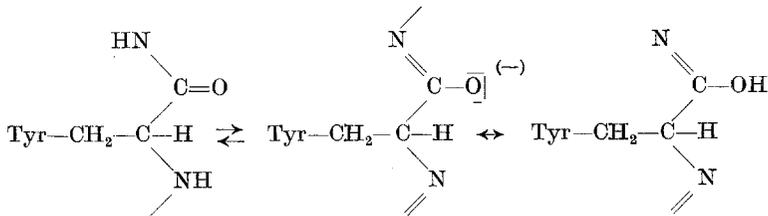
$$f_d \cong 2,85,$$

$$f_b \cong 1,10,$$

$$f_e \cong 1,05.$$

Dementsprechend ist bei neuerlich gequollenen Präparaten damit zu rechnen, daß die mittlere Teilchenentfernung normal zur Filmebene erheblich geringer sein muß, als parallel zu dieser. Tritt beim Dehnen eine Wechselwirkung zwischen den Fadenmizellen auf, so muß sich eine solche in erster Linie in Dickenänderungen bemerkbar machen, wie es auch bei unseren Versuchen tatsächlich der Fall ist.

Fassen wir kurz zusammen, so erkennen wir, daß im Anfangsstadium der Dehnung gequollener Aktomyosinfilme unter sprunghafter Dicken- (bzw. Volums-) Abnahme zweifellos eine dichtere Packung der Fadenmizelle erfolgt und daß dieser Vorgang spektral die gleiche Veränderung bewirkt wie eine Alkalisierung des Proteins, das heißt außer einer Verstärkung der phenolischen Tyrosindissoziation die folgende Enolisierung der intermolekularen Bindungen



unter Ausbildung von C=N -Chromophoren auf der Grundlage primär vorhandener Wasserstoffbrücken.

Es ist bemerkenswert, daß eine so geringfügige Dehnung, die sicher nur unbedeutende Lageverschiebungen der Fadenmizelle bewirken wird, einen Effekt erzielt, der das gleiche Ausmaß erreicht wie eine homogene Durchdringung des Proteins mit einer alkalischen Flüssigkeit. Das Problem läuft also darauf hinaus, zu entscheiden, ob es möglich erscheint, daß die bei den geringen Verschiebungen der Fadenmoleküle sehr kleine Anzahl realisierter zusätzlicher intermizellarer Berührungen eine Wirkung

auf das gesamte Eiweißgefüge ausüben kann. Gerade dies aber wird von der *Wirtzschen* Theorie⁴⁶ gefordert, die besagt, daß ein an einer Stelle einer Peptidkette erfolgter „Treffer“ (negative Aufladung einer peptidischen CO-Gruppe) eine Energiefortleitung über ganze Systeme von Ketten hinweg unter Ausbildung von $\begin{matrix} / \\ \text{C}=\text{N} \\ \backslash \end{matrix}$ -Bindungen in den Ketten bewirken kann. (Vgl. auch die Ausführungen von *O. Schmidt*⁴⁷.)

In vollem Einklang damit stehen Leitfähigkeitsmessungen an ungedehnten und gedehnten gequollenen Aktomyosinfilmen, die ergaben, daß die elektrische Leitfähigkeit solcher Filme gerade innerhalb des Dehnungsbereiches des Volumsdefektes sprunghaft zunimmt⁴⁸.

Es erschien ferner von Interesse zu untersuchen, inwiefern die spektrale Dehnungseffekt durch das Trocknen der gedehnten Filme beeinflusst werden kann. Es zeigte sich dabei, daß die an vier verschiedenen Präparaten gemessene Kurvenverflachung beim Trocknen der Präparate in einem erheblichen Ausmaß (zirka um 80%) zurückgeht. Auch diese Feststellung stützt die dargelegte Ansicht, daß der Effekt auf Bindungen zwischen den Ketten zurückgeht: bei Austritt des elektrolytisch leitenden Quellungsmittels aus den intermolekularen Räumen wird auch an den „Trefferstellen“ das Proton der genäherten Amidgruppe vom Stickstoff stärker angezogen werden und damit die Umlagerung von Form II in I (vgl. S. 835) vor sich gehen, was durch die Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration, wie erwähnt, nicht erreicht werden kann.

Beim Seidenfibroin liegen in Anbetracht der einzigen selektiv absorbierenden Aminosäure die Verhältnisse wesentlich einfacher: entnimmt man der spinnreifen Raupe den nativen Spinnsehlauch und legt ihn einige Min. in 2%ige Essigsäure (auch Alkohol kann verwendet werden), so wird der Inhalt der Drüse dehnbar⁴⁹ und kann durch gleichzeitiges Walzen und Dehnen in stark doppelbrechende Folien von zirka 4μ Dicke verwandelt werden (dabei ist nach der Essigsäurebehandlung die

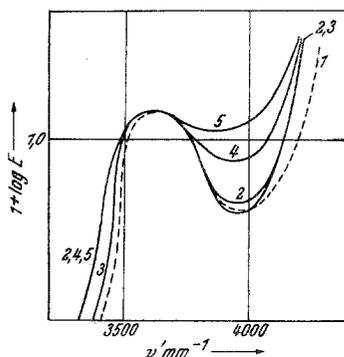


Abb. 9.

- 1: l-Tyrosin, pH = 8,4;
- 2: Seidenfibroinfilmen, nativ;
- 3: „ „ , gewalzt;
- 4: „ „ , gewalzt-gedehnt;
- 5: Kokonfäden.

⁴⁶ *K. Wirtz*, Z. Naturforsch. II b, 314 (1947).

⁴⁷ *O. Schmidt*, Naturwiss. 30, 644 (1942).

⁴⁸ *E. Schauenstein* und *E. Treiber*, J. makrom. Chem. 4, 92 (1949).

⁴⁹ *O. Kratky* und *S. Kuryama*, Z. physik. Chem., Abt. B 11, 363 (1931).

karotinhaltige Hülle zu entfernen). Die Essigsäurebehandlung ändert auch bei langer Dauer das Spektrum von nativem Fibroin nur sehr geringfügig, obgleich die Säure ein pH von sicher < 3 besitzt und — wie die durch sie bewirkte Dehnbarkeit zeigt — sicher in beträchtlichem Ausmaß das Protein durchsetzt. Trotzdem entspricht das Spektrum nur einer pH-Erniedrigung von zirka 0,2 pH. Es wäre denkbar, diese Erscheinung mit einem Einbau der Tyrosinmoleküle in den kristallinen Anteil des Proteins in Zusammenhang zu bringen. Bloßes Walzen bringt das pH im Film wieder auf 8,4, wobei vermutlich die eingedrungene Säure wieder ausgepreßt wird. Auch die meisten der gewalzt-gedehnten Filmpräparate zeigen das diesem pH-Wert entsprechende Absorptionsspektrum. Es finden sich aber auch, in geringer Anzahl, Filme mit Spektren, wie sie beispielsweise die Kurve 4 der Abb. 9 wiedergibt. Die folgende Übersicht orientiert über das Ausmaß der beobachteten spektralen Veränderungen¹⁰.

Tabelle 12.

Seidenfibroin, gewalzt-gedehnt	Extinktions- erhöhung in log <i>m</i> bei 4050 mm ⁻¹	
Präparat I . . .	0,16	Fehlergrenze: ± 0,03 in log <i>m</i>
„ II . . .	0,06	
„ III . . .	0,07	
„ IV . . .	0,12	
„ V . . .	0,15	

In bemerkenswerter Analogie zu dem sonst jedenfalls grundsätzlich anders gearteten Muskelprotein konnten wir also auch beim Protein der Seide eine durch mechanische Eingriffe hervorgerufene Hebung des Absorptionsminimums im Gebiete von 4000 mm⁻¹ feststellen (Tabelle 13).

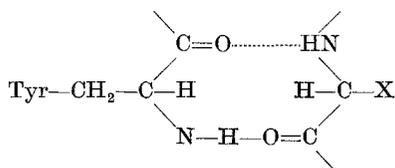
Tabelle 13. Dehnungseffekt bei Seidenfibroin, pH 8,4 (Präparat V der Tabelle 12).

ν mm ⁻¹	Nativ (1 + log <i>E</i>)	Gew. ged. (1 + log <i>E</i>)	Nativ <i>E</i> · 10	Gew. ged. <i>E</i> · 10	$\Delta(E \cdot 10)$
3600	1,12	1,12	13,2	13,2	0
3650	1,10	1,10	12,6	12,6	0
3700	1,06	1,08	11,5	12,0	0
3800	0,95	1,02	8,9	10,5	1,6
3900	0,86	0,98	7,3	9,6	2,3
3950	0,84	0,97	6,9	9,3	2,4
4000	0,85	0,99	7,1	9,8	2,7
4050	0,90	1,05	7,9	11,2	3,3
4100	1,02	1,14	10,5	13,8	3,3
4150	1,27	1,30	18,6	20,0	1,4
4170	1,38	1,38	24,0	24,0	0

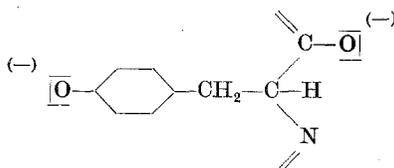
Vergleicht man die so erhaltenen Absorptionskurven mit den Spektren der verschiedenen Dissoziationsstufen des Tyrosins (Abb. 1), so ergibt sich eindeutig, daß die eingetretene spektrale Veränderung sicherlich nicht mit einer Änderung des phenolischen Dissoziationszustandes der im Fibroin enthaltenen Tyrosinmoleküle erklärt werden kann.

Der bei den erwähnten Präparaten gemessene flachere Kurvenverlauf ergibt vielmehr eine Überlagerung durch eine im Gebiete von etwa 4000 mm^{-1} zusätzlich auftretende Absorption.

Nun scheint es nach den bisherigen Ergebnissen naheliegend, anzunehmen, daß bei einem bestimmten Verhältnis von Dehnungszug und Walzdruck die gestreckten Peptidketten so zueinander zu liegen kommen, daß sich Wasserstoffbrücken zwischen ihnen ausbilden können, die im nativen Stadium nicht vorhanden waren. Die Existenz solcher Wasserstoffbindungen in orientierten Seidenpräparaten wurde unter anderem schon von *Coleman* und *Howitt*⁵⁰, *Brill*⁵¹ und anderen auf Grund röntgenographischer Messungen des Kettenabstandes wahrscheinlich gemacht. Befindet sich an dem zwischen zwei solchen Brücken befindlichen aliphatischen Kohlenstoffatom nun ein Tyrosinrest, so ist, wie auf S. 835 u. f. dargestellt, zu erwarten, daß der hierdurch gebildete Pseudo-Diketopiperazinring:



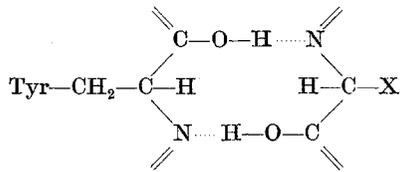
die Absorption dieses Tyrosinteilchens wiederum analog wie etwa im Glycyltyrosinanhydrid beeinflusst. Da nun aber im Seidenfibroin, wie auf S. 828 näher begründet wurde, ein pH von zirka 8,4 die Lage sämtlicher Dissoziationsgleichgewichte beherrscht, wird der Ladungszustand im Protein mehr gegen die Form



verschoben sein. Dieser Zustand stellt sicher die optimale Bedingung für die Ausbildung der Brückensysteme nach

⁵⁰ *D. Coleman* und *F. O. Howitt*, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **190**, 145 (1947).

⁵¹ *R. Brill*, Naturwiss. **29**, 220 (1941).



dar, womit bei vollständiger Beteiligung aller Tyrosinchromophore das Spektrum des Glycyltyrosinanhydrids bei pH 8,4 (Kurve 3, Abb. 2)

zuzüglich der durch die $\text{C}=\text{N}$ -Gruppen verursachten zusätzlichen Bande bei etwa 4000 mm^{-1} zu erwarten wäre. Das Kurvenbeispiel 2 der Abb. 9 zeigt, daß dies nicht der Fall ist; die gemessenen Kurven können vielmehr durch eine teilweise Überlagerung der Kurven von Seidenfibroin bei pH 8,4 und einer Bande bei $4000 \nu'$ erhalten werden.

Sicher wird bei der Ausbildung der $\text{C}=\text{N}$ -Bindungen wieder ein Teil der Tyrosinreste die anhydridartige Ringbindung eingehen, doch kann der Bruchteil nicht erheblich sein (vgl. Abb. 11 b). Die Kurven der Abb. 9 können daher in guter Näherung durch Überlagerung der Kurve 2, Abb. 9 oder Abb. 11 b mit einer zusätzlichen Bande bei 4000 mm^{-1} erhalten werden.