

Lichtabsorption von Eiweißstoffen II.

(UV.-Absorption im polarisierten Licht; Tyndall-Schwächung im UV.)

Von

E. Schauenstein.

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

Mit 3 Abbildungen.

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

Am Schluß von I wurde dargelegt, daß eine bei gewalzt-gedehnten Präparaten von Seidenfibroin im Gebiete von 4000 mm^{-1} auftretende zusätzliche Absorption am befriedigendsten durch die Ausbildung von C=N-Bindungen innerhalb der achsenparallel orientierten Peptidketten erklärt werden kann. Zur Stützung dieser Annahme müßte nun natürlich vor allem der experimentelle Beweis dafür erbracht werden, daß die an entsprechend gewalzt-gedehnten Präparaten beobachteten Extinktionserhöhungen im Gebiete von 4000 mm^{-1} tatsächlich einer echten π -Bindung angehören. Eine Betrachtung des Schemas I, S. 835¹, ergibt als wesentlichstes Kriterium den charakteristischen Winkel der C=N-Chromophore zur Achse der gestreckten Polypeptidketten, die im großen und ganzen mit der Dehnungsrichtung und Lösungsrichtung zwischen gekreuzten Nikols zusammenfallend angenommen werden darf.

Es lag nun nahe, die von *Scheibe*² in grundlegenden Arbeiten untersuchte Richtungsabhängigkeit der UV.-Absorption ebener Chromophore zu einer Prüfung der hier aufgeworfenen Frage heranzuziehen. Nun ist die C=N-Bindung nicht als ebener, sondern als linearer Chromophor vorzustellen. Es erschien somit notwendig, vorerst im Modellversuch zu untersuchen, wie sich solche Resonatoren im polarisierten Licht verhalten, bevor man die Ergebnisse von Polarisationsmessungen an orien-

¹ Zitate aus der vorausgehenden Arbeit I werden mit „I, Seitenzahl“ gegeben.

² G. Scheibe, St. Hartwig und R. Müller, Z. Elektrochem. **49**, 372 (1943).

tierten Präparaten von Seidenfibroin im Hinblick auf strukturelle Gesichtspunkte diskutiert. Hierfür erwies sich der CO-Chromophor aus zweierlei Gründen am geeignetsten:

1. Die CO-Gruppe verhält sich bezüglich ihrer Ultraviolettabsorption sehr ähnlich der C=N-Gruppe, wie aus den im folgenden zitierten Messungen sicher hervorgeht: Nach Untersuchungen von *Meisenheimer* und *Dorner*³ zeigt das Benzophenonimid die Bande des Benzophenons; außerdem besitzen alkalische Lösungen von Oximen $\left(\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{N}-\text{O} \end{array} \right)^{(-)}$ sowie deren Stickstoffäther $\left(\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{N}-\text{R} \end{array} \right)$ mehr oder weniger ausgeprägte Maxima im Gebiete der CO-Bande. Auch *Burawoy*⁴ hat auf die Parallelität zwischen $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{N} \end{array}$ und $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{O} \end{array}$ hingewiesen.

2. Substanzen mit CO-Gruppen vereinigen eher die entscheidenden Voraussetzungen für einen solchen Versuch, nämlich eine gute Kristallisationsfähigkeit und röntgenographisch ermittelte Struktur.

Als günstigster Modellkörper erschien das p-Benzochinon, von dem schon *Scheibe*² erwähnt hat, daß die O=C...C=O-Achse nur in einer Richtung Licht absorbieren könne. Das Absorptionsspektrum von Benzochinon zeigt eine vom anschließenden aromatischen Bandensystem scharf abgesetzte CO-Vorbande bei 2250 mm⁻¹, die die Grundannahme rechtfertigt, daß im Gebiete unterhalb dieser Wellenzahl ausschließlich die Carbonylgruppe an der Absorption beteiligt ist. Nach den röntgenographischen Angaben von *Robertson*⁵ liegen die Benzolebenen in der 20 $\bar{1}$ -Ebene des monoklin-holoedrischen Elementarkörpers derart, daß die O=C...C=O-Achsen miteinander einen Winkel von 79° einschließen.

Zur Aufnahme wurden daher entsprechend große, 35 bis 80 μ dicke Einkristalle aus p-Benzochinon so vor dem Spektrographenspalt justiert, daß die 20 $\bar{1}$ -Ebene parallel zur Ebene des senkrecht schwingenden Vektors zu liegen kam⁶.

Das hier in der Hauptsache interessierende CO-Maximum erlaubt infolge seiner langwelligen Absorptionslage die Verwendung eines normalen *Nikolschen* Doppelp Prismas als Polarisator, das, auf einem Teilkreis befestigt, unmittelbar vor dem sauber ausgeblendeten Präparat in der optischen Achse des Spektrographen justiert wurde. Das jeweils nötige Vergleichsspektrum, das hier außerdem den besonders wichtigen Zweck der Kompensation der „Eigenpolarisation“ der Spektrographenoptik erfüllte, wurde nach Entfernung des Präparats bei sonst völlig unverändertem optischem System im Anschluß an die Absorptionsserie aufgenommen. Nun konnte bei beliebigen Winkeln zwischen Schwingungsrichtung des Vektors und

³ *J. Meisenheimer* und *O. Dorner*, *Liebigs Ann. Chem.* **502**, 156 (1933).

⁴ *A. Burawoy*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **63**, 3164 (1930).

⁵ *J. M. Robertson*, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. A **106**, 106 (1935).

⁶ Versuche mit *J. O. Fizzl*.

CO-Achse die Absorptionsbande des Kristalls ausgemessen werden. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle niedergelegt.

Tabelle 1. Richtungsabhängigkeit der Lichtabsorption in kristallinem p-Benzochinon ($\nu' = 2260 \text{ mm}^{-1}$).

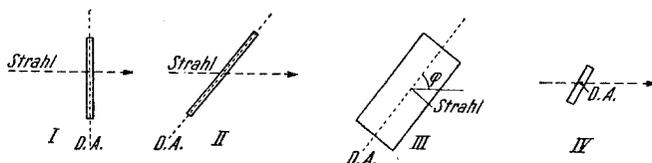
φ	0°	15°	30°	45°	50°	70°	90°
$m \dots\dots$	490	440	270	200	160	105	90

Das Spektrum zeigt die ausgeprägte Struktur der CO-Bande und deren größte Intensität bei paralleler Schwingung des Vektors zur CO-Achse, während unter 90° zu dieser lediglich eine verwaschene Andeutung eines Bandes beobachtet werden kann; die Absorptionsintensitäten in den beiden Schwingungsrichtungen unterscheiden sich um rund das Fünffache im Extinktionsmodul m . Auch die linearen Chromophore, wie die CO-Gruppe, zeigen, ganz im Einklang mit den Mitteilungen *Scheibes*, eine starke Richtungsabhängigkeit der Lichtabsorption, wobei der Anisotropieeffekt etwa die Hälfte des bei Benzol gemessenen Wertes beträgt. Von besonderem theoretischem Interesse ist es, auch die Winkel­funktion der Absorption zu ermitteln. Die erhaltene Kurve läßt sich auch rechnerisch wiedergeben und spricht für die Annahme, daß „lineare“ Chromophore (C=O) praktisch nur in zwei aufeinander normalen, aber in einer Ebene liegenden Richtungen angeregt werden. Die Extinktionen in beiden Richtungen unterscheiden sich etwa um das 4- bis 5fache, wobei die Bindungsachse die Richtung der größten Extinktion darstellt. Eine ausführliche experimentelle und theoretische Behandlung des hier aufgeworfenen Problems steht noch aus und wird demnächst gemeinsam mit *J. O. Fixl* veröffentlicht werden.

Die Winkelfunktion zeigt, daß die Absorptionsintensität linearer Chromophore nur in einem recht eng begrenzten Winkelbereich von zirka $\mp 15^\circ$ keinen erheblichen Abfall zeigt, unter 45° aber nur mehr $\sim 40\%$ ihres Maximalwertes besitzt.

Nun wurden mit der von *Scheibe*² entwickelten Polarisationsanordnung Seidenfibrinfilme, die in ihrem flachen Absorptionsband das Auftreten des Zusatzchromophors erkennen ließen, in verschiedenen Richtungen spektrographiert.

Im einzelnen wurden die Präparate folgendermaßen durchstrahlt:



D. A. = Dehnungsachse.

Dabei zeigten sich grundsätzlich zwei Polarisierungseffekte⁷, und zwar:

1. Das durch Auftreten einer zusätzlichen Absorption im Gebiete von 4000 mm^{-1} hervorgerufene flache Absorptionsband konnte *lediglich bei Stellung III* beobachtet werden (Abb. 2), während bei den Stellungen I, II und IV das normale Fibroinspektrum (vgl. etwa Abb. 2) auftrat. Im einzelnen wurde der Grad der Flachheit der Kurve (als Maß für die Intensität der Zusatzabsorption) in Abhängigkeit von einer Drehung des nach III justierten Präparats um einen Winkel φ (Schwingungsrichtung gegen Horizontale) ermittelt und in Abb. 1 gegen diesen Drehungswinkel graphisch aufgetragen (Tabelle 2).

Tabelle 2. Relative Intensität J der Zusatzabsorption in Stellung III als $f(\varphi)$.

φ	45°	50°	54°	63°	75°	90°
$J \dots$	1	1	1	0,88	0,37	0,15

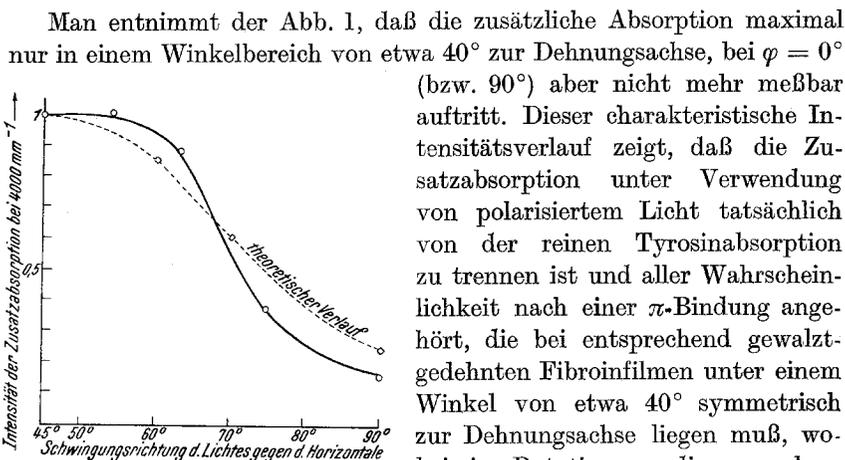


Abb. 1.

Von besonderer Bedeutung erscheinen in diesem Zusammenhang die Untersuchungen von *Bath* und *Ellis*⁸, die bei orientierten Fäden von Seidenfibroin auf Grund der Messung der CO-Bande in linear polarisiertem Infrarot feststellen konnten, daß in derartigen Präparaten die CO-Gruppen in einer Ebene *normal zu der Faserachse* liegen. Nach den in I, S. 841 u. f. entwickelten Vorstellungen über die Zuordnung des richtungsabhängigen Absorptionsinkrementes ist nun zu

⁷ E. Schauenstein, J. Fixl und O. Kratky, Mh. Chem. 80, 143 (1949).

⁸ J. D. Bath und J. W. Ellis, J. physic. Chem. 45, 204 (1941).

schließen, daß es sich hierbei aller Wahrscheinlichkeit nach in der Tat um die in der Theorie von *Wirtz* geforderten, bei Ausbildung von Wasserstoffbrücken auftretenden C=N-Bindungen handeln wird. Die Tatsache, daß die auf Grund der bisherigen Versuche diesen Bindungen zugeordnete zusätzliche Absorption bei zur Dehnungsachse parallel schwingendem Lichtvektor kaum mehr meßbar ist, erklärt sich daraus, daß diese Bindungen als lineare Chromophore unter 45° eben nur mehr $\sim 40\%$ ihrer Maximalabsorption zeigen. Dieser Absorptionsbetrag liegt aber in Anbetracht der starken Absorption der aromatischen Aminosäure bereits innerhalb der Fehlergrenze der Messung.

2. Bei den Stellungen I, II und IV resultiert das normale Tyrosinmaximum, wobei aber, wie Abb. 2 zeigt, die normal zueinander schwingenden Vektoren verschieden stark absorbiert werden. Die Abb. läßt erkennen, daß der parallel zur Dehnungsachse schwingende Lichtstrahl um

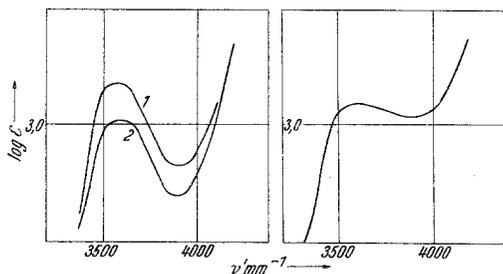


Abb. 2 a. 1: Vektor \parallel Faserachse
2: „ \perp „ „

Abb. 2 b. Vektoren $\pm 45^\circ$ zur Faserachse.

mehr als 0,1 in $\log m$ stärker absorbiert wird, als der normal dazu schwingende. Allgemein läßt dies eine orientierte Lage der Benzolebenen der in die Peptidketten eingebauten Tyrosinmoleküle erkennen. Für eine Diskussion dieses zweiten Polarisationseffektes sind folgende Gesichtspunkte maßgeblich: Der unter 1 geschilderte Effekt läßt erkennen, daß die C=N-Bindungen im wesentlichen (innerhalb eines Winkelbereiches von etwa 30°) als in einer *Ebene*, nämlich der Filmebene, liegend angenommen werden dürfen. Daraus folgt, daß auch für die Benzolebenen der Tyrosinmoleküle keine rotationssymmetrische Lage, sondern eine Variation der Lagen in etwa dem gleichen Winkelbereich um die Dehnungsachse erwartet werden muß.

Das Ausmaß des Anisotropieeffektes beträgt etwa ein Zehntel des für den Benzolechromophor zu erwartenden Effektes im Falle vollständiger, zu den Schwingungsebenen paralleler Orientierung. Im Hinblick auf die Unsicherheit näherer Aussagen über die freie Drehbarkeit der Tyrosinebenen im Eiweißmolekül erscheint eine rechnerische Auswertung des beobachteten Anisotropieeffektes mit dem Ziel der Angabe eines bestimmten Winkels derzeit doch noch zu gewagt.

Mit Sicherheit läßt sich daher der unter 2 geschilderte Effekt zunächst nur dahingehend deuten, daß bei in ganz bestimmter Art gewalzt-gedehnten Seidenfibröinfilmern die Benzolebenen der peptidgebundenen

Tyrosinmoleküle nicht mehr wie ursprünglich völlig regellose Lagen besitzen, sondern ebenfalls mitorientiert werden. Dabei tritt sicher kein Einschwenken in die Walzebene, noch eine zur Schwingungsebene eines der beiden senkrecht zueinander schwingenden Lichtvektoren vollständig parallele Orientierung ein; es ist vielmehr mit einer Schrägstellung der Tyrosinebenen zur Dehnungsachse zu rechnen, die, wie Abb. 3 veranschaulicht, sterisch auch tatsächlich möglich ist und im äußersten Falle etwa 40° zur Dehnungsachse betragen kann.

Bemerkenswert ist, daß eine meßbare Orientierung der Tyrosinebenen nur dann beobachtet werden konnte, wenn das untersuchte Präparat die flache Absorptionskurve, das heißt das *Auftreten der zusätzlichen Absorption im Gebiete von 4000 mm^{-1}* erkennen läßt. Ein kausaler Zusammenhang zwischen den beiden Effekten, der fraglos bestehen wird, kann nach dem derzeitigen Stand der Untersuchungen noch nicht plausibel gemacht werden. —

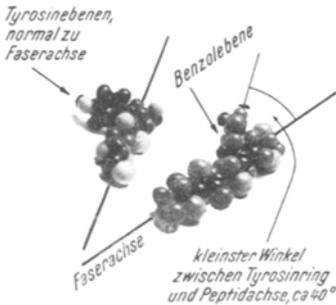


Abb. 3.

Aus den mitgeteilten Ergebnissen geht aber jedenfalls hervor, daß der Begriff „höhere Orientierung“ beim Seidenfibroin differenzierter ist, als bisher angenommen wurde, indem höher orientierte Zustände mit und ohne Ausbildung zusätzlich absorbierender π -Bindungen in den Peptidketten mit orientierten Tyrosinmolekülen realisierbar sind. Eine röntgenographische Unterscheidung beider Orientierungszustände erscheint nach den bisherigen Versuchen noch nicht eindeutig möglich. Die Messung der Doppelbrechung an Filmen beider Orientierungstypen ergab, daß die am stärksten gedehnten Walzpräparate mit den höchsten Doppelbrechungswerten von 7×10^{-3} bis 1×10^{-2} niemals eine Zusatzabsorption bzw. einen Orientierungseffekt der Tyrosinchromophore erkennen ließen, sondern daß nur Filme mit geringeren Doppelbrechungswerten von im Mittel 3×10^{-3} die Effekte zeigen. Besonders hohe Dehnungskräfte bzw. Walzdrucke sind demnach zur Einstellung dieses Zustandes nicht notwendig. Es erscheint daher von besonderem Interesse zu untersuchen, welchem Zustand der von der Raupe gesponnene Seidenfaden angehört. Selbstverständlich stößt eine spektrographische Aufnahme eines nur wenige μ dicken Kokonfadens auf erhebliche methodische Schwierigkeiten. Trotzdem gelang es in Versuchen mit *J. Fixl*, eine solche Aufnahme herzustellen, an die natürlich nicht die gleichen Anforderungen bezüglich Meßgenauigkeit gestellt werden dürfen, wie an normale Spektrogramme. Die Kurve 5 der Abb. 9 in I zeigt ein solches Spektrum, aus dem hervorgeht, daß auch im natürlichen Seiden-

faden die Zusatzabsorption, und zwar in viel stärkerem Ausmaß auftritt als in den künstlich orientierten Filmpräparaten. Dies bedeutet, daß jedenfalls beim Spinnen des Kokonfadens durch ein vielseitiges Abgleiten der Ketten aneinander (vgl. Brill⁹) ein Maximum an Wasserstoffbrücken ausgebildet wird, zu dessen Erreichung, wie aus dem Vorhergehenden folgt, nicht die Größe der auf das Protein ausgeübten mechanischen Kräfte, sondern die Art ihres Angreifens maßgebend ist.

Auch an höchstgedehnten (bis zu 400 Dehnungsprozent) Myosinfilmen wurden ultraviolette Polarisationsmessungen mit *E. Bürgermeister* ausgeführt. Es konnten bei diesen Präparaten jedoch keinerlei meßbare Anisotropieeffekte, weder der Tyrosin- bzw. Tryptophanebenen, noch der zusätzlichen Absorption gefunden werden. Das Fehlen einer experimentell sicher nachweisbaren, bevorzugten Absorptionsrichtung des Zusatzchromophors kann man damit erklären, daß diese Filme keiner Walzung unterworfen werden können, womit auch die Voraussetzung für ein Einschwenken der C=N-Bindungen in die Filmebene in diesem Falle nicht gegeben erscheint. In solchen Myosinfilmen sind daher die C=N-Bindungen der Peptidketten rotationssymmetrisch unter etwa 40° zur Dehnungsachse geneigt anzunehmen, wodurch Anisotropieeffekte nicht mehr sicher meßbar werden dürften. Das Fehlen einer Anisotropie der aromatischen Aminosäuren deutet auf die ohne Zweifel erheblich kompliziertere Struktur des Aktomyosinteilchens, auf die schon *Szent-Györgyi*¹⁰ in seiner Theorie der Schraubenform des Aktomyosinteilchens aufmerksam gemacht hat. Eine Bestätigung dieser Auffassung scheint auch durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Aktomyosin, wie sie von *G. Rosza* und *M. Staudinger*¹¹ veröffentlicht wurden, gegeben zu werden.

Soweit es das bisher untersuchte Material erlaubt, muß demnach die allgemeine Frage, ob eine Wechselwirkung zwischen den Peptidketten das ultraviolette Absorptionsspektrum von Fasereiweißstoffen zu verändern vermag, bejaht werden. Es handelt sich dabei stets um eine selektive Zunahme der Absorption im Gebiete von 4000 mm^{-1} ¹². Die uns derzeit am befriedigendsten erscheinende Deutung vertritt die Ansicht, daß zwischenmolekulare Wasserstoffbrücken zu einer Er-

⁹ *R. Brill*, Naturwiss. **29**, 220 (1941).

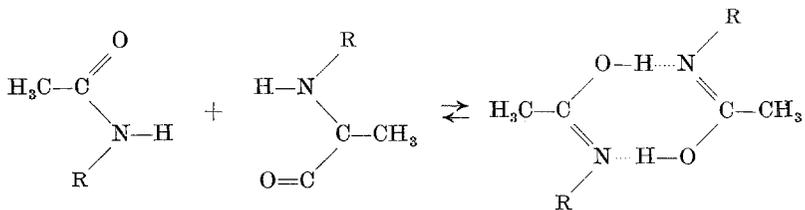
¹⁰ *A. Szent-Györgyi*, Chemistry of Musc. Contr. New York. 1947.

¹¹ *G. Rosza* und *M. Staudinger*, J. makromol. Chem. **2**, 66 (1947).

¹² Bemerkenswerterweise wurde auch von *Scheibe* [*A. Butenandt* und *G. Scheibe*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **274**, 276 (1942)] eine ganz ähnliche zusätzliche Absorption bei Tabakmosaikvirus beobachtet, die allerdings auf eine chromophore Verbindung zurückgeführt wurde; es ist sehr wahrscheinlich, daß es sich aber hierbei auch um fermentativ spaltbare Bindungs-chromophore handeln wird.

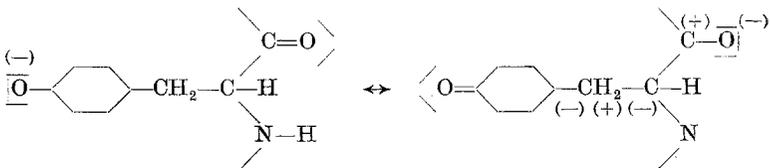
höhung der Absorption führen, die auf die Ausbildung von $\text{C}=\text{N}$ -Bindungen zurückgeht. Auf Grund solcher Ringsysteme, an denen durchaus nicht die gesamten Tyrosinreste beteiligt zu sein brauchen, können im alkalischen Gebiete und bei Dehnungen innerhalb der Ketten weitere $\text{C}=\text{N}$ -Bindungen auftreten.

Auch das von *Rodebush*¹³ auf Grund von Infrarotmessungen festgestellte Verhalten von einfach N-alkylsubstituierten Amiden spräche sehr für eine solche Annahme: bei zunehmender Teilchenassoziation fand *Rodebush* eine scharfe, für H-gebundene OH-Gruppen charakteristische Frequenz bei $3,03 \mu$, so daß der Vorgang nach *Rodebush* folgendermaßen formuliert wurde:



Es ist dabei besonders interessant, daß *Rosebush* auf ein im Infrarot analoges Verhalten von Proteinen, nämlich Gelatine, ausdrücklich aufmerksam macht.

Die Ausbildung solcher Brückensysteme wird sicherlich begünstigt, wenn das Protein sich im nativen Zustand in einem Dissoziationsstadium befindet, das eine Enolisierung der Peptidbindungen zum mindesten begünstigt. Vom Standpunkt der „alternierenden Polaritäten“ aus betrachtet, wäre es durchaus denkbar, daß auch eine Ionisierung des phenolischen Hydroxyls des Tyrosins die Ausbildung der enolisierten Peptidbindung begünstigen kann:



Es erscheint somit verständlich, daß ein solches Protein im nativen Zustand ein relativ hohes „Eigen-pH“, das heißt das Spektrum eines bereits meßbar phenolisch dissoziierten Tyrosins aufweist, wie es das native Seidenfibroin auch tut. In diesem Falle bilden sich dann bei Annäherung der Ketten die Brücken erst sekundär aus.

¹³ A. M. Buswell, W. H. Rodebush und M. F. Roy, J. Amer. chem. Soc. 60, 2444 (1938).

Es wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein müssen, zu beweisen, ob die in den Spektren der beiden bisher gemessenen Faserproteine beobachtete Zusatzabsorption sich nur in der Absorption aromatischer Aminosäuren zu erkennen gibt, oder auch bei Proteinen bereits meßbar stark auftritt, die nur aliphatische Aminosäuren als Bauelemente enthalten (z. B. Kollagen). Damit könnte endgültig ausgesagt werden, ob aus der Anwesenheit bzw. dem Fehlen des zusätzlichen Chromophors im Gebiete von 4000 mm^{-1} Rückschlüsse auf die Anwesenheit von zwischenmolekularen H-Brücken im allgemeinen oder nur im Hinblick auf damit in Resonanz stehende aromatische Chromophore erlaubt sind. Auch die von *Coleman* und *Howitt*¹⁴ festgestellte Lösung von H-Brücken in Seidenfibroin durch Cupriäthylendiamin soll spektral untersucht werden.

Die bei der Alkalibehandlung in der Hitze beobachtete Ausbildung der Absorptionsbande von Glycyltyrosinanhydrid (I, S. 828 u. f.) läßt erkennen, wie leicht sich — möglicherweise nur durch die Temperaturerhöhung — in Faserproteinen Strukturen ausbilden können, die spektral als Diketopiperazine anzusprechen sind. Ob es sich dabei tatsächlich um echte Diketopiperazin- (Hauptvalenz-) Ringe oder etwa um durch H-Brücken hergestellte Pseudoringe handelt, steht noch nicht fest. Sicher ist, daß in dem beobachteten Effekt die Voraussetzung für die schließliche Bildung echter Diketopiperazinringe erblickt werden kann, die beim chemischen Abbau des Seidenfibroins von *Abderhalden* schließlich isoliert werden konnten (vgl. auch I, S. 829).

Messungen über die im Ultraviolett durch Tyndall-Effekt hervorgerufene Lichtabsorption.

Die Messung der durch seitliche Streuung hervorgerufenen Ultraviolettabsorption von Eiweißkörpern erscheint unter anderem in zwei verschiedenen Richtungen von grundsätzlicher Bedeutung: als Korrektur von absorptionsspektrographischen Aufnahmen für die Diskussion echter chromophorer Effekte; andererseits, um aus der Messung der Intensität (unter Umständen der Polarisation) der Streustrahlung Aufschlüsse über die Teilchengröße bzw. Teilchenform zu erhalten.

Bei der Diskussion ultravioletter Proteinspektren ist stets der Intensität der Streustrahlung Rechnung zu tragen, da sonst infolge der beträchtlichen Teilchengröße erhebliche Fehler entstehen können. Grundsätzlich gibt es hierfür zwei Möglichkeiten: Entweder man wendet näherungsweise eine einfache Korrektur derart an, daß man dem durch seitliche Abbeugung bewirkten Intensitätsverlust im durchgehenden Lichtstrahl durch eine Verlängerung der Belichtungszeit Rechnung trägt.

¹⁴ *D. Coleman* und *F. O. Howitt*, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A 190, 145 (1947).

In Versuchen mit *E. Treiber*¹⁵ erwies sich der auf die Einheit von Konzentration und Schichtdicke bezogene Verlängerungsfaktor $p \cdot \log f/c' d$ für Aktomyosinlösungen von pH 6 bis 7,4 als praktisch konstant, begann bei pH 9 merklich abzusinken und betrug bei pH 13 weniger als ein Fünftel des ursprünglichen Wertes.

Tabelle 3. Verlängerungsfaktor für die Exposition von Aktomyosinlösung als Funktion des pH.

pH	7,0	8,0	9,0	11—13
$p \cdot \log f/c' d \dots$	2,5	2,4	1,7	0,4

Im Vergleich hierzu seien Angaben von *Deutike*¹⁶ erwähnt, nach denen das Aktomyosinteilchen bei Erhöhung der Alkalität in kleinere Bruchstücke zerfällt (vgl. *Svedberg*¹⁷ und *Holwerda*¹⁸).

Nach einer vorsichtigen Schätzung beträgt der im Gebiete von pH 7 bis 8 bei der angegebenen näherungsweise *Tyndall*-Korrektur noch mögliche Fehler im ungünstigsten Falle etwa 20% des Extinktionskoeffizienten.

Für eine exakte *Tyndall*-Korrektur muß natürlich die *Frequenzabhängigkeit* der Streustrahlintensität berücksichtigt werden. Grundsätzliche Untersuchungen in dieser Richtung liegen auf dem Eiweißsektor bereits von *Schramm* und *Dannenberg*¹⁹ vor. (vgl. auch hierzu die Absorptionsmessungen am Tabakmosaikvirus von *Lavin*, *Loring* und *Stanley*²⁰). Die von *Schramm* und *Dannenberg* angewendete Methode beruht auf folgenden zwei Annahmen: zunächst auf der Gültigkeit des *Rayleighs*chen Gesetzes:

$$\varepsilon_{\text{Tyndall}} = K \cdot \lambda^{-4},$$

worin $\varepsilon_{\text{Tyndall}}$ den Extinktionskoeffizienten lediglich der *Tyndall*-Streuung und K eine Konstante bedeutet, die in erster Linie vom Teilchenvolumen abhängt. Der Wellenlängenexponent kann sich zwischen 0 und 4,0 bewegen und darf in Spektralbereichen, in denen keine echte Absorption auftritt, als konstant angenommen werden²¹. Der Wert von 4,0 tritt aber nur bei Teilchen auf, deren Durchmesser (bzw. lange Achse bei

¹⁵ *E. Schauenstein* und *E. Treiber*, J. polymer. Sci. (im Druck).

¹⁶ *J. H. Deutike*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **224**, 216 (1934).

¹⁷ *T. Svedberg*, *L. M. Carpenter* und *D. C. Carpenter*, J. Amer. chem. Soc. **52**, 241 (1930).

¹⁸ *B. J. Holwerda*, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **50**, 601 (1931).

¹⁹ *G. Schramm* und *Dannenberg*, Ber. dtsh. chem. Ges. **77**, 53 (1944).

²⁰ *G. J. Lavin*, *N. S. Loring* und *W. M. Stanley*, J. biol. Chem. **130**, 259 (1939).

²¹ *W. Heller* und *E. Vassy*, J. chem. Physics **14**, 565 (1946).

axial asymmetrischen Teilchen) kleiner ist als ein Zehntel der betreffenden Wellenlänge (vgl. auch die Theorie von *G. Mie*²²). Der bei Aktomyosin nach der auf S. 852 prinzipiell geschilderten Meßmethodik gefundene Exponent von λ beträgt beispielsweise im Mittel 3,2, bei einem Fehler von $\mp 0,15$ ¹⁵.

Außerdem setzen *Schramm* und *Dannenber* voraus, daß zwischen *Tyndall*-Absorption und wahrer Absorption strenge Additivität besteht. Beide Grundannahmen werden in der zitierten Arbeit experimentell überzeugend belegt, indem zunächst bei zwei Wellenlängen λ_1 und λ_2 im absorptionsfreien Gebiet zwei Werte von $\varepsilon_{\text{Tyndall}}$ gemessen werden, woraus sich der Wellenlängenexponent nach dem Ausdruck

$$(\log \varepsilon_{T_1} - \log \varepsilon_{T_2}) / (\log \lambda_2 - \log \lambda_1)$$

im Mittel für das Tabakmosaikvirusteilchen zu 4,0 ergibt. Dieses Ergebnis erscheint allerdings nach den oben unter Anm. 21 zitierten Feststellungen anderer Autoren im Hinblick auf die Abmessungen der Viruspartikel nicht ohne weiteres verständlich. Auf Grund der nunmehr auch im Absorptionsbereich zugänglichen *Tyndall*-Kurve kann die reine Absorptionskurve berechnet und gezeigt werden, daß sie von Schwankungen der *Tyndall*-Intensität praktisch unabhängig ist und nur bei Denaturierung durch eine damit verbundene Strukturänderung beeinflußt wird. Eine funktionelle Abhängigkeit zwischen *Tyndall*-Strahlung und wahrer Lichtabsorption besteht demnach nur dann, wenn chromophor wirkende Strukturänderungen gemeinsam mit einer Veränderung der Teilchengröße einhergehen. Andernfalls tritt streng additives Verhalten auf. Damit ist die Grundlage für eine exakte *Tyndall*-Korrektur gegeben. Man kann nach einem Vorschlag von *E. Treiber* die Methodik auch noch dadurch modifizieren, daß man außerhalb des Absorptionsgebietes einige Werte für $\varepsilon_{\text{Tyndall}}$ bestimmt, logarithmisch gegen den Logarithmus von λ aufträgt und den Exponenten aus der Steigung der erhaltenen Geraden ermittelt, worauf wir gemeinsam noch ausführlich zurückkommen werden. Auf diese Art wurde die *Tyndall*-Korrektur für die in dieser Abhandlung diskutierten Aktomyosin- bzw. Fibroinspektren durchgeführt.

Zusammenfassung von I und II.

Bei Eiweißabsorptionskurven müssen stets echte Lichtabsorption und durch seitliche Abbeugung vorgetäuschte Absorption des durchgehenden Lichtstrahls scharf getrennt werden. Absorbieren Eiweißkörper im Gebiete zwischen 3300 und 4200 mm^{-1} , so läßt dies auf Anwesenheit aromatischer Aminosäuren, gegebenenfalls auch von Histidin, schließen, während Aminosäuren mit aliphatischem Rest erst ab 4200 mm^{-1}

²² *G. Mie*, Ann. Physik 25, 377 (1908).

absorbieren. Die in bezug auf die CO- und NH-Gruppen des Peptidgerüsts isolierte Stellung der erstgenannten Aminosäuren läßt einen additiven Charakter des Absorptionsspektrums erwarten, der folgende Auswertungsmöglichkeiten bietet:

1. Qualitative Erkennung mehrerer Aminosäuren;
2. quantitative Bestimmungen, wobei besonders auf die von *Holiday* entwickelte Bestimmungsmethode der bei dem gleichen ν' -Wert maximal absorbierenden Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan nebeneinander hingewiesen wird;
3. Erkennung von zusätzlich auftretenden Chromophoren, die z. B. auf besondere Bindungsverhältnisse zurückzuführen sein können.

Der Einfluß der Peptidbindung selbst auf das Spektrum aromatischer Aminosäuren ist nur unerheblich, wie unter anderem am Beispiel des Seidenfibroins gezeigt wird.

Zusätzliche Chromophore wurden bisher ausgemessen bei Seidenfibroin und Aktomyosin, dürften aber nach orientierenden Versuchen auch in Kollagen, Aktin, Gelatine und — nach den Kurven von *Scheibe* — im Tabakmosaikvirus vorhanden sein. Während sie im Seidenfibroin erst bei gleichzeitigem Dehnen und Walzen, bzw. im von der Raupe gesponnenen Seidenfaden auftreten, sind sie im Aktomyosin von vorneherein vorhanden. In den genannten, bisher untersuchten Fällen sind also Proteinspektren und ein dem Aminosäuregehalt entsprechend berechnetes Modellspektrum nicht miteinander identisch. Aktomyosin- und Fibroinspektrum lassen sich als Überlagerung der Spektren der peptidgebundenen aromatischen Aminosäuren (teilweise an anhydridartige Ringe gebunden) mit einem den C=N-Bindungen der Peptidketten zugeschriebenen Zusatzmaximum bei 4000 mm^{-1} befriedigend interpretieren. Die bisherigen Ergebnisse lassen sich am befriedigendsten dadurch deuten, daß durch das Angreifen zweier Wasserstoffbindungen an den CO- und NH-Gruppen einer Peptidkette Pseudodiketopiperazininge entstehen. Dabei ist eine Tautomerie insofern möglich, daß die Protonen der H-Brücken im alkalischen Milieu soweit an die CO-Gruppen herangezogen werden, daß sich chromophore C=N-Gruppen innerhalb der Ketten ausbilden. Die Absorption dieser C=N-Gruppen muß ein Maximum bei ca. $4000\ \nu'$ aufweisen und überlagert sich dann der Absorption der Aminosäuren.

Im Falle des Seidenfibroins erweist sich diese zusätzliche Bande durch Messungen im polarisierten Licht als einer echten π -Bindung zugehörig, indem sie die bei Doppelbindung zu erwartende Richtungsabhängigkeit zeigt. Nach diesen Messungen lägen die C=N-Bindungen unter einem Winkel von zirka 45° spiegelsymmetrisch zu der Dehnungsachse geneigt, was ebenso dafür spricht, daß es sich um Doppelbindungen innerhalb der ausgerichteten Peptidketten handelt.

Beim Aktomyosin konnte auf Grund von Abbauprüfungen nachgewiesen werden, daß etwa 50 bis 70% der Zusatzabsorption fermentativ *in vitro* zum Verschwinden gebracht werden können, wodurch die Zuordnung zu einem Bindungssystem weiterhin gestützt erscheint. Die beim Dehnen unter Kontraktion in Aktomyosinfilmen auftretende Absorptionserhöhung erwies sich beim Nachlassen der Dehnung oder beim Ansäuern als irreversibel, verschwindet aber weitgehend bei gedehnt getrockneten Präparaten, was für die zwischenmolekulare Ursache der Ausbildung spricht. Ob sich die beobachteten Effekte allgemein auf Wasserstoffbrücken beziehen oder nur im Spektrum aromatischer Aminosäuren auftreten, kann noch nicht gesagt werden. —

Die näherungsweise und exakten Korrekturverfahren der *Tyndall*-Erscheinungen bei Proteinen werden kurz behandelt. Zwischen Teilchengröße und Intensität bzw. Frequenzabhängigkeit der Streustrahlung bestehen eindeutige Zusammenhänge.

Ich erlaube mir, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. *O. Kratky* für die zahlreichen wertvollen Anregungen und Diskussionen, sowie die in jeder Hinsicht großzügigste Förderung und Unterstützung unserer Arbeit meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Auch dem Vorstand des Med.-chem. Institutes der Universität Graz, Herrn Prof. Dr. *H. Lieb*, bin ich für die liebenswürdige Beistellung von Literatur, Chemikalien und Apparaten aufrichtig zu Dank verpflichtet.