

Dehnungseffekte an Aktomyosinfilmen.

Von

E. Schauenstein und J. O. Fixl.

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

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 15. Juni 1950. Vorgelegt in der Sitzung am 29. Juni 1950.)

Die vorliegende Arbeit stellt eine Ergänzung zu vorangegangenen Untersuchungen über das optische und elektrische Verhalten von Aktomyosinfilmen dar¹. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legten mit aller Wahrscheinlichkeit die Annahme nahe, daß bei geringfügigem Dehnen in wassergequollenen Filmpräparaten zusätzliche Bindungen

zwischen den $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagdown \end{array}$ - und $\begin{array}{c} \diagdown \\ \text{N}-\text{H} \\ \diagup \end{array}$ -Gruppen der Peptidketten auftreten.

Zur weiteren Überprüfung dieser Annahmen wurde das Verhalten gequollener Filme hinsichtlich der Änderung des Filmvolumens einerseits sowie der Gesamtdoppelbrechung und der elastischen Eigenschaften andererseits in Abhängigkeit vom Dehnungsgrad gemessen.

Lufttrockene Aktomyosinfilme, hergestellt aus quergestreiften Kaninchenmuskeln², quellen in Wasser und werden dehnbar. Die Quellungsfaktoren für Länge und Breite liegen bei Zimmertemperatur und destilliertem Wasser im Mittel bei 1,3. Der Quellungsfaktor für die Dicke schwankt zwischen 1,8 und 3,5. Am häufigsten ergeben sich Werte von etwa 2,8 (vgl. Tabelle 1).

Um möglichst reproduzierbare Bedingungen zu schaffen, wurden für die im folgenden beschriebenen Versuche nur völlig homogene, klare,

¹ a) O. Kratky, E. Schauenstein und E. Treiber, Mh. Chem. 78, 174 (1947). — b) E. Schauenstein und E. Treiber, J. Polymer Sci. (1950), im Druck. — c) E. Schauenstein und E. Treiber, Makromol. Chem. 4, 91 (1949). — d) E. Bürgermeister und E. Schauenstein, Mh. Chem. 80, 310 (1949).

² A. Szent-Györgi, Chemistry of the Muscular Contraction. New York, N. Y.: Acad. Press Publishers. 1947.

20 bis 40 μ dicke Filme verwendet, deren Dickenquellungsgrad zwischen 2,7 und 2,9 lag.

Elastisches Verhalten von Aktomyosinfilmen beim Dehnen.

Beobachtet man das elastische Verhalten in Wasser gequollener Aktomyosinfilme in Abhängigkeit vom Dehnungsgrad L/L_0 (unter L ist die jeweilige Länge eines markierten Filmstückes, unter L_0 die Länge des in Wasser gequollenen, gestreckten und noch vollkommen ungedehnten gleichen Filmstückes zu verstehen), so ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 1. Längen-, Breiten- und Dickenquellungsgrade von Myosinfilmen.

l Länge	l Breite	l Dicke
1,29	1,26	2,40
1,26	1,27	3,50
1,32	1,34	1,73
1,30	1,29	2,67
1,35	1,33	2,78
1,28	1,35	2,72
1,31	1,28	2,90
1,31	1,27	2,82

Die Filme lassen sich bis zu einem Dehnungsgrad von 1,15 bis 1,25 plastisch auseinanderziehen. Bei weiterem Dehnen bis zu $L/L_0 = 1,35$ bis 1,45 setzt geringe Elastizität ein. Nunmehr werden die Filme kautschukähnlich elastisch. Sie gehen beim Dehnen auf das Doppelte von $1,4 L_0$ und mehr immer wieder auf $1,4 L_0$ zurück. Wiederholt man dies öfters, so beginnen die Filme zu fließen

und es treten Relaxationserscheinungen auf. Die Grenze, bei der die Elastizität beginnt, schiebt sich immer mehr in den Bereich größerer Dehnungsgrade hinaus. Bei Werten für $L/L_0 = 4,0$ verliert sich nach

mehrmaligem Dehnen und Relaxieren die Elastizität fast ganz und die Filme reißen (vgl. Abb. 3).

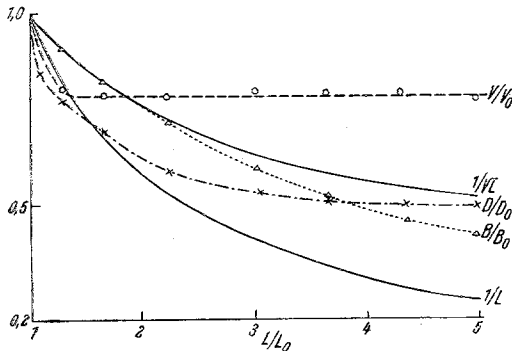


Abb. 1. Änderung von Dicke, Breite und Volumen gequollener Myosinfilme in Abhängigkeit vom Dehnungsgrad.

Quellungsanisotropie von gedehnten Aktomyosinfilmen.

Rechteckige Filmstücke wurden scharfkantig geschnitten und in einem Dehnungsapparat so eingespannt, daß Länge, Breite und Dicke in gequollenem Zustand bei jedem beliebigen

Dehnungsgrad mikroskopisch gemessen werden konnten. Durch das Einklemmen der beiden Enden des Filmes schnürt er sich beim Dehnen in der Mitte ein. Dadurch läßt sich die Fläche aus Breite und Länge

nur mit großen Fehlern berechnen. Um dies auszuschalten, wurde etwa in der Mitte des eingespannten, 5 bis 8 mm langen Präparats ein 0,5 bis 1,0 mm langes Stück markiert, das auch noch bei großen Dehnungsgraden parallele Seitenkanten zeigte.

Länge und Breite des eingespannten, markierten Filmstückes wurden mit einem *Zeißschen* Meßmikroskop bei 11facher Vergrößerung auf $\pm 2\%$ genau gemessen. Bei Bestimmung der Dicke wurde eine 150fache, 300fache oder 600fache Vergrößerung in Verbindung mit einem Okularmikrometer angewendet, so daß ein Teilstrich der Mikrometerskala 1, bzw. 2 oder 4 μ entsprach. Die Fehlergrenze hierbei betrug $\pm 3\%$. Das aus den drei Abmessungen des Filmstückes berechnete Volumen läßt sich dann mit einer Genauigkeit von $\pm 4,1\%$ ermitteln.

Abb. 1 gibt die Quotienten D/D_0 , B/B_0 und V/V_0 in Abhängigkeit vom Dehnungsgrad L/L_0 wieder. Zum Vergleich enthält die Abbildung ferner die beiden Funktionen $1/L$ und $1/\sqrt{L}$. Man ersieht daraus als auffallendste Tatsache, daß innerhalb des ersten Dehnungsbereiches, nämlich von $L/L_0 = 1,0$ bis 1,15 bzw. 1,20, eine Volumskontraktion um rund 20% des Ausgangsvolumens V_0 eintritt (vgl. Tabelle 2). Im weiteren Verlauf der Dehnung erweist sich das Volumen als konstant. Die Breitenabnahme geht im Anfangsstadium der Dehnung parallel zu $1/\sqrt{L}$, während die Dicke wesentlich rascher abnimmt. Der gesamte beobachtete Volumsdefekt geht demnach auf eine spontane Dickenänderung zurück. Bis zu einem Dehnungsgrad von ungefähr 2,0 nehmen dann Dicke und Breite nach der Funktion $1/\sqrt{L}$ ab. Im weiteren Verlauf wird die Dicke allmählich konstant und die Breitenänderung geht, der Theorie entsprechend, von der Funktion $1/\sqrt{L}$ auf die Funktion $1/L$ über.

Tabelle 2. Volumsabnahme gequollener Myosinfilme beim Dehnen.

V_0 cm ³	$V_{\text{const.}}$	ΔV	in %
1,784	1,428	0,356	20,0
2,463	2,054	0,409	16,6
1,428	1,168	0,260	18,2
1,276	1,005	0,271	21,3
3,394	2,739	0,655	19,3
2,080	1,606	0,374	18,0
2,623	2,256	0,367	13,9
1,842	1,418	0,424	23,0

Optische Anisotropie von Aktomyosinfilmen.

Zwischen gekreuzten *Nicol'schen* Prismen wurde mit einem *Bereck-*Kompensator die Doppelbrechung der Aktomyosinfilme in gequollenem Zustand gemessen. Bei Objekten der vorliegenden Art sind nach der klassischen Theorie drei Arten von Doppelbrechung zu berücksichtigen³:

³ *F. Wiener*, Handbuch der Physik von *Geiger* und *Scheel*. Berlin: Springer-Verlag.

1. *Eigendoppelbrechung* (anisotrope Anordnung für sich doppelbrechender Teilchen).

2. *Wienersche Formdoppelbrechung* (parallele Anordnung anisodiametrischer Teilchen in einem Medium mit anderem Lichtbrechungsvermögen).

3. *Spannungsdoppelbrechung* (optische Anisotropie als Folge einer deformierenden Kraft, bzw. einer latenten Spannung).

Da in unserem Falle die Spannungsdoppelbrechung infolge der Elastizität der gequollenen Präparate sich nicht ausschalten, aber auch nicht quantitativ berücksichtigen läßt, ist eine rechnerische Zerlegung der gemessenen Gesamtdoppelbrechung nicht exakt durchführbar, was für die vorliegende Fragestellung auch nicht so wesentlich erscheint.

Die Doppelbrechungsmessungen wurden teils mit gelbem Natriumlicht ($\lambda = 590 \text{ m}\mu$), teils mit Tageslicht ($\bar{\lambda} = 540 \text{ m}\mu$) ausgeführt. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Man entnimmt daraus,

Tabelle 3. Gesamtdoppelbrechung gequollener Myosinfilme in Abhängigkeit vom Dehnungsgrad.

L/L_0	Gesamtdoppelbrechung	L/L_0	Gesamtdoppelbrechung
1,19	$0,09 \cdot 10^{-3}$	2,80	$2,99 \cdot 10^{-3}$
2,05	$2,08 \cdot 10^{-3}$	1,51	$0,49 \cdot 10^{-3}$
2,54	$2,48 \cdot 10^{-3}$	2,31	$2,28 \cdot 10^{-3}$
1,41	$0,33 \cdot 10^{-3}$	2,80	$2,90 \cdot 10^{-3}$
1,91	$1,36 \cdot 10^{-3}$	3,27	$3,78 \cdot 10^{-3}$
2,32	$2,28 \cdot 10^{-3}$	3,63	$4,10 \cdot 10^{-3}$
1,96	$1,47 \cdot 10^{-3}$	3,90	$4,28 \cdot 10^{-3}$
2,35	$2,32 \cdot 10^{-3}$	4,30	$4,42 \cdot 10^{-3}$
2,70	$2,97 \cdot 10^{-3}$	4,45	$4,46 \cdot 10^{-3}$

daß die Doppelbrechung erst ab Dehnungsgraden von $L/L_0 = 1,2$ bis 1,3 meßbar wird, dann allmählich linear ansteigt und bei Dehnungsgraden von etwa 3,5 bis 4,0 einem konstanten Wert zustrebt.

Diskussion der Meßergebnisse.

Die wichtigsten Ergebnisse der hier beschriebenen Untersuchungen seien noch einmal kurz zusammengestellt:

1. Aktomyosinfilme werden erst bei Dehnungsgraden von 1,2 bis 1,3 elastisch.
2. Eine Doppelbrechung ist erst von $L/L_0 = 1,3$ an meßbar.
3. Im Dehnungsintervall von $L/L_0 = 1,0$ bis 1,2 tritt eine Volumskontraktion von 15 bis 20% ein.
4. Der Volumsdefekt geht auf eine spontane Dickenabnahme zurück.

Es soll nun versucht werden, ein Bild über die Vorgänge zu entwerfen, die sich beim Dehnen eines in Wasser gequollenen Aktomyosinfilmes im molekularen Feinbau abspielen.

Beim Eingießen der Eiweißlösung in stark verdünntes wäßriges KCl fällt das Aktomyosin so aus, daß die Fadenmoleküle ein räumlich isotropes lockeres Gefüge bilden.

Nach dem Absaugen des Fällbades setzt der anisotrope Trocknungsvorgang ein. Es nimmt dabei im wesentlichen die Dicke des Filmes ab, so daß man annehmen kann, daß die Aktomyosinmoleküle oder bereits

gebildete Aggregate sich in Ebenen, parallel zur Unterlage, einordnen (Filmebene). Die Ordnung ist natürlich sicher keine ideal ebene. Da der Trocknungsprozeß langsam erfolgt, wird das Gefüge locker sein und die Molekülebenen werden miteinander keine oder nur geringfügige Verbindungen haben.

Mißt man das UV-Absorptionsspektrum in Wasser gequollener Aktomyosinfilme^{1a, b}, so findet man im ersten Dehnungsintervall ($L/L_0 = 1,0$ bis $1,2$) eine Absorptionszunahme im Wellenzahlengebiet von $\nu' = 3800$ bis 4100 mm^{-1} (Abb. 2). Die Abb. 2 gibt die Absorptionskurven für den ungedehnten (Kurve I) und den leicht gedehnten Film (Kurve II) wieder. Kurve I entspricht aber auch quantitativ der Absorption einer neutralen, bzw. schwach sauren Aktomyosinlösung. Bringt man die Lösung auf ein pH von 8,3 bis 9,6, so tritt die gleiche Extinktionserhöhung ein, die man beobachtet, wenn man Aktomyosinfilme dehnt. In der Lösung kann man den Absorptionszuwachs durch Herabsetzen des pH-Wertes wieder rückgängig machen. Beim Dehnen des Filmes jedoch ist die Absorptionserhöhung irreversibel; sie wird durch Hinzufügen von Säure nicht zum Verschwinden gebracht⁴. Da die Filme in diesem Bereich noch plastisch sind, kann die Dehnung selbst nicht rückgeführt werden. Durch Abbau des Proteins mit Pankreatin^{1d} läßt sich zeigen, daß die beobachtete Absorptionserhöhung im wesentlichen auf das Eiweißgerüst zurückzuführen ist. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen am Seidenfibroin⁵ und Kollagen⁶ sowie auf Grund der theoretischen Überlegungen von K. Wirtz⁷ kann die neu auftretende Absorption im Wellenzahlenbereich von $\nu' = 3800$ bis 4100 mm^{-1} mit einer Enolisation der Peptidbindungen, das heißt Ausbildung von C=N-Bindungen innerhalb der Polypeptidketten plausibel erklärt werden. Die Voraussetzung hierfür bildet das Vorhandensein von möglichst ausgedehnten Wasserstoffbrückensystemen und dissoziierfähigen Gruppen in den Seitenketten. Die durch die Dehnung hervorgerufene Änderung

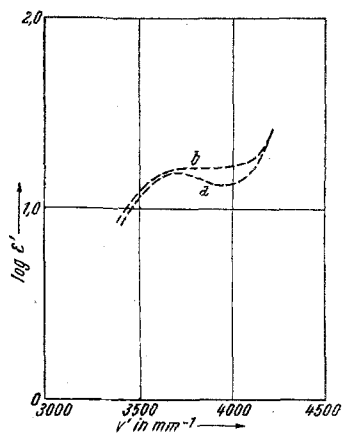


Abb. 2. Spektren von Aktomyosinfilmen, gequollen in Wasser:
a) ungedehnt, b) mehr als 10 Prozent gedehnt.

⁴ E. Bürgermeister und E. Schauenstein, bisher unveröffentlichte Versuche.

⁵ E. Schauenstein, J. O. Fixl und O. Kratky, Mh. Chem. 80, 143 (1949).

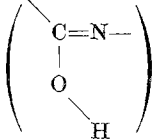
⁶ E. Schauenstein und D. Stanke, Mh. Chem. 80, 870 (1949). — J. O. Fixl, O. Kratky und E. Schauenstein, Mh. Chem. 80, 439 (1949).

⁷ K. Wirtz, Z. Naturforsch. 2 b, 94 (1947).

des Absorptionsspektrums kann darnach folgende zwei Ursachen haben:

1. Die Molekülstruktur ändert sich bereits durch geringfügiges Dehnen derart, daß K^+ - oder Na^+ -Ionen frei werden und das pH im Film selbst steigt. Dies ist unwahrscheinlich, da der Effekt durch Zusatz von Salzsäure nicht zurückgeht.

2. Beim Dehnen entstehen zusätzliche Wasserstoffbrücken, wobei sich gleichzeitig auch neue, in der Enolform vorliegende Peptidgruppen



ausbilden, ohne daß das pH sich ändern muß. Ein derartiger Effekt läßt sich zwanglos so erklären, daß sich beim Dehnen

$-\text{NH}-$ bzw. $\text{C}=\text{O}$ -Gruppen einander auf einen Abstand von rund 3 \AA nähern, wobei es infolge der Polarität beider Gruppen zur Ausbildung einer H-Brücke kommt. Diese Polarität wird um so größer sein, je größer

die Aufrichtungstendenz der Carbonylgruppe $\left(\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagdown \end{array} \right) \rightarrow \left(\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}-\text{O}^- \\ \diagdown \\ (+) \quad (-) \end{array} \right)$ ist.

Fördernd in diesem Sinne wirkt allgemein steigende Alkalität des Mediums. Ein hohes pH bewirkt aber auch eine Ionisierung der seitenständigen COOH -Gruppen, wodurch gleichfalls (im Sinne der Überlegungen von

Wirtz) der Übergang in die Enolform $\begin{array}{c} \text{C}=\text{N}- \\ | \\ \text{O} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$ begünstigt wird. So

darf man annehmen, daß von den an den nun gebildeten H-Brücken-

systemen beteiligten $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}-\text{N} \\ || \quad | \\ \text{O} \quad \text{H} \end{array}$ -Gruppen jene in der Enolform vorliegen

werden, die an ionisierte Seitenreste ($-\text{COO}^{(-)}$) gebunden sind.

Das Spektrum zeigt ferner eine Zunahme der phenolischen Dissoziation der Tyrosinmoleküle an.

Man könnte hier an die Ausbildung von Salzbrücken denken. Damit stünde auch der so charakteristische Wasseraustritt in Einklang⁸.

Gleichzeitig mit dem Absorptionseffekt und der Volumskontraktion tritt im Dehnungsintervall von $L/L_0 = 1,0$ bis $1,2$ eine deutliche Änderung in der Leitfähigkeit gequollener Aktomyosinfilme auf^{1c}. Für größere Dehnungsgrade bleibt dann der spezifische Widerstand des Systems konstant (vgl. Abb. 3).

⁸ Vgl. A. Holzöhner und F. Seelich, Klin. Wschr. 2, 1169 (1938).

Filme von Eiweißkörpern und künstlichen Aminosäurepolymerisaten lassen sich erst kautschukelastisch dehnen, wenn zwischen den einzelnen Ketten genügend Querverbindungen vorhanden sind. Das System des gequollenen Aktomyosinfilmes gleicht bei Dehnungsgraden ab 1,3 einem verknüpften Netz. In diesem Stadium beginnt tatsächlich auch die kautschukähnliche Elastizität. Da die Wasserstoffbindung um vieles schwächer ist als die Schwefelbrücken im Kautschuk, zeigen Aktomyosinfilme eine viel größere Fließfähigkeit. Die elastischen Eigenschaften

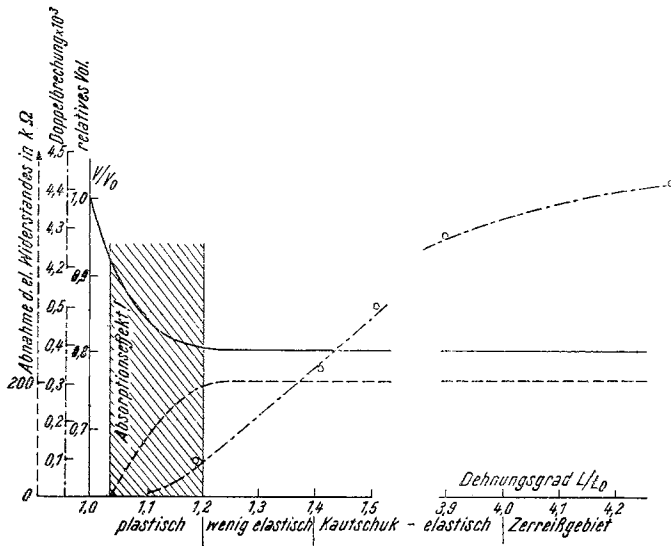


Abb. 3.

verlieren sich bereits, wenn die Filme mindestens 30 Min. lang in hochgedehntem Zustande gehalten werden ($L/L_0 = 4$). Bei diesem Dehnungsgrad sind die Polypeptidketten bzw. Aktomyosinmizellen oder -fäden, wie man aus dem Konstantwerden der Doppelbrechung ersieht, alle eindimensional orientiert. Es liegt hier auch die Zerreißgrenze der Filme.

Zusammenfassung.

Die vorstehenden Untersuchungen dürfen als eine weitere Stütze für die Annahme angesehen werden, daß ein geringfügiges Dehnen gequollener Aktomyosinfilme, deren Teilchen hinsichtlich ihrer großen Achse primär unorientiert liegen, zu einer Ausbildung zusätzlicher intermolekularer Wasserstoffbrücken zwischen den $C=O$ - und $N-H$ -Gruppen führt. Dabei darf eine bestimmte Anzahl der an diesen Bindun-

gen beteiligten Carbonimidgruppen in der Enolform ($\text{—O—C}=\text{N} \dots$
 H—O—) angenommen werden. Diese absorbiert bereits merklich im
 mittleren Ultraviolett unterhalb $\nu' = 4200 \text{ mm}^{-1}$ (im Gegensatz zur
 mesomeren Peptidgruppe: $\text{O}=\text{C—NH}$).

Die zusätzliche H-Bindung führt daher zu einer Absorptionserhöhung
 bei zirka $4000 \nu'$. Gleichzeitig steigt auch die phenolische Dissoziation
 der Tyrosinreste und nimmt die elektrische Leitfähigkeit zu, das Film-
 volumen aber spontan ab. Aus den Dickenmessungen geht hervor, daß
 die neu entstandenen Bindungen mindestens teilweise normal zur Film-
 ebene liegen. Dabei kommt es noch zu keiner wesentlichen Längs-
 orientierung der Teilchen. Dieses Anfangsstadium der Dehnung bildet
 gewissermaßen die Voraussetzung für das Auftreten kautschukähnlicher
 Elastizität, die bei weiterem Dehnen unter Zunahme der Längsorientierung
 der Teilchen einsetzt.

Es handelt sich also um einen für die physikalischen Eigenschaften
 von Aktomyosinfilmen ganz charakteristischen Schwellenwert, der unter
 allen Umständen durchlaufen werden muß, um in das Gebiet elastischer
 Dehnbarkeit zu gelangen; er liegt bei einem Dehnungsgrad von
 $L/L_0 = 1,15$ bis $1,25$.

Der durch ein entsprechend sanftes Dehnen erreichte Umbau im
 intermizellaren Verband ist irreversibel, das heißt er kann weder durch
 Nachlassen der deformierenden Kraft, noch durch pH-Einflüsse rück-
 gängig gemacht werden. Es handelt sich allem Anschein nach um die
 spontane Einstellung eines energetisch stabileren Zustandes, wie er
 letzten Endes sicher auch im Muskel vorhanden ist.

Herrn Prof. Dr. O. Kratky sind wir für anregende Diskussionen und
 großzügige Förderung unserer Untersuchungen aufrichtig zu Dank ver-
 pflichtet.