

paß flüssige Stoffe auch mit trockenem Harnstoff ohne Lösungsmittel sich verbinden. Nicht minder reizvoll ist es auch, in einem Reagensglas eine konzentrierte wäßrige oder alkoholische Harnstoff-Lösung mit einigen Tropfen Octanol zu überschichten und zu beobachten, wie augenblicklich an der Berührungsfläche lange feine Nadeln des Additionsproduktes anschießen. Diese Versuchsanstellung brachte mich auf den Gedanken, die Überschichtung auch mit Kohlenwasserstoffen zu versuchen, wie Testbenzin, Petroleum, Paraffin, liquid. und dergleichen. Die Verbindung mit Paraffin kristallisiert in kleinen, sehr derben Nadeln, bei denen sich die zersetzende Wirkung des Wassers besonders gut beobachten läßt. Bringt man unter dem Mikroskop einige Kriställchen in einen Tropfen Wasser, so sieht man, wie sie förmlich explodieren, so daß im Nu das ganze Gesichtsfeld von unzähligen winzigsten Fetttropfchen übersät ist.

Aber die Überraschungen gingen noch weiter. Bisher hatte ich nur Verbindungen mit einer geraden unverzweigten Kohlenstoffkette untersucht. Bei den Versuchen mit Testbenzin tauchte plötzlich der Gedanke auf, wie sich wohl Kohlenwasserstoffe mit einer oder mehreren Seitenketten verhalten würden. Dabei ergab sich ein grundlegender Unterschied. Es zeigte sich, daß reines iso-Octan mit Harnstoff überhaupt nicht reagiert. Dies verschiedene Verhalten schien mir für eine Trennung der beiden Arten von Kohlenwasserstoffen von Bedeutung zu sein,

doch überstieg die weitere Erforschung dieser auffallenden Erscheinung die Kräfte eines Einzelnen, zumal das meinem eigentlichen Arbeitsgebiet, der Lebensmittelchemie, fern lag.

Ich gewann für meine Patentanmeldung das Interesse von *Matthias Pier*, einem der bedeutendsten Forscher der Kohlenwasserstoffchemie. Infolgedessen übernahm die zur damaligen I.G.-Farbenindustrie gehörige Badische Anilin- & Soda-Fabrik die weitere Bearbeitung. Im Ammoniaklaboratorium dieses Werkes übernahm Dr. *Wilhelm Schlenk jr.*, unterstützt von den reichen Mitteln und Erfahrungen dieses Werkes, die weitere Arbeit. In fast zehnjähriger Forschung hat er dieses anfangs so rätselhafte Gebiet nach allen Richtungen hin durchgearbeitet und seine Ergebnisse in einigen umfassenden grundlegenden Arbeiten<sup>1)</sup> veröffentlicht. Eine kurze Ankündigung wurde von ihm und mir gemeinsam in der schweizerischen Zeitschrift „Experientia“<sup>2)</sup> gebracht. Kristallstrukturuntersuchungen an den neuen Verbindungen nahm C. *Hermann* vor.

Aus diesen Darlegungen ersieht man, wie aus Beobachtungen auf einem ganz abseitigen Gebiete durch Glück und planmäßige Verfolgung schließlich ganz allgemeinwichtige Ergebnisse für die organische Chemie sich ergeben können.

Eingeg. am 27. November 1950 [A 335]

<sup>1)</sup> Liebigs Ann. Chem. 565, 204–240 [1949]; vgl. auch diese Ztschr. 62, 299 [1950]; W. *Schlenk jr.*, „Die neuen Harnstoff-Additionsverbindungen“.

<sup>2)</sup> Experientia 5, 200 [1949].

## Über die Ultraviolettabsorption der Proteine

Von Dr. H. DANNENBERG, Tübingen\*). Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, Tübingen

Ausgehend von der UV-Absorption der einzelnen Aminosäuren werden die Spektren der Proteine, Nukleinsäuren und Nukleoproteide beschrieben und die entspr. Analysenmöglichkeiten von Aminosäuren und -Gemischen gezeigt. Der zweite Teil der Arbeit behandelt die Wirkung der UV-Strahlung auf Aminosäuren und Proteine unter bes. Berücksichtigung der Denaturierung.

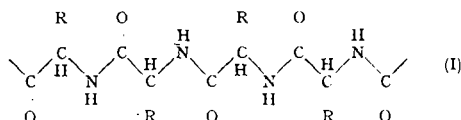
### Einleitung

1909 fand erstmalig *Dhéré*<sup>1)</sup>, daß Proteine ultraviolettes Licht absorbieren und daß das Spektrum von Proteinen im wesentlichen durch eine Bande mit einem Maximum bei 280 m $\mu$  ausgezeichnet ist.

Eine Analyse von Absorptionsspektren wird stets von der Frage ausgehen haben: Worauf ist die Absorption zurückzuführen? Man weiß, daß Absorption im UV oder im Sichtbaren immer dann auftritt, wenn in einer Molekel chromophore Gruppen vorhanden sind. Chromophore Gruppen sind gekennzeichnet durch  $\pi$ -Elektronen oder einsame Elektronenpaare. Die isolierten chromophoren Systeme verursachen eine Absorption im kurzwelligen Teil des UV unterhalb 220 m $\mu$ , die bei den meisten Untersuchungen nicht erfaßt wird. Die Vereinigung von zwei oder mehr chromophoren Gruppen führt zur Wechselwirkung der einzelnen Systeme. Die Anregungsenergie eines derartig „konjugierten“ Systems ist kleiner als die Anregungsenergie der isolierten chromophoren Gruppen, d. h. die Absorption des konjugierten Systems ist nach Rot verschoben. Derartig konjugierte Systeme können in langer Kette vorliegen wie z. B. bei den Polyenen, oder sie können in Ringsystemen auftreten, z. B. Benzol, Indol, Pyrimidin und Purin.

### UV-Absorption der Aminosäuren

Wenn man das Absorptionsspektrum der Proteine deuten will, wird man zuerst überlegen müssen, auf welche chromophoren Gruppen oder Systeme die Absorption zurückzuführen ist. Eiweiß ist aufgebaut aus Aminosäuren, die peptidartig zu langen Ketten verknüpft sind (I). Die Vielzahl der Eiweißverbindungen ist bedingt durch die Art und Reihenfolge der Aminosäuren in den

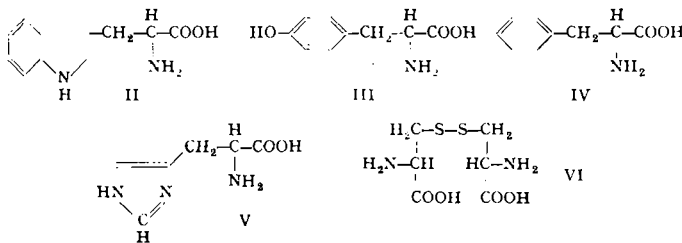


Polypeptidketten einerseits und durch die Knäuelung oder Faltung der Peptidketten andererseits. Die Polypeptidkette als solche sollte oberhalb 240 m $\mu$  keine Absorption aufweisen, da alle  $-CO-NH$ -Gruppen (Peptidbindungen) durch  $CH_2$ -Gruppen

\*) Nach einem Vortrag auf d. biophysik. Arbeitstagung Mosbach, am 20. Oktober 1949, mit Ergänzungen bei der Niederschrift.

<sup>1)</sup> Recherches spectrograph. Thèses de Fribourg 1909.

getrennt, also isoliert sind. Die Absorption der Peptidbindung entspricht etwa derjenigen des Acetamids, dessen Absorption durch eine steil ansteigende Bande unterhalb 220 m $\mu$  ausgezeichnet ist<sup>2)</sup>. Die Messungen an Peptiden bestätigen dieses<sup>3, 4, 5)</sup>. Die Absorptionsbande des Dipeptids Glycyl-d,l-leucin (Absorption unterhalb 230 m $\mu$ ) ist gegenüber derjenigen der Komponenten Glycin und Leucin zwar etwas nach Rot verschoben, zeigt aber keine neue Banden<sup>6, 7)</sup>. Die Absorption, die Proteine oberhalb 240 m $\mu$  zeigen, kann daher nur von den Resten R (I) der Aminosäuren herrühren. Untersucht man diese nun auf chromophore Systeme, so bleiben nur fünf Aminosäuren übrig, die oberhalb 240 m $\mu$  eine selektive Absorption aufweisen: Tryptophan (II)<sup>8, 16)</sup>, Tyrosin (III)<sup>3, 4, 8, 9a, 9, 9a, 11–15)</sup>, Phenyl-



<sup>2)</sup> H. *Ley* u. B. *Arends*, Z. physik. Chem. (B) 17, 177 [1932].

<sup>3)</sup> P. A. *Kober*, J. biol. Chemistry 22, 433 [1915].

<sup>4)</sup> Y. *Shibata* u. T. *Asahina*, Bull. chem. Soc. Japan 2, 324 [1928].

<sup>5)</sup> M. A. *Magill*, R. E. *Steiger* u. A. J. *Allen*, Biochemic. J. 31, 188 [1937].

<sup>6)</sup> E. *Abderhalden* u. R. *Haas*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 155, 195 [1926]; 166, 78 [1927].

<sup>7)</sup> Die Angaben von G. A. *Anslow* u. S. C. *Nassar* (J. opt. Soc. Amer. 3, 118 [1941] sowie H. *Mohler* (Das Absorptionsspektrum der chemischen Bindung. Jena, Gustav Fischer. 1943. Seite 68) bezüglich einer Eigenabsorption der Peptidbindung im Gebiet von etwa 280 m $\mu$  konnten bisher noch nicht bestätigt werden. Vgl. E. *Schauenstein*, J. O. *Fixl* u. O. *Kratky*, Mh. Chemie 80, 143 [1949].

<sup>8)</sup> F. W. *Ward*, Biochemic. J. 17, 891 [1923].

<sup>9a)</sup> T. W. *Goodwin* u. R. A. *Morton*, ebenda 40, 628 [1946].

<sup>9b)</sup> W. *Stenström* u. M. *Reinhard*, J. biol. Chemistry 66, 819 [1925].

<sup>10a)</sup> J. W. *Sizer* u. A. C. *Peacock*, ebenda 171, 769 [1947].

<sup>10b)</sup> F. C. *Smith*, Proc. Roy. Soc. London Ser. B 104, 198 [1929].

<sup>11)</sup> J. *Gröh* u. M. *Hanák*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 190, 169 [1930].

<sup>12)</sup> W. F. *Roß*, J. biol. Chemistry 104, 531 [1934].

<sup>13)</sup> S. *Becker*, Strahlentherap. 52, 531 [1935].

<sup>14)</sup> C. B. *Coulter*, F. M. *Stone* u. E. A. *Kabat*, J. gen. Physiol. 19, 739 [1936].

<sup>15)</sup> K. *Feraud*, M. S. *Dunn* u. J. *Kaplan*, J. biol. Chemistry 112, 323 [1935]; 114, 665 [1936].

<sup>16)</sup> E. R. *Holiday*, Biochemic. J. 30, 1793 [1936].

alanin (IV)<sup>4, 8, 8a, 9a, 12-14</sup>), Histidin (V)<sup>8</sup>) (Maximum unterhalb 240 m $\mu$ ) und Cystin (VI)<sup>8, 12, 17, 18, 19</sup>). Und zwar Tryptophan wegen seines Indol-Systems (Bild 1), Phenylalanin auf Grund seines Benzol-Ringes (Bild 2), Tyrosin wegen seiner

Die Absorptionsbanden des Tryptophans, Tyrosins und Phenylalanins weisen Feinstruktur auf, die derjenigen der Grundsysteme Indol, Phenol und Benzol vollkommen entspricht, aber eine geringe Verschiebung nach Rot zeigt<sup>12, 15</sup>) (Tabelle 2).

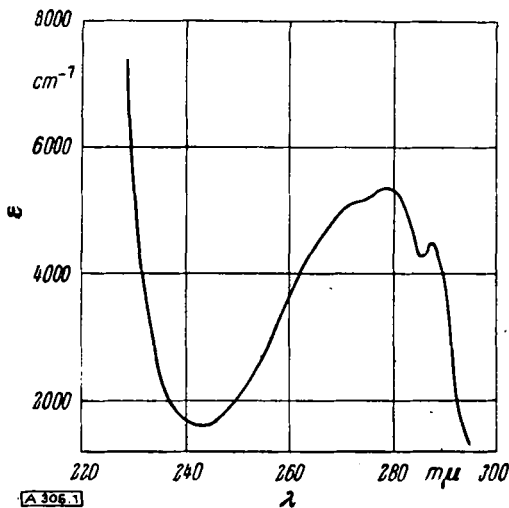


Bild 1<sup>18</sup>). Spektrum des Tryptophans in m/15 Phosphatpuffer, p<sub>H</sub> = 8

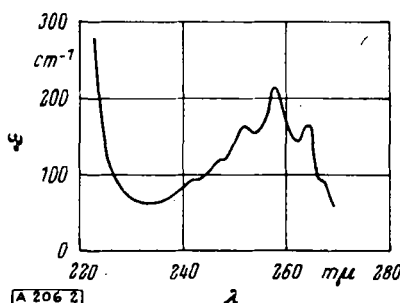


Bild 2<sup>18</sup>). Spektrum des Phenylalanins in m/15 Phosphatpuffer, p<sub>H</sub> = 8

Phenol-Gruppierung, Histidin des Imidazol-Ringes halber und Cystin auf Grund der S-S-Brücke. Die Extinktionskoeffizienten der drei am stärksten absorbierenden Aminosäuren: Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, im Maximum verhalten sich wie 27:8:1 (in alkoholischer Lösung). Die Absorptionen des Histidins und des Cystins sind von geringerer Bedeutung, da sie entweder kurzwelliger liegen oder die Intensität der Absorption nur klein ist (Tabelle 1).

Aminosäure	Lsgmittel	Maxima		Minima	
		m $\mu$	$\epsilon^*$	m $\mu$	$\epsilon^*$
Tryptophan	95% Äthanol	275, 280, 290,5	5410, 5770, 4970		<sup>19)</sup>
	25% Äthanol	(270), 281, 287,5	(4600), 5300, 4330		<sup>19)</sup>
	Wasser	271, 280, 287,5	4600, 5190, 4810		<sup>19)</sup>
	0,1 HCl	278	5450	244	1475 <sup>19a)</sup>
	0,1 NaOH	281	5030	246	950 <sup>19a)</sup>
	0,1 NaOH	280,5	5250		<sup>8a)</sup>
	p <sub>H</sub> = 8	(271), 280, 288	(5200) 5400 4500***)		<sup>5a)</sup>
Tyrosin	50% Äthanol	279	1600	247	200 <sup>8)</sup>
	0,1 HCl	277,5	1500	246,5	50 <sup>19a)</sup>
	p <sub>H</sub> 4,3	276	1500**)		<sup>9a)</sup>
	p <sub>H</sub> = 8	275	1300***)		<sup>5a)</sup>
	p <sub>H</sub> 12,0	240, 293	11500, 2600**)		<sup>9a)</sup>
	0,1 NaOH	294	2550	264	850 <sup>19a)</sup>
	0,1 NaOH	293	2390		<sup>8a)</sup>
Phenylalanin	0,1 NaOH	258,5	200		<sup>8a)</sup>
	p <sub>H</sub> 8	258	208***)		<sup>3a)</sup>
Histidin	50% Äthanol	220	9000		<sup>19)</sup>
Cystin (Hydrochlorid)	Wasser	Inflexion 250	400		<sup>19)</sup>

Tabelle 1. Absorptionsdaten der Aminosäuren

\* Der Extinktionskoeffizient ist definiert durch die Gleichung:

$$\epsilon = \frac{M}{c \cdot d} \cdot \log \frac{J_0}{J} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Darin bedeuten: M = Molgewicht, c = Konzentration in g/L und d = Schichtdicke in cm.

\*\* In der Originalarbeit ist die Absorptionskurve in  $\alpha$ -Werten angegeben. Die  $\epsilon$ -Werte wurden daraus erhalten durch Multiplikation mit dem Molgewicht des Tyrosin-hydrochlorids.

\*\*\* Originalkurve umgerechnet auf Extinktionskoeffizient  $\epsilon$ .

<sup>17)</sup> G. A. Anslow u. E. R. Lyman, J. opt. Soc. Amer. 31, 114 [1941].

<sup>18)</sup> Arend, Z. physik. Chem. (B) 17, 177 [1932].

<sup>19a)</sup> E. Abderhalden u. Rößner, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 178, 156 [1929].

<sup>19)</sup> B. G. Edwards, Arch. Biochemistry 21, 103 [1949].

<sup>19a)</sup> R. A. Morton, The Application of absorption Spectra to the Study of Vitamins and Hormones. 2nd. Edit. London 1942, S. 181 ff.

Phenylalanin - Benzol		Tyrosin - Phenol		Tryptophan Indol	
267.5	268.5	282.0	276.0	289.4	287.3
264.3	264.5	276.0	269.0	280.4	279.0
257.6	260.5	268.0	262.5		271.0
252.5	254.5				
246.2	248.0				
241.0	242.0				
235.0	238.0				
	233.0				

Tabelle 2

Feinstruktur der aromatischen Aminosäuren und ihrer Grundsysteme (in m $\mu$ <sup>15</sup>)

Die Spektren aller Aminosäuren mit Ausnahme des Tyrosins sind ziemlich unabhängig vom p<sub>H</sub> der Lösungen. Lediglich das Tyrosin zeigt auf Grund seiner phenolischen OH-Gruppe eine Abhängigkeit vom p<sub>H</sub> der Lösung. In saurer Lösung liegt die phenolische OH-Gruppe vollkommen undissoziiert vor, in stark alkalischer Lösung liegt dagegen ein anderes chromophores System vor: das Phenolat-Ion. Die beiden Systeme unterscheiden sich in ihrer Absorption<sup>9, 16</sup>). Bei p<sub>H</sub> 4,3 zeigt das Spektrum des Tyrosins oberhalb 230 m $\mu$  nur ein Maximum (bei 277 m $\mu$ ), bei p<sub>H</sub> 12 dagegen zwei Maxima (bei 240 und 293 m $\mu$ ) (s. Bild 3)<sup>9a</sup>). Im p<sub>H</sub>-Gebiet, in dem Phenol-Form und Phenolat-Ion nebeneinander vorliegen, stellen die Spektren dann die Summe der beiden Grenzformen dar. Bei p<sub>H</sub> 10,1–10,3, bei dem die phenolische OH-Gruppe zu 50% dissoziiert ist (pK = 10,1<sup>20</sup>), erhält

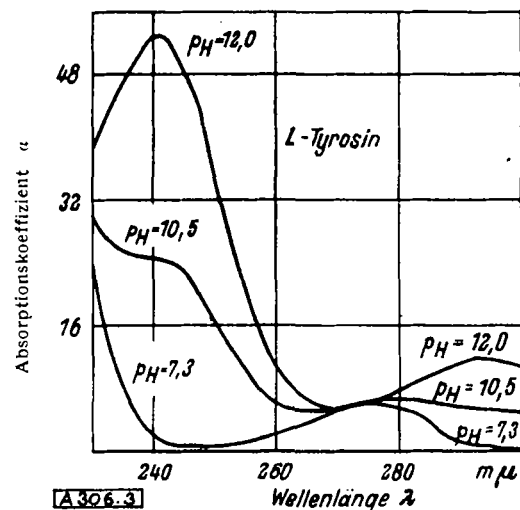


Bild 3

Abhängigkeit des Spektrums des L-Tyrosins vom p<sub>H</sub><sup>9a)</sup>

man eine Absorptionskurve, die sich zu je 50% aus den beiden Grenzformen zusammensetzt<sup>21</sup>). Umgekehrt kann aus dem Maximum der Absorptionsbande des Tyrosins auch geschlossen werden, welcher Prozentsatz des Tyrosins dissoziiert ist.

## UV-Absorptionsspektrum der Proteine

### Globaläre Proteine

Das Spektrum der globulären Proteine ist nun im wesentlichen rein additiv aus den Absorptionen der einzelnen chromophoren Systeme entsprechend ihrer Menge zusammengesetzt. Bei Proteinen mit kleinem Molekulargewicht, die sich klar lösen, zeigt das Spektrum unterhalb 250 m $\mu$  eine ansteigende Absorption, die außer auf die aromatischen Aminosäuren auch auf die aliphatischen Aminosäuren, Histidin und u. U. Cystin zurückzuführen ist, oberhalb 250 m $\mu$  zeigt das Spektrum der Proteine eine Bande mit einem Maximum um 280 m $\mu$ , das nur durch die aromatischen Aminosäuren bedingt ist<sup>22</sup>). Proteine mit sehr großem Molekulargewicht zeigen zusätzlich noch eine unspezifische,

<sup>20)</sup> J. L. Crammer u. A. Neuberger, Biochemic. J. 37, 302 [1940].

<sup>21)</sup> T. Caspersson, Chromosoma 1, 562 [1940].

<sup>22)</sup> Zusammenstellung von Absorptionskurven von Proteinen s. F. Ellinger, Tabulae Biologicae 12, 291 [1937].

nach kurzen Wellen ansteigende Absorption, die auf eine Streuung des eingestrahnten Lichtes an der Oberfläche der Molekeln (Trübung) beruht<sup>21, 47, 48</sup>) (s. Bild 4).

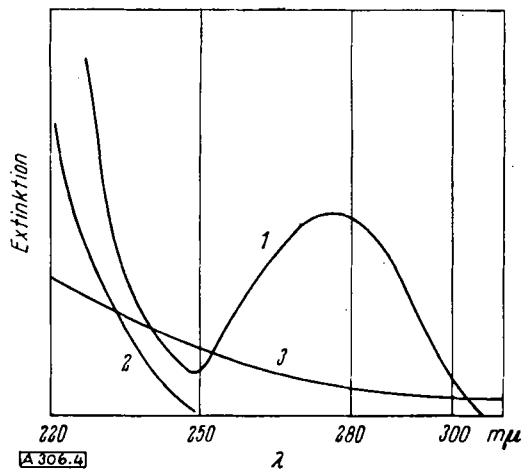


Bild 4. Schematische Darstellung der Absorption von Proteinen.  
1.) Aromatische Aminosäuren, 2.) Aliphatische Aminosäuren,  
3.) Tyndall-Streuung

Die Feinstruktur der Spektren der im Protein vorhandenen aromatischen Aminosäuren verschwindet im allgem. im Spektrum der Eiweißstoffe infolge von Überlagerung der Banden der einzelnen Aminosäuren. Bei tiefen Temperaturen ( $-100^{\circ}$ ) kann aber zuweilen, wie beim Pepsin, eine Auflösung in eine Anzahl scharfer, enger Banden erzielt werden<sup>23</sup>), entsprechend dem Befund, daß die Einzelbanden von Benzol-Derivaten bei tiefen Temperaturen viel stärker hervortreten<sup>24</sup>). Auch beim Tryptophan erhält man bei tiefen Temperaturen eine schärfere Auflösung in Einzelbanden<sup>25</sup>).

Die Spektren der meisten Proteine werden vom  $p_H$  der Lösung beeinflusst, da sie Tyrosin als Baustein im Molekularverband enthalten. Man beobachtet beim Übergang vom sauren zum alkalischen Gebiet je nach dem Tyrosin-Gehalt eine mehr oder weniger starke Verschiebung der Absorptionsbande um  $280\text{ m}\mu$  nach längeren Wellen (maximal etwa bis  $295\text{ m}\mu$ ), eine Abflachung des Minimums um  $260\text{ m}\mu$  und eine Zunahme der Absorption unterhalb  $265\text{ m}\mu$ . Lediglich die Spektren Tyrosin-freier Proteine sind weitgehend unabhängig vom  $p_H$  der Lösung.

Das Spektrum des Papains entspricht der Summe des darin enthaltenen Tyrosins und Tryptophans. Beim Übergang vom sauren ( $0,01\text{ n HCl}$ ) zu alkalischem Gebiet ( $0,01\text{ n}$  und  $0,1\text{ n NaOH}$ ) erfolgt Verschiebung der Absorption nach Rot, entsprechend der Dissoziation der Tyrosin-Gruppen. In saurer Lösung ist die Vorhandensein des Tryptophans bei  $289\text{ m}\mu$  noch zu erkennen, in alkalischer Lösung wird sie durch die Dissoziation der Tyrosin-Gruppen überdeckt<sup>25a</sup>).

Das Spektrum des Insulins kann im  $p_H$ -Gebiet zwischen 1 und 13 oberhalb  $270\text{ m}\mu$  (Bild 5) vollkommen erklärt werden durch den Gehalt an den Aminosäuren Tyrosin und Cystin (Insulin enthält 12,5% Tyrosin und 12,5% Cystin<sup>26</sup>); bei einem Molekulargewicht von  $46000$ <sup>27</sup>) entspricht dieses 32 Tyrosin-Gruppen und 24 Cystin-Gruppen in der Insulin-Molekel. Das Absorptionsmaximum ist um etwa  $2\text{ m}\mu$  nach längeren Wellen gegenüber der aus der Zusammensetzung berechneten Kurve verschoben. Eine Verschiebung der Absorptionsbande um  $280\text{ m}\mu$  in Proteinen um  $1-3,5\text{ m}\mu$  gegenüber dem Spektrum entsprechender Aminosäure-Gemische wurde auch von anderer Seite angegeben<sup>14</sup>) (s. unten). Unterhalb  $270\text{ m}\mu$  läßt sich die für das Insulin gefundene Absorptionskurve nicht mehr allein durch Tyrosin und Cystin erklären; in diesem Gebiet muß auch die Absorption des Phenylalanins berücksichtigt werden. Die Änderung der Absorption zwischen  $p_H\ 9$  und  $13$  entspricht der zunehmenden Dissoziation der Tyrosin-Gruppen. Allerdings disso-

ziieren die phenolischen OH-Gruppen im Insulin bei einem höheren  $p_H$  als diejenigen des freien Tyrosins. Während sich aus den Absorptionsdaten des Tyrosins die phenolische Dissoziationskonstante  $pK$  zu  $10,1$  berechnen läßt, in Übereinstimmung mit auf anderem Wege erhaltenen Ergebnissen, ergibt sich für die phenolischen Gruppen im Insulin aus der Änderung der Spektren mit dem  $p_H$  ein  $pK$ -Wert von etwa  $11,0$ . Während also im Tyrosin die phenolischen OH-Gruppen bereits bei einem  $p_H$  von  $10,1$  zu  $50\%$  dissoziiert sind, sind im Insulin  $50\%$  dieser Gruppen erst bei einem  $p_H$  von etwa  $11,0$  dissoziiert. Dementsprechend tritt vollkommene Dissoziation beim Insulin auch erst bei einem etwas höheren  $p_H$ -Wert ein als beim Tyrosin selbst. Beim  $p_H\ 13$  sind etwa  $30$  von  $32$  Tyrosin-Gruppen dissoziiert. In stark alkalischer Lösung (oberhalb  $p_H\ 13$ ) zeigt das Spektrum des Insulins eine starke Zunahme zwischen  $265$  und  $285\text{ m}\mu$  und das dem Phenolat-Ion der Tyrosin-Gruppen entsprechende Maximum bei  $295\text{ m}\mu$  wird weniger ausgeprägt. Diese „unspezifische“ Absorption ist vielleicht auf eine bisher unbekannte Änderung in der Insulin-Molekel zurückzuführen<sup>18a</sup>).

Daß die Additivität der Eiweiß-Absorption aus den Absorptionen der Komponenten nicht immer vollkommen ist, beobachteten bereits  $1925$  Stenström und Reinhard<sup>9</sup>) beim Studium der Absorption von Bluteiweißkörpern (Albumin und Globulin).

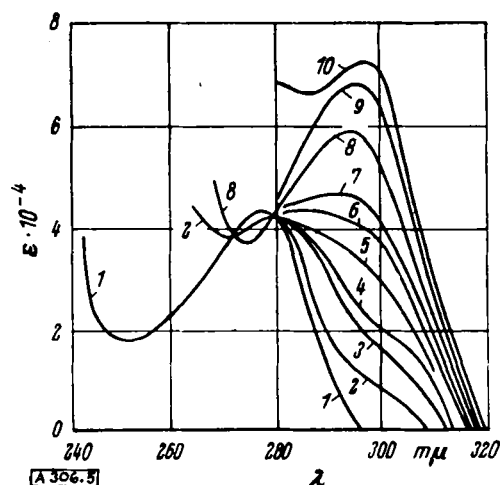
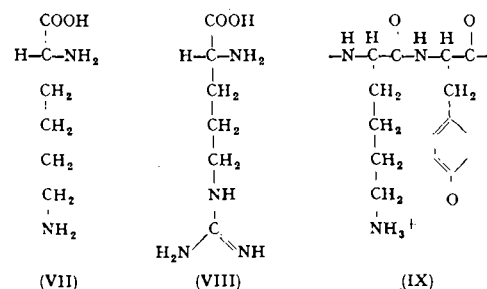


Bild 5  
Spektrum des Insulins<sup>18a</sup>). Kurve 1.)  $p_H = 1$ ; 2.)  $p_H = 9,9$ ; 3.)  $p_H = 10,2$ ;  
4.)  $p_H = 10,45$ ; 5.)  $p_H = 10,8$ ; 6.)  $p_H = 11,35$ ; 7.)  $p_H = 11,8$ ;  
8.)  $p_H = 12,3$ ; 9.)  $p_H = 13,0$ ; 10.)  $p_H = 13,4$

In neutraler Lösung ( $p_H\ 7,5$ ) lag die Absorptionsbande der Bluteiweißkörper um etwa  $5\text{ m}\mu$  längerwellig, als es dem Gehalt an den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan entsprach. Während das Maximum der Absorption im Eiweiß bei  $280\text{ m}\mu$  lag, zeigte eine entspr. Mischung vom Tyrosin und Tryptophan ein Maximum bei  $275\text{ m}\mu$ . In alkalischer Lösung ( $p_H\ 12,7$ ) befand sich dagegen das Maximum der Absorption der Aminosäure-Mischung und der Eiweiß-Lösung an gleicher Stelle ( $290\text{ m}\mu$ ). Stenström und Reinhard stellten zur Erklärung dieses Phänomens die Hypothese auf, daß auch in neutraler Lösung im Eiweißverband die phenolische OH-Gruppe der Tyrosin-Gruppen zum Teil dissoziiert ist. Sie machen für diese Dissoziation in die Peptidkette eingebaute Diaminosäuren verantwortlich. Ein Teil der Tyrosin-Gruppen soll in der Peptidkette mit einer Aminosäure verbunden sein, die eine freie Amino-Gruppe trägt (Lysin (VII), Arginin (VIII)), so daß unter dem Einfluß der Amino-Gruppen die phenolische OH-Gruppe enolisiert und damit auch in neutraler Lösung ein Zustand fixiert wird, der sonst nur in alkalischer Lösung beständig ist (IX).



<sup>23</sup>) G. J. Lavin, J. H. Northrop u. H. S. Taylor, J. Amer. Chem. Soc. 55: 3497 [1933]; 57, 874 [1935].

<sup>24</sup>) Kistiakowsky u. Arnold, ebenda 54, 1713 [1932].

<sup>25</sup>) J. E. Scott, R. L. Stinsheimer u. J. R. Loofbouroow, Science 107, 302 [1948].

<sup>25a</sup>) H. H. Darby, J. biol. Chemistry 139, 721 [1941]. Diese Untersuchungen stellen eine Korrektur der Arbeit von J. S. Fruton u. G. J. Lavin (ebenda 130, 375 [1939]) dar, welche die Banden des Tyrosins im Spektrum des Papains nicht zu finden meinten.

<sup>26</sup>) V. du Vigneaud, Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. 6, 275 [1938].

<sup>27</sup>) G. L. Miller u. K. J. L. Anderson, J. biol. Chemistry 144, 459 [1942].

Mit Zunahme des Gehaltes an Diaminosäuren in einer Eiweiß-Molekel sollte man dementsprechend eine noch ausgeprägtere Verschiebung der Absorptionsbande erwarten, und das scheint in der Tat der Fall zu sein.

Aus Thymus kann man sehr reine Histon-Präparate gewinnen, das sind verhältnismäßig niedrig molekulare Eiweißverbindungen, die sich durch einen hohen Gehalt an Diaminosäuren (s. Tabelle 3) auszeichnen. Die Spektren derartiger Präparate zeigen die „Tyrosin-Verschiebung“ in neutraler Lösung noch ausgeprägter<sup>21)</sup>. Der eigentliche Beweis dieser Hypothese müßte an Peptiden geführt werden. Allerdings wäre dabei zu beachten, daß bei diesen die Diaminosäure-Gruppe und Tyrosin-Gruppe frei drehbar sein können, während im Eiweiß-Verband eine Fixierung statthaben kann.

	Thymushiston	Serumglobulin	Serumalbumin
	%	%	%
Arginin .....	15,5	6,0	4,9
Lysin .....	7,7	8,9	13,2
Tyrosin .....	5,2	3,1	5,8
Tryptophan .....	1,5	6,6	1,4

Tabelle 3<sup>28)</sup>

Die eben besprochene Abhängigkeit des Maximums der Eiweiß-Absorption vom Gehalt der Diaminosäuren hat *Caspersson*<sup>21)</sup> ermöglicht, die Analyse von Zellbestandteilen durchzuführen. Mit Hilfe einer Apparatur, die Mikroskop und UV-Monochromator vereinigt, konnte er die UV-Absorption kleinster Zellbezirke bestimmen. Er fand dabei, daß in der Zelle (außer Nukleinsäure) zwei verschiedene Eiweiß-Verbindungen vorkommen, einmal Eiweiß vom Typ der Globuline und Albumine und zum anderen basische Eiweißstoffe vom Typ der Histone. Das Globulin-Albumin-Eiweiß hat ein Maximum der Absorption bei 275–280 m $\mu$ , die Histone dagegen ein solches bei 290 m $\mu$ .

*Crammer* und *Neuberger*<sup>18a)</sup> haben das Spektrum des Eieralbumins in Abhängigkeit vom p<sub>H</sub> oberhalb 260 m $\mu$  näher untersucht. In saurer Lösung ist die Absorptionsbande um etwa 3–4 m $\mu$  nach Rot verschoben im Vergleich zu der Bande einer entsprechenden Mischung von Tyrosin und Tryptophan (Eieralbumin enthält bei einem Molgewicht von 43000<sup>29)</sup> 10 Tyrosin-Gruppen und 3 Tryptophan-Gruppen je Molekel). Bei p<sub>H</sub> 9,5 und p<sub>H</sub> 13 stimmen die Lagen der Bandenmaxima zwischen gefundener und berechneter Absorptionskurve überein, aber die Bande des Eieralbumins ist etwas breiter. Die Autoren diskutieren die Möglichkeit, daß die Absorption des Tyrosins und des Tryptophans im Eiweiß-Verband durch die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken etwas verändert sein könnten. Es ist bekannt, daß Wasserstoff-Bindungen in einer Molekel eine Verschiebung der Absorption nach Rot verursachen<sup>30, 31)</sup>. Ferner hat *Holiday*<sup>32)</sup> gefunden, daß die Feinstruktur der Tryptophan-Bande im Eieralbumin etwas nach längeren Wellen verschoben ist. Auffälligerweise zeigt das Spektrum des Eieralbumins im Gebiet zwischen p<sub>H</sub> 9,5 und 12,0 nur eine geringere Änderung, als es dem Gehalt an Tyrosin entspricht. Die Berechnung der phenolischen Dissoziationskonstante für das im Eieralbumin gebundene Tyrosin ergibt aus der Spektrumsverschiebung einen pK-Wert von 11,4–11,8 (Tyrosin: pK 10,1). Beim Übergang von p<sub>H</sub> 12 zu p<sub>H</sub> 13 findet eine deutliche Änderung der Absorptionskurve statt. Diese Veränderung des Spektrums bleibt nun auch bestehen, wenn das p<sub>H</sub> wieder auf 12 erniedrigt wird (s. Bild 6). Bei p<sub>H</sub> 13 wird das Eieralbumin aber bereits denaturiert und die irreversible Änderung des Spektrums entspricht dem Denaturierungsvorgang. Nicht nur die durch Alkali (p<sub>H</sub> 13) hervorgerufene Denaturierung, sondern auch die Denaturierungen durch Säure, Harnstoff oder Hitze verursachen eine ausgeprägte Zunahme der Absorption oberhalb 285 m $\mu$  bei p<sub>H</sub> 12 gegenüber dem Spektrum des nativen Eieralbumins. *Crammer* und *Neuberger* nehmen zur Erklärung dieses Vorganges an, daß im nativen Eieralbumin die phenolischen OH-Gruppen der Tyrosin-

Gruppen zum Teil durch Wasserstoff-Bindungen blockiert sind und nur 2–3 OH-Gruppen (von 10) pro Molekel frei dissoziieren können. Die Wasserstoff-Brücken sollen zu Carboxyl-Gruppen bzw. Carboxylat-Ionen und zu SH-Gruppen bestehen. Durch Denaturierung werden die Wasserstoff-Bindungen gelöst, und es werden nun weitere phenolische OH-Gruppen zur Dissoziation frei (die Zunahme der Absorption beim Übergang von p<sub>H</sub> 12 zu p<sub>H</sub> 13 entspricht 5–6 Tyrosin-Gruppen pro Molekel). Diese Auffassung steht im Einklang mit dem Bild, das *Mirsky* und *Pauling*<sup>33)</sup> von der Denaturierung entworfen haben.

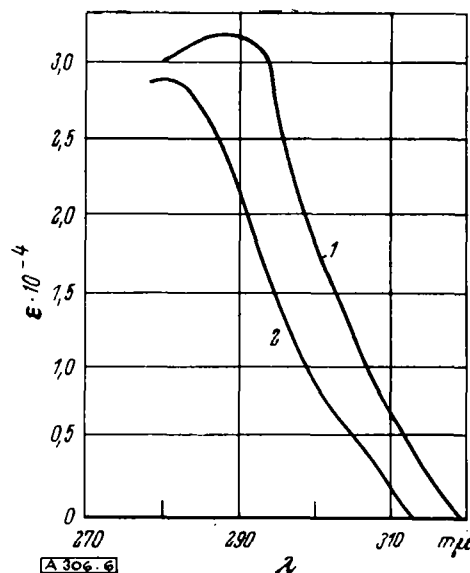


Bild 6

Spektrum des nativen (2.) und denaturierten (1.) Eieralbumins bei p<sub>H</sub> = 12,0<sup>18a)</sup>

Zur gleichen Auffassung gelangen auch *Sizer* und *Peacock*<sup>34)</sup>, die das Spektrum des Rinderserumalbumins in Abhängigkeit vom p<sub>H</sub> untersuchten. Das Spektrum und der Einfluß des p<sub>H</sub> darauf kann beinahe quantitativ gedeutet werden auf der Basis, daß nur Tyrosin für die Absorption verantwortlich zu machen ist. Für die langwellige Bande ist die Übereinstimmung bei allen untersuchten p<sub>H</sub>-Werten (4,3; 10,5; 12,0) gut. Ein deutlicher Unterschied tritt aber bei p<sub>H</sub> 12 im kurzwelligen Teil des Spektrums auf. Während das Spektrum des Tyrosins bei p<sub>H</sub> 12 ein zweites scharfes Maximum bei 240 m $\mu$  hat, zeigt die Absorptionskurve des Rinderserumalbumins an dieser Stelle nur eine Abflachung. Nach enzymatischer Spaltung nimmt die Absorption bei 240 m $\mu$  bei 10,5 und noch ausgeprägter bei p<sub>H</sub> 12 zu. Dieser Unterschied wird dadurch erklärt, daß im nativen Protein die meisten phenolischen OH-Gruppen durch Wasserstoff-Brücken gebunden sind und erst durch die enzymatische Hydrolyse frei werden.

Während in den Albuminen und auch bei den Proteinen des Serums<sup>9)</sup> die vollständige Ionisation der Tyrosin-OH-Gruppen erst nach Denaturierung, Hydrolyse oder oberhalb p<sub>H</sub> 12 stattfinden kann und sich im Spektrum nachweisen läßt, ist sie nach an kristallisiertem Trypsin durchgeführten Absorptionsmessungen beim p<sub>H</sub> 12 im wesentlichen abgeschlossen. Im Trypsin müssen demnach die phenolischen OH-Gruppen weitgehend frei vorliegen, was im Hinblick auf die leichte alkalische Inaktivierbarkeit (Übergang undissoziierter in ionisierte Tyrosin-Gruppen) von Bedeutung ist<sup>34)</sup>. Dieser Auffassung entspricht, daß Trypsin und auch Insulin von dem Ferment Tyrosinase angegriffen werden, während Eieralbumin, Rinderserumalbumin im nativen Zustand dagegen resistent sind<sup>35)</sup>.

Nachdem die Zusammenhänge zwischen Absorption und den Eiweißbausteinen erkannt worden waren, lag es nahe, die Absorptionsspektren der Proteine auch zu quantitativen, analytischen Untersuchungen heranzuziehen. Besonders hervorzuheben sind die grundlegenden Versuche von *Holiday*<sup>16, 36)</sup>, der eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Tyrosin und Tryptophan

<sup>28)</sup> Nach *F. Lehnartz*, Einführung in die physiolog. Chemie, 7. Auflage, 1947.

<sup>29)</sup> *A. C. Chidnall*, Proc. Roy. Soc. Ser. B 131, 136 [1942].

<sup>30)</sup> *R. A. Morton* u. *C. A. Stubbs*, J. Chem. Soc. [London] 1940, 1347.

<sup>31)</sup> *H. Dannenberg*, Z. Naturforsch. 4b, 327 [1949].

<sup>32)</sup> Zitiert nach <sup>18a)</sup>.

<sup>33)</sup> *A. E. Mirsky* u. *L. Pauling*, Proc. nat. Acad. Sci., Wash., 22, 439 [1936].

<sup>34)</sup> *J. Schormüller*, Pharmazie 4, 105 [1949].

<sup>35)</sup> *J. W. Sizer*, J. biol. Chemistry 163, 145 [1946].

<sup>36)</sup> Biochemic. J. 32, 1166 [1938].

ausgearbeitet hat. Diese beruht auf der charakteristisch verschiedenen  $p_H$ -Abhängigkeit der Spektren von Tyrosin und Tryptophan. Die Aufnahme des Spektrums wird in stark alkalischer Lösung durchgeführt, in der das Tyrosin vollkommen dissoziiert vorliegt. Die Auswertung erfolgt durch die Extinktionen bei 280  $m\mu$  (Maximum der Tryptophan-Absorption) und bei 305  $m\mu$  (hauptsächlich Tyrosin-Absorption) nach den Gleichungen:

$$M_{\text{Tyrosin}} = (0,99 E_{305} - 0,032 E_{280}) \cdot 10^{-3}$$

$$M_{\text{Tryptophan}} = (0,207 E_{280} - 0,280 E_{305}) \cdot 10^{-3}$$

Darin bedeuten  $M$  die molaren Konzentrationen der beiden Aminosäuren und  $E_{280}$  bzw.  $E_{305}$  die Extinktionen der Protein-Lösung bei 280 bzw. 305  $m\mu$ . Die Zahlenfaktoren ergeben sich aus den Absorptionswerten der reinen Aminosäuren bei entsprechendem  $p_H$ .

Tabelle 4 gibt eine Zusammenstellung der aus den Absorptionsdaten errechneten Prozentzahlen von Tyrosin und Tryptophan für verschiedene Proteine im Vergleich zu Werten, die auf chemischem Wege bestimmt worden sind.

	Tyrosin %		Tryptophan %	
	Spektr.	Chem.	Spektr.	Chem.
Pferdeserumeuglobulin ..	7,7	6,9	2,3	2,1
Pferdeserum-pseudoglobulin .....	7,5	7,2	2,3	2,2
Caseinogen I .....	5,8	5,7	2,6	2,1
Caseinogen II .....	6,95	6,2	1,0	1,2
Caseinogen I .....	6,45	6,55		
Gliadin .....	3,4	3,1	0,7	0,84
Insulin .....	12,7	12,5	0	—

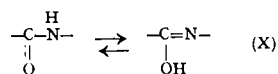
Tabelle 4  
Bestimmung von Tyrosin und Tryptophan in Proteinen<sup>18)</sup>

Godwin und Morton<sup>8a)</sup> nehmen zur quantitativen Bestimmung des Tyrosins und Tryptophans auch das Spektrum des Proteins in stark alkalischer Lösung (0,1 NaOH) auf, benutzen bei der Berechnung aber den Extinktionswert einer Wellenlänge, bei der Tyrosin und Tryptophan die gleichen Extinktionskoeffizienten haben (294,4  $m\mu$ ), und einer anderen Wellenlänge (280  $m\mu$ ), bei der die beiden Aminosäuren verschiedene Extinktionskoeffizienten haben. Gute Werte werden nur dann erhalten, wenn das Molverhältnis von Tyrosin zu Tryptophan zwischen den Grenzen 20:1 und 1:20 liegt.

Der Vorteil der quantitativen Bestimmung des Tyrosins und des Tryptophans in Proteinen aus den Absorptionsspektren liegt vor allem darin, daß das Protein nur in wenig verändertem Zustand, ohne Gefahr von Verlusten und von sekundären Umwandlungen durch chemische Eingriffe, untersucht wird und außerdem nur kleinste Substanzmengen benötigt werden. Die Durchführung der Bestimmungen mit Hydrolysaten an Stelle der nativen Proteine bietet keinen Vorteil<sup>8a)</sup>.

## Faserproteine

Die Ultraviolettabsorption der globulären Proteine läßt sich weitgehend durch die Absorption der Aminosäuren, aus denen die Eiweißverbindungen aufgebaut sind, erklären, ohne daß der Verknüpfungsart der Aminosäuren untereinander, der Peptidkette, eine zusätzliche, spezifische Absorption zuzuschreiben wäre. Im Gegensatz dazu zeigen die Faserproteine, soweit sie bis jetzt untersucht worden sind, eine zusätzliche Absorption im Gebiete von 250  $m\mu$ . Diese ist entweder vorhanden oder kann künstlich erzeugt werden und ist, wie Kratky, Schauenstein und Mitarbeiter zeigen konnten, zurückzuführen auf die Ausbildung der tautomeren Form, der Enolform, der Peptid-Gruppierung (X).



Als Modellschubstanz wurde das Glycyl-l-tyrosin-anhydrid (XI) im Bereich von  $p_H$  6– $p_H$  13 untersucht (s. Bild 7)<sup>37)</sup>. Bei  $p_H$  6,5 zeigt diese Verbindung ein Spektrum, das demjenigen des Tyrosins (s. Bild 8) und anderer Tyrosin-haltiger Di- und

<sup>37)</sup> E. Schauenstein, Mh. Chem. 80, 821 [1949].

Tri-peptide<sup>38)</sup> entspricht. Bei  $p_H$  8,8–9,5 erscheint eine Inflektion um 250  $m\mu$ , die im Spektrum des Tyrosins nicht auftritt und

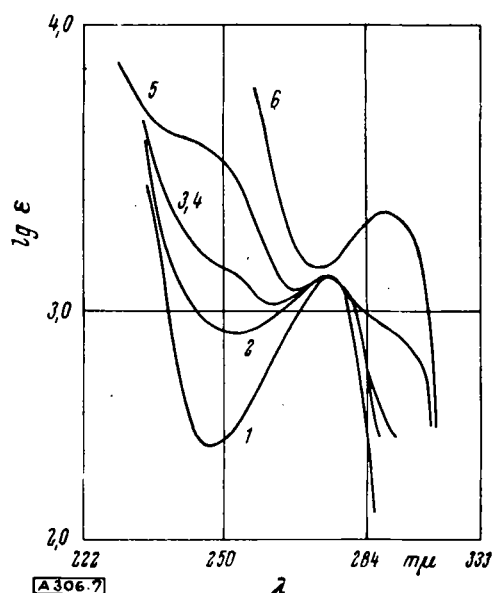


Bild 7<sup>37)</sup>  
Spektrum des Glycyl-l-tyrosin-anhydrids  
1.)  $p_H = 6-7$ ; 2.)  $p_H = 8,4$ ; 3 u. 4.)  $p_H = 8,8-9,0$ ; 5.)  $p_H = 9,5$ ;  
6.)  $p_H = 13,0$

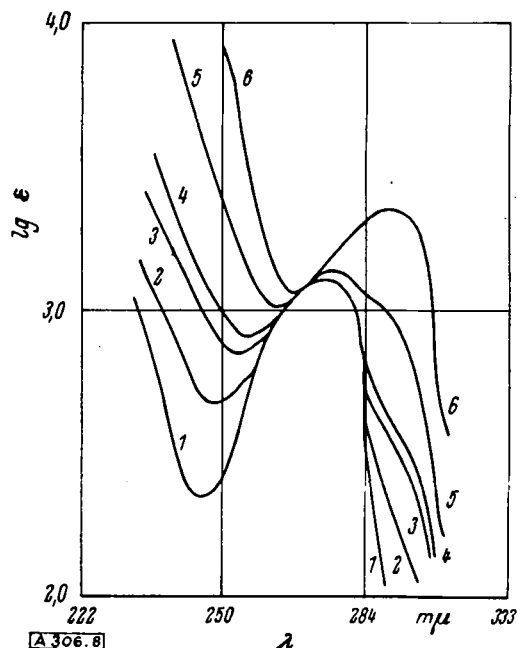
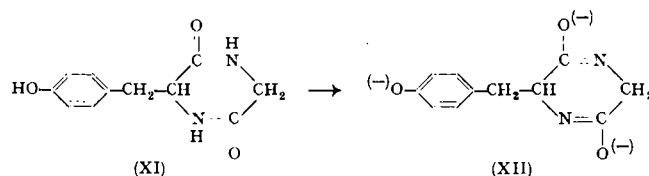


Bild 8<sup>37)</sup>  
Spektrum des l-Tyrosins  
1.)  $p_H = 6-7$ ; 2.)  $p_H = 8,4$ ; 3.)  $p_H = 8,8$ ; 4.)  $p_H = 9$ ;  
5.)  $p_H = 9,6$ ; 6.)  $p_H = 13$

die nur durch das Entstehen der tautomeren Form XII des Glycyl-l-tyrosin-anhydrids zu erklären ist.



Diese Zusatzabsorption bei 250  $m\mu$ , die auf das chromophore System  $-\text{N}-\text{C}-$  zurückzuführen ist, wurde bisher bei Fibrinen oder Lösungen vom Seidenfibroin<sup>39)</sup>, Aktomyosin<sup>40)</sup> und vom Kollagen<sup>41)</sup> beobachtet. Das Auftreten der Zusatzabsorption bei letzterem ist besonders wichtig, da dieses Protein keine

<sup>38)</sup> J. S. Fruton u. G. J. Lavin, J. biol. Chemistry 130, 375 [1939].

<sup>39)</sup> E. Schauenstein, J. O. Fixl u. O. Kratky, Mh. Chem. 80, 143 [1949].

<sup>40)</sup> E. Bürgermeister u. E. Schauenstein, ebenda 80, 310 [1949].

<sup>41)</sup> J. O. Fixl, O. Kratky u. E. Schauenstein, ebenda 80, 439 [1949].

Aminosäuren enthält, welche oberhalb 250 m $\mu$  absorbieren, so daß die  $-N-C-$ -Absorption hier rein vorliegt. Nach einem Vor-

schlag von *Schauenstein* wird in folgendem die  $-N=C-$ -Gruppe

als „Peptenol“-Gruppe und ihre spezifische Absorption um 250 m $\mu$  als Peptenol-Absorption bezeichnet<sup>42)</sup>.

Allgemein verstärkt die Erhöhung des  $p_H$ -Wertes die Peptenol-Absorption und in der gleichen Richtung wirkt in manchen Fällen eine mechanische Deformation (Dehnung bei Filmen) (s. Bild 9). Der  $p_H$ -Effekt ist weitergehend reversibel als der durch Dehnung bewirkte. Beide Effekte bewirken eine Umwandlung der Peptid-Gruppen in Peptenol-Gruppen, deren Bildung im Sinne der theoretischen Überlegungen von *Wirtz*<sup>43)</sup> mit dem Einschnappen der Wasserstoff-Brücken zwischen benachbarten Peptidketten zusammenhängt. Während aber die  $p_H$ -Erhöhung wohl weitgehend die Enolisierung, nicht aber unbedingt das Einschnappen der Wasserstoff-Brücken bewirken muß, schafft die Dehnung vielleicht primär die räumlichen Voraussetzungen für das Einschnappen der Wasserstoff-Brücken, denen dann die Enolisierung auch ohne  $p_H$ -Änderung folgt.

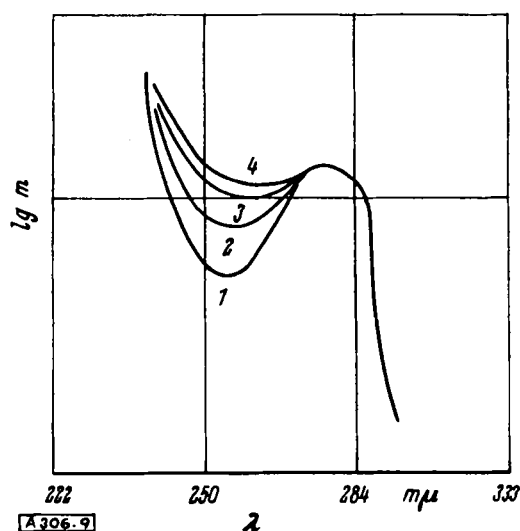


Bild 9  
Spektrum des Seidenfibroins<sup>42)</sup>  
1.) Nativschnitt; 2.) gewalzt-gedehnt, verschiedene Präparate

Durch hydrolytischen sowie enzymatischen Abbau kann die Peptenol-Absorption weitgehend beseitigt werden. Nunmehr vermag auch eine starke  $p_H$ -Erhöhung nur noch geringe Wirkungen zu entfalten. Im Gegensatz dazu tritt die Absorption der Phenolat-Ionen der Tyrosin-Gruppen im Gebiet um 250 m $\mu$  bei den globulären Proteinen (s. Rinderalbumin<sup>44)</sup>) erst auf nach der enzymatischen Hydrolyse.

Zur weiteren Klärung der Peptenol-Absorption haben Untersuchungen mit polarisiertem UV-Licht beigetragen<sup>37, 39)</sup> unter Anwendung einer Methode, die insbes. von *Scheibe*<sup>44)</sup> entwickelt worden ist. Beim höher orientierten Seidenfibroin wurde mit dieser Methode gefunden:

- 1.) eine Orientierung des Tyrosins parallel zur Dehnungsrichtung,
- 2.) eine Orientierung der Peptenol-Absorption unter etwa 45° zur Dehnungsrichtung in der Filmebene (s. Bild 10).

Der Winkel von 45° entspricht etwa der Richtung der C=N-Bindung in der  $\beta$ -Form des Seidenfibroins. Die gleichzeitige Ausrichtung der Tyrosin-Reste läßt den Zusammenhang der beiden Erscheinungen erkennen. Letzteres legt die Vorstellung einer Erhöhung der gittermäßigen Ordnung, eines Einschnappens der Tyrosin-Reste in eine bestimmte Lage, nahe. Diese Deutung wird durch Röntgenergebnisse aufs beste gestützt<sup>45)</sup>.

Im Gegensatz zum Seidenfibroin absorbiert nach Untersuchungen mit polarisiertem UV-Licht beim Kollagen bevorzugt die Achsenrichtung offenbar in Übereinstimmung mit dem Ast-

buryschen Modell, in welchem ein Teil der C=N-Bindungen mit der Faserachse zusammenfällt, während die anderen C=N-Bindungen schief zur Faserachse liegen, aber symmetrische Stellungen zu dieser einnehmen. Es ist dann eine resultierende bevorzugte Absorption in der Faserrichtung verständlich<sup>41)</sup>.

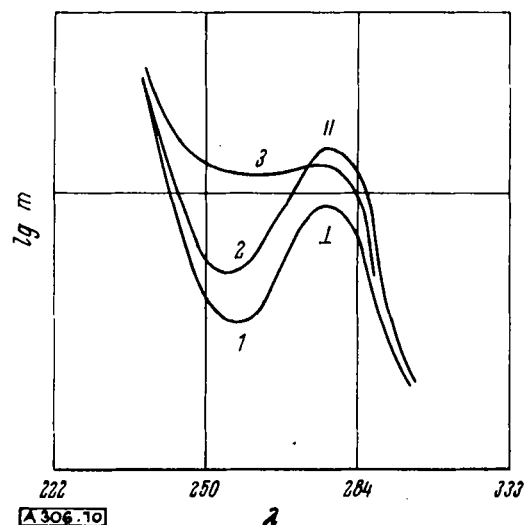
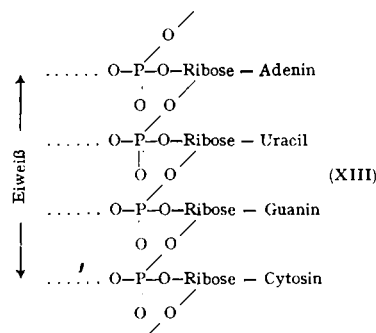


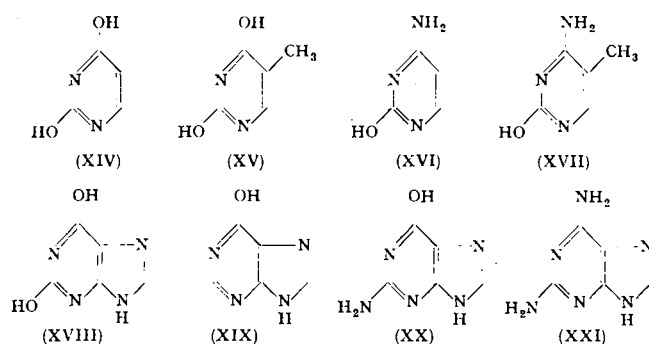
Bild 10. Spektrum des Seidenfibroins mit polarisiertem Licht<sup>42)</sup>  
1.) Schwingungsebene senkrecht zur Faserachse  
2.) Schwingungsebene parallel zur Faserachse  
3.) Schwingungsebene unter 45° zur Faserachse

## Nukleinsäuren und Nukleoproteide

Eine Betrachtung der Absorption von Proteinen wäre unvollständig, wenn man nicht zugleich auch die Nukleinsäuren betrachten würde. Die Nukleinsäuren bestehen aus Purin- und Pyrimidinbasen, die an Ribose oder Desoxyribose gebunden sind (Nukleoside), diese Verbindungen werden wiederum durch Phosphorsäure miteinander verknüpft (XIII). Hefenukleinsäure enthält d-Ribose als Zuckerkomponente, Thymonukleinsäure dagegen d-2-Desoxy-ribose. Für die Absorption der Nukleinsäuren, die ein ausgeprägtes Maximum bei etwa 260 m $\mu$  aufweisen, sind die Purin- und Pyrimidinbasen verantwortlich zu machen. Die



Pyrimidinbasen sind: Uracil (XIV), Thymin (XV), Cytosin (XVI) und Methyl-cytosin (XVII); die Purinbasen: Xanthin (XVIII), Hypoxanthin (XIX), Guanin (XX) und Adenin (XXI). Sämtliche Basen sind durch charakteristische Absorptionskurven ausgezeichnet. Die Absorption der Nukleinsäuren stellt die Summe der Einzelabsorptionen der Purin- und Pyrimidinbasen dar<sup>46)</sup>.



<sup>42)</sup> O. Kratky u. E. Schauenstein, Vortrag auf d. biophysik. Arbeitstagung Mosbach, Oktober 1949; Z. Naturforsch. 58, 281 [1950].  
<sup>43)</sup> K. Wirtz, Z. Naturforsch. 2b, 94, 314 [1947]; 3b, 131 [1948].  
<sup>44)</sup> G. Scheibe, St. Hartwig u. D. Müller, Z. Elektrochem. 49, 372 [1943].  
<sup>45)</sup> O. Kratky, E. Schauenstein u. A. Sekora, Nature 165, 319, 528 [1950].

<sup>46)</sup> Zusammenstellung u. Literatur: R. A. Morton: The Application of absorption Spectra to the Study of Vitamins and Hormones. 2nd. Edit. London, 1942. S. 171 ff.

Hefenukleinsäure und Thymonukleinsäure zeigen die gleiche Form und Lage der Absorptionsbanden, die Intensität scheint bei der Hefenukleinsäure etwas größer zu sein.

Die Nukleinsäuren kommen nie als solche in der Zelle vor, sondern sind stets mit der Phosphorsäure salzartig an Proteine gebunden: Nukleoproteide (XIII). Die Absorption von Nukleoproteiden stellt eine Überlagerung der Absorption der Nukleinsäuren mit derjenigen der Proteine dar. Bild 11 zeigt die Absorptionskurven von Zellbestandteilen: Nukleinsäure-Globulin und Nukleinsäure-Histon. Im letzteren sind die beiden Komponenten im Spektrum deutlicher zu erkennen, da die Bandenmaxima weiter auseinanderliegen<sup>21)</sup>.

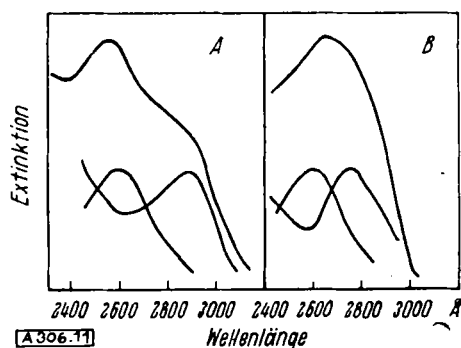


Bild 11

Schematische Darstellung der Entstehung von 2 Typen von Absorptionsspektren von Zellkernstrukturen<sup>21)</sup>

- A.) Nukleinsäure und Eiweiß vom Histon-Typ  
B.) Nukleinsäure und Eiweiß vom höheren Typ (Globulin-Albumin)

Ein Nukleoprotein stellt auch das Tabakmosaikvirus (TM-Virus) dar. Reine TM-Virus-Lösungen zeigen bei  $p_H$  7,0 ein Maximum bei etwa 260  $m\mu$ , welche auf den Nukleinsäure-Anteil zurückzuführen ist, eine schwache Inflektion um 280  $m\mu$ , bedingt durch die aromatischen Aminosäuren der Eiweiß-Komponente, und eine uncharakteristische Absorption oberhalb 310  $m\mu$ . Das Spektrum des TM-Virus wird beeinflusst vom  $p_H$  der Lösung; diese Abhängigkeit wird hauptsächlich durch den Eiweiß-Anteil verursacht, das Spektrum der Nukleinsäure ist weitgehend unabhängig vom  $p_H$  der Lösung. Die Absorption im Gebiet oberhalb 310  $m\mu$  beruht auf der Streuung des eingestrahlten Lichtes an den großen, stäbchenförmigen Molekeln des TM-Virus (Länge etwa 200  $m\mu$ , Dicke 15  $m\mu$ ). Dieser Kurvenast geht proportional  $1/\lambda^4$  entsprechend dem Rayleighschen Gesetz für die Streuung:  $\alpha = C/\lambda^4$ . Die Konstante C kann aus der reinen Kurve der Tyndall-Streuung oberhalb 310  $m\mu$  berechnet werden. Mit Hilfe der Konstante kann auch die Streuungskurve im Gebiet der selektiven Absorption unterhalb 310  $m\mu$  berechnet werden. Subtraktion der Streuungskurve von der gemessenen Gesamtaborption ergibt die wahre Absorptionskurve des TM-Virus (s. Bild 12). Beinahe die gleiche Absorptionskurve, unter Berücksichtigung der geringeren Tyndall-Streuung, erhält man, wenn man TM-Virus in kleinere Bruchstücke spaltet (s. Bild 12) oder wenn man TM-Virus in Nukleinsäure- und Eiweiß-Komponente spaltet und die Absorptionskurven der Komponenten addiert (s. Bild 13). Nur wenn die durch Tyndall-Streuung bedingte „scheinbare“ Absorption berücksichtigt wird, können reproduzierbare Absorptionskurven des TM-Virus erhalten werden<sup>47)</sup>. Die Verschiedenheit der Spektren von TM-Virus-Lösungen, die unter verschiedenen Bedingungen hergestellt worden waren<sup>48)</sup>, ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß die Tyndall-Streuung nicht beachtet wurde. Auch die großen Unterschiede der Absorptionskurven von Mutanten des TM-Virus<sup>49, 50)</sup> verschwinden, wenn der jeweilige Anteil der Tyndall-Streuung von der Gesamtaborption subtrahiert wird<sup>51)</sup>. Eine Bestätigung, daß Streuung und selektive Absorption sich gegenseitig nicht beeinflussen und daß sich die Gesamtaborption rein additiv aus

<sup>47)</sup> G. Schramm u. H. Dannenberg, Ber. dtsch. chem. Ges. 77, 53 [1944].

<sup>48)</sup> G. J. Lavin, N. S. Loring u. W. M. Stanley, J. biol. Chemistry 130, 259 [1939].

<sup>49)</sup> G. Schramm u. L. Rebersburg, Naturwiss. 30, 49 [1942].

<sup>50)</sup> G. Melchers, G. Schramm, H. Trurnit u. H. Friedrich-Freksa, Biol. Zbl. 60, 524 [1940].

<sup>51)</sup> H. Dannenberg, G. Schramm u. H. Flammersfeld, Z. Naturforsch. 3b, 241 [1948].

dem Anteil der Tyndall-Streuung und demjenigen der selektiven Absorption zusammensetzt, ist in neuerer Zeit auch bei anderen Proteinen gefunden worden<sup>52)</sup>.

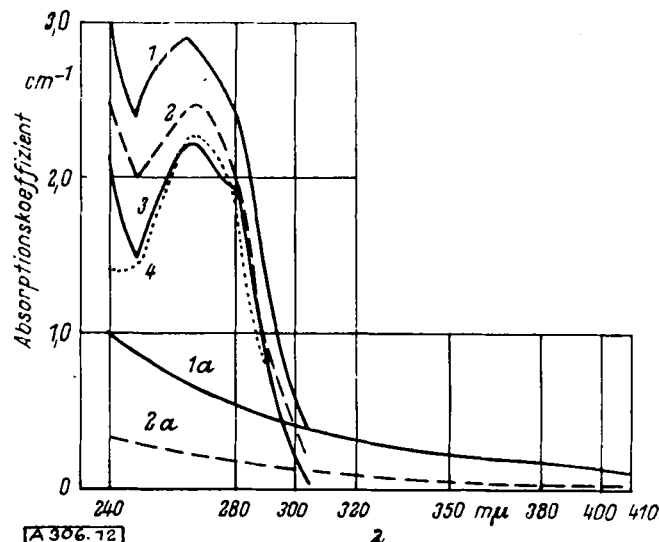


Bild 12. Spektren des nativen und denaturierten Tabakmosaikvirus<sup>47)</sup>

- 1.) Nativer TM-Virus; gemessene Extinktionskurve  
1a.) Nativer TM-Virus; gemessene und berechnete Streuungskurve  
2.) Denat. TM-Virus; gemessene Extinktionskurve  
2a.) Denat. TM-Virus; gemessene und berechnete Streuungskurve  
3.) Nativer TM-Virus; reine Absorptionskurve; Differenz 1-1a  
4.) Denat. TM-Virus; reine Absorptionskurve; Differenz 2-2a

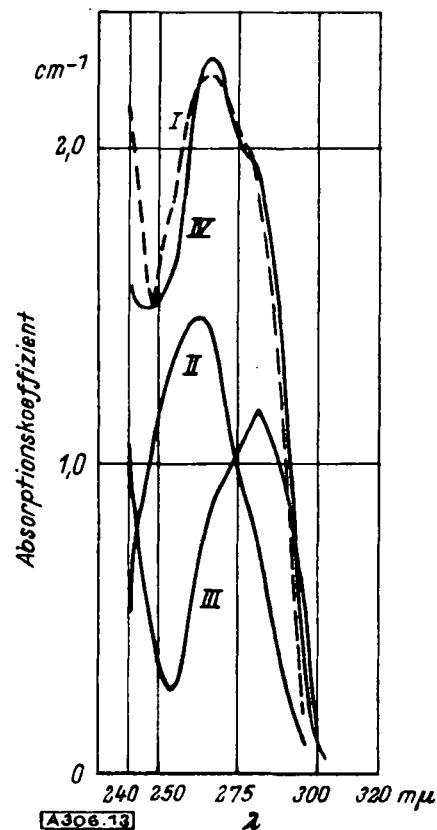


Bild 13. Zusammensetzung der TM-Virus-Absorption<sup>47)</sup>

- 1.) Reine Absorption des TM-Virus (vgl. Bild 12, Kurve 3)  
2.) Nukleinsäure-Komponente des TM-Virus  
3.) Proteinkomponente des TM-Virus  
4.) Additionskurve 2 + 3

Spaltet man TM-Virus in Nukleinsäure- und Eiweiß-Komponente, so läßt sich aus den Komponenten-Absorptionskurven der Gehalt des TM-Virus einerseits an Nukleinsäure und andererseits an den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan berechnen (s. Tabelle 5)<sup>47)</sup>.

	Spektr.	Chem.
	%	%
Nukleinsäure .....	5	5
Tryptophan .....	5,0	4,5
Tyrosin .....	4,0	3,8

Tabelle 5. Tabakmosaik-Virus

<sup>52)</sup> E. Treiber u. E. Schauenstein, Z. Naturforsch. 4b, 252 [1949].

Den umgekehrten Weg wählten *Butenandt, Friedrich-Freksa, Hartwig und Scheibe*<sup>53</sup>). Sie verglichen die Absorption der Mischung der absorbierenden Bestandteile mit derjenigen des nativen Virus und fanden auch hier eine recht gute Übereinstimmung der Kurven. Unstimmigkeiten besonders im kurzwelligen Gebiet um 250 m $\mu$  sind neben einer Nichtberücksichtigung der Tyndall-Streuung vielleicht auch auf die Absorption von Peptenol-Gruppen im nativen TM-Virus, wie sie bei Faserproteinen nachgewiesen worden ist, zurückzuführen<sup>54</sup>).

Untersuchungen mit polarisiertem UV-Licht gewährten weiteren Einblick in die Struktur des TM-Virus. Die Bestimmung des Absorptionsspektrums von durch Strömung ausgerichtetem TM-Virus mit polarisiertem Licht ergab, daß die Spektren verschieden sind, je nachdem ob der elektrische Lichtvektor parallel oder senkrecht zur Strömungsrichtung schwingt. Schwingt der elektrische Vektor des Lichtes senkrecht zur großen Achse des TM-Virus, so ist einmal das Maximum der Nukleinsäureabsorption ausgeprägter und zum anderen kommt die schmale Vorbande des Tryptophans bei 289 m $\mu$  nur in diesem Falle deutlich zum Vorschein (s. Bild 14). Aus diesem Ergebnis ist der Schluß zu ziehen, daß die Pyrimidin- und Purin-Ringsysteme der Ribonukleinsäure und die Indol-Ringe des Tryptophans im Stäbchen des TM-Virus in einer sehr strengen Ordnung vorliegen müssen, etwa wie Geldstücke in einer Geldrolle<sup>55</sup>).

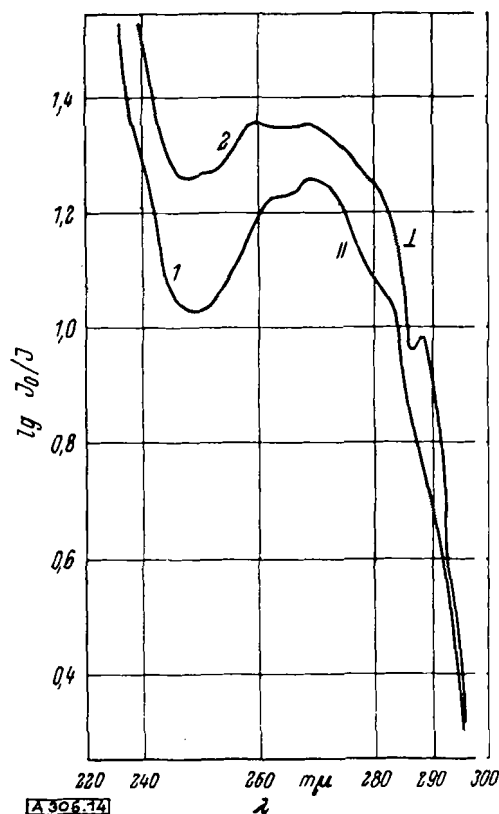


Bild 14

Absorptionskurve des durch Strömung ausgerichteten Tabakmosaikvirus<sup>53</sup>) m/15 Phosphatpuffer p<sub>H</sub> = 8; c = 4,5%

- 1.) Elektrischer Lichtvektor parallel zur Strömungsrichtung
- 2.) Elektrischer Lichtvektor senkrecht zur Strömungsrichtung

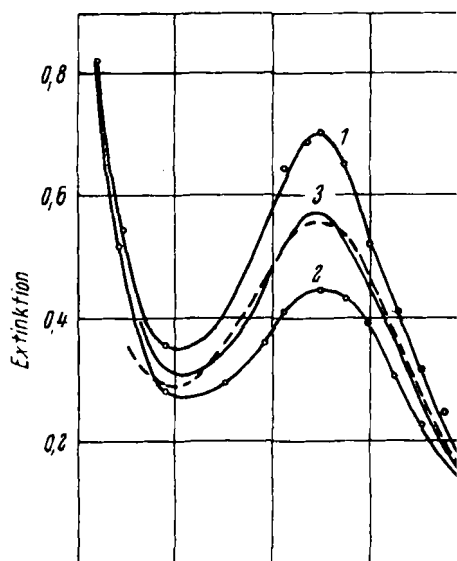
Eine Ausrichtung der Pyrimidin- und Purin-Ringsysteme beobachtete auch *Caspersson*<sup>56</sup>) bei gestreckten Thymonukleinsäure-Filmen. Polarisiertes UV-Licht mit zur Molekelachse senkrechter Schwingungsrichtung wird innerhalb der Pyrimidin- und Purin-Bande stärker absorbiert als Licht mit paralleler Schwingungsrichtung zur Molekelachse (Quotient maximal 1,5–1,6). In beiden Fällen weicht die Form der Absorptionskurven ab von derjenigen, die in unpolarisiertem Licht erhalten wird. Im ersteren Fall ist das Maximum spitzer, im letzteren stumpfer. Das Mittel der Werte der beiden Kurven gibt eine

<sup>53</sup>) Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 274, 276 [1942].

<sup>54</sup>) Nach Diskussionsbemerkung von O. Kratky auf d. biophysik. Arbeitstagung, Mosbach, Oktober 1949.

<sup>55</sup>) Chromosoma 1, 605 [1940].

Kurve, welche genau dieselbe Form und Höhe hat wie eine in unpolarisiertem Licht aufgenommene Kurve (s. Bild 15).



## Die Wirkung der aufgenommenen Strahlung

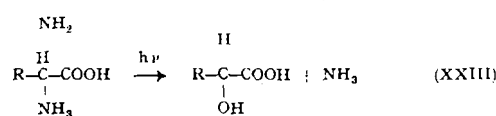
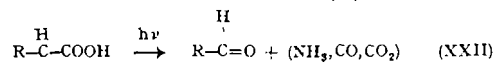
### Aminosäuren

Welche Wirkung hat die absorbierte Strahlung auf die Proteine? Unzählige Versuche haben gezeigt, daß die Eiweiß-Verbindungen sehr empfindlich sind gegenüber UV-Licht und daß die aufgenommene Energie zu photochemischen Veränderungen führt.

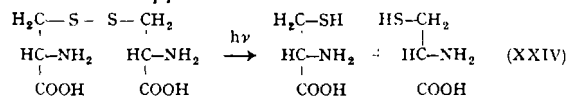
Es ist zweckmäßig, zuerst die photochemischen Reaktionen der Bausteine, der Aminosäuren, zu betrachten und dann erst zu den Proteinen selbst überzugehen. Hier soll versucht werden, das Typische dieser Reaktionen herauszustellen.

Ganz allgemein gilt das Gesetz von *Grotthius*, das besagt, daß photochemische Prozesse nur dann vor sich gehen können, wenn Strahlung absorbiert wird.

Aliphatische Aminosäuren und Peptide aus aliphatischen Aminosäuren werden bei vorsichtiger Bestrahlung mit Wellenlängen oberhalb 240 m $\mu$  nicht verändert<sup>56, 57, 58</sup>). Ist die Strahlung kurzwellig (etwa 220 m $\mu$ ) oder sind Sensibilisatoren zugegen, so tritt Zersetzung ein (Entwicklung von NH<sub>3</sub>, CO und CO<sub>2</sub>), die etwa durch folgende Reaktionsgleichungen gekennzeichnet werden kann<sup>59, 60, 61, 62, 63</sup>) (XXII, XXIII).



Sobald die Aminosäuren chromophore Systeme enthalten, die leichter anregbar sind, laufen auch die photochemischen Reaktionen leichter ab. Cystin geht bei Bestrahlung über in Cystein<sup>64, 65</sup>) (XXIV). Der photochemische Prozeß läuft an der absorbierenden Gruppe selbst ab:



<sup>56</sup>) D. T. Harris, Biochemic. J. 20, 288 [1926].

<sup>57</sup>) H. C. Eckstein u. F. Lieben, Biochem. Z. 263, 366 [1934].

<sup>58</sup>) Guillaume u. Tanret, C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. 201, 1057 [1933].

<sup>59</sup>) C. Neuberg, Biochem. Z. 13, 305 [1908].

<sup>60</sup>) H. Wieland u. Bergel, Liebigs Ann. Chem. 439, 203 [1924].

<sup>61</sup>) Ch. Weizmann, E. Bergmann u. Y. Hirshberg, J. Amer. Chem. Soc. 58, 1675 [1936].

<sup>62</sup>) Ch. Weizmann, Y. Hirshberg u. E. Bergmann, ebenda 60, 1799 [1938].

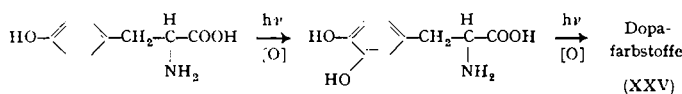
<sup>63</sup>) A. I. Allen, R. E. Steiger, M. A. Magill u. R. G. Franklin, Biochemic. J. 31, 195 [1937].

<sup>64</sup>) P. Scandré, U. Lampert u. F. Wrede, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 222, 16 [1933].

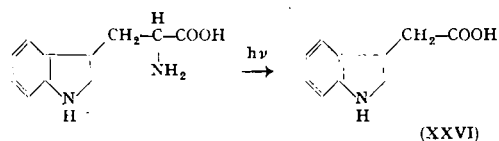
<sup>65</sup>) P. Holz, Klin. Wschr. 12, 1876 [1933].



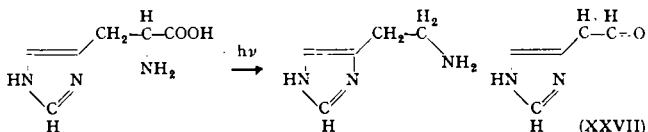
Noch leichter wird das Tyrosin photochemisch verändert. Unter Aufnahme von Sauerstoff bildet es zuerst Dioxy-phenylalanin, das zu Dopa-Farbstoffen weiter verändert wird<sup>66, 67</sup>) (XXV). Ähnlich wird auch das Tryptophan unter Aufnahme von Sauerstoff verändert und in Farbstoffe übergeführt<sup>68</sup>).



Interessanter ist aber eine andere photochemische Reaktion des Tryptophans. Unter Luftausschluß wird es bei Bestrahlung mit Wellenlängen unter 290 m $\mu$  oder mit Sonnenlicht in Indol-3-essigsäure übergeführt<sup>69</sup>) (XXVI). Dies scheint insofern bemerkenswert, da die absorbierte Strahlung nicht zu einer Veränderung am absorbierenden System führt, sondern zu einer Reaktion an der  $\alpha$ -Aminosäure-Gruppierung, die durch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe vom absorbierenden System isoliert ist:

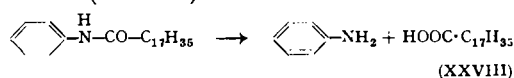


Ein ähnliches Ergebnis liefert die Bestrahlung des Histidins. Die Bestrahlung führt hier entweder zum Histamin<sup>69, 70, 71</sup>) oder zum Imidazol-acetaldehyd<sup>72</sup>) (XXVII). Auch hier tritt die Reaktion nicht am absorbierenden System ein.



## Peptidbindung

Die häufigste und charakteristischste Gruppierung in den Proteinen ist die Peptid-Gruppe. Oben wurde bereits erwähnt, daß Peptide aus aliphatischen Aminosäuren bei vorsichtiger Bestrahlung nicht verändert werden<sup>58</sup>). Die Beobachtung, daß bei der Bestrahlung von Eiweißlösungen die Zahl der freien Amino-Gruppen im Protein zunimmt<sup>73, 74</sup>), und daß kleinere Bruchstücke gebildet werden, hat zu Untersuchungen an Modellsubstanzen angeregt. Mitchell<sup>75</sup>) zeigte an Stearinanilid, daß dieses bei Bestrahlung in monomolekularer Schicht auf Säuren durch Wellenlängen von 235–250 m $\mu$  in Stearinsäure und Anilin gespalten wird (XXVIII):



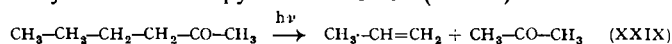
Die absolute Quantenausbeute betrug hierbei 0,2–0,3. Stearinanilid ist als Modellsubstanz aber nicht anzuerkennen, denn Peptid-Bindung und Benzol-Kern bilden ein einheitliches chromophores System (UV-Spektrum: Maximum bei 242 m $\mu$ ,  $\epsilon = 10500$ ) und die Photoreaktion tritt an der Atombindung des absorbierenden Systems ein, welche die geringste Energie für ihre Spaltung benötigt, und das ist in diesem Falle die C–N-Bindung (Spaltungsenergie 48,6 kcal/Mol<sup>76</sup>)). Später zeigte aber Carpenter<sup>77</sup>), daß die CO–NH-Bindung auch dann gespalten wird, wenn zwischen Peptid-Bindung und Benzol-Kern noch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe zwischengeschaltet wird (Benzyl-stearyl-amin). Die gleiche Spaltung tritt sogar ein, wenn zwei CH<sub>2</sub>-Gruppen

zwischengeschaltet werden ( $\beta$ -Phenyläthyl-stearyl-amin). Beide Verbindungen wurden auch wieder auf Säuren gespreitet und mit Wellenlängen um 250 m $\mu$  bestrahlt. Das Spektrum der beiden Verbindungen (Maximum bei 258 m $\mu$ ,  $\epsilon = 170$ ) in Lösung zeigt eindeutig, daß im Gebiet der aufgenommenen Strahlung nur der Benzol-Kern absorbiert. Bei diesen Versuchen kann man aber wohl diskutieren, ob im gespreiteten Zustand die CO–NH-Gruppe als solche vorliegt oder ob nicht unter dem Einfluß der Spreitung eine Enolisierung der Peptid-Gruppe, ein Übergang in die Peptenol-Gruppierung, vor sich gehen kann, wie es bei der Dehnung von Faserproteinen beobachtet worden ist<sup>42</sup>). Die eingestrahlte Energie würde in diesem Falle nicht nur vom Benzol-Kern, sondern auch von der Peptenol-Gruppe aufgenommen werden, und man könnte eine direkte Spaltung dieser Gruppierung annehmen, ohne eine Fortleitung der vom Benzol absorbierten Energie über eine bzw. zwei CH<sub>2</sub>-Gruppen anzunehmen. Diesem Einwand steht aber entgegen, daß bei acylierten Aminosäuren, die einen Benzol-Kern durch eine bis drei CH<sub>2</sub>-Gruppen getrennt von der CO–NH-Gruppierung tragen, auch in wäßriger Lösung bei 253,7 m $\mu$  Spaltung an der Peptid-Bindung auftritt<sup>78</sup>). Dabei ist es gleichgültig, ob der Benzol-Ring auf der Seite der CO-Gruppe oder auf derjenigen der NH-Gruppe steht. Die Quantenausbeute ist sogar um eine Zehnerpotenz größer, wenn Benzol-Kern und Peptid-Bindung durch drei CH<sub>2</sub>-Gruppen voneinander getrennt sind als wenn eine oder zwei CH<sub>2</sub>-Gruppen dazwischen stehen. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Intensität der Absorption bei 253,7 m $\mu$  und die Quantenausbeute. Dabei fällt auf, daß auch Acetylalanin bei dieser Wellenlänge Photolyse erleidet; die Quantenausbeute sogar höher ist als bei den Verbindungen, die einen Benzol-Kern enthalten. Vielleicht ist dieses auf eine direkte Absorption durch die CO–NH-Gruppe zurückzuführen.

Wäßrige Lösung von	in	Extinktionskoeff. bei 253,7 m $\mu$	Quantenausbeute
Acetyl-alanin	Luft	1,28	0,0715
Benzoyl-alanin	Luft	3000	0,0034
Phenylacetyl-alanin	Luft	142	0,00704
Phenylpropionyl-alanin	Luft	177	0,00680
"	Sauerstoff		0,00695
"	Stickstoff		0,00512
Propionyl-phenylalanin	Sauerstoff	145	0,0058
"	Stickstoff		0,0045
Phenylbutyryl-alanin	Luft	354	0,0437

Tabelle 6<sup>78</sup>)

Als Beispiel dafür, daß der Ort der Energieaufnahme und der Ort der photochemischen Reaktion voneinander durch CH<sub>2</sub>-Gruppen isoliert sein können, gilt die Spaltung des n-Butylmethylketons in Propylen und Aceton (XXIX):



Diese Spaltung erfolgt bei Bestrahlung mit Wellenlängen zwischen 220 und 300 m $\mu$ , dem Gebiet, in dem die CO-Gruppe absorbiert<sup>79</sup>).

Wenn auch heute über den Mechanismus der Spaltung von Peptiden aromatischer Aminosäuren noch nichts Endgültiges gesagt werden kann, so zeigen die Versuche an den Modellsubstanzen aber, daß hauptsächlich Peptidbindungen gespalten werden, die von aromatischen Aminosäuren gebildet werden wie z. B. die Peptidbindungen in Tyrosyldi- und -tri-peptiden<sup>80</sup>).

## Proteine

Die Vielzahl der vorstehend beschriebenen photochemischen Reaktionen der Eiweißbausteine macht deutlich, daß die Photo-reaktion der Proteine ein sehr komplexer Vorgang sein muß, und überblickt man die große Zahl der Arbeiten, die auf diesem Gebiet gemacht worden sind<sup>81</sup>), so stellen sie zum größten Teil nur eine Aufzählung einzelner physikalischer oder chemischer Veränderungen dar. Eine Deutung wird auch erst dann möglich sein, wenn man genügend Kenntnisse über die Feinstruktur der einzelnen nativen Proteine haben wird.

<sup>78</sup>) I. Mandl, B. Levy u. A. D. McLaren, J. Amer. Chem. Soc. 72, 1790 [1950].  
<sup>79</sup>) Norrish u. Appleyard, J. Chem. Soc. [London] 1934, 874.

<sup>80</sup>) D. C. Carpenter, J. Franklin Inst. 232, 76 [1941].

<sup>81</sup>) L. F. Arnow, Physiol. Rev. 16, 671 [1936].

<sup>66</sup>) L. E. Arnow, J. biol. Chemistry 120, 151 [1937]; J. phys. Chem. 42, 415 [1938].

<sup>67</sup>) F. W. Bernhart u. L. E. Arnow, J. phys. Chem. 43, 733 [1939].

<sup>68</sup>) A. Berthelot u. G. Amoureux, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 206, 699 [1938].

<sup>69</sup>) A. Ellinger, Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 136, 129 [1928]; Strahlentherapie 38, 521 [1930].

<sup>70</sup>) R. B. Bourdillon, I. H. Gaddum u. R. G. C. Jenkins, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. B 106, 388 [1930].

<sup>71</sup>) P. Holtz, Klin. Wschr. 12, 1613 [1933]; Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 174, 97 [1934].

<sup>72</sup>) P. Szendrői, Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 157, 136 [1930]; Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere 228, 742 [1931].

<sup>73</sup>) Fort u. Lloyd, J. Soc. Dyers Colourists 30, 73 [1914].

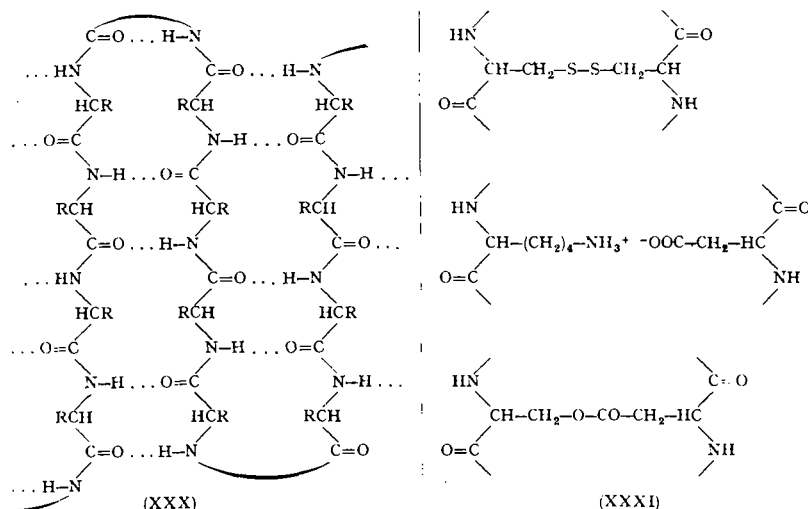
<sup>74</sup>) F. Lieben u. H. Jessorer, Biochem. Z. 276, 367 [1935].

<sup>75</sup>) Proc. Roy. Soc. [London] Ser. A. 159, 206 [1937].

<sup>76</sup>) Pauling u. Niemann, J. Amer. Chem. Soc. 61, 1862 [1939].

<sup>77</sup>) D. C. Carpenter, Science [New York] 89, 251 [1939]; J. Amer. Chem. Soc. 62, 289 [1940].

Die charakteristischste photochemische Reaktion der Proteine ist die Denaturierung mit anschließender Koagulation<sup>82, 83</sup>). Als Primärreaktion ist die eigentliche Denaturierung zu betrachten, sie stellt eine monomolekulare Reaktion dar, ist weitgehend unabhängig von der Temperatur und irreversibel. An sie schließt sich die eigentliche Koagulation, die von der Temperatur abhängig ist. Nach unserem heutigen Wissen treten bei der Photodenaturierung in der Eiweißmolekel folgende Veränderungen ein<sup>83</sup>). Das native Protein besteht aus einer Polypeptidkette, die in bestimmter Weise zusammengelagert, geknäult oder gefaltet ist. Diese Faltung wird stabilisiert durch Wasserstoffbindungen (XXX), durch S-S-Brücken (Cystin), durch salzartige Bindungen der Reste von Amino-dicarbonsäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) oder Tyrosin mit Diaminosäuren (Arginin, Lysin) und durch Veresterung der freien Carboxyl-Gruppen von Amino-dicarbonsäuren mit Oxy-aminosäuren (Serin, Threonin) (XXXI). Durch die Energie, die bei der Bestrahlung



von den absorbierenden Resten der Aminosäure-Bausteine und zumindestens bei den Faserproteinen von den Peptenol-Gruppen aufgenommen wird, werden die Peptid-Gruppen angeregt und zuerst die Wasserstoff-Bindungen zwischen den Peptid-Gruppen gelöst, welche zur Spaltung die geringste Energie benötigen. Ferner können die Wasserstoff-Bindungen aufgehoben werden, an denen die phenolischen OH-Gruppen der Tyrosin-Reste beteiligt sind, und außerdem können die S-S-Brücken des Cystins gespalten werden<sup>84</sup>). Durch die Lösung dieser Bindungen wird die Polypeptidkette entfaltet. Dieser Vorgang stellt die eigentliche Photodenaturierung dar. Anschließend können die aktiven Stellen der Polypeptidkette neue Bindungen eingehen, und zwar nicht nur in der eigenen Kette, sondern auch mit den Polypeptidketten anderer Molekeln, wodurch es zur Bildung von Aggregaten, zur Koagulation, kommt. Dem denaturierten Protein fehlt die charakteristische Konfiguration, es ist daher leicht verständlich, daß Enzyme und Virusarten bei Bestrahlung so leicht ihre Wirksamkeit verlieren, da diese zumeist an die Konfiguration gebunden ist.

Neben der eigentlichen Photodenaturierung werden bei der Bestrahlung von Proteinen aber auch Peptidbindungen gespalten, vor allem solche, welche an die Seitenketten der Tyrosin-, Phenylalanin- und Tryptophan-Bausteine grenzen<sup>85</sup>), wodurch das Protein inhomogen wird und niedrigmolekulare Bruchstücke auftreten<sup>86</sup>), die durch Dialyse abgetrennt werden können<sup>87</sup>).

Ferner können bei den einzelnen Protein-Bausteinen, den Aminosäuren, die gleichen photochemischen Veränderungen ablaufen, die oben bei den Aminosäuren besprochen worden sind, wobei besonders in Gegenwart von Luft Photooxydationen im Vordergrund stehen. Da Photolyse der Peptidbindungen und Veränderungen der Aminosäure-Reste auch bereits neben der

Photodenaturierung ablaufen, ist es nicht verwunderlich, wenn diese irreversibel ist im Gegensatz zur Hitzedenaturierung, die unter vorsichtigen Bedingungen reversibel sein kann.

Außer dem Verbrauch der eingestrahnten Energie am Ort ihrer Aufnahme oder in seiner unmittelbaren Nähe, die zur photochemischen Reaktion führt, ist in Proteinen auch eine verlustlose Energiefortleitung möglich. Ein derartiger Mechanismus ist zuerst von biophysikalischer und biologischer Seite erörtert und gefordert worden, aber erst in letzter Zeit ist ein experimenteller Beweis bei der photochemischen Spaltung des Kohlenoxyd-Myoglobins erbracht worden<sup>88</sup>). Myoglobin ist ein sauerstoff-übertragendes Ferment, das besonders im Herzmuskel vorkommt und ein Hämin an ein Protein gebunden enthält. Die Hämin-Komponente kann eine Molekel Kohlenoxyd binden, die bei Bestrahlung leicht abgespalten wird, und zwar entspricht ein Lichtquant einer Molekel Kohlenoxyd. Die photochemische Wirkungskurve (s. Bild 16) ist im Gebiet oberhalb

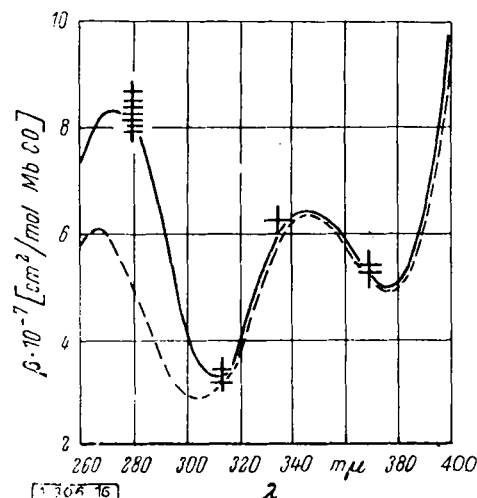


Bild 16

Photochemisches Wirkungsspektrum (Kreuze zugrunde gelegt die Quantenausbeute = 1) und Absorptionsspektrum (ausgezogen) von Kohlenoxyd-Myoglobin, sowie Absorptionsspektrum (gestrichelt) von dessen Hämin-Komponente<sup>88</sup>)

300 mμ, in dem nur das Hämin absorbiert, identisch mit der Absorptionskurve. Unterhalb 300 mμ, wo auch die Eiweißkomponente absorbiert, ist das Wirkungsspektrum nicht identisch mit der reinen Hämin-Absorptionskurve, sondern mit dem gesamten Absorptionsspektrum des Myoglobins, d. h. sämtliche aufgenommene Strahlung, auch die von den Tyrosin- und Tryptophan-Resten der Proteinkomponente absorbierte, verursacht eine Abspaltung des am Hämin gebundenen Kohlenoxyds.

Zur Erklärung der photochemischen Spaltung des Kohlenoxyd-Myoglobins kann die Vorstellung von Förster<sup>89</sup>) dienen, nach der die von den aromatischen Aminosäure-Resten aufgenommene Energie über Fluoreszenzstrahlung an das Hämin des Kohlenoxyd-Myoglobins weitergeleitet werden könnte. Außerdem käme der für eine verlustlose Energiefortleitung von Wirtz<sup>43</sup>) aufgestellte Mechanismus über eine Peptid-Peptenol-Tautomerie in Betracht, der durch die Auffindung einer spezifischen Absorption von Peptenol-Gruppen in Faserproteinen an Bedeutung gewonnen hat. Der Einwand, daß die Orte der Energieaufnahme, die aromatischen Ringsysteme der Aminosäure-Reste, von der Peptid-Kette durch CH<sub>2</sub>-Gruppen getrennt sind, kann durch die Ergebnisse der photochemischen Reaktionen von Aminosäuren und Peptiden als widerlegt betrachtet werden. Die CH<sub>2</sub>-Gruppen sind keine Isolatoren und man wird zumindest für die von den aromatischen Aminosäure-Resten aufgenommene Energie einen Übergang auf die Peptidkette zulassen müssen. Daneben wird man aber auch den Befunden Beachtung schenken müssen, daß die aromatischen und heterocyclischen Ringsysteme in den Proteinen und Nukleoproteinen ausgerichtet sein können und die absorbierte Energie auch entlang derartig ausgerichteter Systeme fortgeleitet werden kann.

Eingeg. am 11. August 1950 [A 306]

<sup>82</sup>) B. Rajewsky, Strahlentherapie 34, 582 [1929].

<sup>83</sup>) J. H. Clark, J. gen. Physiol. 19, 199 [1936].

<sup>84</sup>) P. Wels, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 171, 480 [1933]; 183, 265 [1938].

<sup>85</sup>) J. S. Mitchell u. E. K. Rideal, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. A 167, 342 [1938].

<sup>86</sup>) Th. Svedberg u. S. Brohult, Nature [London] 143, 938 [1939].

<sup>87</sup>) E. B. Sanijar, L. E. Krejci u. E. O. Kraemer, Biochemic. J. 33, 1 [1939].

<sup>88</sup>) Th. Bücher u. J. Kaspers, Naturwiss. 33, 93 [1946].

<sup>89</sup>) Z. Naturforsch. 2b, 174 [1947]; 4a, 321 [1949].