

self (20). Peptides **23** and **29** incorporate peptide sequence **2**, but contain additional C-terminal residues. However, as viewed from the C-terminal end, the enzyme's point of view, they are very different in structure from pentapeptide **2**, and they are about 100-fold less potent as inhibitors. Peptides **28** and **30**, each of which incorporates essentially the sequence of peptide **2** at the C-terminal end of its structure, have inhibitory potencies similar to that of pentapeptide **2**. Peptides **49** to **57** are fragments of the nonapeptide **31**. In this case, it appears that at least the C-terminal pentapeptide sequence -Pro-Gln-Ile-Pro-Pro is required for significant inhibition (peptide **51**).

Kinetic data reported elsewhere²⁶, as well as the structure-activity correlations described in this paper, indicate that all of the peptides found in the venom of *Bothrops jararaca* are bound to angiotensin-converting enzyme in a manner that is, in part, identical to the binding of substrates for this enzyme; this competitive interaction is necessary, but not sufficient, for inhibition. The venom peptides, unlike substrates, are also bound to a second portion of the enzyme; this second interaction greatly increases their inhibitory potency. These two interactions

of the venom peptides with angiotensin-converting enzyme combine to produce extremely potent, as well as highly specific, inhibitors.

Zusammenfassung. Nachweis mit Analogen der im Gifte von *Bothrops jararaca* gefundenen Peptide, dass die Inhibition des Angiotensins «converting enzyme» von zwei eindeutigen Teilsequenzen dieser Peptide abhängig ist. Die hohe spezifische kompetitive Inhibition, hervorgerufen durch die Peptide von *Bothrops jararaca*, wird der Bindung ihrer Tripeptidreste vom Carboxyterminus mit dem aktiven Zentrum des Enzyms zugeschrieben, die in gleicher Weise wie die Peptidsubstrate mit dem Enzym gebunden werden. Die Wirksamkeit der Giftpeptide hängt von der Bindung eines zweiten Teiles der Peptide mit dem Enzym ab.

D. W. CUSHMAN, J. PLUŠČEC, N. J. WILLIAMS,
E. R. WEAVER, E. F. SABO, O. KOCY,
H. S. CHEUNG and M. A. ONDETTI

*The Squibb Institute for Medical Research,
Princeton (New Jersey 08540, USA), 12 March 1973.*

COGITATIONES

L-Methionin als Regulator der Spannung von Collagen

Das Macromolekül Collagen, das im Körper in vielen Organen als Fibrillen und in reinster Form in den Sehnenfasern vorhanden ist, hat eine charakteristische Stabilität. Diese erklärt man als die Folge von intra- und intermolekularen kovalenten «crosslinks» (Vernetzungen) zwischen den helikal angeordneten Protein-Fäden.

Bei Zerstörung von H-Brücken durch Temperaturwirkung, sowie von «covalenten crosslinks» erscheinen Spannungen. Isotonisch gemessen zeigt sich Schrumpfung (Verkürzung); isometrisch gemessen, Spannungen von sehr erheblicher Grösse. Diese sind nicht reversibel.

Demgegenüber kann man ähnlich grosse Spannungen erhalten, wenn man aus Collagen mit hypertonen (hochmolaren) Salzlösungen, (wie NaClO_4 5 M oder KJ, 2 bis 7 M etc.), der Faser H_2O entzieht. Diese Spannung ist in Wasser, in Ringer-Lösung oder in physiologischem NaCl (0.15 M) reversibel. Die Collagen Fibrille kehrt in ihren vorigen Zustand zurück (Figuren 1 und 3). Die Re-

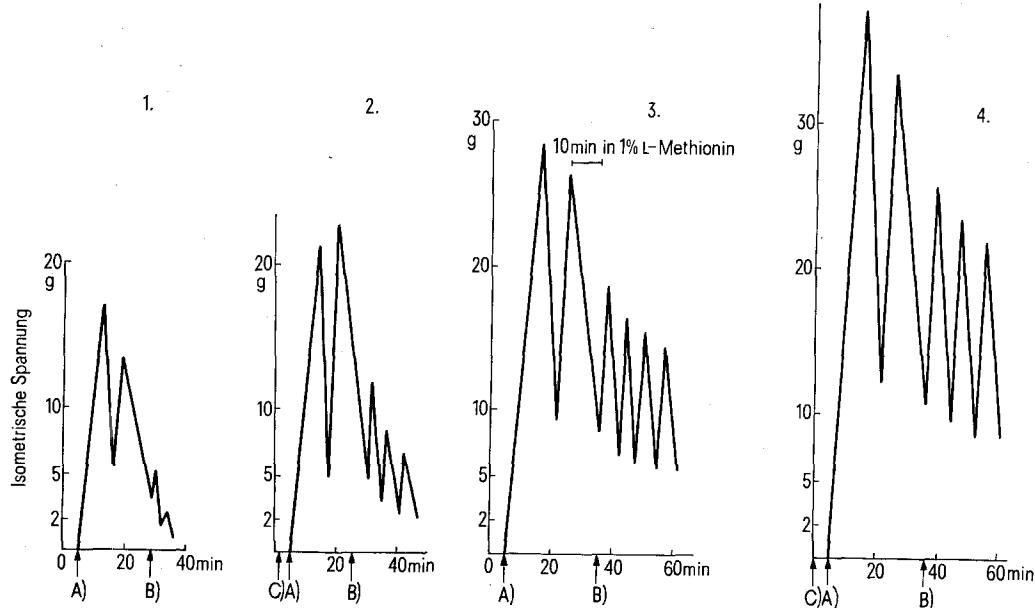


Fig. 1-4. A) Isometrische Spannungs-Entwicklung durch $\uparrow 5\text{ M NaClO}_4$ und danach Erschlaffung \downarrow mit physiol. NaCl (0.15 M). Zweimal wiederholt. B) Einlegen in 1% Methionin (10 min) vermindert die Spannungsentwicklung durch 5 M NaClO_4 . Mehrfach wiederholt. C) In Figuren 2 und 4 verstärkt die Vorbehandlung der Sehne mit 0.035% HCOH die Spannungsentwicklung. Figuren 1 und 2: 6 Monate (junge), Figuren 3 und 4: 28 Monate (alte) Tiere. Vertikal: Spannung in g; horizontal: Zeit in min.

versibilität der durch H_2O -Entzug bewirkten Spannung zeigt, dass als Ursache ein anderer Mechanismus in Frage kommt wie bei der thermischen Spannungswirkung, welche nicht reversibel ist. Als Erklärung kann die Hypothese dienen, dass die Entfernung von H_2O zwischen den Helix des Macromoleküls so wirkt wie das Zurückziehen eines Riegels («clutch»), wodurch eine Hemmungs-Wirkung auf die covalenten Brücken («crosslinks») ausgeschaltet wird, und damit Spannung frei wird.

Die normale Helix-Struktur hemmt also die Wirkung der kovalenten Brücken. Wird der Helix durch H_2O -Entzug verändert, dann wirkt er nicht mehr hemmend. Lässt man aber osmotisch wieder H_2O zurückströmen, indem man die Sehne in 0.15 M NaCl taucht, dann stellt sich der ursprüngliche Zustand wieder her. Es sei bemerkt, dass für Collagen von jungen Tieren das weniger gilt als für das von alten Tieren.

Durch H.COH in 0.035 M oder höheren Konzentrationen wird das Molekül so beeinflusst, dass nun dieselbe $NaClO_4$ 5 M Salzlösung viel stärkere Spannungen als vorher bewirkt (Figuren 2 und 4).

Wie andernorts gezeigt wurde, kann diese reversible Spannungsreaktion nun viel öfter wiederholt werden. Fasern von alten Tieren können das in 4 min Perioden z. B. 40000 mal (3 Tage lang) fortsetzen. Die geleistete Spannungsarbeit eines 5 cm langen, 0.15 mm dicken Collagenfadens einer 27 Monate alten Ratte beträgt dann über 4000 g. Schliesslich schwindet die Fähigkeit Spannung zu bilden jedoch vollkommen.

Es wurde nun gefunden, dass L-Methionin in sehr geringen Konzentrationen (0.01 M bis 0.05 M) die Restitution der Spannung vermindert und nach kurzer Zeit ganz aufhebt.

Es wird angenommen, dass die intra- und intermolekularen «crosslinks» Lysinoaldol und Aldimine sind. Dem entspricht unsere Beschreibung, dass Zusatz von 0.035 M H.COH die «crosslinks» Wirkung und damit die Spannung sehr verstärkt. Diese Aldehyd-Bildung wird anscheinend durch die Wirkung des Methionins, verhindert.

Ähnlich wie L-Methionin wirkt auch Cystein in ähnlicher Verdünnung (VERZÁR et al.¹)

L-Methionin ist die einzige S enthaltende Aminosäure und sie ist im Collagen zu rund 0.5% (Gewicht) enthalten. L-Methionin hat bekanntlich eine intensive und vielartige Wirkung auch als «aktives Methyl», indem eine der beiden Methylgruppen abgegeben wird.

Bestimmung der Löslichkeit des Collagens hat gezeigt, dass der Übergang von Collagen aus dem (durch 5 M $NaClO_4$ bedingten) Spannungszustand in den Zustand ohne Spannung mit Zunahme der Wasserlöslichkeit einhergeht. Wasserunlöslich ist Collagen mit kovalenten «crosslinks», aber wasserlöslich ohne diese. Nach Methionin nimmt die Wasserlöslichkeit bedeutend zu.

Zusammenfassend wird angenommen, dass Methionin eine regulierende Wirkung auf die Stabilitäts-Spannung des Collagen Macromoleküls hat, indem es antagonistisch (hemmend) auf die Bildung von Aldehyd-«crosslinks» im Collagen wirkt.

Summary. Collagen fibres produce tension in hypermolar salt solutions such as 5 M $NaClO_4$. This tension can be increased by formaldehyde 0.035 M (or more). These reactions are reversible in 0.15 M NaCl and can be repeated many times. L-Methionine in 0.01 M solution inhibits the reversal. It is supposed that this effect is caused by inhibition of the aldol-aldimin reaction which restitutes the crosslink in the collagen fibre.

F. VERZÁR und E. STRITTMATTER-ACKERSCHOTT

Institut für experimentelle Gerontologie, Nonnenweg 7, CH-4051 Basel (Schweiz), 20. März 1973.

¹ F. VERZÁR, R. MOSER and E. STRITTMATTER-ACKERSCHOTT, Gerontologia, in press (1973).

PRO LABORATORIO

Reaktionskinetische Studien an Enzymen mittels Laser-Interferometrie

Zur Prüfung unserer Vorstellungen über die Eigenschaften intrazellulären Regulationsmechanismen werden in steigendem Masse mathematische Modelle herangezogen. Dabei werden die möglichen Zustände des betrachteten Systems vor allem durch enzymatische Daten auf der Grundlage der bekannten MICHAELIS-MENTEN-Beziehung und der Kinetik von Enzymsubstratkomplexen beschrieben.¹⁻³

Der Ablauf enzymatischer Reaktionen wird allgemein durch Messung der Lichtabsorption verfolgt. Bedauerlicherweise absorbieren aber die meisten biologischen Substrate in keinem messtechnisch verwertbaren Wellenlängenbereich, nur das Coenzym NaDH hat eine Absorption bei 340 nm. Man muss also oft ganze Ketten von Folgereaktionen durchführen, bis die letzte davon unter Verbrauch oder Bildung von NADH abläuft. Als Alternative zu diesem aus theoretischen Gründen nicht immer befriedigenden Verfahren bietet sich die Messung des Brechungsindex an. In verdünnten Lösungen ändert sich der Brechungsindex α annähernd proportional zur Konzentration jedes gelösten Stoffes. Die Proportionalitätskonstante α ist jedoch für verschiedene Stoffe i. a. ver-

schieden. Es tritt also in Fällen, in denen nicht α von Substrat und Produkt gleich sind, eine Änderung des Brechungsindex auf, die bei kleinen Konzentrationen in guter Näherung proportional der umgesetzten Stoffmenge ist. Selbstverständlich ist eine sorgfältige Temperaturkontrolle erforderlich, da der Effekt durch die grosse thermische Ausdehnung der Flüssigkeiten völlig überdeckt werden könnte. Bei enzymatischen Reaktionen ist allerdings vorteilhafterweise die Wärmetönung meist so klein, dass sie die Messung nicht nennenswert beeinflusst, das zu messende System ist also lediglich gegen externe Temperatureinflüsse abzusichern.

Die Änderungen des Brechungsindex liegen bei Umsetzungen in biologischen Konzentrationen in der Grössenordnung von 10^{-3} – 10^{-4} , d. h. die konventionelle Messung mit einem Abbé- oder Pulfrich-Refraktometer

¹ B. HESS, Nova Acta Leopoldina 33, 195 (1968).

² B. CHANCE, Enzymol. 12, 153 (1951).

³ H. BIELKA, *Molekulare Biologie der Zelle* (VEB Gustav Fischer, Jena 1969).