

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 Hemmungswirkung auf die kovalenten 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. 40 000 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-aldimine 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 intrazellulärer 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 Folgeaktionen 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 n 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).

würde bereits auf Schwierigkeiten stossen. Dies dürfte wohl der Grund dafür sein, dass dieses Messprinzip bisher keine Beachtung gefunden hat. Durch die jetzt günstig greifbaren Dauerstrich-Gaslaser ist die interferometrische Messung, mit der Brechzahländerungen von 10^{-5} – 10^{-6} aufgelöst werden können, bequem zugänglich geworden. Diese Laser liefern ein monochromatisches, kohärentes Lichtbündel hoher Intensität, mit dem auch nach Durchgang durch lange Küvetten mit mässig absorbierenden Flüssigkeiten einwandfreie Interferenzen erhalten werden können. Wir haben daher diese interessante Möglichkeit zur Untersuchung einer enzymatischen Reaktion verwendet und als Beispiel die Reaktion zwischen Glucose und Glucoseoxydase (EC 1.1.3.4) herangezogen.

Experiment. Der verwendete Laser war ein Dauerstrich-Gaslaser der Fa. CW Radiation Inc. mit einer Leistung von 0,5 mW bei 6328 Å. Der Lichtstrahl wurde durch eine Lochblende soweit verengt, dass eine Rohrküvette von 2 mm Durchmesser mit aufgeschobenen Endscheiben bequem ohne Wandreflexe montiert werden konnte (Figur 1). Bei einer Küvettenlänge von 50 mm waren daher nur ca. 160 µl Flüssigkeit zur Füllung erforderlich, ein bei biologischen Arbeiten nicht zu unterschätzender Vorteil. Die Küvette befindet sich im Innenraum eines Fabry-Perrot-Interferometers⁴. Als Spiegel für diese Fabry-Perrot-Anordnung wurden dielektrische Beläge mit 50 % Reflexion verwendet. Da keine Interpolation zwischen den einzelnen Maxima erforderlich war, hätten Spiegel mit

höherer Reflexion und damit schärferen Interferenzen keinen Vorteil gebracht.

Alle Bauteile wurden auf einer optischen Bank montiert und der Eintrittsspiegel des Interferometers so justiert, dass der Reflex des Primärstrahls knapp neben der Öffnung der Lochblende lag. Der Austrittsspiegel des Interferometers wurde auf leichtkeilig einjustiert, so dass nach Aufweitung des Strahles ein Muster von Interferenzstreifen auf einem Schirm (A in Figur 1) beobachtet werden kann. Ändert sich die Brechzahl der Testlösung, so beginnen die Streifen zu wandern. Ein Streifen erreicht den Ort, an dem zuvor sein Nachbar war, wenn sich die Brechzahl um

$$n = \frac{\lambda}{l}$$

ändert (l = Schichtdicke, λ = Wellenlänge). Wird anstelle des Schirmes eine Fotodiode gebracht, so kann das Wandern der Streifen direkt registriert werden. Da Δn allein durch die Anzahl der vorbeiziehenden Streifen gegeben ist, haben nicht zu grosse Amplitudendifferenzen keine Auswirkung auf die Messung. In dieser Anordnung bewirkt ein Δn den Durchgang eines Interferenzstreifens, was zum Unterschied zu einer Extinktionsänderung einen definierten Bruchteil k eines Formelumsatzes bedeutet. Allerdings liefert die interferometrische Methode keine Absolutwerte des Brechungsindex. Der zeitliche Verlauf der Reaktion lässt sich aus der zeitlichen Folge des Vorbeiwanderns der Interferenzstreifen ermitteln. Wegen Mischungsschlieren konnte in unseren Versuchen erst ca. 2 min. nach Beginn der Reaktion mit der Messung begonnen werden. In Figur 2 ist für drei Experimente der Logarithmus der Zahl der von der Zeit t bis zum vollständigen Ablauf der Reaktion beobachteten Streifen gegenüber der Zeit aufgetragen. Die Punkte liegen innerhalb der Messfehler auf einer Geraden, was bedeutet, dass die Reaktion durch eine Kinetik 1. Ordnung beschrieben werden kann. Aus der Neigung der Geraden lässt sich die Reaktionskonstante zu $k_r = 0,41 \text{ min}^{-1}$ bestimmen.

Die Ergebnisse zeigen, dass enzymatische Reaktionen grundsätzlich durch Messung der Änderung des Brechungsindex im Laserstrahl verfolgt werden können. Die Weiterentwicklung dieser Verfahrenskombination erscheint gerechtfertigt, da hierbei enzymkinetische Beobachtungen kleinster Probemengen ohne Gefahr einer Verfälschung durch langsamere Folgereaktionen möglich sind.

Summary. An enzymatic reaction is followed by measuring the index of refraction with an accuracy of 10^{-6} , using an interferometer and a CW He-Ne-laser. The evaluation of the results shows that the kinetics is of the first order.

B. PALETTA, H. TRUTNOVSKY, F. AUSSENEGG und H. GILLY

Institut für Medizinische Chemie und Pregl-Laboratorium der Universität, Universitätsplatz 2, A-8010 Graz (Österreich), and Physikalisches Institut der Universität Graz (Österreich), 19 January 1973.

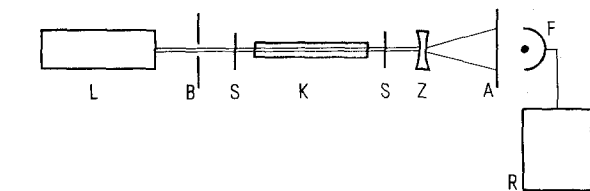


Fig. 1. Messanordnung. L, He Ne Gaslaser; B, Lochblende; S, Fabry-Perrot Spiegel; K, Küvette; Z, Zerstreuungslinse; A, Schirm; F, Fotodiode; R, Schreiber.

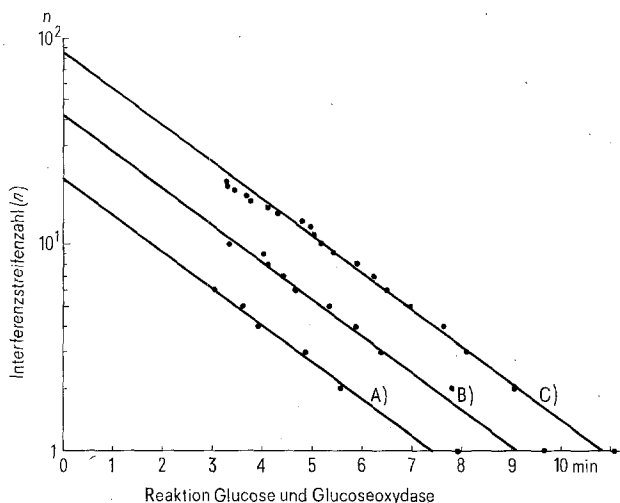


Fig. 2. Logarithmische Auftragung der Interferenzstreifenanzahl n in Abhängigkeit von der Zeit bei der Reaktion zwischen Glucose und Glucoseoxydase. Versuchsbedingungen: Phosphatpuffer: pH 7; Temperatur 23 °C; Enzymkonzentration: 900 µg Glucoseoxydase pro ml Reaktionsgemisch; Anfangskonzentrationen: Von einer 9,1 mg/100 ml Glucoselösung wurden eingesetzt bei A) 50 µl; B) 100 µl; C) 200 µl.

⁴ W. H. STEEL, *Interferometry* (Cambridge University Press 1967).