

Über die sogenannte denaturierende Wirkung von Elektrolyten und Nichtelektrolyten, geprüft an der von Konzentration und pH-Wert abhängigen Volumsveränderung des elastischen Gewebes

On the So-called Denaturing Effect of Electrolytes and Non-electrolytes Shown by the Volume Changes of the Elastic Tissue Depending on Concentration and pH

R. Winkler

Physiologische Abteilung des Paracelsus Instituts, Bad Hall

(Z. Naturforsch. **28** c, 310–312 [1973]; eingegangen am 7. Februar 1973)

Fibrous proteins, elastin, iodide, urea, hydration

The effects of the saccharides on the volume of elastin are primarily "dehydrating" or "osmotic" ones, those of J^- and Cl^- are primarily "electrostatic" ones, and the effect of urea is predominantly a "denaturing" one.

Das Bindegewebe ist nicht nur wegen seiner Quantität im Organismus bedeutsam, sondern interessiert auch als Modell für Reaktionen der Strukturproteine. Nach Wilbrandt *et al.*¹ und nach Rowedder² zeigen die Strukturproteine zwei physiko-chemische Reaktionstypen: Adstriktion (Verstärkung von Brückenbindungen) und Denaturierung (Entkopplung mit Strukturentfaltung). Vertreter der Denaturantien wären Jodid und Harnstoff. Um zu einer kausalen Differenzierung der Einflußnahmen beitragen zu können, wurde nunmehr untersucht, inwieweit das Gewebe Verschiedenheiten der Volumsreaktionen erkennen läßt, je nachdem, ob die Einwirkung ionaler oder nichtionaler Natur ist. Hohe Jodidempfindlichkeit und eine bessere Deutbarkeit der Befunde mangels lyotroper Quellung ließen elastisches Gewebe als Versuchsobjekte wählen.

Material und Methodik

Als Testpräparate dienten 40 bis 60 mg schwere (mg G_1) annähernd würfelförmige Stücke des Ligamentum nuchae von geschlachteten Rindern. Um kollagene Anteile wegzulösen, war stets zuvor das frisch entnommene Lig. nuchae etwa 12 Stdn. lang in Aq. demin. gekocht worden. Die jeweils 10 bis 20 Einzelstücke verblieben 60 min bei 5 °C in wäßrigen Lösungen von NaJ oder NaCl bzw. von Harnstoff, Glukose oder Saccharose. Der pH-Wert wurde entweder (bei Änderung der Konzentration der Agentien) auf 6,5 eingestellt oder variierte zwischen

pH 5,0 und 1,5 (Ansäuerung mit 0,15 oder 1 N HCl). Jedes Gewebestück wurde 4-mal gewogen, und zwar erstens unmittelbar nach Präparation und vor Einbringung in die Testlösung (mg G_1), zweitens nach Einwirkung der Testlösung (mg G_2), drittens nach darauffolgender Vakuumtrocknung bei 10^{-3} Torr (mg G_3) und viertens nach zweimaliger Eluierung in Aq. demin. und nochmaliger Vakuumtrocknung (mg G_4). Berechnet ist das interstitielle Volumen (μl), bezogen auf 10 mg getrocknetes eluiertes Gewebe nach der Formel:

$$V_i(\mu l/10 \text{ mg}) = 10 \cdot (G_2 - G_4) \cdot G_4^{-1} \cdot \rho_w^{-1}.$$

ρ_w : Dichte der interstitiellen Lösungen, abgelesen aus Tabellen nach w .

$$w = (G_3 - G_4) \cdot (G_2 - G_4)^{-1}.$$

Angaben als Mittelwerte und deren mittlere Streuung.

Ergebnisse und Diskussion

Wirkung der Konzentration (Abb. 1)

Die mit Erhöhung der Konzentration der Elektrolyte und Saccharide gefundene Volumsverminderung des elastischen Gewebes läßt sich erstens osmotisch deuten. In Anlehnung an Veis³ müßte dann allerdings wegen der viel stärkeren Wirksamkeit des Saccharose- als des Glukosemoleküls (insbesondere bei 1 und 2 osm) der Strukturverband so beschaffen sein, daß die der Suspensionsflüssigkeit zugeführte Saccharose selektiv zurückgehalten würde. Zweitens aber läßt sich die das Volumen stärker vermindernde Wirkung des größeren Sacharidmoleküls auch auf dessen größeres Wasserbindungsvermögen

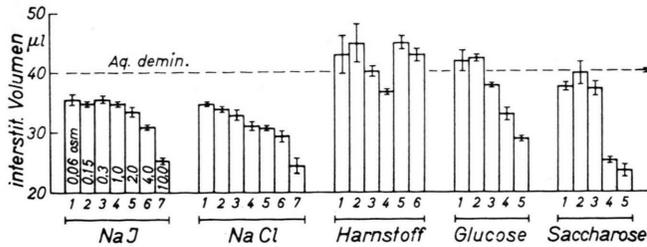


Abb. 1. Von einzelnen Elektrolyten und Nichtelektrolyten verschiedener, sich wiederholender Osmolarität (Abszisse) bewirkte Volumsänderung des exponierten Elastins (Ordinate). Von NaJ und NaCl kleinste Konzentration (0,06 osm) bereits stark kontrahierend; von Harnstoff hohe Konzentration (4,0 osm) noch dilatierend.

zurückführen (primäre Dehydrierung des Strukturproteins). Der Betrag, um den die Elektrolyte stärker wirksam sind (auffällig bei 0,06 osm) wäre elektrostatisch zu verstehen⁴, was im Sinne des Donnan-Effekts ebenfalls der osmotischen Entwässerung zugerechnet werden könnte. Die räumliche Trennung der Ionen würde allerdings von der Oberfläche des reagierenden Strukturproteins selbst besorgt werden und ohne zwischengeschaltete Membran zustandekommen. Die für den Harnstoff gefundene Volumsvermehrung der Gewebe ist als Entkoppelung von Nebervalenzen aufzufassen (z. B. Wilbrandt *et al.*¹). Vielleicht geht diese Entkoppelung in 2 Stufen vor sich (0,06–0,3 osm und 2–4 osm). Es können sowohl Wasserstoffbrücken (Konkurrenz der H-Brücken zwischen Protein und Harnstoff) als auch die gerade im Fall des Elastins bedeutsamen hydrophoben Wechselbeziehungen betroffen sein. Für ein Schwinden solcher Wechselbeziehungen als Grundmechanismus der Harnstoffwirksamkeit sprechen insbesondere neuere Befunde von Herskovits *et al.*⁵ und Barone *et al.*⁴, und zwar finden diese Autoren eine sich verstärkende Wirkung der Harnstoffe mit deren steigender Alkylsubstitution. Diese Verminderung der hydrophoben Kräfte beruht wahrscheinlich auf einer Veränderung der Struktur des Lösungsmittels Wasser selbst^{7, 8}. Prinzipiell besteht noch die Möglichkeit, den volumsvermindernden Einfluß der Elektrolyte über eine Herabsetzung der Dielektrizitätskonstante der Flüssigkeit⁹ zu erklären, bzw. umgekehrt die vom Harnstoff bewirkte Anschwellung des Gewebes auf die Erhöhung der Dielektrizitätskonstante¹⁰ zu beziehen. Obwohl aber Fructose die Dielektrizitätskonstante wesentlich stärker erniedrigt als Glukose¹¹, unterscheiden sich die beiden Monosaccharide hinsichtlich ihrer volumsvermindernden Wirkung kaum voneinander (Glukose im Vergleich 1 M Lösungen nur um rund 5% wirksamer). Demnach sind die ausschlaggebenden Momente der Volumsänderung wohl anderer Natur.

Bezogen auf NaCl muß NaJ allein schon aus elek-

trostatischen Gründen zu einer Volumsvergrößerung des Elastins führen⁴. Doch ebenso wie überlegt werden kann, ob vielleicht eine elektrostatische Abstoßung die Aminosäureketten mechanisch entkoppelt, so ist auch eine chemische Entkopplung von Brückenbindungen zu erwägen. Eine solche Denaturierung würde zwangsläufig die molare Wärmekapazität bei konstantem Druck ändern. Für Jodid fehlen aber solche Messungen. Beispielsweise läuft nach Thiem *et al.*¹² der inaktivierende Einfluß von Ionen auf Enzyme über die Schwächung hydrophober Bindungen durch Strukturveränderungen des Wassers.

Wirkung des pH-Werts (Abb. 2)

Entsprechend der Lage des isoelektrischen Punkts (I.P.) des Gewebes galt das Interesse dem sauren Bereich zwischen pH 1,5 und pH 5. Bezogen auf das

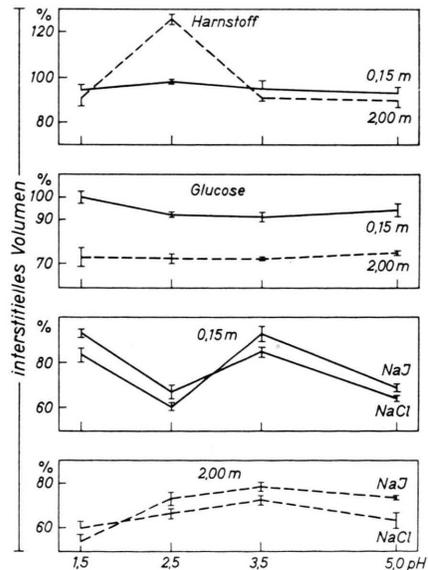


Abb. 2. Einfluß des pH-Werts (Abszisse) auf die von 4 Soluten bewirkte Volumsänderungen des exponierten Elastins. Prozentwerte (Ordinate), bezogen auf das Volumen des Elastins in entsprechend angesäuertem Wasser. Für Harnstoff 2 M: Deutliche I.P.-Verschiebung nach rechts (relatives Elastinvolumen bei pH 2,5 maximal); für NaJ und NaCl: Elektrostatisch deutbare Umkehr der gegenseitigen Wirksamkeit im I.P.-Bereich, gültig für 2 M so wie auch für 0,15 M.

Volumen in Aq. demin. gleichen pH-Werts zeigen 0,15 M und 2 M Glukose und 0,15 M Harnstoff keine spezifische Wirksamkeit auf den Verlauf der Volumsänderungen, der 2 M Harnstoff aber ergibt ein ausgeprägtes Volumsmaximum bei pH 2,5. Dies könnte einer Verschiebung des in Aq. demin. gefundenen I.P. nach der alkalischen Seite hin entsprechen (nach den Absolutwerten findet sich ein ausgeprägtes Volumsminimum bei pH 3,5 in Harnstoff anstatt bei 2,5 in Aq. demin.). Ui¹³ erklärt eine solche Verschiebung des I.P. mit einer Freilegung dissoziierbarer Gruppen aus dem Inneren des Proteinmoleküls, also mit dessen Entfaltung („Denaturierung“

im Sinne Wilbrandts). Diese Erklärung berücksichtigt, daß konzentrierter Harnstoff an sich (6 M) den pH-Wert der wäßrigen Lösungen numerisch erhöht (+0,42 pH-Einheiten), und zwar wie Bull *et al.*¹⁴ annehmen, zufolge Verminderung der H⁺-Aktivität. Der hingegen vom pH-Wert stark abhängige Verlauf der Chlorid- und Jodid-Kurven und deren Überkreuzung im isoelektrischen Bereich ist wohl als typische Folge der elektrostatischen Wirksamkeit der Ionen zu verstehen⁴. Mit Erhöhung der Konzentration von 0,15 auf 2,00 M verschiebt sich das Minimum des Gewebevolumentens sinngemäß in den extrem sauren Bereich hinein (pH 1,5).

¹ W. Wilbrandt, H. Ryser u. P. N. Witt, Arch. exper. Path. und Pharmakol. **215**, 469 [1952].

² M. Rowedder, Diss., Med. Fak. d. Univ. Bern, 3, 1954.

³ A. Veis, „Treatise on Collagen“ **I**, hrg. von G. Ramachandran, p. 383, Acad. Press, London und New York 1967.

⁴ H. Hellauer u. R. Winkler, Experientia [Basel], im Druck.

⁵ T. T. Herskovits, H. Jaillet u. B. Gedegbeku, J. biol. Chemistry **245**, 4544 [1970].

⁶ G. Barone, E. Galbiati, E. Rizzo u. V. Volpe, Proceedings of the First European Biophysics Congress, I, p. 49, Verl. d. Wiener Medizin. Akademie, Wien 1971.

⁷ G. G. Hammes u. P. J. Schimmel, Amer. chem. Soc. **89**, 442 [1967].

⁸ J. R. Warren u. J. A. Gordon, The J. biol. Chemistry **245**, 4097 [1970].

⁹ G. H. Haggis, J. B. Hasted u. T. J. Buchanan, J. chem. Physics **20**, 1452 [1952].

¹⁰ S. Katz u. E. Miller, J. phys. Chem. **75**, 1120 [1971].

¹¹ H. M. Rauen, Biochemisches Taschenbuch II, p. 111, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York 1964.

¹² N. V. Thiem, G. Lacombe u. N. V. Thoai, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **258**, 422 [1972].

¹³ N. Ui, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **229**, 567 [1971].

¹⁴ H. B. Bull, K. Breese, G. L. Ferguson u. C. A. Swenson, Arch. Biochem. Biophysics **104**, 297 [1964].