

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

(Direktor: Prof. H. U. ZOLLINGER)

und dem Pathologischen Institut der Universität Zürich

(Direktor: Prof. E. UEHLINGER)

Die Kollagensynthese in ihrer Beziehung zur submikroskopischen Struktur des Osteoblasten (elektronenmikroskopisch-autoradiographische Untersuchung mit Tritium-markiertem Prolin)*

Von

HANSPETER ROHR

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. November 1964)

Die organische Intercellularsubstanz des Knochens setzt sich zur Hauptsache aus Mucopolysacchariden und Kollagen zusammen. Sie wird von den Osteoblasten und Präosteoblasten gebildet. Diese schmale Schicht von Osteoblasten und Präosteoblasten bleibt während des Wachstums in engem Kontakt mit dem Knochengewebe. Die kollagenen Fasern, die eine Querbänderung und eine Periode von 640 Å aufweisen, sind in eine amorphe Kittsubstanz eingebettet, die durch einen Mucopolysaccharid-Proteinkomplex gebildet wird.

Der kombinierte Einsatz von *Autoradiographie und Elektronenmikroskopie* ermöglicht es, die Syntheseorte der Proteine den verschiedenen Zellstrukturen zuzuordnen und den Ablauf der Synthese sowohl topographisch als auch zeitlich genauer zu erfassen. In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, die Frage der *intracellulären Kollagensynthese beim Osteoblasten der Ratte* weiterhin zu klären. Als Vorläufer für unsere Untersuchungen wählten wir H^3 -Prolin, das im Kollagen zusammen mit Glycin und Hydroxyprolin in hoher Konzentration vorkommt.

Bisher liegen nur wenige elektronenmikroskopisch-autoradiographische Arbeiten mit H^3 -Prolin vor (REVEL und HAY, ROSS und BENDITT). Weder H^3 -Glycin noch H^3 -Prolin sind spezifische Kollagenvorläufer. Es finden sich jedoch in den Osteoblasten und in der Knochenmatrix keine Proteine mit hohem Prolingehalt. Der Prolingehalt der Zellkerne ist hoch, doch wird dort das Prolin nur in die Strukturproteine eingebaut. Es kann daher angenommen werden, daß das Prolin am Osteoblasten-Knochenmodell hauptsächlich für die Kollagensynthese verwendet wird.

Methodik

60—80 g schwere, weibliche etwa 4 Wochen alte Wistarratten erhielten zu Versuchsbeginn eine einmalige Dosis von 250 μ C H^3 -Prolin (spez. Akt.: 1 C/mM) i.p. Je zwei Ratten wurden 5, 15, 30, 60 und 240 min nach der H^3 -Prolininjektion getötet.

Die rechte Tibia wurde in neutralem Formalin fixiert, mit EDTA entkalkt, in Paraffin eingebettet und zu 5 μ dicken Schnitten verarbeitet. Lichtmikroskopische Autoradiogramme mit den Ilfordemulsionen G 5 und K 2. Expositionszeit 8—21 Tage. Entwicklung der Autoradiogramme mit dem Kodak Developer 19b. Färbung der Schnitte durch die Filmemulsion mit Hämalalaun.

* Ausgeführt mit Unterstützung durch die Holderbankstiftung (Schweiz) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Die primäre Spongiosa der linken Tibia wurde in kleine Würfel geschnitten, bei 4° C in Glutaraldehyd (pH 7.4) 4 Std fixiert, und anschließend 2 Std in OsO₄ (pH 7.4) nachfixiert. Nach Wässerung in einem Veronalacetat-Saccharosepuffer wurden die Organstücke über die aufsteigende Alkoholreihe in Epon 7301, sowie in Metacrylat eingebettet. Die Dünnschnitte wurden mit dem LKB- und dem Porter-Blum Sorvall MT 2 Ultramikrotom hergestellt. Die Präparate wurden auf Formvar befilmte Kupfernetze gebracht und vor der autoradiographischen Verarbeitung mit einer Karbonschutzschicht überzogen.

Bei der elektronenmikroskopischen Autoradiographie kam die Ilford-Emulsion L 4 zur Anwendung, die im Prinzip nach der „Zentrifugenmethode“ von KOEHLER, MÜHLETHALER und FREY-WYSSLING aufgetropft wurde. Die unverdünnte L 4-Ilfordemulsion wird während 15 min bei 45° C aufgelöst, anschließend mit Aqua dest. im Verhältnis 1:4—1:6 verdünnt, und sodann auf eine rotierende Wachsplatte aufgetropft. Auf dieser Wachsplatte sind nahezu zentral die Kupfernetze mit den Präparaten angebracht (methodische Einzelheiten s. ROHR, KLIETMANN und OEHLERT). Die elektronenmikroskopischen Autoradiogramme werden 1—2 Monate in einem luftdichten Kasten bei Zimmertemperatur (18° C) unter Zusatz eines starken Trockenmittels gelagert. Bei der photographischen Entwicklung folgten wir im Prinzip den Angaben von CARO und VAN TUBERGEN und GRANBOULAN u. Mitarb. Nach der Fixation werden die Präparate nach einer kurzen sorgfältigen Zwischenwässerung in üblicher Weise mit der Bleifärbung bei hohem pH nach KARNOVSKY „gefärbt“, wodurch die Gelatineschicht mindestens teilweise abgebaut wird. Bei allen Versuchsserien wurden zur Kontrolle der Verteilung der Silberkörner Autoradiogramme von Thymidin markierter Milz mitverarbeitet.

Etwa 70 % der auf diese Weise hergestellten Autoradiogramme sind für die Auswertung brauchbar.

Auswertung mit dem Siemens Elmiskop I und Zeiss EM 9.

Ergebnisse

Lichtmikroskopische Ergebnisse. 5 min nach der Injektion von H³-Prolin weisen nur vereinzelte Osteoblasten im Bereiche der primären Spongiosa eine geringe Markierung mit 1—5 Silberkörnern auf. Die Markierung der Osteoblasten nimmt bei den späteren Versuchszeiten (15 und 30 min) stetig zu und erreicht 60 min nach der Prolininjektion ein Maximum (Abb. 1). 30 min nach der Prolininjektion liegen die Silberkörner diffus im Cytoplasma verteilt, während sie nach 60 min deutlich auf der dem Knochen zugewandten Seite zu erkennen sind.

Vier Stunden nach der Prolingabe lassen sich die Silberkörner deutlich als von den Osteoblasten abgesetzter Markierungssaum erkennen (Abb. 2).

Elektronenmikroskopische Befunde. Als Grundlage für die Untersuchungen über den zeitlichen und topographischen Ablauf der Kollagensynthese diente uns der Markosteoblast und die angrenzende unverkalkte und verkalkte Knochenmatrix. Das endoplasmatische Reticulum der Markosteoblasten ist stark entwickelt (Abb. 3). Stellenweise kann in den Cisternen ein netzförmiges Material nachgewiesen werden, das mit großer Wahrscheinlichkeit einem Kollagenvorläufer dem Tropokollagen entspricht. Die Tropokollagenmoleküle besitzen einen Durchmesser von nur 15 Å und viele der in den Cisternen beobachteten Filamente sind auch nicht viel dicker als 15 Å (Abb. 4) (SHELDON und ROBINSON).

5 und 15 min nach Injektion von H³-Prolin finden sich in allen Autoradiogrammen erst vereinzelt Silberkörner über denjenigen Anteilen des endoplasmatischen Reticulums, die sich noch nicht zu Cisternen erweitert haben. Die dilatierten Anteile des endoplasmatischen Reticulums weisen keine Markierung mit H³-Prolin auf. Dabei läßt sich die Aktivität nur über den Osteoblasten und den

Präosteocyten nachweisen. Die Osteocyten sind mit Ausnahme der frisch eingeschlossenen Osteocyten, noch unmarkiert. Die Zellen des Knochenmarkes weisen ebenfalls keine Aktivität auf.

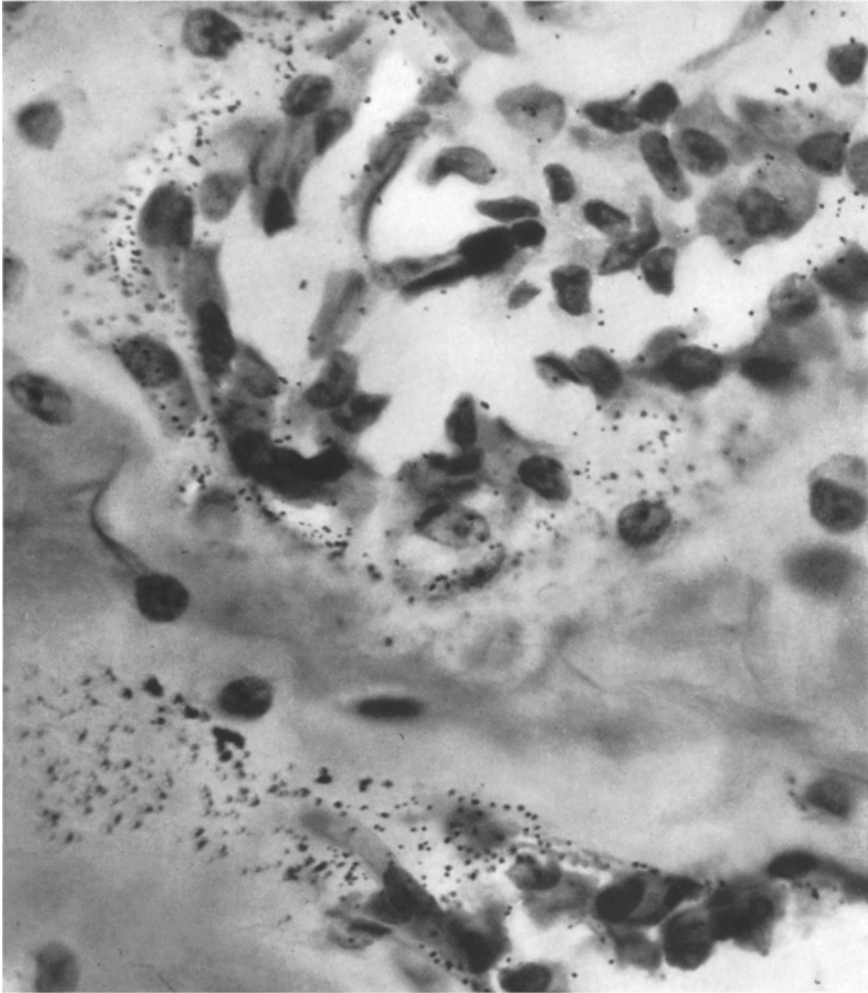


Abb. 1. Ratte, proximale Tibiaepiphyse. 30 min nach Injektion von H^3 -Prolin. Osteblasten mit einer deutlichen Markierung (schwarze Silberkorngranula). Maßstab: 1:800

30 min nach der H^3 -Prolingabe hat sich die Markierung größtenteils in die Lumina der Cisternen verschoben. Vereinzelt können zu diesem Zeitpunkt bereits Silberkörner beobachtet werden, welche in Cisternen dicht unter der Zellmembran liegen (Abb. 5). 60 min nach der Prolingabe erreicht der Einbau einen Höhepunkt. Die meisten Silberkörner liegen nun in den weiten Cisternen, daneben beobachtet man außerdem alle Stadien der vorangehenden Versuchszeiten. Die Markierung über dem Golgfeld ist jedoch auch zu diesem Zeitpunkt nicht besonders ausgeprägt.

Ganz vereinzelt konnten wir auch Cisternen finden, deren Inhalt eben freigesetzt wurde, so daß sich die Cisternen frei gegen die präossäre Zone hin zu öffnen schienen. Teilweise sind auch die Kollagenvorläufer mit dem eingebauten Prolin

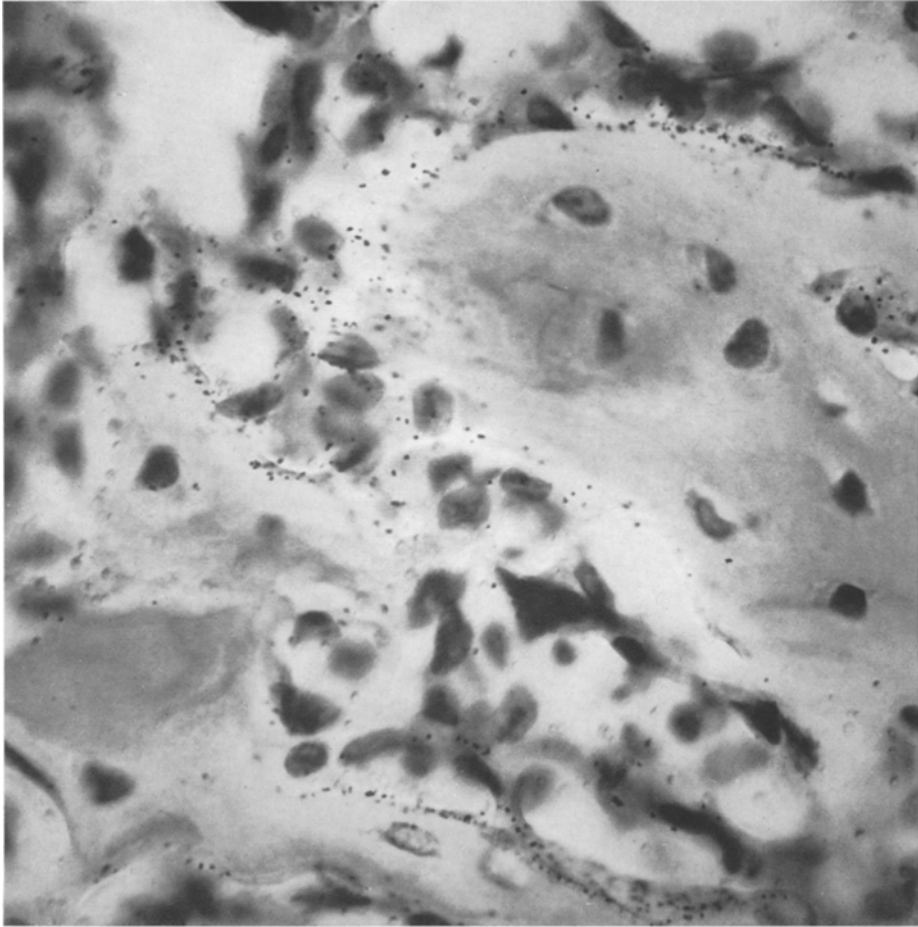


Abb. 2. Ratte, proximale Tibiaepiphyse. 240 min nach der H^3 -Prolininjektion. Die Silberkörner lassen sich als deutlich von den Osteoblasten abgesetzter Markierungssaum erkennen. Maßstab: 14000

bereits in die präossäre Zone übergetreten, und bilden dort einen Saum, welcher demjenigen der lichtmikroskopischen Autoradiogramme entspricht. 60 min nach der Prolingabe ist jedoch kein neugebildetes Kollagen über der verkalkten Matrix nachzuweisen (Abb. 6).

240 min nach der Prolininjektion haben die meisten Osteoblasten und Präosteoblasten die Prolinmarkierung verloren. Nur gelegentlich ist noch markiertes Prolin über den Cisternen anzutreffen. Die Markierungssäume, die vorher über den noch ungeordnet liegenden kollagenen Fasern zu finden waren, haben sich nun weiterhin von den Osteoblasten abgesetzt. Das gebündelte Kollagen ist

markiert, teilweise liegen die Silberkörner bereits in oder nahe der Verkalkungszone (Abb. 7 und 8).

Diskussion

Die elektronenmikroskopisch erhobenen Befunde des Einbaues von H^3 -Prolin stehen in guter Übereinstimmung mit den lichtmikroskopischen Befunden. Die

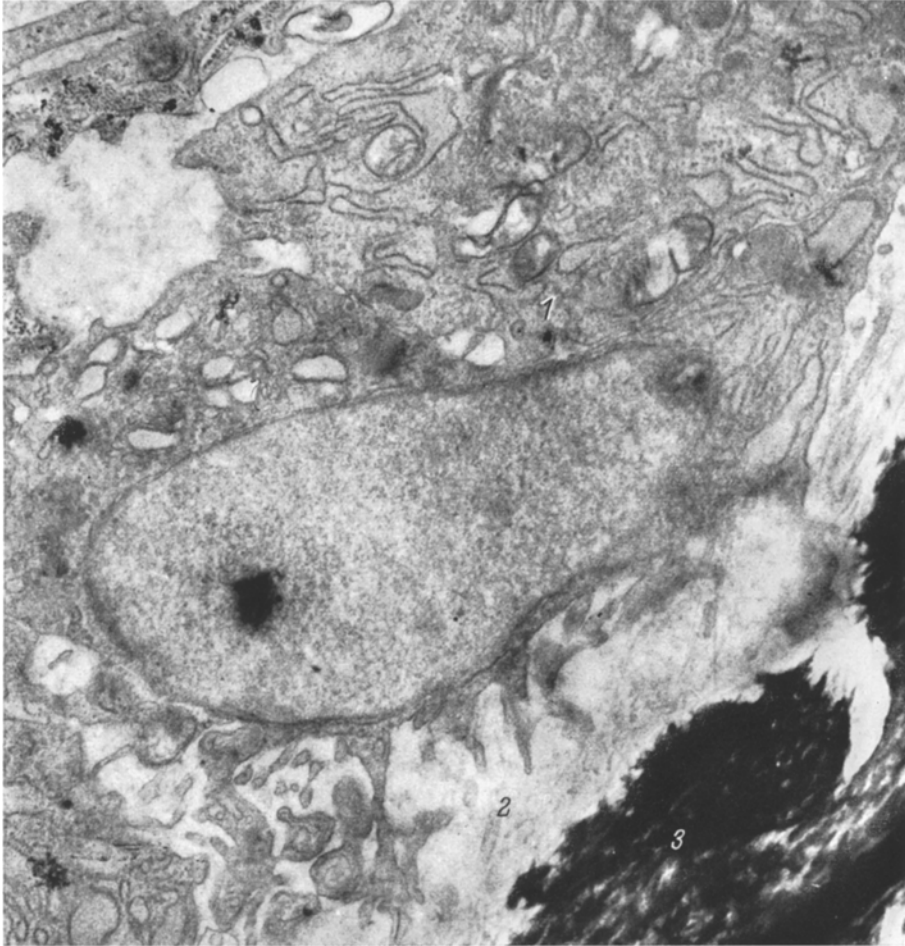


Abb. 3. Primäre Tibiaspongiosa der Ratte. 1 Osteoblast mit stark entwickeltem endoplasmatischem Reticulum; 2 junges fibrilläres Knochengewebe; 3 verkalkte Matrix. Ges.-Vergr.: ca. 14000 \times

Kollagensynthese durch die Osteoblasten konnte bei Untersuchungen mit H^3 -Glycin durch CARNEIRO und LEBLOND und ROHR nachgewiesen werden. Der zeitliche Ablauf des Einbaues von H^3 -Prolin und H^3 -Glycin liegt in der gleichen Größenordnung.

Bereits 15 min nach der H^3 -Prolininjektion konnten wir Aktivität über dem nicht erweiterten endoplasmatischen Reticulum nachweisen. Das markierte Prolin liegt zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich in der Form eines Tropokollagens vor, d.h. als Eiweiß. Dagegen dürften niedermolekulare Eiweißvorstufen, d.h.

Polypeptide, durch die elektronenmikroskopische Verarbeitung mindestens teilweise herausgelöst werden. Die Synthese der Kollagenvorläufer scheint sich über dem nicht erweiterten endoplasmatischen Reticulum zu vollziehen.

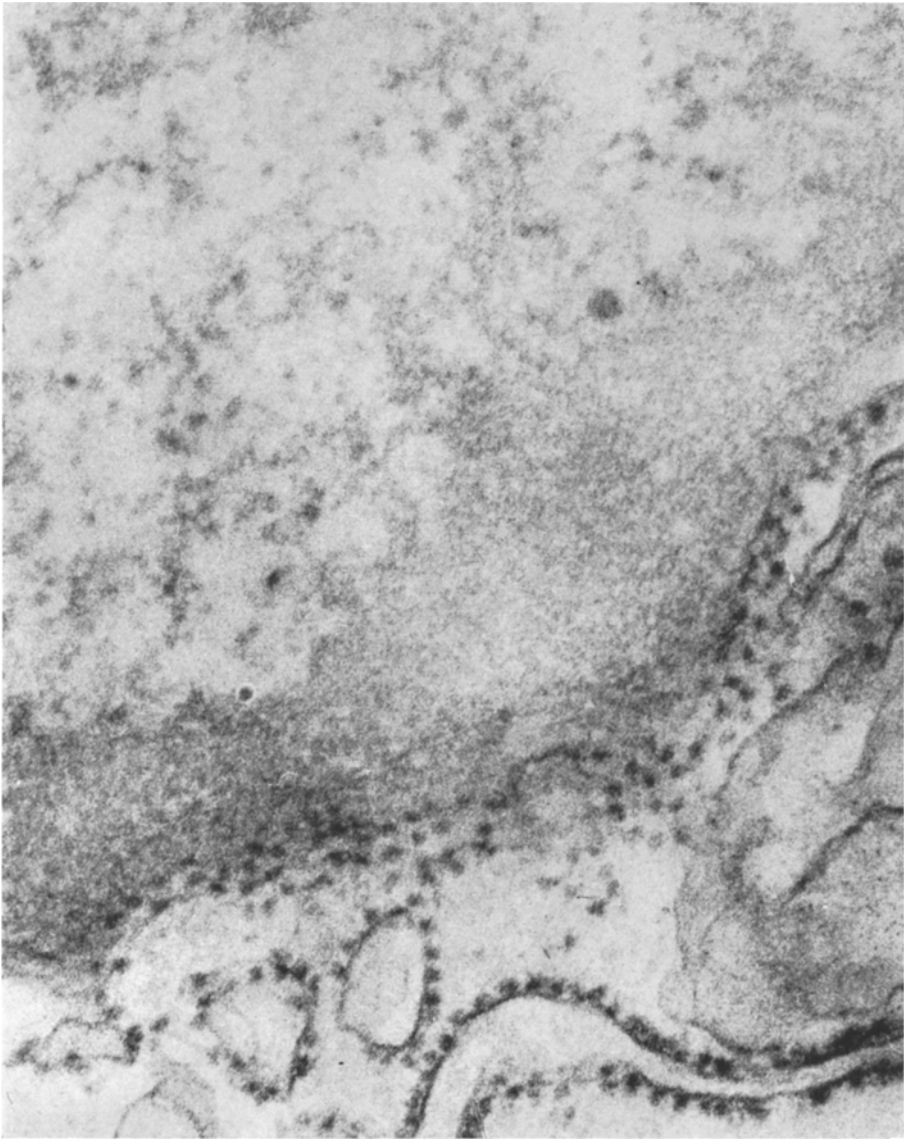


Abb. 4. Primäre Tibiaspongiosa der Ratte. Detailaufnahme einer Cisterne, die einen deutlich netzförmig angeordneten Inhalt aufweist. Ges.-Vergr.: ca. 200 000 \times

Die Tatsache, daß 5 min nach der Prolingabe noch kein markiertes Prolin über den Osteoblasten zu finden ist, kann dadurch erklärt werden, daß die Mengen von Prolin, die sich zu diesem Zeitpunkt in der Zelle finden für eine Erzeugung eines virtuellen Bildes in der Filmemulsion nicht ausreichen. Unsere

Befunde schließen daher einen Einbau von Prolin schon zu diesem Zeitpunkt in die Zelle nicht mit Sicherheit aus.

30 und 60 min nach der H^3 -Prolininjektion konnten wir die Aktivität zur Hauptsache über den Cisternen nachweisen. REVEL und HAY dagegen fanden

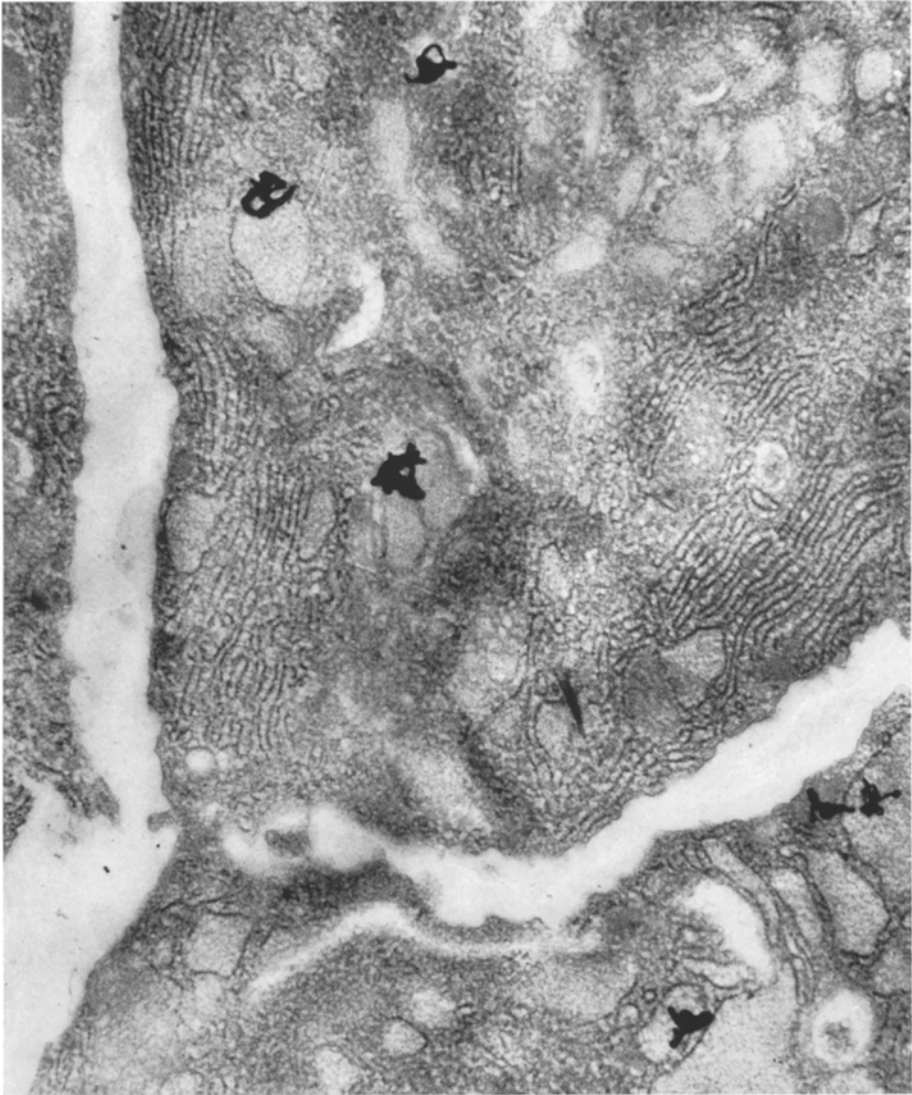


Abb. 5. Primäre Tibiaspongiosa der Ratte. Autoradiogramm: 30 min nach Injektion von H^3 -Prolin. Die „ H^3 -Prolin-Silberkörner“ (in typischer Weise aufgekäuelt) liegen in den stark erweiterten Zisternen des endoplasmatischen Reticulums. Ges.-Vergr.: ca. 26000 \times

zu diesem Zeitpunkt die Prolinaktivität vorwiegend über dem Golgfeld der Knorpelzellen. Im Gegensatz zu demjenigen der Knorpelzellen ist jedoch das Golgfeld der Osteoblasten weniger stark ausgebildet. Sowohl 30 als auch 60 min nach der Prolininjektion konnten wir nur vereinzelt eine sichere Markierung

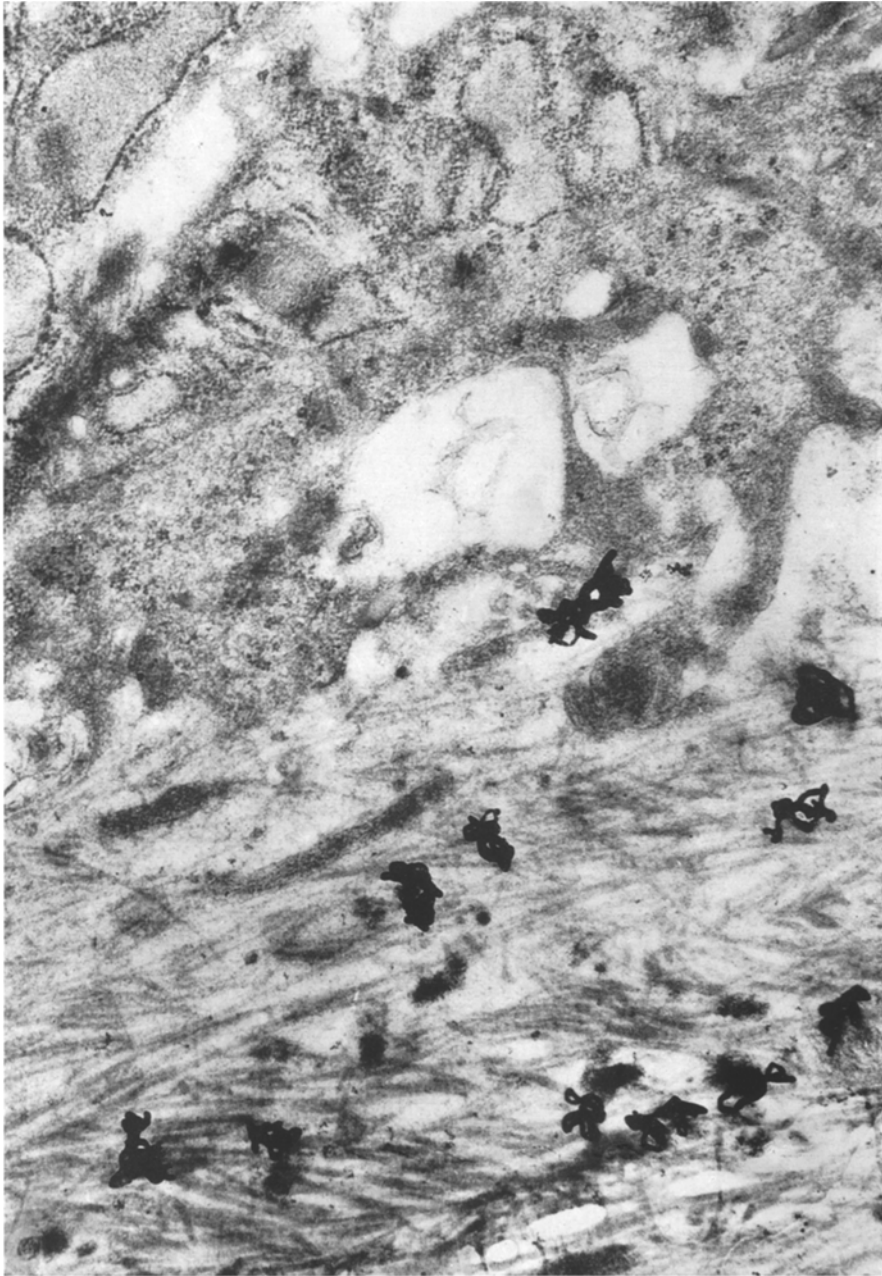


Abb. 6. Primäre Tibiaspongiosa der Ratte: Autoradiogramm. 60 min nach Injektion von H^3 -Prolin. Die Silberkörner, die dem in das neugebildete Kollagen eingebauten Prolin entsprechen, liegen über der präossären, noch nicht verkalkten Zone der Knochenbälkchen. Über den Osteoblasten findet sich keine Markierung mehr.
Ges. Vergr.: ca. 26000 \times

über dem Golgifeld finden. Hingegen fanden wir bei der Durchmusterung einer größeren Zahl von Autoradiogrammen immer wieder Cisternen, die nahe der Zellmembran lagen, diese teilweise sogar auszubuchten schienen. Ganz vereinzelt

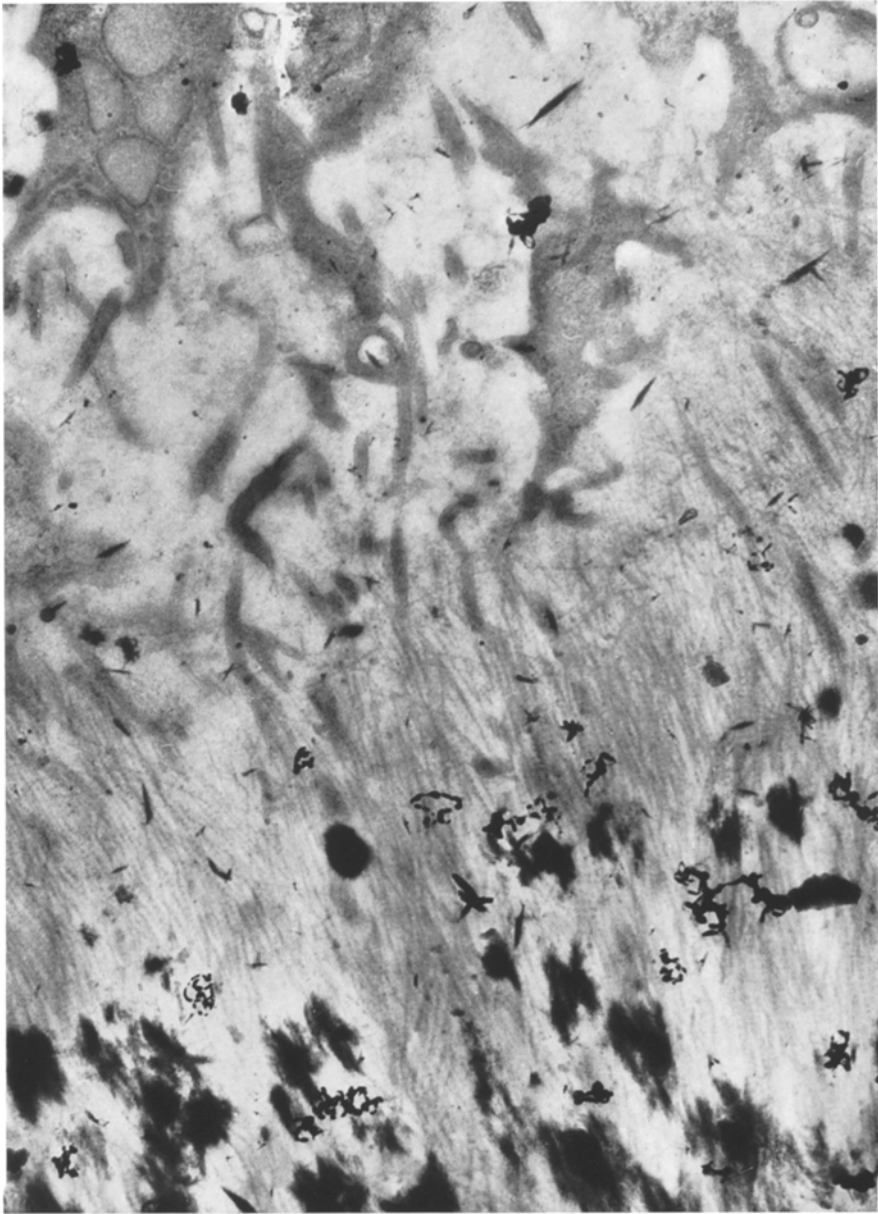


Abb. 7. Primäre Tibiaspongiosa der Ratte. 240 min nach Injektion von H^3 -Prolin. Autoradiogramm. Das markierte Prolin liegt als deutlicher Markierungssaum nahe der Verkalkungszone. Vereinzelte Silberkörner liegen bereits in der verkalkten Matrix. Ges. Vergr.: ca. 26000 \times

konnten wir auch Cisternen finden, deren markierter Inhalt eben freigesetzt wurde, so daß sich die Cisterne gegen die präossäre Zone hin zu öffnen schien. Die Kollagenvorläufer können somit auch direkt über die Cisternen aus der Zelle ausgeschleust werden.

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheinen alle Eiweiße — und im besonderen das Kollagen — die von sezernierenden Zellen, mit Einschluß der Osteoblasten

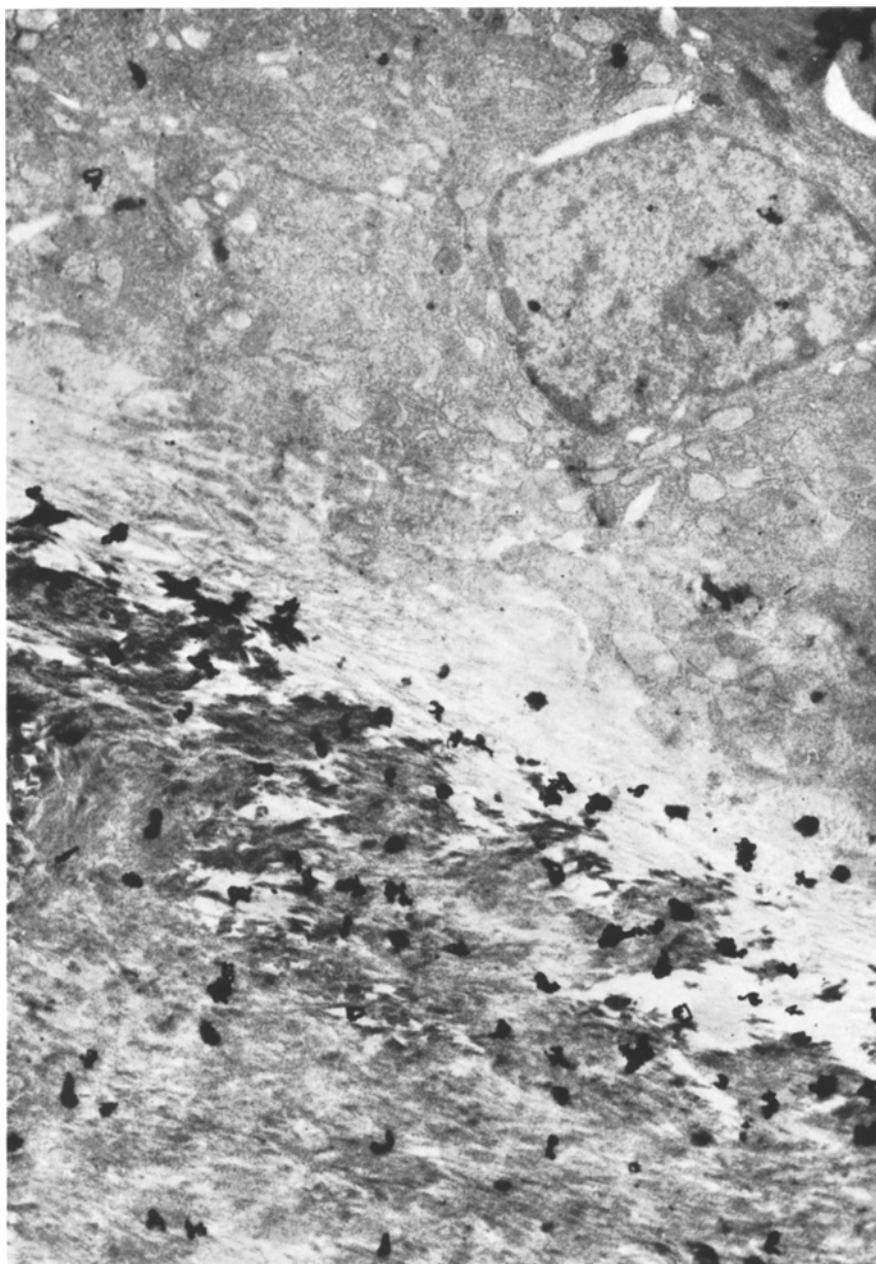


Abb. 8. Primäre Tibiaspongiosa der Ratte. Knochenbälkchen umgeben von Markosteoblasten. Autoradiogramm, 240 min nach Injektion von H^3 -Prolin. Das neugebildete Kollagen findet sich zu diesem Zeitpunkte nahe und in der Verkalkungszone. Ges. Vergr.: ca. 7000 \times

gebildet werden, an oder in den Ribosomen gebildet zu werden (REVEL und HAY, CARO und PALADE). Das begrenzte autoradiographische Auflösungsvermögen ($0,1 \mu$) läßt eine scharfe Trennung nicht zu. Nur bei vereinzeln Schnitten konnte bei mäßig dilatierten Cisternen die Prolinaktivität den Ribosomen einigermaßen zugeordnet werden.

Der neugebildete Kollagenvorläufer, wahrscheinlich ein Tropokollagen, wird nach unseren Befunden einerseits über das Golgfeld und andererseits zum größten Teil über die Cisternen direkt aus der Zelle ausgeschleust. Bereits nach 4 Std findet sich die Prolinaktivität in der präossären Zone der Knochenbälkchen. Dabei liegt das eingebaute Prolin vorerst über den Kollagenfibrillen, die noch keine Orientierung aufweisen, d.h. noch nicht gebündelt sind. Erst später findet sich die Aktivität über dem gebündelten Kollagen oder schon über der verkalkten Knochenmatrix. Das Kollagen befindet sich in zunehmendem Abstände von den Osteoblasten in einem höheren Polymerisationsgrad.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Prolin, als Kollagenvorläufer, nach der Injektion bevorzugt von denjenigen Zellen aufgenommen wird, die bei der Kollagensynthese beteiligt sind. Der Vorgang der Kollagensynthese in seinen zeitlichen und topographischen Ablauf steht in guter Übereinstimmung zum elektronenmikroskopisch beschriebenen Synthese- und Sekretionsablauf der Drüsenzellen.

Unbeantwortet bleibt die Frage, ob das in der Zelle gebildete Syntheseprodukt fakultativ oder obligatorisch den Weg über das Golgfeld beschreitet. Unsere elektronenmikroskopischen Befunde machen es jedoch wahrscheinlich, daß beide Wege beschritten werden können. Die Rolle des Golgfeldes im Synthesablauf des Kollagens bleibt vorerst noch ungeklärt. Untersuchungen mit H^3 -Glucose (PETERSON und LEBLOND), sowie mit S^{35} am Knorpel (FEWER, THREADGOLD, SHELDON) deuten darauf hin, daß das Golgfeld bei der Mucopolysaccharidsynthese eine wichtige Rolle spielt.

Eine extracelluläre Bildung von Kollagen kann nach unseren Befunden zumindestens für die Knochenmatrix ausgeschlossen werden.

Frau G. SCHMIDT und Fräulein A. FELDHEGE bin ich für die technische Hilfe zu großem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung

60—80 g schwere Wistarratten erhielten eine einmalige Dosis von $250 \mu C$ H^3 -Prolin i. p. Je zwei Ratten wurden in Intervallen von 5 bis zu 240 min nach der Prolininjektion getötet. 15 min nach der Injektion liegt die Prolinaktivität über dem nicht erweiterten endoplasmatischen Reticulum, das dem Ort der Kollagensynthese entspricht; nach 30 und 60 min liegt das markierte Prolin über den Cisternen; nach 240 min ist die gesamte Prolinaktivität in die präossäre Zone der Knochenbälkchen übergetreten. Über dem Golgfeld liegt zu allen Versuchszeiten nur eine geringe Markierung mit H^3 -Prolin. Topographisch und zeitlich läuft die Kollagensynthese analog der Sekretbildung der Drüsenzellen ab. Eine extracelluläre Kollagensynthese kann am Knochen ausgeschlossen werden. Die Ausschleusung des Tropokollagens des Knochens findet wahrscheinlich größtenteils über die Cisternen und nur teilweise über das Golgfeld statt.

The Synthesis of Collagen in Regards to the Submicroscopic Structure of Osteoblasts

(Electron Microscopic-Autoradiographic Studies with Tritiated Proline)

Summary

Wistar rats, weighing 60—80 g, received a single ip. injection of $250 \mu C$ of H^3 -proline. Two rats were then sacrificed beginning at five minutes after the

injection, and at five minute intervals thereafter up to 240 minutes. *Fifteen* minutes after the injection the proline activity was located at the non-dilated endoplasmic reticulum which corresponds to the site of collagen synthesis. After *30 and 60 minutes* the labeled proline was at the cisternae; after *240 minutes* the entire proline activity had moved into the preosseous zone of the bony trabeculae. At all experimental times there was only a slight labeling with H_3 -proline at the Golgi apparatus. Topographically and temporally the synthesis of collagen came about in a way analogous to the formation of secretion in glandular cells. An extracellular synthesis of collagen in bones could be excluded. The extrusion of the tropocollagen of the bone took place for the most part probably by way of the cisternae and only partially by way of the Golgi apparatus.

Literatur

- CARNEIRO, J., and C. P. LEBLOND: Role of osteoblasts and odontoblasts in secreting collagen of bone and dentin as shown by radioautography in mice given tritium labeled glycine. *Exp. Cell Res.* **18**, 291 (1959).
- CARO, L. G., and G. E. PALADE: Protein synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocrine cell. An autoradiographic study. *J. Cell Biol.* **20**, 473 (1964).
- , and R. P. VAN TUBERGEN: High resolution autoradiography I. Methods. *J. Cell Biol.* **15**, 173 (1962).
- FEWER, D., J. THREADGOLD and H. SHELDON: Studies on cartilage. V. Electron microscopic observations on the autoradiographic localization of S^{35} in cells and matrix. *J. Ultrastruct. Res.* **11**, 166 (1964).
- GRANBOULAN, P., N. GRANBOULAN et W. BERNHARD: Application de l'autoradiographie à la microscopie électronique. *J. Microscopie* **1**, 75 (1962).
- GREULICH, R. C., and C. P. LEBLOND: Radioautographic visualization of radiocarbon in the organs and tissues of newborn rats following administration of C^{14} -labelled bicarbonate. *Anat. Rec.* **115**, 559 (1953).
- KARNOVSKY, M. J.: Simple methods for 'staining' with lead at 'high pH' in electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **11**, 729 (1961).
- KARPISHKA, J. S.: Sites of protein synthesis as shown by radioautographic distribution of methionine labelled with C^{14} - or S^{35} in mice and rats. M. Sc. Thesis, McGill University Montréal 1958.
- KOEHLER, J. K., K. MUEHLETHALER, and A. FREY-WYSSLING: Electron microscopic autoradiography. An improved technique for producing thin films and its application to H^3 -thymidine labelled maize nuclei. *J. Cell Biol.* **16**, 73 (1963).
- PETERSON, M., and C. P. LEBLOND: Synthesis of complex carbohydrates in the golgi region, as shown by radioautography after injection of labeled glucose. *J. Cell Biol.* **21**, 143 (1964).
- REVEL, J. P., and E. D. HAY: Autoradiographic and electron microscopic study of collagen synthesis in differentiating cartilage. *Z. Zellforsch.* **61**, 110 (1963).
- ROHR, H. P.: Autoradiographische Untersuchungen über den Kollagenstoffwechsel bei der experimentellen Rattenrachitis. (Untersuchungen mit Tritium markiertem Glycin). *Z. ges. exp. Med.* (im Druck).
- , KLIETMANN, W., u. W. OEHLERT: Methodik und Anwendungsmöglichkeiten der elektronenmikroskopischen Autoradiographie. Im Druck.
- ROSS, R., and E. P. BENDITT: An electron microscopic autoradiographic study of the utilization of proline- H^3 in healing wounds, Abstracts 2nd Meeting American Society of Biologists, p. 157. San Francisco 1962.

- SHELDON, H., and R. A. ROBINSON: Electron microscope studies of crystal-collagen relationship in bone. IV. The occurrence of crystals within collagen fibrils. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 1011 (1957).
- SLACK, H. G. B.: Metabolism of collagen in the rat. In: *Nature and structure of collagen*, Ed. J. T. RANDALL, p. 51. London: Butterworths Sci. Publ. 1953.
- TONNA, E. A., E. P. CRONKITE, and M. PAVELEC: A serial autoradiographic analysis of H^3 -glycine utilization and distribution in the femora of growing mice. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 720 (1963).
- YOUNG, R. W.: Autoradiographic studies on postnatal growth of the skull in young rats injected with tritiated glycine. *Anat. Rec.* **143**, 1 (1962).

Dr. med. HANSPETER ROHR
Pathologisches Institut
78 Freiburg i.Br., Albertstr. 19