

## Immunhistochemische Untersuchungen zur Kollagencharakterisierung in Lebercirrhosen\*

K. Remberger, S. Gay und P. P. Fietzek

Pathologisches Institut der Universität München (Direktor: Prof. Dr. M. Eder) und  
Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/München (Abteilung: Prof. Dr. K. Kühn)

Eingegangen am 24. April 1975

### Immunhistochemical Characterization of Collagen in Liver Cirrhosis

*Summary.* Using indirect immunofluorescence technique, 21 cases of hepatic cirrhosis of differing etiology were studied with type-specific antibodies to collagen type I, II, and III.

In all cases the fibrous septa and portal tracts showed an increase in type III collagen. No fluorescence could be observed with antibodies to collagen type I and II. Thus, biochemical studies are supported which show, in addition to type III collagen, a new, as yet undescribed type of collagen in liver cirrhosis that is similar to type I collagen electronmicroscopically, but differs from type I collagen biochemically and immunologically.

No correlation between the etiology of cirrhosis and the pattern of different collagen types could be found.

The origin of different collagen types in liver cirrhosis is briefly discussed.

*Zusammenfassung.* 21 Lebercirrhosen unterschiedlicher Ätiologie wurden mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenztechnik mit typ-spezifischen Kollagenantikörpern auf Vorkommen und Verteilung einzelner Kollagentypen untersucht.

In cirrhotischen Bindegewebssepten und Portalfeldern fand sich in allen Cirrhosen Kollagen Typ III stark vermehrt. Dagegen ließen sich mit typ-spezifischen Antikörpern gegen Kollagen Typ I und II keine anderen Kollagentypen nachweisen. Damit werden biochemische Untersuchungen bestätigt, die in Lebercirrhosen neben Kollagen Typ III einen neuen, bisher nicht beschriebenen Kollagentyp zeigen, der elektronenoptisch als Kollagen Typ I erscheint, sich jedoch biochemisch und immunologisch anders verhält.

Eine Korrelation zwischen Ätiologie der Cirrhosen und Auftreten oder Verteilungsmuster bestimmter Kollagentypen konnte bisher nicht gefunden werden.

### Einleitung

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß im menschlichen Organismus mehrere unterschiedliche, genetisch determinierte Kollagentypen auftreten. Bisher konnten folgende Kollagenmoleküle isoliert und charakterisiert werden:

Kollagen Typ I wird in Fibroblasten und Osteoblasten synthetisiert und konnte aus Haut, Sehnen und Knochen extrahiert werden. Dieses Kollagenmolekül besteht aus zwei identischen  $\alpha 1$  (I)-Ketten und einer ähnlichen, aber nicht identischen  $\alpha 2$ -Kette (Traub und Piez, 1973; Fietzek und Kühn, 1975).

Kollagen Typ II stellt den kollagenen Anteil des hyalinen Knorpels dar und setzt sich aus drei identischen  $\alpha 1$  (II)-Ketten zusammen (Miller, 1973).

Kollagen Typ III wurde erstmals aus fetaler Haut und Aorta isoliert (Chung *et al.*, 1974; Epstein, 1974; Rauterberg und v. Bassewitz, 1975). Es besteht aus drei identischen  $\alpha 1$  (III)-Ketten und wird ebenfalls von Fibroblasten synthetisiert.

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (R 388/1).

Kollagen Typ IV enthält drei identische  $\alpha 1$  (IV)-Ketten und stellt den Kollagenanteil der Basalmembran dar (Kefalides, 1973).

Die einzelnen  $\alpha$ -Ketten sind homologe Polypeptidketten, die sich in ihrem chromatographischen Verhalten, ihrer Aminosäuresequenz und ihrem Kohlehydratanteil unterscheiden.

Die verschiedenen Kollagenmoleküle tragen unterschiedliche antigene Determinanten, so daß sie durch typ-spezifische Antikörper unterschieden und mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik identifiziert werden können (Hahn *et al.*, 1974; Gay *et al.*, 1975).

Aus cirrhotischem Lebergewebe konnte biochemisch neben Kollagen Typ III ein neuer, bisher nicht beschriebener Kollagentyp extrahiert werden (Gay *et al.*, 1975).

In der vorliegenden Arbeit wurden 21 Lebercirrhosen unterschiedlicher Ätiologie immunhistochemisch mit typ-spezifischen Antikörpern gegen Kollagen Typ I, Typ II und Typ III untersucht. Dabei soll gezeigt werden, welche Kollagentypen in normalem, fibrosiertem und cirrhotisch verändertem Lebergewebe auftreten, ob sich neben quantitativen auch qualitative Veränderungen der Kollagenzusammensetzung in Cirrhosen nachweisen lassen und ob eine Korrelation zwischen Ätiologie der Cirrhose und dem morphologischen Verteilungsmuster der einzelnen Kollagentypen besteht.

## Material und Methode

### Untersuchungsmaterial

21 Lebercirrhosen des anfallenden Obduktionsgutes wurden immunhistochemisch untersucht. Die Entnahme der Organe erfolgte zwischen 6 und 24 Std nach dem Tode. Die Organproben wurden mit Kohlensäureschnee tiefgefroren und bei  $-30^{\circ}\text{C}$  gelagert. Als Kontrollen dienten die Organe junger, bei Unfällen verstorbener Patienten, Lebern mit kardial bedingten Fibrosen sowie eine Leber einer veno-okklusiven Erkrankung.

Das Alter der Patienten schwankte zwischen 26 und 79 Jahren mit einem Mittelwert von 55,5 Jahren. Von den Cirrhosepatienten waren 15 Männer, 6 Frauen.

In 11 Fällen lag der Cirrhose ein anamnestisch gesicherter und histologisch bestätigter toxisch-nutritiver Leberschaden durch Alkohol zugrunde. Weitere Ursachen der Cirrhosen waren eine chronische Leberdystrophie (2 Fälle), eine chronisch aggressive Hepatitis (1 Fall), eine chronische Cholangitis (1 Fall) sowie eine Thorotrustose (1 Fall).

In 5 Fällen konnte eine exakte Ätiologie der Cirrhose weder anamnestisch noch histologisch gesichert werden.

In 4 Cirrhosen fanden sich zusätzlich primäre Leberzellcarinome, davon 2 hepatocelluläre, ein gemischtzelliges und ein cholangiocelluläres Carcinom. In der Thorotrustleber fand sich ein malignes Hämangioendotheliom.

### Präparation der Antigene

Kollagen Typ I wurde aus der Haut von Neugeborenen durch limitierten Pepsinabbau gewonnen (Chung *et al.*, 1974; Fujii, 1975).

Kollagen Typ II stammt aus dem hyalinen Gelenkknorpel von Feten und Kälbern und wurde nach der Methode von Miller (1972) isoliert.

Kollagen Typ III wurde aus der Haut von Neugeborenen und Kälbern ebenfalls durch limitierten Pepsinabbau in Anlehnung nach Chung *et al.* (1974) und Fujii (1975) extrahiert.

Die Reinheit der Kollagentypen wurde durch Carboxymethylcellulose-Chromatographie (Le Roy, 1969) und Diskelektrophorese (Furthmayer und Timpl, 1971) überprüft.

### Herstellung typ-spezifischer Antikörper

Immunisiert wurden Kaninchen. Genauere Einzelheiten und Immunisierungsschema siehe Gay *et al.* (1974, 1975). Antikörpertiter wurden durch passive Hämagglutination (Beil *et al.*, 1972) und mittels Radioimmunoassay (Adelmann, 1973) bestimmt.

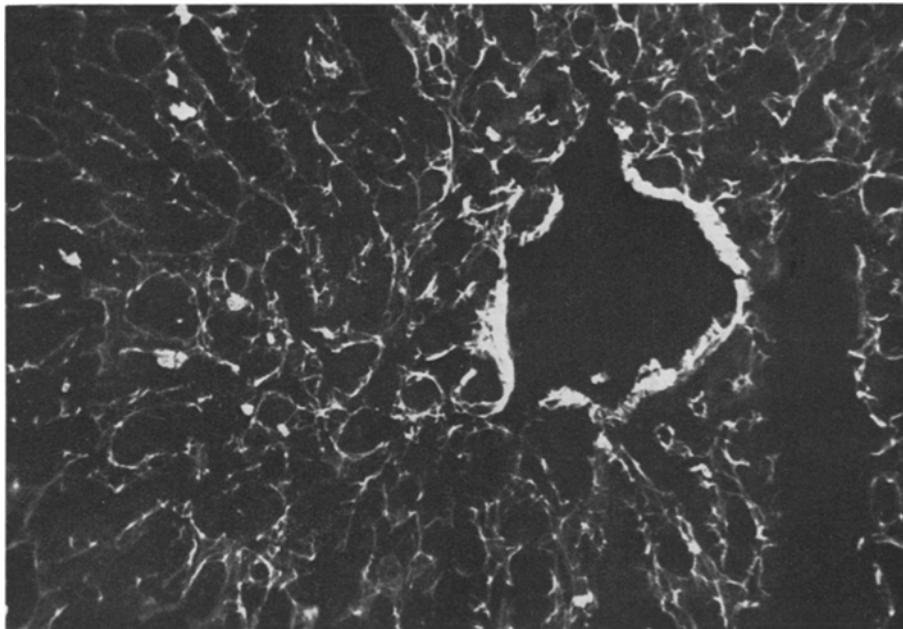


Abb. 1. Normale Leber (25jähriger Mann, Unfalltod. Kryostatschnitt. Indirekte Immunfluoreszenz mit Typ III-Kollagen-Antikörpern von Kaninchen und FITC markiertem Anti-Kaninchen-Globulin. Vergr. 120×). Zentralvene und Reticulinfasern der Sinusendothelien zeigen positive Fluoreszenz mit Antikörpern gegen Kollagen Typ III

Die Reinigung und Isolierung der Antikörper erfolgte durch Immunadsorption an trägergebundenem Kollagen (Wick *et al.*).

Kreuzreagierende Antikörper wurden durch Adsorption an den entsprechenden Kollagentypen entfernt.

#### Immunfluoreszenz

Zur Darstellung der Kollagentypen verwendeten wir die indirekte Immunfluoreszenzmethode. Von den tiefgefrorenen Organproben wurden Kryostatschnitte von 4—6  $\mu$  angefertigt und mit den typspezifischen Antikörpern 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in phosphatgepufferter NaCl-Lösung erfolgte die Behandlung der Präparate mit FITC- oder TRITC-markiertem Antikaninchenglobulin (Fa. Behring und Nordic) in einer Verdünnung von 1:20 bzw. 1:40. Als Kontrollen dienten außer normalem Kaninchengammaglobulin FITC-markierte Antiseren gegen IgA, IgG und IgM in Verdünnungen von 1:10 oder 1:20. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte an einem Universal-Fluoreszenzmikroskop der Fa. Zeiß mit Quecksilberhochdrucklampe, Auflichtkondensor und den entsprechenden Filterkombinationen für FITC und TRITC.

Nach der immunfluoreszenzmikroskopischen Betrachtung wurden dieselben Schnitte anschließend mit Hämalaun-Eosin oder nach v. Gieson gefärbt.

#### Ergebnisse

In gesunden normalen Lebern zeigen sich mit Antikörpern gegen Kollagen Typ III deutlich fluoreszierende schmale Säume entlang den Leberzellbälkchen und den Sinusendothelien. Auch das Bindegewebe der Portalfelder und die Wände der Zentralvenen reagieren mit Typ III Kollagen-Antikörpern (vgl. Abb. 1).

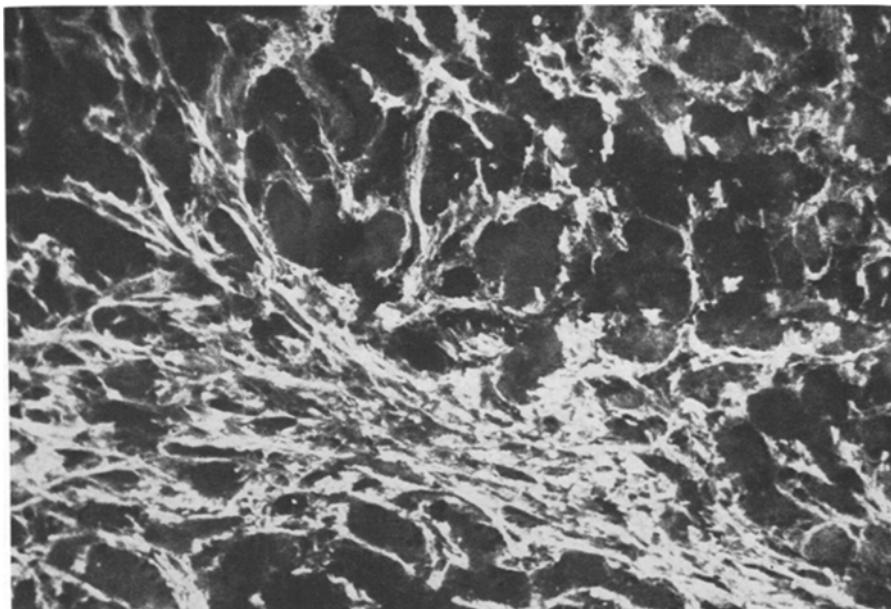


Abb. 2. Retikuläre Fibrose in alkoholischer Fettleber mit unvollständiger Cirrhose. (26jähriger Mann, Kryostatschnitt. Immunfluoreszenz wie Abb. 1). Starke Fluoreszenz der retikulären Kollagenfasern mit Antikörpern gegen Kollagen Typ III

Kollagen Typ I lässt sich immunhistochemisch in normaler gesunder Leber außer in den großen Gefäßwänden nicht nachweisen. Auch Kollagen Typ II, das Kollagen des hyalinen Knorpels, ist in der Leber erwartungsgemäß nicht darstellbar.

An fibrosierten Zentralvenen und fibrosierten angrenzenden Sinusoiden (z.B. bei chronischer kardialer Stauung) finden sich entsprechend breitere und stärker fluoreszierende Bänder mit Antikörpern gegen Kollagen Typ III.

Das Kollagen der retikulären Fibrose in alkoholischen Fettlebern lässt sich ebenfalls nur mit Antikörpern gegen Kollagen Typ III nachweisen (vgl. Abb. 2).

In den verbreiterten Portalfeldern und Bindegewebssepten aller untersuchten cirrhotischen Lebern findet sich immunfluoreszenzmikroskopisch nur vermehrt Kollagen Typ III (Abb. 3). Kollagen Typ I stellt sich außer in den Wänden großer Arterien in den cirrhotischen Lebern nicht dar, ebensowenig Kollagen Typ II.

Dabei besteht kein Unterschied zwischen den Cirrhosen verschiedener Ätiologie. In allen untersuchten Fällen, toxisch-nutritiven, postdystrophischen und cholangitischen Cirrhosen und solchen nicht mehr eruierbare Genese findet man mit typ-spezifischen Antikörpern gegen Typ I, II und III nur Kollagen Typ III in Portalfeldern und Bindegewebssepten. In den Regeneratknoten stellt sich, wie im normalen Leberparenchym, Kollagen Typ III als schmaler Saum entlang den Sinusendothelen dar.

Auch die periductale und periductuläre Fibrose in den cirrhotischen Portalfeldern zeigt nur mit Typ III-Antikörpern eine positive Fluoreszenz.

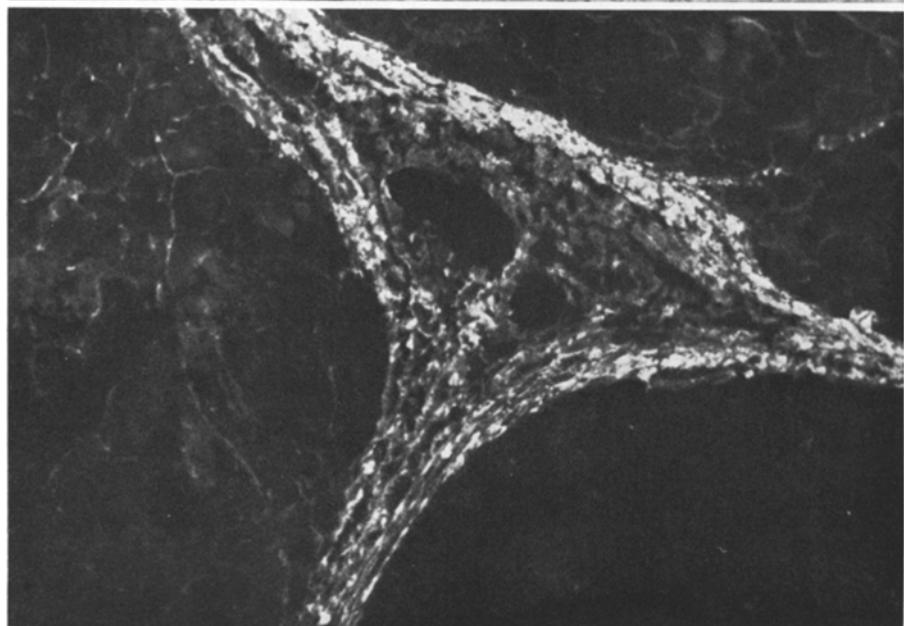
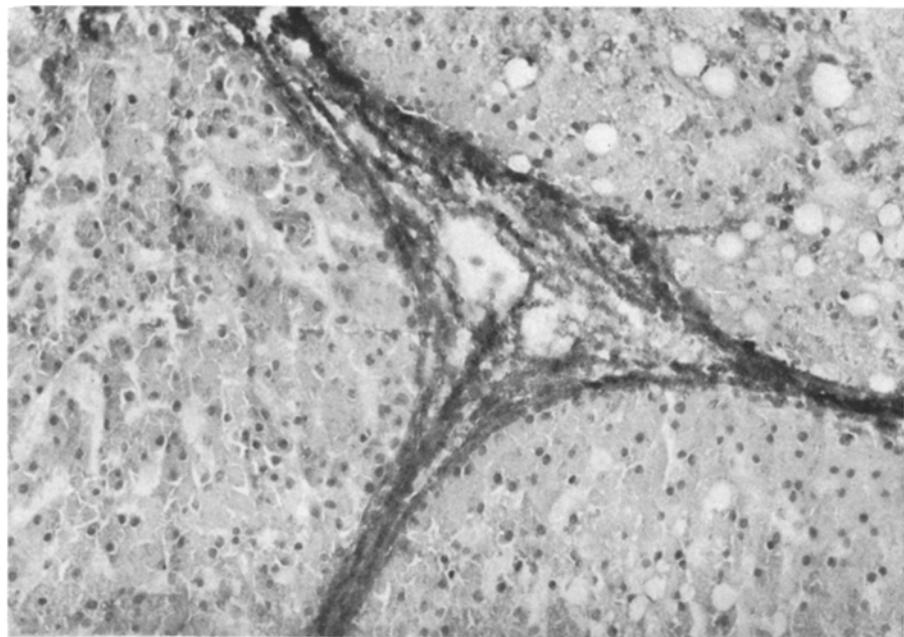


Abb. 3. Alkoholische Lebercirrhose (38-jähriger Mann. Kryostatschnitt. Links: Indirekte Immunfluoreszenz mit Anti-Typ III-Kollagen vom Kaninchen und Anti-Kaninchen-Globulin-FITC. Rechts: Derselbe Schnitt nach Immunfluoreszenztechnik in v. Gieson-Färbung. Vergr. 120 $\times$ ). Deutliche Fluoreszenz der Kollagenfasern in Portalfeldern und cirrhotischen Bindegewebssepten mit Typ III-Kollagen-Antikörpern. Schmale fluoreszierende Säume der Reticulinfasern entlang den Sinusendothelen der Regeneratknoten

In dem cholangiolären Carcinom ebenso wie im Bereich des Hämangiosarkoms reagiert das Bindegewebe immunhistochemisch ebenfalls mit Kollagen Typ III (Abb. 4). Dagegen findet man in den hepatzellulären Carcinomen nur in schmalen herdförmigen Bezirken eine positive Fluoreszenz mit Kollagen Typ III-Anti-

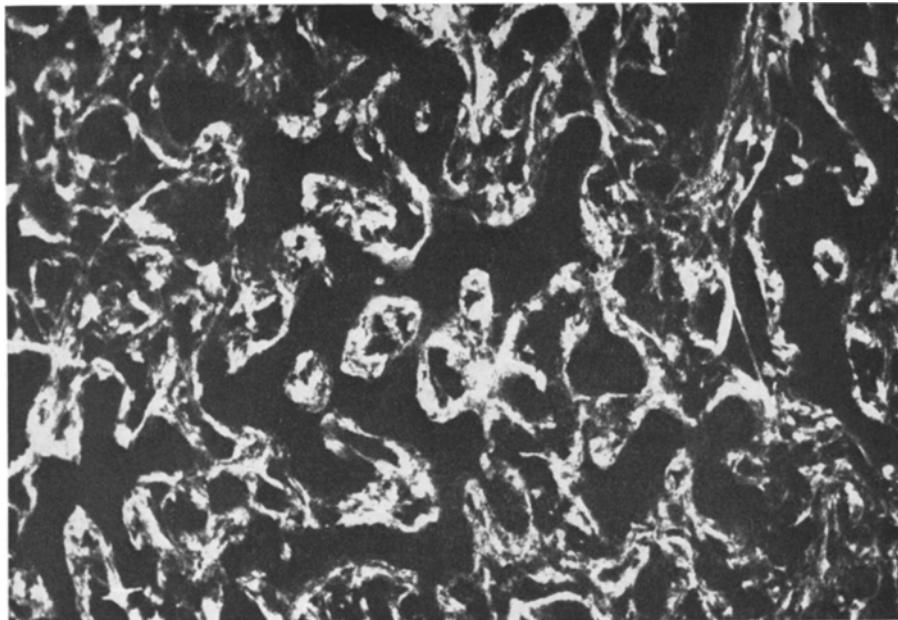


Abb. 4. Cholangiocelluläres Carcinom in postdystrophischer Lebercirrhose (72jähriger Mann, Kryostatschnitt, Immunfluorescenz wie Abb. 1—3, Vergr. 190×). Deutliche Fluorescenz des Bindegewebes zwischen den Carcinomzellen mit Antikörpern gegen Kollagen Typ III

körpern. Im Gegensatz zur normalen Leber und zu Regeneratknoten sind nicht alle Zellbälkchen der Hepatomknoten von Kollagenfibrillen des Typ III umgeben (Abb. 5).

#### Diskussion

Unsere immunhistochemischen Untersuchungen zeigen, daß ein Teil des Kollagens eirrhoischer Lebern Kollagen Typ III darstellt. Damit bestätigen sich biochemische Studien, die 40% des Gesamtkollagengehalts in Lebercirrhosen als Kollagen Typ III identifizierten (Gay *et al.*, 1975).

Dieser Kollagentyp, der ursprünglich aus fetalen Geweben extrahiert wurde, läßt sich jedoch auch in normalen Lebern gesunder Patienten nachweisen (s. Abb. 1). Er ist immunhistologisch an den Leberzellbälkchen entlang den Sinusendothelien, in den Wänden der Zentralvenen und im Bindegewebe des Portalfeldes lokalisiert und entspricht damit zumindest lokalisatorisch den v. Gieson-negativen, argyrophilen Reticulinfasern. Auch in anderen Organen, z.B. in Milz, Lymphknoten und Niere, lassen sich Reticulinfasern mit typ-spezifischen Antikörpern gegen Kollagen Typ III darstellen (Remberger *et al.*, in Vorbereitung). Es handelt sich dabei offensichtlich um sehr dünne Kollagenfibrillen, die im Schnittpräparat elektronenmikroskopisch nicht als Kollagen identifiziert werden können, da die typische periodische Querstreifung der Kollagenfibrillen mit einer Periodenlänge von etwa 640 Å von der Fibrillendicke abhängig ist und erst nach lateraler Aggregation gleichgerichteter Mikrofibrillen zu dickeren Kollagenfibrillen sichtbar wird.

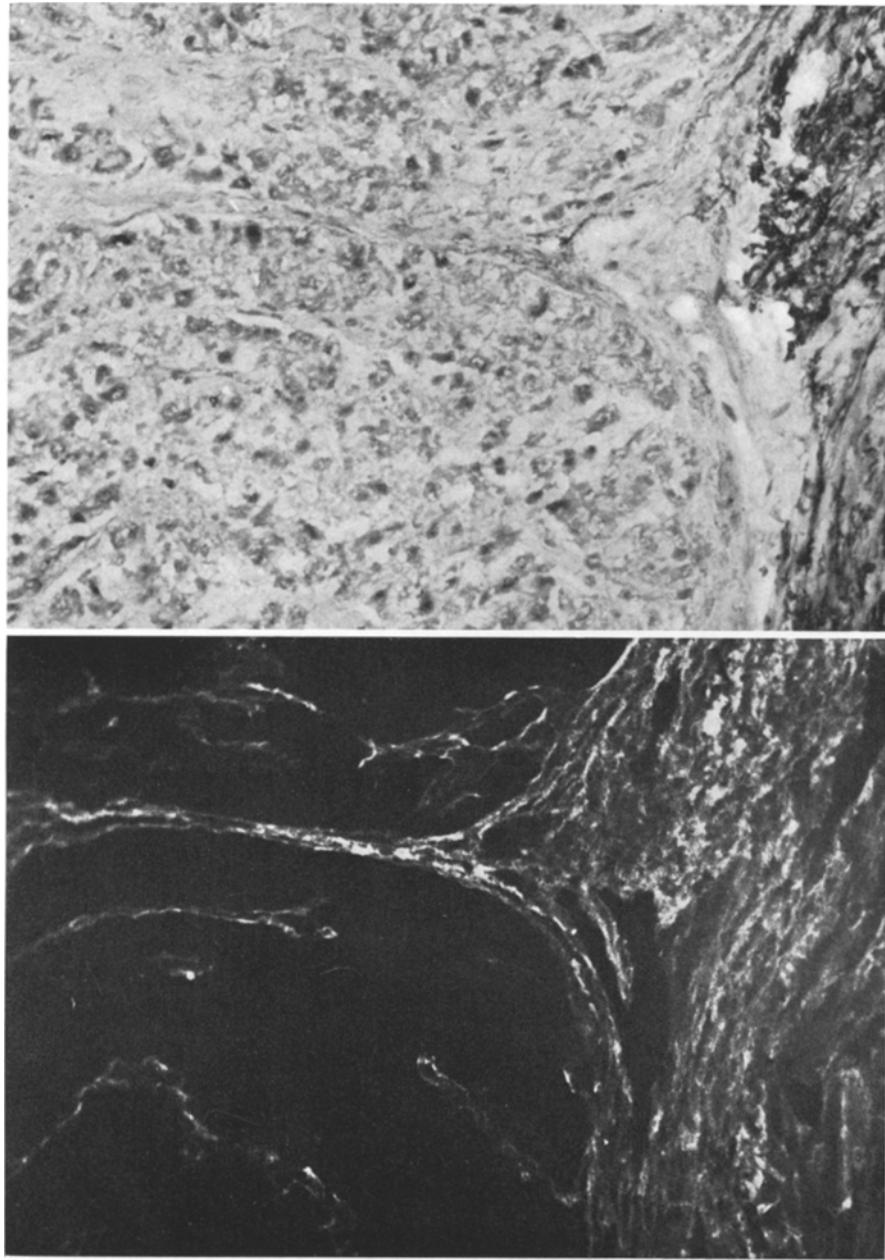


Abb. 5. Hepatocelluläres Carcinom in kleinknotiger Lebercirrhose (60jähriger Mann. Kryostatschnitt. Links: Indirekte Immunfluoreszenz wie Abb. 1-4, Rechts: Derselbe Schnitt nach Immunfluoreszenztechnik mit v. Gieson, Vergr. 120×). Deutliche Fluoreszenz der v. Gieson-positiven Cirrhotosepten und der Reticulinfasern. Nur schmale fluoreszierende v. Gieson-negative Kollagenfasern in den Hepatomknoten.

Die Reticulin- bzw. Kollagen Typ III-Fasern sind jedoch elektronenoptisch als feinfibrilläre Strukturen, z.B. im subendothelialen Raum oder im Niereninterstitium nachweisbar (Stemermann, 1974; Langer, 1975).

Aus biochemischen Untersuchungen (Gay *et al.*, 1975) ergibt sich, daß 60% des Kollagens cirrotischer Lebern offensichtlich einem anderen Kollagentyp ent-

sprechen, der, wie aus unseren Untersuchungen hervorgeht, sich mit Antikörpern gegen Typ I und II immunhistochemisch nicht nachweisen läßt.

Kollagen Typ III unterscheidet sich in Form von Segment-long-spacing-Crystalliten im elektronenoptischen Querstreifungsmuster deutlich von Kollagen Typ I (Wiedemann *et al.*, 1975). Das Kollagen cirrhotischer Lebern, das nicht mit Typ III identisch ist, zeigt elektronenoptisch in Form von Segment-long-spacing-Crystalliten ein dem Kollagen Typ I ähnliches Querstreifungsmuster (Gay *et al.*, 1975).

Da jedoch das chromatographische Verhalten sowie immunhistochemische und serologische Reaktionen dieses Kollagens nicht identisch sind mit dem aus Haut und Knochen extrahierbaren Kollagen Typ I, handelt es sich hierbei offensichtlich um einen neuen, möglicherweise pathologischen, zumindest bisher nicht beschriebenen Kollagentyp.

Die immunhistochemischen Untersuchungen mit typ-spezifischen Antikörpern gegen Kollagen Typ I, II und III zeigten bei den Cirrhosen verschiedener Ätiologie bisher keinen Unterschied in der Verteilung der Kollagentypen. In keinem der untersuchten Fälle konnte neben Typ III immunfluoreszenzmikroskopisch ein anderer Kollagentyp nachgewiesen werden. Ob dagegen das bisher nicht beschriebene Kollagen in Cirrhosen unterschiedlicher Ätiologie identisch ist und ein identisches Verteilungsmuster aufweist, können erst künftige Untersuchungen mit typ-spezifischen Antikörpern gegen diesen neuen Kollagentyp zeigen.

Nach Popper (1970) ergeben sich zwei Wege der Fibrosierung von Lebergewebe: Einmal durch sog. „Kondensation“ und „Kollagenisierung“ von Reticulinfasern nach Leberzellnekrosen und Parenchymkollaps. Zum anderen durch Neubildung kollagener Fasern durch Fibroblasten.

Wie oben gezeigt werden konnte, sind Kollagenfasern des Typs III als sog. Reticulinfasern in reichlicher Menge im normalen Lebergewebe enthalten. Verstärkte Zellregeneration und wiederholte Leberzellnekrosen haben eine Vermehrung von Reticulinfasern bzw. Kollagen Typ III-Fasern zur Folge. Sie sind unabhängig vom Auftreten einer Cirrhose auch in der retikulären Fibrose der alkoholischen Fettleber (vgl. Abb. 2) und in der Fibrose bei kardialer Stauung vermehrt nachweisbar, wobei auch hier formalpathogenetisch Leberzellnekrosen, Parenchymkollaps und verstärkte Zellregeneration für die Vermehrung der Kollagen Typ III-Fibrillen verantwortlich sind. Die Aggregation dieser vermehrt anfallenden Reticulin- bzw. Kollagenfasern ist möglicherweise ausschlaggebend für die Anfärbung mit Fuchsin nach v. Gieson.

Darüber hinaus zeigt das periductuläre Bindegewebe in den verbreiterten Portalfeldern und Cirrhosesepten sowie das Bindegewebe zwischen den Zellen der cholangiocellulären Carcinome, daß Kollagenfasern des Types III in Cirrhosen auch durch proliferierte Fibroblasten gebildet werden können.

Ob das elektronenoptisch an der Querstreifung identifizierbare Kollagen in den Lebercirrhosen tatsächlich „kondensiertes“ Typ III-Kollagen dargestellt, ist nach den bisherigen Untersuchungen nicht sicher. Möglicherweise bleibt Kollagen Typ III in elektronenoptisch nicht identifizierbaren fibrillären Strukturen erhalten und das in Cirrhosen elektronenoptisch quergestreifte Kollagen entspricht dem neuen, bisher nicht beschriebenen Typ, das gewisse Ähnlichkeiten zu Kollagen Typ I aufweist.

Zur Herkunft dieses neuen Kollagentyps können vorerst nur Vermutungen angestellt werden. Wahrscheinlich wird dieser Kollagentyp von proliferierenden Fibroblasten der Portaltrakte bzw. der Cirrhosesepten ähnlich dem Kollagen der cholangiocellulären Carcinome neu gebildet.

Möglicherweise stellt das Auftreten dieses neuen Kollagentyps auch die molekulare Grundlage für den Übergang der reversiblen Fibrose in die irreversible Cirrhose dar.

Künftige Untersuchungen mit typ-spezifischen Antikörpern gegen das neue Cirrhose-Kollagen werden eine genaue Lokalisation seiner Syntheseorte ermöglichen.

### Literatur

- Adelmann, B. C., Gentner, G. J., Hopper, K.: A sensitive radioimmunoassay for collagen. *J. Immunol. Meth.* **3**, 319 (1973)
- Beil, W., Furthmayr, H., Timpl, R.: Chicken antibodies to soluble rat collagen. I. Characterization of the immune response by precipitation and agglutination methods. *Immunochemistry* **9**, 779 (1972)
- Chung, E., Keele, E. M., Miller, E. J.: Isolation and characterization of the cyanogen bromide peptides from the  $\alpha 1$ (III)-chain of human collagen. *Biochemistry* **13**, 3459—3464 (1974)
- Epstein, E. H., Jr.:  $(\alpha 1\text{III})_3$  Human skin collagen. *J. biol. Chem.* **249**, 3225—3231 (1974)
- Fietzek, P. P., Kühn, K.: The Primary Structure of Collagen. *Int. Rev. Connect. Tiss. Res.* (1975) (in press)
- Fietzek, P. P., Rauterberg, J.: Cyanogen bromide peptides of type III collagen: First sequence analysis demonstrates homology with type I collagen. *FEBS Letters*, submitted for publication (1975)
- Fujii, T.: In Vorbereitung
- Furthmayr, H., Timpl, R.: Characterization of collagen peptides by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis. *Anal. Biochem.* **41**, 510 (1971)
- Gay, S., Adelmann, B. C.: Spezifische Antikörper gegen Kollagentyp I und Kollagentyp II: Immunfluoreszenzoptische Differenzierung und selektive Cytolyse von Typ I- bzw. Typ II-synthetisierenden Bindegewebszellen. *Z. Immun.-Forsch.* **147**, 315—316 (1974)
- Gay, S., Adelmann, B. C., Remberger, K.: Identification by immunofluorescence of collagen types I, II and III in tissue. I. Preparation and characterization of rabbit antibodies. (in Vorbereitung)
- Gay, S., Fietzek, P. P., Remberger, K., Eder, M., Kühn, K.: Liver cirrhosis: Immunofluorescence and biochemical studies demonstrate two types of Collagen. *Klin. Wschr.* **53**, 205—208 (1975)
- Hahn, E., Timpl, R., Miller, E. J.: The production of specific antibodies to native collagens with the chain composition  $(\alpha 1\text{I})_3$ ,  $(\alpha 1\text{II})_3$  and  $(\alpha 1\text{I}_2 \alpha 2)$ . *J. Immunol.* **113**, 421—423 (1974)
- Kefalides, N. A.: Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int. Rev. Connect. Tiss. Res.* **6**, 63—104 (1973)
- Langer, K. H.: Niereninterstitium, -Feinstrukturen und Kapillarpermeabilität. I. Feinstrukturen der zellulären und extrazellulären Komponenten des peritubulären Niereninterstitiums. *Cytopathologie* **10**, 161—184 (1975)
- Leroy, E. C.: Some characteristics of the antigenic moiety of calf skin collagen. *J. Immunol.* **102**, 919 (1969)
- Miller, E. J.: Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. *Biochemistry* **11**, 4903 (1972)
- Miller, E. J.: A review of biochemical studies on the genetically distinct collagens of the skeletal system. *Clin. orthop. Rel. Res.* **92**, 260—280 (1973)
- Popper, H., Hutterer, T.: Hepatic fibrogenesis and disturbance of hepatic circulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **170**, 88—98 (1970)
- Popper, H., Udenfriend, S.: Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphological investigation. *Amer. J. Med.* **49**, 707—721 (1970)

- Rauterberg, J., v. Bassewitz, D. B.: Segment-long-spacing-crystallites of type III collagen from calf aorta and fetal calf skin. *Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.* **356**, 95—100 (1975)
- Stark, M., Miller, E. J., Kühn, K.: Comparative electron-microscope studies on the collagens extracted from cartilage, bone and skin. *Europ. J. Biochem.* **27**, 192—196 (1972)
- Stemerma, M. B.: Platelet interaction with intimal connective tissue. In: "Platelets"—production, function, transfusion and storage. New York: Grune and Stratton 1974
- Traub, W., Piez, K. A.: The chemistry and structure of collagen. *Advanc. Protein Chem.* **25**, 243—352 (1973)
- Wick, G., Furthmayr, H., Timpl, R.: Int. Arch. Allergy (submitted for publication)
- Wiedemann, H., Chung, E., Fujii, T., Miller, E. J., Kühn, K.: Comparative electronmicroscope studies on type III and type II collagens. *Europ. J. Biochem.* **51**, 363—369 (1975)

Dr. K. Remberger  
Pathologisches Institut  
der Universität  
D-8000 München 15  
Thalkirchner Str. 36  
Bundesrepublik Deutschland