

# Parakristallite in nativem Kollagen

Paracrystals in Native Collagen

W. Dreißig, R. Hosemann

Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin-Dahlem

und

Th. Nemetschek

Institut für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, Abteilung für Ultrastrukturforschung,  
Universität Heidelberg

(Z. Naturforsch. **29 c**, 516–520 [1974]; eingegangen am 15. Mai 1974)

Herrn Prof. Dr. W. Doerr zum 60. Geburtstag gewidmet

Rat Tail Tendon-Collagen, X-Ray Pattern, Paracrystals, Fraunhofer Pattern

From X-ray photographs informations are derived in the region between small angle and wide angle scattering about the quaternary structure of the biopolymere collagen. A splitting of the equatorial and meridional reflections implies a unit cell with lattice parameters  $a = 38.2 \text{ \AA}$  and  $b = 34.9 \text{ \AA}$  tilted around the  $b$ -axis by  $3.5^\circ$ . However, there exists no crystallographic lattice, but the single protofibrils build up this lattice only as a statistical average. This causes a slight displacement of the reflections of the third order against their ideal positions. Introducing moreover paracrystallinie distortions a comparison of the Fraunhofer-pattern of this model with the experimental results shows a good agreement.

## Einleitung

Drei umeinander gewundene Polypeptidketten bilden die ca.  $2900 \text{ \AA}$  lange Monomereinheit des

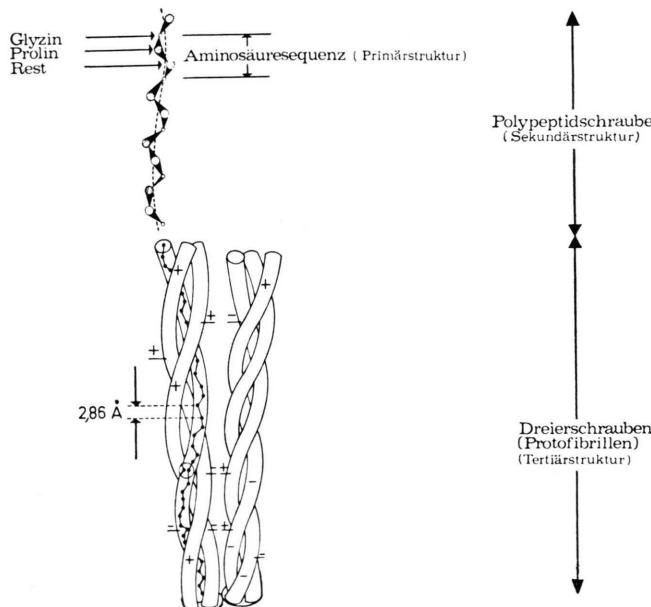


Abb. 1. Aufbau des Kollagen unter Zugrundelegung des Kolagen-II-Modells von Rich und Crick. Primärstruktur = Aminosäuresequenzen, Sekundärstruktur = einzelne  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Ketten, Tertiärstruktur = Dreierschraube (Proteofibrille) (aus Nemetschek <sup>3</sup>).

Kollagen. Während nun unsere Kenntnisse über die Primär-, Sekundär- und Tertiärstrukturen (Abb. 1) recht weit reichen und insbesondere die Fortschritte in der Sequenzanalyse zur fast vollständigen Entschlüsselung der Primärstrukturen der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Ketten geführt haben<sup>1</sup>, herrschen über das Ordnungsschema der räumlichen Anordnung dieser Dreierschrauben zu höheren Einheiten noch Unklarheiten. Da andererseits nativ feuchte Fasern aus Rattenschwanzsehnen in der Röntgenbeugung zu einem charakteristischen Beugungsmuster im Grenzgebiet zwischen Klein- und Weitwinkelstreuung führen, sollen im folgenden unter Anwendung der Theorie des parakristallinen Zustandes weitere Informationen über die Quartärstruktur dieses Biopolymers zur Diskussion gestellt werden.

## Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial dienten Kollagenfasern, die lebensfrisch aus Schwanzsehnen weißer Inzuchtratten präpariert und nativ feucht unter Ringer-Lösung oder Hämaccel® gehalten werden.

Kleinwinkeldiagramme wurden mit Kiessig-Kammern und einer selbst gebauten Kammer bei 101,5, 201,5 und 401,5 mm Filmabstand unter Helium oder im Vakuum bei Verwendung punktförmig ausgebündelter CuKa-Strahlung angefertigt.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Die Fasern wurden nativ feucht und verstreckt in Küvetten mit Fenstern aus Hostaphan R6 Folien vor den Röntgenstrahl gebracht. Die Photometerkurven wurden mit dem Joyce-Loebl-Microdensitometer und die Fraunhofer-Beugungsaufnahmen unter Verwendung eines Laserstrahls mit der Anlage von Kontron angefertigt.

## Ergebnisse und Diskussion

### Die Verkipfung der Gitterzelle

In Abb. 2 ist das Kleinwinkelröntgendiagramm einer nativ feucht verstreckten Faser aus der Schwanzsehne einer  $2\frac{1}{2}$  Jahre alten Ratte wiedergegeben. Man erkennt auf dem Äquator und in der Nähe des Äquators einige Reflexe; die höchsten Maxima entsprechen Abständen im physikalischen Raum von 12,6 bzw. 13,4 Å und sind wohl eindeutig Abständen zwischen benachbarten Dreierschrauben (Protobibrillen) zuzuordnen. Man findet außerdem zwei verschiedene Arten von Reflexen: solche, die auf dem Äquator liegen, wie z. B. der Reflex bei 12,6 Å und solche, die symmetrisch zum Äquator aufgespalten sind wie bei 13,5 Å und 38,2 Å. Die Lagen der Maxima der einzelnen Reflexe, wie man sie aus der Photometrierung der oben gezeigten Aufnahme erhält, sind in Abb. 3 schematisch wiedergegeben. Diese Refleksanordnung ist schon längere Zeit bekannt und wurde unabhängig voneinander von Miller und Wray<sup>2</sup> und von Nemetschek<sup>3</sup> gefunden. Von Nemetschek wurde zusätzlich noch eine Aufspaltung der meridionalen Kleinwinkelreflexe beobachtet.

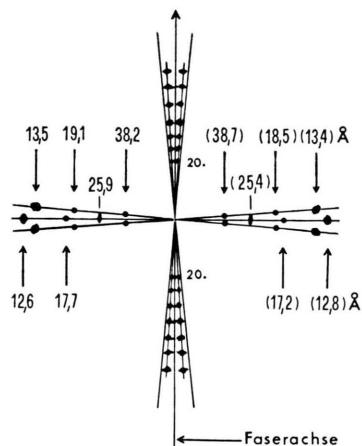


Abb. 3. Lage der Maxima, wie sie aus Photometrierungen der Abb. 2 erhalten wurden. Die Zahlen in Klammern geben die entsprechenden Abstände im physikalischen Raum an, die Zahlen ohne Klammern sind aus dem theoretischen Modell hergeleitet.

Betrachtet man nun zuerst die Äquatorreflexe, so sind grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten der Interpretation gegeben:

1. Die Aufspaltungen um den Äquator entsprechen Reflexen höherer Schichtlinien, d. h. es wird eine Gitterzelle angenommen, deren *c*-Achse in Faserrichtung verläuft und die eine bestimmte Struktur – z. B. eine übergeordnete Helixstruktur bei Miller und Parry<sup>4</sup> – besitzt.
2. Die Gitterzelle ist gegen die Faserachse in definierter Weise gekippt, d. h. die *c*-Achse präzidiert im Faserdiagramm um die Faserachse und die

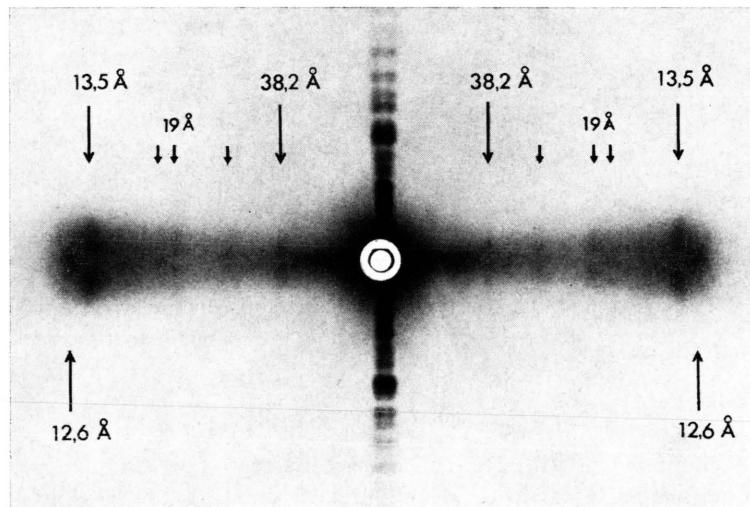


Abb. 2. Röntgenbeugungsdiagramm einer verstreckten nativ feuchten Kollagenfaser aus Rattenschwanzsehne. Abstand Präparat-Film 201,5 mm, Cu-K $\alpha$ -Strahlung.

$b^*$ -Achse z. B. bleibt senkrecht zur Verstreckrichtung. Dann entsprechen den auf dem Äquator liegenden Reflexen solche längs der  $b^*$ -Achse, den aufgespaltenen Reflexen aber Beugungsmaxima auf der  $a^*$ -Achse bzw. Zwischenreflexe.

Bezieht man die regelmäßige Aufspaltung der Meridianreflexe in die Überlegungen mit ein, so ist diese mit dem Modell 1 nur unter der Annahme einer niedrig symmetrischen (monoklinen oder triklinen) Gitterzelle zu erklären, nicht jedoch mit einer tetragonalen, wie bei Miller und Parry<sup>4</sup>, oder noch höhersymmetrischen Anordnung. Nimmt man jedoch eine gegen die Faserrichtung gekippte Gitterzelle entsprechend Modell 2 an, so ergibt sich die Aufspaltung zwangsläufig. Ein weiteres Argument liefert die Tatsache, daß bei hohen  $\vartheta$ -Winkeln die Meridian-Aufspaltung wieder kleiner wird und schließlich keine Meridianreflexe mehr auftreten. Betrachtet man nämlich die Reflexionsbedingungen für eine solche gekippte Gitterzelle, so kann man ableiten, daß die Meridianreflexe zuerst mit einem Winkel  $2\alpha$  aufspalten, wenn  $\alpha$  der Neigungswinkel gegen die Faserachse ist; daß aber bei einem bestimmten Grenzwert  $2\vartheta = 2\alpha$  die aufgespaltenen Reflexe als Schlaufe zusammenlaufen (also keine Aufspaltung mehr auftritt) und jenseits dieses Grenzwinkels der Meridianreflexion überhaupt keine Reflexe mehr auftreten dürfen (Abb. 4).

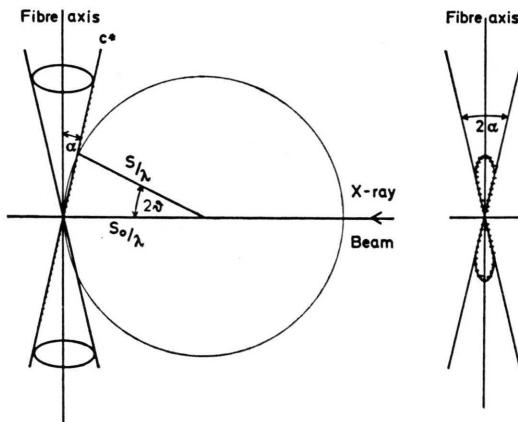


Abb. 4. Beugungsbedingung für eine gegen die Faserachse geneigte  $c^*$ -Achse, links: Schnitt längs des Primärstrahls, rechts: Aufsicht in Richtung des Primärstrahls mit den zur Reflexion kommenden Beugungsordnungen des Meridians.

Diese Tatsache wird noch weiter erhärtet durch Aufnahme einer gegen den Primärstrahl geneigten Kollagen-Faser (Abb. 5). Es muß eine unsymmetrische Aufnahme entstehen, bei der in der oberen

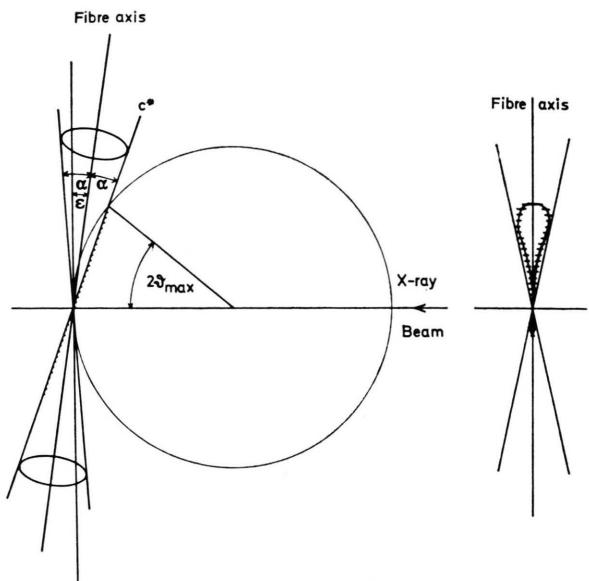


Abb. 5. Beugungsbedingung für eine Aufnahme, bei der die Faserachse nicht senkrecht zum Primärstrahl angeordnet ist.

Hälfte eine verstärkte Aufspaltung der Reflexe bis zu höheren  $\vartheta$ -Winkeln auftritt, während auf der Unterseite nur wenige Reflexe zu sehen sind. Genau das zeigt eine Aufnahme, bei der die Faserachse um ca.  $87^\circ$  gegen den Primärstrahl geneigt ist (Abb. 6).

Bei der quantitativen Betrachtung dieses Sachverhalts fällt auf, daß die Aufspaltung der Äquatorreflexe  $3,8^\circ$  beträgt, der Grenzwinkel der Meridianreflexion in der nicht geneigten Aufnahme (Abb. 2) auch ungefähr zu  $4^\circ$  bestimmt werden kann, die Meridianreflexe im untersten Ast der Schlaufe aber nur eine Aufspaltung von etwa  $2,6^\circ$  zeigen. Diese Diskrepanz wird erklärlich, wenn man in Betracht zieht, daß die Reflexe durch endliche Kristallitgröße verbreitert werden, wodurch sich die Maxima nach innen verschieben (Abb. 7). Unter diesem Gesichtspunkt erhält man bei der asymmetrischen Aufnahme bereits einen Aufspaltungswinkel von  $3,2^\circ$ , der der Äquatoraufspaltung von  $3,8^\circ$  schon recht nahe kommt. Damit ist die Annahme einer gekippten Gitterzelle hinreichend begründet. Sie wird weiterhin erhärtet durch die Tatsache, daß die Photometrierung senkrecht zum Äquator für drei aufgespaltene Reflexe genau den gleichen Aufspaltungswinkel erkennen läßt<sup>5</sup>.

#### Die kollabierte Gitterzelle

Wie muß nun eine Gitterzelle aussehen, um alle Äquatorreflexe erklären zu können? Ein Deutungs-

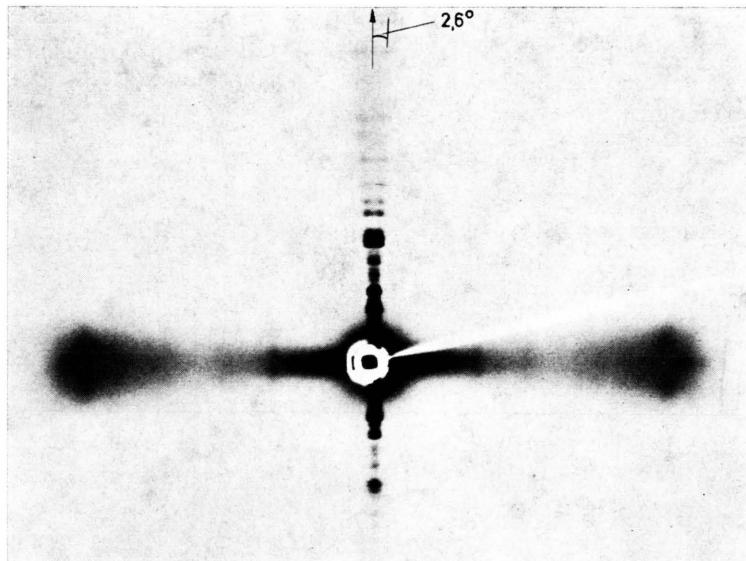


Abb. 6. Röntgenbeugungsdiagramm einer nativ feucht verstreckten Faser, bei der die Faserachse ca.  $3^\circ$  gegen die Senkrechte zum Primärstrahl geneigt ist. Abstand Präparat-Film 201,5 mm, Cu-K $\alpha$ -Strahlung.

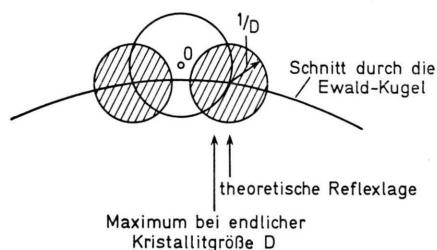


Abb. 7. Beeinflussung der Lage der Maxima der Meridianreflexe durch endliche Kristallitgröße D.

versuch<sup>5</sup> ist in Abb. 8 wiedergegeben: Dabei ist die reziproke  $a$ -Achse (horizontal) etwas gegen den Äquator geneigt; die entsprechenden Reflexe sind also aufgespalten. Die  $b^*$ -Achse (vertikal) steht hingegen senkrecht zur Faserrichtung; die dazugehörigen Reflexe liegen daher genau auf dem Äquator.

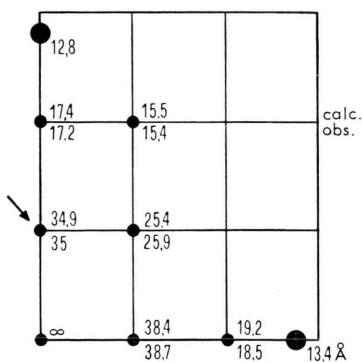


Abb. 8. Reziprokes Gitter der Kollagen-Quartärstruktur. Die Reflexe 30 und 03 sind gegenüber ihren Ideallagen nach innen verschoben.

Eine Schwierigkeit liegt nun darin, daß nach diesem Modell die Reflexe dritter Ordnung nicht genau auf ihrem Platz liegen, sondern etwas nach innen verschoben sind. Es kann sich also nicht um ein Gitter im kristallographischen Sinn handeln, sondern das physikalische Gitter muß Besonderheiten aufweisen, die das Auftreten auch nicht-kristallographischer Reflexe erlauben. Abb. 9 a zeigt das Ordnungsschema

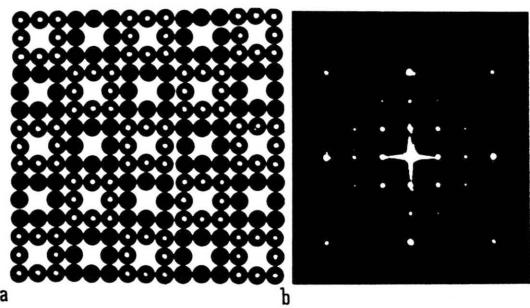


Abb. 9. a. Modell des Grundmusters von geordneten Oktafibrillen. b. Fraunhofer-Beugungsaufnahme dieses Modells.

einer idealen Oktafibrille und in Abb. 9 b ist das dazugehörige Fraunhofer-Beugungsdigramm wiedergegeben. Die hier nicht berücksichtigte leichte orthorhombische Verzerrung läßt sich nachträglich durch unterschiedliche Protomembranenabstände in den beiden Richtungen erklären. Man sieht, daß die Intensitätsverhältnisse schon recht gut wiedergegeben werden: Die dritte Ordnung ist der bei weitem stärkste Reflex; er röhrt von der Beugung an benachbarten Dreierschrauben (Protomembranen) her.

Allerdings ist dies ein „kristallographisches“ Gitter, bei dem die Reflexe dritter Ordnung noch an ihrem Platz sind. Die Periode dieses Gitters ist durch die „Löcher“ in den Oktafibrillen bestimmt. Werden nun diese Hohlräume etwas verkleinert, so wird im statistischen Mittel ihr Abstand, also die Periode des Gitters, kleiner, obwohl der Abstand zwischen zwei Protofibrillen gleich bleibt. Es sollten also die Reflexe des „Übergitters“, das durch die Hohlräume gebildet wird, nach außen wandern, während die Reflexe dritter Ordnung ihre Lage nicht verändern. Ein solches Modell (Abb. 10) hat

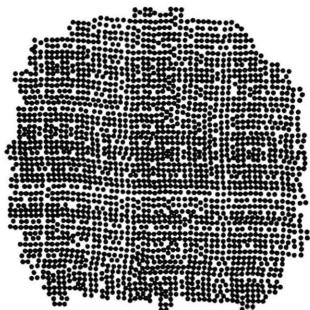


Abb. 10. Modell kollabierter Oktafibrillen (Subfibrillen) mit 10% parakristallinen Störungen.

natürlich mit einem „kristallographischen“ Gitter kaum noch etwas zu tun. Wir haben, da die Reflexe auf den Röntgendiagrammen keineswegs scharf sind, sondern große Breiten besitzen, zusätzlich parakristalline Störungen von etwa 10% eingeführt. Die Fraunhofer-Beugungsaufnahmen eines solchen Modells zeigen bereits den gewünschten Effekt; allerdings enthalten sie wegen der starken Störungen

<sup>1</sup> R. R. Bruns u. J. Gross, Biochemistry **12**, 808 [1973], dort einschlägige Arbeiten von K. Kühn *et al.* und P. Bornstein *et al.*

<sup>2</sup> A. Miller u. J. S. Wray, Nature **230**, 437 [1971].

noch sehr viele „Geister“. Dreht man allerdings das Modell während der Aufnahme, so erhält man schon eine recht gute Näherung des Kollagen-Beugungsmusters. Abb. 11 schließlich zeigt einen Ver-

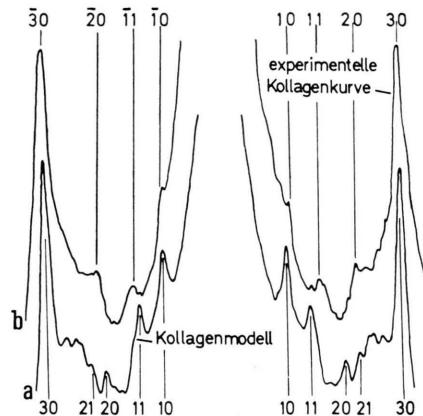


Abb. 11. Bei b Photometerkurve eines Röntgenbeugungsdiagramms entlang der (aufgespaltenen) Reflexe der  $b^*$ -Achse; bei a Photometerkurve des Modells aus Abb. 10. Der Abstand zwischen den Reflexen 10 und  $\bar{1}0$  beträgt 23 mm, zwischen 30 und 30 nicht 69 sondern 64 mm.

gleich der Photometerkurven einer Röntgenbeugungsaufnahme längs einer um  $3,8^\circ$  gegenüber dem Äquator geneigten Geraden und der Fraunhofer-Beugungsaufnahme von einem während der Aufnahme rotierenden Modell.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre wertvolle Unterstützung und Herrn Bernd Uther ebenso für seine ausgezeichnete technische Hilfe.

<sup>3</sup> Th. Nemetschek, Altern und Entwicklung III, p. 38, Stuttgart-New York 1971.

<sup>4</sup> A. Miller u. D. A. D. Parry, J. Mol. Biol. **75**, 441 [1973].

<sup>5</sup> Th. Nemetschek u. R. Hosemann, Kolloid-Z. Z. Polym. **251**, 1044 [1973].