

Struktur und mechanische Eigenschaften dermatosparaktischen Kollagens[§]

Structure and Mechanical Properties of Dermatosparactic Collagen

R. Jonak *, Ch. M. Lapière **, A. Meinel ***, H. Nemetschek-Gansler *,
Th. Nemetschek * und H. Riedl *

* Pathologisches Institut der Universität Heidelberg, Abteilung für Ultrastrukturforschung,
Heidelberg

** Department of Dermatology, Hôpital de Bavière, University of Liège, Belgium

*** Chirurgisches Zentrum des Klinikums der Universität Heidelberg

(Z. Naturforsch. **32 c**, 743–747 [1977]; eingegangen am 29. Juli 1977)

Collagen, Dermatosparaxis, Mechanical Behaviour, Thermal Stability, x-Ray Diffraction

Dermatosparactic calf-tail-tendon-collagen was investigated by mechanical measurements, electron microscopy and x-ray diffraction. We suppose, that the tensile strength decrease of the fibres is due to the irregular aggregation of subfibrils to fibrils. The x-ray diagram of the fibre is not influenced by state of disorder. Cyclic extension of dermatosparactic collagen leads to a higher increase in tensile strength than in the case of normal calf tendon. The effect might be due to the increase of fibril- and area-density resulting in an augmentation of crosslinks.

Einleitung

Die mechanischen Eigenschaften von Kollagen hängen wesentlich von der Struktur und vom Ordnungszustand der Fasern bzw. Fibrillen ab. So führt eine Auflockerung des Gefüges durch Quellung¹ ebenso wie durch überhöhtes Dehnen der Fasern² infolge Aufweitung zwischenmolekularer Abstände zu einem Abfall der Zugfestigkeit. *In vivo* sind ähnliche Gegebenheiten überall dort anzutreffen, wo infolge eines Defektes in der Fibrogenese unvollständig vernetzte oder schlecht assoziierte Fibrillen bzw. Fasern resultieren. Wohl am eindrucksvollsten läßt sich dies am dermatosparaktischen Kollagen³ – einer vererblichen Bindegewebskrankheit, bei der insbesondere das Kollagen der Haut nur noch eine stark herabgesetzte Zugfestigkeit besitzt – veranschaulichen.

Material und Methoden

Es standen zur Verfügung frei präparierte Beinsehnen eines 3 Tage alten und Schwanzsehnen eines 8 Tage alten dermatosparaktischen Kalbes. Als Kontrolle dienten Fasern aus der Schwanzsehne eines

8 Wochen alten Kalbes und aus der Schwanzsehne einer 4 Wochen alten Ratte. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte in Ringerlösung bei +2 °C.

Bestimmung der mechanischen Größen mit Hilfe der von Bowitz⁴ beschriebenen Meßanordnung. Fa-

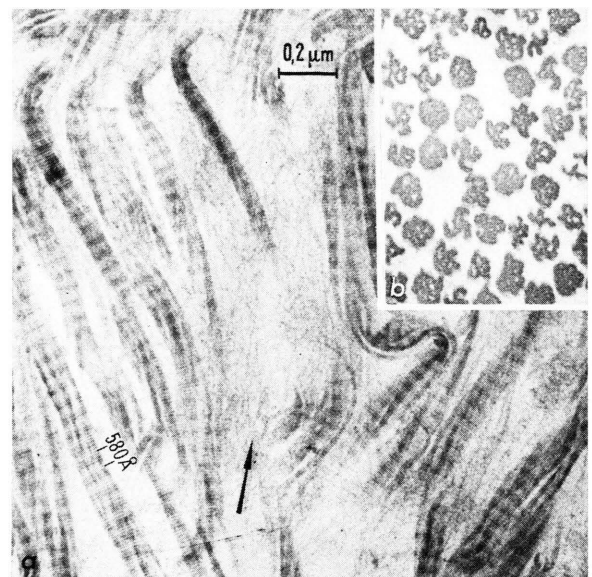


Abb. 1. Pseudofibrillen aus der Schwanzsehne eines 8 Tage alten dermatosparaktischen Kalbes; a) Längs-, b) Querschnitte. Der Pfeil zeigt auf ein Netzwerk aus Subfibrillenbündel. Man achte auf den bandartigen Charakter dieser stark aufgelockerten Fibrillen. Schnittkontrastierung mit PWS und Uranylacetat. 2560/76 und 2549/76; el. opt. 19.000 : 1.

§ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Schwerpunktprogramm: Biopolymere und Biomechanik von Bindegewebssystemen).

Requests for reprints should be sent to Prof. Dr. Th. Nemetschek, Pathologisches Institut der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 220/221, D-6900 Heidelberg 1.



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 digitalized 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.

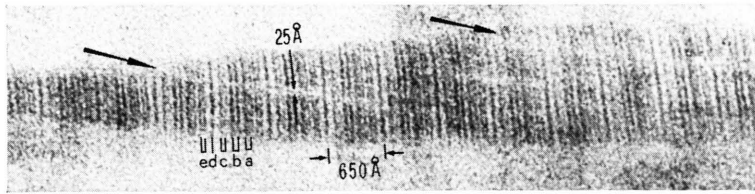


Abb. 2. Leicht aufgelockerte Fibrille aus der Beinsehne eines 3 Tage alten dermatosparaktischen Kalbes. Die Pfeile markieren schräg verlaufende Spaltlinien. Kontrastierung wie bei Abb. 1. 2635/75; el. opt. 38.000 : 1.

sern aus Schwanzsehn wurden unter Ringerlösung oder Hämaccel® bei 20 °C zwischen 3 und 9% ein- oder mehrfach gedehnt; Dehnungsgeschwindigkeit 8%/min; Fasern aus Beinsehn wurden wegen ungleichmäßiger Querschnitte nicht vermessen. Von sämtlichen Proben wurden Röntgenbeugungsdiagramme und elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt sowie der Schrumpfungspunkt (T_s) bestimmt.

Die Präparation der Fasern für die Elektronenmikroskopie sowie für die Anfertigung von Röntgenbeugungsdiagrammen erfolgte wie bereits beschrieben⁵.

Zählung und Klassifizierung der Fibrillenquerschnitte mit Hilfe eines Teilchengrößenanalysators TGZ 3 von Zeiss an lichtoptischen Vergrößerungen

elektronenmikroskopischer Aufnahmen: Endvergrößerung $\sim 30\,000 : 1$.

Ergebnisse

Als Beispiel für dieses in seinem Aufbau gestörte Kollagen sind in Abb. 1 Fibrillen aus der Schwanzsehne eines dermatosparaktischen Kalbes wiedergegeben. Man erkennt, ähnlich wie bei Fibrillen aus der Haut dieser Tiere, stark aufgelockerte, mehr bandartige Pseudofibrillen, deren Querschnitte (Abb. 1 b) ein bizarres Aussehen besitzen. In Abb. 2 sind zum Vergleich Fibrillen aus der Beinsehne eines dermatosparaktischen Tieres wiedergegeben. Eine Fibrillenauflockerung ist weniger deutlich zu beobachten und verläuft entlang den mit Pfeilen markierten Spaltlinien.

In Abb. 3 sind schließlich die zum Objekt aus Abb. 1 gehörigen Klein- und Weitwinkelröntgenbeugungsdiagramme wiedergegeben. Man findet alle für intaktes natives Kollagen charakteristischen Reflexe, so z. B. auch die Langperiode mit der 1. Ordnung bei 670 Å. Ebenso findet man an mit Phosphorwolframsäure (PWS) behandelten Fasern in der Röntgenbeugung die für eine geordnete Einlagerung typischen Reflexfolgen⁶.

Bestimmt man nun an Schwanzsehn-Fasern im biphasischen Spannungs-Dehnungs-Diagramm⁷ die mechanischen Eigenschaften, so findet man bei einer Dehnungsgeschwindigkeit von 8%/min einen E_1 -Modul von nur $\sim 2\text{ kp/mm}^2$ entsprechend $\sim 2 \times 10^7\text{ N/m}^2$; demgegenüber besitzt eine Faser aus einer 8 Wochen alten Rattenschwanzsehne bei der gleichen Dehnungsgeschwindigkeit einen E -Modul von 42 kp/mm^2 oder $4,1 \times 10^8\text{ N/m}^2$. Bei Wiederholungsmessungen führt mehrmaliges Dehnen bis $\sim 6\%$ (8%/min) zu einem auffälligen Anstieg des E -Moduls auf 23 kp/mm^2 entsprechend $2,26 \times 10^8\text{ N/m}^2$. Im einzelnen lag die maximale Zunahme des E -Moduls E_1 bei ca. 1200% (Abb. 4) und war jeweils am größten an dicken, mehrsträngigen Fasern. Demgegenüber war an allerdings nur schwer zu präparierenden Einzelfasern der Anstieg von E_1 mit

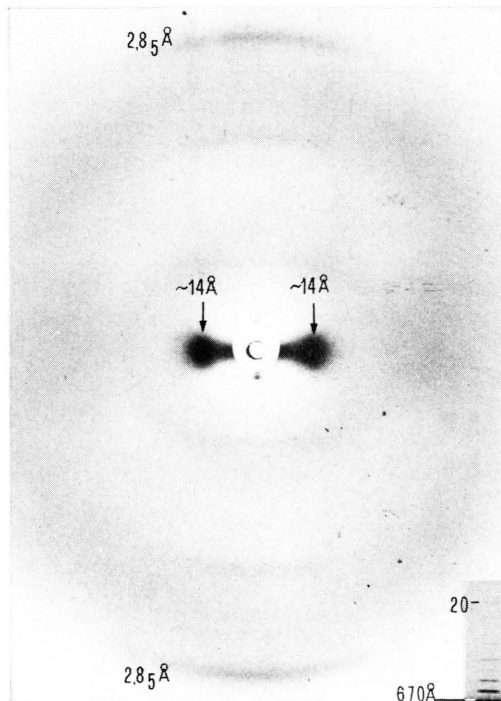


Abb. 3. Weit- und Kleinwinkelröntgendiagramme einer nativ feuchten Faser aus der Schwanzsehne eines 8 Tage alten dermatosparaktischen Kalbes. Im Kleinwinkeldiagramm ist die 1. und 20. Ordnung der 670 Å Langperiode angezeigt. Kiessig- und Kratky-Kammern; $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung; Abstand Präparat—Film: 51,4 bzw. 235 mm. Rö 2521 und 2510.

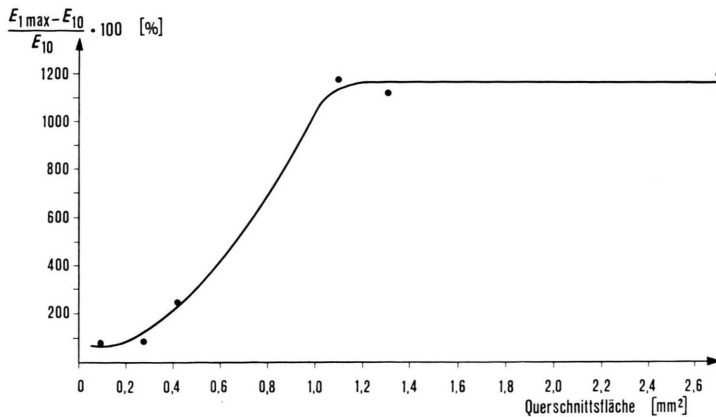


Abb. 4. Maximale, durch Konditionierung erzielte E -Modul-Änderungen in Abhängigkeit vom Faserquerschnitt, gemessen an Fasern aus Schwanzsehne eines dermatosparaktischen Kalbes. Die E -Modul-Werte wurden aus Konditionierungskurven entnommen, von denen eine in Abb. 5 dargestellt ist. E_{10} = Ausgangswert; $E_{1\max}$ = Maximalwert.

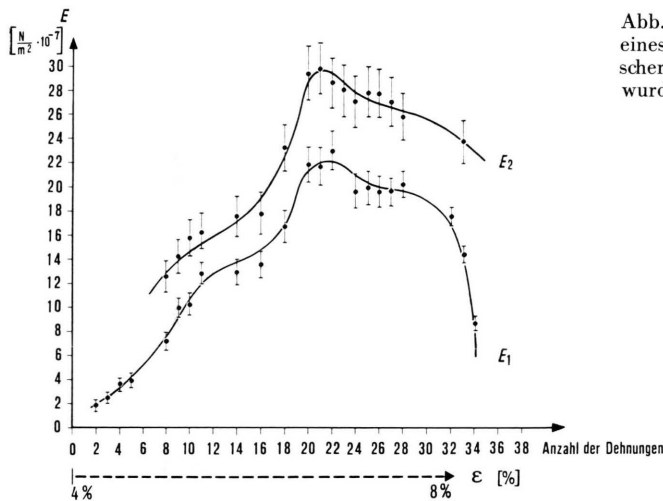


Abb. 5. Änderung der E -Moduln der Schwanzsehnenfasern eines dermatosparaktischen Kalbes bei fortgesetzter zyklischer Belastung. Mit zunehmender Zahl der Dehnungen wurde die Amplitude stufenweise von 4% auf 8% vergrößert.

90% erheblich niedriger. Eine normale Kalbssehnen-Faser von $0,84 \text{ mm}^2$ Querschnitt zeigte bei gleicher Dehnungsvorgeschichte eine Zunahme im E_1 -Modul von 450% gegenüber einer beim dermatosparaktischen Kollagen zu erwartenden Änderung von 750% (s. Abb. 4).

Parallel mit dem Anstieg der Zugfestigkeit war weiterhin auch eine Erhöhung der Thermostabilität der Fasern zu registrieren. So lag der Schrumpfungspunkt der konditionierten Faser bei $\sim 61^\circ \text{C}$ gegenüber einem Ausgangswert von $56,5^\circ \text{C}$.

Die Zunahme von E_2 unterliegt hingegen Schwankungen, da bei den ersten $\sigma - \epsilon$ -Kurven wegen zu geringer Dehnung E_2 noch nicht zu ermitteln war, und somit die Ausgangswerte der jeweils ersten Dehnung fehlten.

In Abb. 5 ist nun die Änderung des E -Moduls mit der Zahl der Dehnungen bei ansteigender prozentualer Dehnung graphisch dargestellt. Die Kurvenform hatte bei allen Versuchen annähernd das gleiche Aussehen. Weiterhin findet man die E -Moduln sogenannter Einzelfasern bis zum Faktor 3,5 niedriger als an den dicken Fasern.

Diskussion

Wie gezeigt werden konnte, besitzen die Fibrillen aus der Schwanzsehne eines dermatosparaktischen Kalbes einen vergleichbar gestörten Ordnungs- zustand wie Hautkollagen entsprechender Tiere. Ebenso findet man an diesen Fasern im Vergleich mit

Kontrollkollagen einen niedrigeren *E*-Modul. Die hierdurch angezeigte geringe Zugfestigkeit der Fasern beruht offenbar auf einer gestörten Assoziation der Kollagenmonomeren zu höheren Ordnungen. Als Ursache hierfür wird bekanntlich eine sterische Behinderung durch den Verbleib terminaler Peptidketten an den Dreierschrauben angesehen, die infolge des Fehlens der zum Abspalten erforderlichen Prokollagenpeptidase⁹ zu erwarten ist. Die Assoziation der Prokollagenmonomeren zu den strukturtragenden Subfibrillen muß jedoch störungsfrei erfolgt sein, was sowohl aus der Darstellung einer hochunterteilten Querstreifung als auch vor allem aus den Röntgendiagrammen in Abb. 3 hervorgeht. Im Einklang mit dem aufgelockerten bandartigen Habitus dieser Pseudofibrillen muß somit die ange deutete sterische Behinderung durch die terminalen Peptidschwänze seinen Niederschlag, wie bereits vermutet⁹, bei der *Assoziation der Subfibrillen zu Fibrillen* gefunden haben. Das Auftreten der für die Umsetzung mit PWS charakteristischen Röntgenreflexe deutet allerdings darauf hin, daß im Mittel dennoch eine ausreichende Anzahl von Subfibrillen „richtig“ assoziiert sein müssen. Das gestörte Fibrillengefüge ist nicht zuletzt auch durch die bizarren Formen der Querschnitte widerspiegelt. Bemerkenswerterweise besitzen *in vitro* durch Quellung aufgelockerte Fibrillen zwar einen vergrößerten, aber dennoch stets ovalen bis runden und geschlossenen Querschnitt^{10, 11}. Lediglich die Querschnitte rekonstituierter Fibrillen aus kolloidalen Kollagenlösungen besitzen ein vergleichbar bizarres Aussehen¹². Bekanntlich ist es auf dem Wege einer Ausfällung kolloidal gelösten Kollagens nicht möglich, lange zusammenhängende Fasern zu erhalten, vielmehr führt dieser Rekonstitutionsprozeß als Ausdruck einer gestörten Faserbildung lediglich zu kurzen flockigen Assoziaten.

Die Störung der Fibrillenbildung bei der Dermatosparaxie und die damit verbundene Beeinträchtigung physikalischer Quervernetzungen (vgl. aber auch Ref. 13) ist somit als Ursache für die geringe Zugfestigkeit dieses Kollagens anzusehen. Neben einer geringeren Packungsdichte dürfte dabei insbesondere auch eine Beeinträchtigung des Längenwachstums der unter diesen Bedingungen entstandenen bandartigen Pseudofibrillen von Bedeutung sein. Geht man nämlich davon aus, daß nicht nur die ~ 2900 Å langen Dreierschrauben, sondern auch alle anderen Untereinheiten einer Faser stets erheb-

lich kürzer als das nächst höhere System sind, so ergibt sich daraus zweierlei:

1. Die endlich langen Bausteine müssen versetzt zueinander parallel angeordnet sein, damit
2. Querbindungskräfte nicht nur zur lateralen, sondern auch zur longitudinalen Stabilisierung des jeweiligen Systems (Subfibrille, Fibrille, Faser) beitragen können.

Die festigkeitsbestimmenden Untereinheiten dürfen sich also nicht über die gesamte Fibrillen- bzw. Faserlänge erstrecken. Die mechanischen Eigenschaften eines solchen Systems müssen also stark von der Länge dieser Untereinheiten bzw. ihrer Überlap-

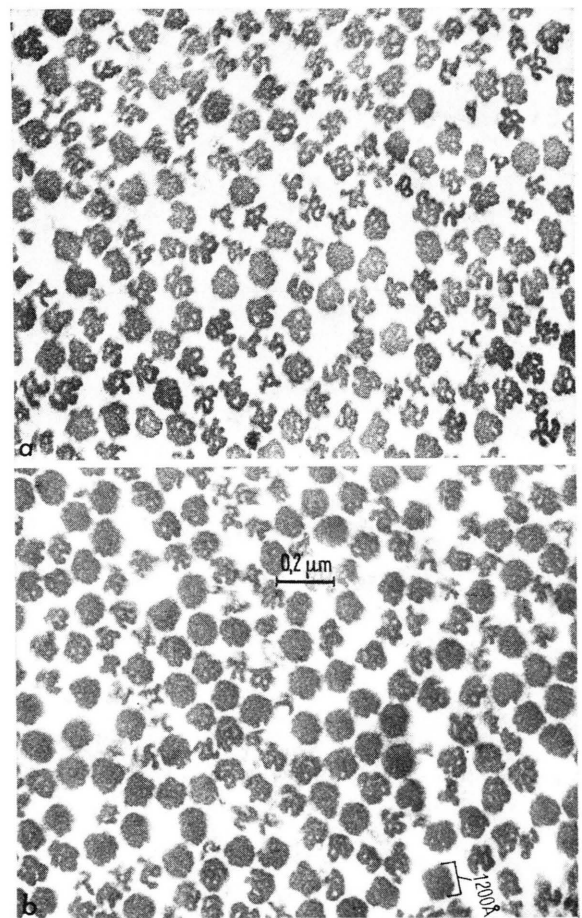


Abb. 6. Fibrillenquerschnitte aus einer Schwanzsehnenfaser eines 8 Tage alten dermatosparaktischen Kalbes; in a) vor und b) nach Konditionierung durch mehrmaliges Dehnen. Bei insgesamt gezählten ~ 18000 Querschnitten nimmt die Flächendichte [Fibrillen/ μ^2] beim Verstrecken der Faser von 65 auf 80 zu. Gleichzeitig ändert sich auch das Verhältnis zwischen stark aufgelockerten und annähernd kompakten Querschnitten von 7 : 3 für die unverstreckte, auf $\sim 1 : 1$ für die konditionierte Faser.

pungszonen und der hierdurch gegebenen Quervernetzungsichte abhängen. An einer Faser, die nicht nur aus einem lockeren Gefüge von dünnen, sondern vor allem auch kurzen Fibrillen bzw. Subfibrillenbündeln besteht, wird man deshalb einen niedrigen *E*-Modul messen. Andererseits liegen in einem solchen System besonders viele Möglichkeiten vor, bei einer durch zyklisches Dehnen verbesserten Parallelasoziation der Untereinheiten, insbesondere physikalische Neuvernetzungen auszubilden. Wie zu erwarten, resultiert hieraus parallel mit dem Anstieg der Flächendichte [Fibrillen/ μ^2] und einer Zunahme kompakter Fibrillenquerschnitte (Abb. 6 b) ein hoher relativer Festigkeitszuwachs (Abb. 4), der um so größer ist, je dicker die Faser war. Schließlich ist der hierdurch resultierende Zuwachs an nicht notwendigerweise kovalenten Quervernetzungen auch noch durch einen Anstieg der Thermostabilität angezeigt.

Die niedrige Zugfestigkeit des dermatosparaktischen Kollagens dürfte also nicht allein aus einer gestörten Parallelaggregation von Untereinheiten, sondern vor allem auch auf dem Vorliegen kürzerer Baueinheiten als normalerweise beruhen. Diese Schlußfolgerung wird weiterhin gestützt durch Messungen an *in vitro* durch Quellung aufgelockerten gesunden Fasern mit einem *E*-Modul von $3,3 \times 10^8$

N/m² vor der Quellung und von $1,9 \times 10^8$ N/m² in gequollenem Zustand. Hier führt eine Konditionierung nur zu einem relativ geringen Anstieg der Zugfestigkeit, und zwar auf $2,5 \times 10^8$ N/m² und lag also noch unter dem Ausgangswert. Die bereits optimalen Vernetzungsbedingungen der Ausgangsfaser konnten somit weder überboten noch wieder erreicht werden. Daraus läßt sich ableiten, daß z. B. eine *in vivo* infolge unphysiologischer Bedingungen aufgelockerte Sehnenfaser bzw. Fibrille eines erwachsenen Menschen durch Konditionierung zwar einen Stabilisierungsanstieg erfahren kann, mit großer Wahrscheinlichkeit aber die ursprüngliche Vernetzungsdichte nicht wieder erreichen dürfte. Eine auch nur partielle Wiederverfestigung durch Konditionierung erscheint jedoch fragwürdig bei Hautkollagen dermatosparaktischer Tiere, da nunmehr nicht nur aufgesplitterte Fibrillen vorliegen, sondern zusätzlich auch die Anordnung zu Fasern stark gestört ist⁹. Zugbeanspruchungen wirken sich deshalb viel stärker auf nicht-gebündelte Einzelfibrillen aus, verbunden mit einem fortschreitenden Fibrillenzerfall. Andererseits wäre es aber denkbar, daß das in Abb. 2 wiedergegebene Beugesehenkollagen seinen kompakten Habitus der funktionsmechanischen Inanspruchnahme und der damit verbundenen Konditionierung verdankt.

¹ H. Rollhäuser, *Morph. Jb.* **90**, 180 [1950].

² Th. Nemetschek, R. Jonak, A. Meinel, H. Nemetschek-Gansler u. H. Riedl, *Arch. orthop. Unfall-Chir.* **89**, 249 [1977].

³ P. J. O'Hara, W. K. Read, W. M. Romane u. C. H. Bridges, *Lab. Invest.* **23**, 307 [1970].

⁴ R. Bowitz, *G-I-T Fachz. Lab.* **19**, 1085 [1975].

⁵ Th. Nemetschek, A. Meinel, H. Nemetschek-Gansler, P. Reill u. H. Riedl, *Virchows Arch. A. Path. Anat. Histol.* **372**, 57 [1976].

⁶ R. Hosemann u. Th. Nemetschek, *Kolloid Z. Z. Polym.* **251**, 53 [1973].

⁷ R. Bowitz, H. Nemetschek-Gansler, Th. Nemetschek u. O. Schiller, *Naturwissenschaften* **62**, 493 [1975].

⁸ G. E. Piérard u. Ch. M. Lapière, *J. Invest. Dermatol.* **66**, 2 [1976].

⁹ Ch. M. Lapière, B. Nusgens, G. E. Piérard u. J. F. Hermanns, *Dynamics of Connective Tissue Macromolecules* (P. M. C. Burleigh and A. R. Poole, ed.), p. 34–50, North-Holland Publishing Comp. 1976.

¹⁰ Th. Nemetschek u. H. Gansler, *Z. Naturforsch.* **16b**, 496 [1961].

¹¹ M. Bouteille u. D. C. Pease, *J. Ultrastr. Res.* **35**, 314 [1971].

¹² R. R. Bruns, *J. Cell Biol.* **68**, 521 [1976].

¹³ K. Fujii, M. L. Tanzer u. P. H. Cooke, *J. Mol. Biol.* **106**, 223 [1976].