

Kollagen-Einschlußverbindungen

Inclusion Compounds of Collagen

H. Newesely

Lehrgebiet für Spezielle medizinische Chemie und Werkstoffkunde (FB 7) der Freien Universität Berlin

und

R. Hosemann und B. Uther

Fritz-Haber-Institut der MPG, Teilinstitut für Strukturforschung, Faradayweg 4 – 6, D-1000 Berlin 33

Z. Naturforsch. **35 c**, 177–187 (1980); eingegangen am 19. November 1979

Microparacrystals, Calcification, Octafibrils, Hydroxyl Apatite, Collagen Inclusion Compounds

Small angle X-ray diagrams of native collagen of rat tail treated with phospho tungstic acid or mercury chloride or cobalt- and uranyl-nitrate, osmiumoxide or hydroxy apatite show the same characteristic new reflections and reflection lines. The only remarkable difference exists between fibers treated under stress or relaxed. These experiments give new evidence for the paracrystallinity of collagen. More than 100 parallel aligned ca. 40 Å thick octafibrils consist of 670 Å long micro-paracrystals with 5 ca. 25 Å thick soft segment layers. In these soft segments the holes of the octafibrils build up a lattice of vacancies with lattice cells of $38.5 \times 35 \times 135 \text{ \AA}^3$ length. The above mentioned molecules penetrate from the lateral sides through the soft segments into these vacancies building up complexes with peptide groups of collagen. Under stress only a small amount of vacancies is occupied, statistically distributed over the vacancy-lattice, because the soft segments of the octafibrils are constricted. Without stress about 10 to 25% of the octafibrils within one paracrystal are filled up with sediments in the soft regions. With increasing precipitation finally 500 Å long needles are formed of the inclusive material as detected by Höhling with the electron microscope in collagen of turkey tendon. The importance of the paracrystalline collagen model is emphasized to understand the biological process like the mineralisation of collagen and β -keratin in organism or the activity of bone apatite in exchanging calcium ions.

I. Einleitung

In früheren Arbeiten zur Biomineralsation war versucht worden, diese aufgrund epitaktischer Vorgänge zu verstehen. Bei den Aufwachungsexperimenten am Polypeptidmodell wiesen die beobachteten Strukturen mit großer Wahrscheinlichkeit darauf hin, daß der biologische Reaktionsmechanismus bei der Kristallnukleation kollagener Mineralisationen über den Standard einer eigentlichen Epitaxie – nämlich Orientierung durch elektrostatische Valenzkräfte für die Gastphase – hinausreicht. Der negative Orientierungserfolg im Epitaxie-System organischer Aufwachungspartner unter physiologischen Temperatur- und Konzentrationsbedingungen schließt eine strenge Analogie zum Typus der kristallographischen Epitaxie-Reaktion im Nukleationsstadium mit großer Wahrscheinlichkeit aus und unterstreicht das Konzept der Einlagerung mineralisierender Moleküle im Urgel nach sterischen Gesichtspunkten des

Platzbedarfs. Da es sich bei diesem Problemkreis sowohl theoretisch als auch experimentell um schwierig faßbare Vorgänge handelte, war versucht worden, die Orientierungsversuche stufenweise dem biogenen Realzustand anzunähern [1]. Es sollte sich hierbei einerseits um Mineralisationsstudien an präparierten natürlichen Geweben (vorgebildeten Faserstrukturen) handeln, z.B. Verkalkung von kollagenen Sehnen mit metastabilen Kalziumphosphatlösungen, oder Reaktionen von Oktakalziumphosphatlösungen mit synthetischen Fibrillärstrukturen; diese haben morphologisch nur unzureichend und nicht zwingend eine Zuordnung erweisen können (1. Näherung). In nächster Näherung sollte versucht werden, nach den Prinzipien kristallographischer Kopräzipitation bzw. Kokristallisation der organischen Partner auf vorgegebenen Kristallflächen die orientierten Mikrogefüge zu reproduzieren (2. Näherung). Die weitestgehende Näherung an die biologische Wirklichkeit wäre auch in Modellversuchen nur durch die Reaktion der Strukturpartner als Nukleation auf der Proteinmatrix in deren statu nascendi zu erreichen (3. Näherung).

Reprint requests to Prof. Dr. R. Hosemann.
0341-0382/80/0300-0177 \$ 01.00/0



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.

Nachdem also die Orientierungsversuche nach strukturchemischen Prinzipien für die Einlagerung anorganischer Salze in die Kollagenstruktur auf ein sterisch bestimmtes Modell der 1. Näherung zurückverwiesen; mußte versucht werden, diese durch verfeinerte experimentelle Methoden von der bloß morphologischen Beschreibung zur quantitativ faßbaren Analyse anzuheben. Die Röntgenkleinwinkelstreuung erfüllt diese Forderung, wenn man sie nicht nach Methoden der klassischen Kristallographie entschlüsselt, sondern den mit der Theorie des Parakristalls eingeführten neuartigen Gitterkomplex mit flüssigkeitsstatistischen Störungen einführt [2]. Die auf unterschiedliche Weise mit Fremdmolekülen präparierten Kollagenfasern liefern eine Fülle neuer Informationen über das parakristalline Modell der etwa 39 Å dicken Oktafibrillen, die in Faserrichtung alle 135 Å Weichsegmente ähnlich dem Nylon 66 aufweisen. Hier dringen von den Seiten die Fremdmoleküle in die Innenräume der Oktafibrillen ein, unbeschadet ihres jeweiligen Chemismus. Wir nennen diese Strukturen „Kollagen-Einschlußverbindungen“. Einschlußverbindungen sind seit langem in der organischen Chemie bekannt. Harnstoff und Phyllosilikate nehmen z. B. gewisse Mengen von aliphatischen Ketten in sich auf [3]. Bei Harnstoff lagern sie in den von den Harnstoffmolekülen parallel der *c*-Achse gebildeten Kanälen, bei Phyllosilikaten werden auch andere Moleküle wie Polyphosphate, Polygalacturonsäure, Polymannuronsäure oder Desoxiribonucleinsäure eingeschlossen. Nemetschek hat erstmalig derartige Einschlußverbindungen von Phosphorwolframsäure in nativem Rattenschwanzkollagen anhand von Röntgenkleinwinkeldiagrammen untersucht [4]. Ein besonders interessantes Beispiel zur Biomineralisierung von Kollagen oder β -Keratin liefert die im folgenden auch untersuchte Einlagerung von Hydroxylapatit, die im wesentlichen ebenso verläuft wie bei den anderen hier untersuchten, leichter löslichen Salzen verschiedener Heteropolarität.

II. Parakristallines Strukturmodell von nativem Kollagen

Abb. 1 zeigt eine Röntgenkleinwinkelaufnahme des nativen um 4% verstreckten Rattenschwanzkollagens von Nemetschek [4]. In Faserrichtung beobachtet man die bekannte Langperiode von 670 Å, die der gegenseitigen Verschiebung benachbarter

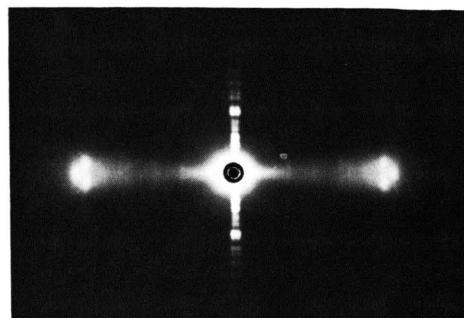


Abb. 1. Röntgenkleinwinkeldiagramm von nativem Kollagen eines Rattenschwanzes, feucht aufgenommen in einem Behälter mit Ringer-Lösung. Faserrichtung in der Vertikalen.

Tripelhelices entspricht (Abb. 2). Jede Tripelhelix zeigt alle 135 Å sog. weiche, etwa 20 Å lange Segmente, die sich ähnlich wie in Nylon mit harten, etwa 115 Å langen Segmenten abwechseln (Abb. 3). Beim leichten Dehnen werden die Ketten in den weichen Segmenten etwas aneinandergedrückt, wodurch sich die harten Segmente um einige Grade gegenüber der Streckrichtung verdrehen. Dadurch tritt die in Abb. 1 beobachtbare Aufspaltung der 670 Å-Meridianreflexe auf. Aber auch auf dem Äquator beobachtet man bei 38,5 Å, 19 und 13,4 Å eine entsprechende Aufspaltung von Reflexen, die dem lateralen Abstand benachbarter Tripelhelices entsprechen (Abb. 1). Der sehr diffuse Charakter einiger dieser Reflexe weist auf große parakristalline laterale Störungen hin [2]. Die Indizierung der Reflexe läßt sich mit Hilfe des parakristallinen Strukturmodells in einfacher Weise durchführen (Abb. 4) und beweist, daß sich die beiden Segmente bei Verspannung um die *b*-Achse drehen, auf der die Reflexe von 17,4 Å und 12,8 Å liegen. Denn diese werden in Abb. 1 nicht aufgespalten. Die Reflexe bei 12,8 Å und 13,4 Å liegen nicht auf den reziproken Gitterpunkten des von den Oktafibrillen gebildeten Gitters mit $a = 38,5 \text{ \AA}$ und $b = 35 \text{ \AA}$. Die Antwort hierzu gibt Abb. 5: Die Oktafibrillen sind etwas zusammengepreßt, so daß die von jeweils 8 Tripelhelices umgebenen Leerstellen einen etwas kleineren Abstand als das Dreifache des Abstandes benachbarter Tripelhelices haben. Abb. 2 zeigt schematisch den Aufbau einer einzelnen Oktafibrille aus im Rechteck angeordneten 8 Tripelhelices, wobei die Tripelhelices 2,2 gegenüber 1,1 um 670 Å verschoben sind. 3,3 in gleicher Weise gegenüber 2,2 und 4,4 ebenso gegenüber 3,3. 1,1 ist dann abermals um

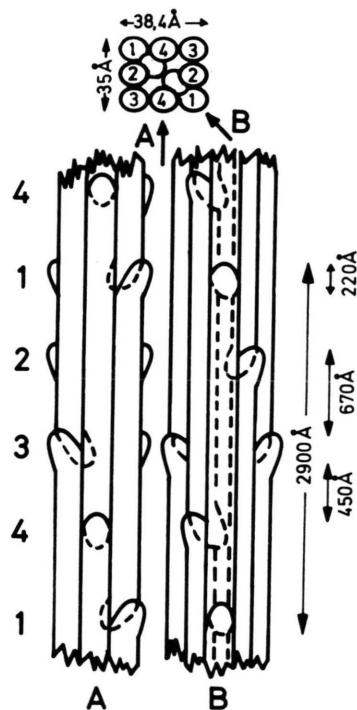


Abb. 2. Das parakristalline Modell einer Oktafibrille bestehend aus acht Tripelhelices (grob schematisch). Oben: Querschnitt durch eine Oktafibrille. Unten: Seitenansichten. a) aus Richtung A betrachtet; b) aus Richtung B betrachtet. Die 2900 Å langen Moleküle überlagern sich um 220 Å an ihren Enden und sind jeweils entsprechend den Zahlen 1 bis 4 um 670 Å gegeneinander verschoben.

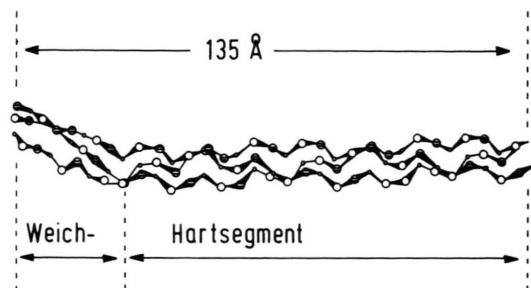


Abb. 3. Ein 135 Å langes Teilsegment von einer aus 3 Polypeptidketten helixartig zusammengesetzten Tripelhelix im verstreckten Zustand. Die in den Weichsegmenten sedimentierenden Einschlußstoffe erzeugen die 135 Å-Unterperiode der 670 Å-Langperiode.

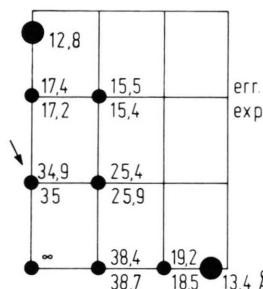


Abb. 4. Basisreflexe des Rattenschwanz-Kollagens. Die bei 13,4 und 12,8 Å liegenden Äquatorreflexe sind fast so diffus wie in einer Flüssigkeit und haben deshalb auch einen zu kleineren Streuwinkeln verlagerten Schwerpunkt.

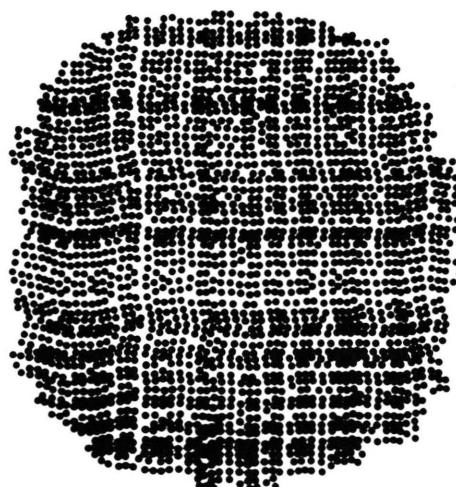


Abb. 5. Parakristalline Anordnung der Tripelhelices in den Oktafibrillen innerhalb eines Mikroparakristalls (grob schematisch).

670 Å gegenüber 4,4 verschoben, hat also die Ausgangsstellung wieder erreicht. Bei einem Umgang um die Oktafibrille hat man sich also $8 \times 670 \text{ Å}$ in Faserrichtung bewegt. Im Gegensatz zu den bekannten, auf klassischer Kristallographie aufgebauten „five stranded“ Kollagenmodellen [5] überlappen sich also die 2900 Å langen Einzelmoleküle um jeweils $2900 - 4 \times 670 = 220 \text{ Å}$, wie in Abb. 2 dargestellt. Nicht gezeichnet sind in Abb. 2 die harten und weichen Segmente. Pro Langperiode gibt es je fünf von ihnen, wobei ja $5 \times 135 = 670 \text{ Å}$ ist. Sie brauchen – das zeigen die weiter unten besprochenen Kleinwinkeldiagramme – keinesfalls alle genau gleich lang zu sein. 135 Å ist nur ihre mittlere Periode. Beispielsweise kann ein hartes Segment auch innerhalb einer 220 Å langen Überlappungszone liegen. Inwieweit eine fortgeschrittene Sequenzanalyse weitere Anhaltspunkte für die Lokalisierung der weichen Segmente liefern wird, ist abzuwarten.

III. Einlagerungsversuche

Präparation des nativen Kollagens

Als Substrat für die Einlagerungsversuche dienten Rattenschwanzsehnen bzw. deren Hauptbestandteil – das Kollagen. Die Sehnen wurden in geeigneter Weise aus dem sie umhüllenden Bindegewebe freipräpariert und bei 4 °C in Ringer-Lösung aufbewahrt. Die Behandlung und Durchstrahlung der Faser wurde in einer luftdicht verschließbaren Titan-Küvette* durchgeführt. Eine Klemmvorrichtung innerhalb der Küvette ermöglichte es, die Faser zu fixieren und bei Bedarf zu verstrecken. Die Strahlendurchtrittsöffnung der Küvette wurde mit einer 10 µm starken Hostafanfolie verschlossen. Zur Aufrechterhaltung des nativen Zustandes der Faser während der Aufnahme war es erforderlich, eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre im Innern der Küvette zu schaffen. Dazu wurden 2–3 ml der bei der Behandlung der Faser verwendeten wässrigen Lösung in die Küvette gegeben und diese hermetisch verschlossen.

Apparatives: Die Kleinwinkel-Röntgendiagramme wurden angefertigt mit Hilfe eines Rigaku-DrehanodenGenerators, der mit einer Leistung von 100 mA und 40 kV betrieben wurde. Die Kleinwinkelkamera war mit drei Blenden bestückt, von denen die erste in einer Blei-Lochblende am Röhrenfenster bestand. Die Blendenöffnung der 2. und 3. Blende betrug 0,2 bzw. 0,3 mm. Der Abstand Film:Präparat betrug 17 cm. Der Brennfleck auf der Anode hatte eine Größe von 0,5 × 10,0 mm².

Imprägnierung

Es wurden im Allgemeinen sowohl Versuchsreihen im verstreckten Zustand des Kollagens, als auch im unverstreckten Zustand durchgeführt. Jedoch waren während der Exposition alle Fasern leicht verstreckt.

Im einzelnen wurden – neben der Behandlung mit Phosphorwolframsäure – verschiedene Salze unterschiedlicher Heteropolarität und schließlich das schwerlösliche Kalziumphosphat-Hydroxylapatit als Einbaustoffe wie folgt eingesetzt:

1) PWS

Eine leicht verstreckte bzw. unverstreckte Faser wurde nach halbstündiger Fixierung in 4-prozen-

* Wir danken der Berliner Niederlassung der Krupp AG für die kostenlose Überlassung des für die Anfertigung der Klemmvorrichtung benötigten Materials „Trikutan“ sowie für den vorzülichen Kundendienst.

tigem Formaldehyd 1 h mit 1-prozentiger PWS-Lösung imprägniert. Diese Behandlungsmethode wurde von Nemetschek übernommen, der die Rolle des Formaldehyds bei dieser Behandlung als Komponente deutet, die für eine weniger intensive PWS-Kollagen-Reaktion sorgt. Einlagerungsversuche bei höherem pH-Wert (5,0 und 7,5) ließen eine Abnahme der typischen 38 Å-Linien bei steigendem pH-Wert erkennen.

2) $HgCl_2$

Die Fasern wurden einer einstündigen Behandlung mit 1-prozentiger $HgCl_2$ -Lösung (pH-Wert 6,0) unterzogen.

3) $UO_2(NO_3)_2/UO_2(CH_3COO)_2$

Als Reagenz dienten 1-prozentige Lösungen mit einem pH-Wert von 6,0. Die Einwirkzeit betrug eine Stunde. Die unterschiedliche Reaktivität des Nitrats bzw. Azetats in der Uranylverbindung im Hinblick auf den Einlagerungsmechanismus in die Kollagenstruktur in 135 Å-Bereiche ist signifikant: Das Nitrat wird, wie weiter unter röntgenographisch bewiesen wird, in ähnlicher Weise wie PWS und $HgCl_2$ eingebaut, das Azetat nicht merklich. Die Analyse dieser Reaktion vermag möglicherweise den Schlüssel zum Verständnis des chemischen Aspekts dieses Problemkreises zu liefern: Marx und Nitsche [6] beobachteten nämlich ähnliches bei der Komplexbildung der Uranylsalze mit Tributylphosphat:

Die Nitratgruppen erwiesen sich als relativ festgebunden, es erfolgte keine Dissoziation zu NO_3^- -Ionen, d. h. das Dissoziationsgleichgewicht lag stark auf der Seite des Komplexes. Der Komplex war stabil. Anders im Falle des Uranylazetats: Die Azetatgruppen reagierten z. T. zu undissoziierter Essigsäure CH_3COOH , folglich sinkt die Azetationenkonzentration in der Umgebung des Komplexes; das Gleichgewicht in der Flüssigkeit wird durch weiteres Abziehen von Azetatgruppen aus dem Uranylkomplex aufrecht erhalten. Der Komplex wird dadurch zerstört. Ähnlich sehen die Verhältnisse im Kollagen aus. Welche Peptidgruppen allerdings als Liganden zur Komplexbildung bevorzugt in Frage kommen, läßt sich noch nicht sagen. Wesentlich ist nur, daß sie sich in den Hohlräumen befinden, die das paramikristalline Gitter mit den 38,5 × 35 × 135 Å³ großen Gitterzellen aufbauen.

4) $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$

Die Faser wurde 1 h mit 1-prozentiger $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (pH-Wert 6,0) behandelt.

5) OsO_4

Die Faser wurde einer dreiminütigen Behandlung mit einer verdünnten (ca. 1-prozentigen) neutralen OsO_4 -Lösung unterzogen.

6) $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$

Bei der Kalziumphosphatfällung erfordern die einleitend genannten Nukleationsbedingungen besondere Kautelen, die hier ausführlich erläutert werden sollen:

Die Hydroxylapatit-Mineralisation der Kollagenfaser erfolgt nach der Methode der „balanced salt solution“ [7, 8], um die Modellvorstellungen an die Wirklichkeit der Biomineralisation möglichst anzunähern, durch Vereinigung folgender Lösungen:

<i>Ca-Lösung</i>	<i>Phosphat-Lösung</i>
2,659 g NaCl	2,659 g NaCl
0,201 g KCl	0,201 g KCl
0,5 g Glucose	0,5 g Glucose
2,978 g HEPES *	2,978 g HEPES *
0,197 g NaSO_4	0,790 g Na_2HPO_4
0,474 g CaCl_2	2,184 g NaHCO_3

Die angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf 500 ml. Beide Lösungen wurden mit 1-N-NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Dem Ansatz, der uns Abb. 11 lieferte, wurde außerdem NaF in einer Konzentration von 0,3 mM zugesetzt. NaF verbessert die Mineralisation. Beide Lösungen wurden „millipore“-gefiltert mit der Absicht, Kristallisationskeime aus der Lösung vorher abzuschneiden. Gleiche Volumina der beiden gefilterten Lösungen wurden nun zusammen mit der Kollagen-Faser in ein verschließbares Reaktionsgefäß eingebracht. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 37 °C. Diese Reaktionsbedingungen berücksichtigen das eigentümliche kristallchemische Verhalten der Kalziumphosphate. Die Untersuchung von Fällungsprodukten, hergestellt durch (tropfenweise langsames oder schnelles) Zusammengießen von Kalzium- und Phosphatlösung (oder umgekehrt) – mit oder ohne Rühren in der Kälte oder bei erhöhter Temperatur – zeigen, daß selten typische Kristallformen entstehen, sondern un-

geformte Produkte, die höchstens verschiedene relative Ausdehnungen in den drei Dimensionen zeigen. Da diese Fällungen jedoch das Debye-Scherrer-Diagramm (das für den strukturellen Aufbau maßgebend ist) des Hydroxylapatits ergeben, so kann als Konstitution die des Apatits zugrunde gelegt werden:



A, B: Ca oder isomorph vertretbare Ionen.

Vorwegzunehmen ist, daß die erwähnten Fällungsbedingungen also kaum geeignet sind, kristallisierte Produkte zu ergeben [9, 10].

Kristallisationen erfolgen stets in einem (in weiterem oder engerem Bereich) homogenen Medium, d. h. aus einer Lösung (Schmelze, Gasphase), die alle im Gitter des zu kristallisierenden Stoffes zu bindenden Ionen (Moleküle, Komplexe) in annähernd richtigem Mengenverhältnis enthält, durch Überschreitung des Löslichkeitsproduktes (Unterkühlung, Übersättigung durch Verdampfen, Zerstörung leicht löslicher Komplexe . . .) in einer relativ langsam Reaktion.

Fällungen sind Umsetzungen in einem Medium, das nicht alle Bestandteile des resultierenden schwerlöslichen Produktes enthält, durch Zusatz des fehlenden, wobei am Reaktionsort solche Konzentrationsverhältnisse herrschen, daß das Löslichkeitsprodukt örtlich weit überschritten wird; die Ausfällung ergibt als Momentreaktion ein amorphes Produkt, da die für die Einordnung und Anordnung der Ionen und Komplexe in die Gitterebene erforderliche Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung im Schichtgitter unterschritten ist und da durch die Schwerlöslichkeit die Zahl der Keime groß ist. Die Phänomene des Mitreißen bei der Ausfällung, Mitfällung und der Adsorption an den amorphen Teilchen seien nur angedeutet [7, 11]. Wenn man Kalziumphosphate unter nahezu physiologischen Konzentrationen präzipitiert, spielen somit einige grundlegende Probleme der Nukleation und der Nukleationsbeeinflussung (Begleitsubstanzen, Verunreinigungen) eine große Rolle [12, 13]: Wenn 1) die Löslichkeit des auszufällenden Stoffes, 2) die Ausfällungsgeschwindigkeit und 3) die Konzentration der Lösungen so beschaffen sind, daß in engeren Bereichen das Löslichkeitsprodukt nicht im Augenblick der Fällung überschritten wird, sondern die Überschreitung in einer von der Keimbildungsenergie bestimmten Zeitreaktion erfolgen kann, so kann in diesen Bereichen eine Ordnung

* HEPES: N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-aethansulfonsäure-Puffer.

der Ionen und Komplexe zum Kristallgitter erfolgen. Auch die spontane Umwandlung amorpher Fällungsprodukte (ACP) kann so zu Gitterordnungen führen [14, 15]. Im besonderen Falle der Phosphate gilt, daß in reinen Kalziumphosphatlösungen bei den Gleichgewichtsbedingungen des physiologischen Milieus die Oktakalziumphosphatstruktur ($\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, OCP) stabil wäre, und die Apatitstruktur HA nur in Gegenwart von Nebenbestandteilen (Carbonat, Fluorid) entsteht [1, 16]. Bei der Ausfällung von Kalziumphosphaten in neutralem und basischem Medium sind diese Voraussetzungen normalerweise nicht gegeben, es erfolgt eben eine amorphe Ausfällung [17].

Unsere ersten Experimente, Apatiteinlagerungen an das Mikrogefüge des Kollagens durch spontan gebildete Kristalle, z. B. durch Ausfällung aus einer „balanced salt solution“ zu erzielen, führten daher nicht zum Ziel. Ein Nukleationseffekt wurde erst durch Zusatz von Fluorid-Ionen zur Lösung der „balanced salt solution“-Zusammensetzung erzielt (0,01–0,3 mM) [7, 18]. Der Reaktionsmechanismus des Fluorids bei der Apatitnukleation wird unter kristallchemischen Aspekten durch die Blockierung der lamellaren Gefügeentwicklung des Oktakalziumphosphats interpretiert (Markierung der columnsites im Kristallgitter durch F), und unter kinetischen Aspekten durch die bedeutende Erhöhung der Kristallisationsgeschwindigkeit des Kalziumphosphat-Niederschlages [19, 20].

IV. Analyse der Kleinwinkelstreuung von Einbau-Kollagen

Allgemeines

Es ist hier nicht Raum genug, die Grundlage der Theorie des Parakristalls in Einzelheiten darzulegen. Hier sei auf die vorhandene Literatur hingewiesen [2, 4, 21–23]. Die Sachlage lässt sich kurorisch in folgender Weise beschreiben:

Aus der Gestalt der bei 13 Å liegenden Äquatorreflexe in Abb. 1 kann man errechnen, daß die in Abb. 5 angedeuteten statistischen Abstandsschwankungen Δd benachbarter Tripelhelices

$$\Delta d = (\bar{d}^2 - \bar{d}^2)^{1/2}; \quad g = \Delta d / \bar{d}. \quad (1)$$

Größen von $g = 8\%$ und mehr erreichen, wie man sie auch aus Schmelzen schon gemessen hat. Die Breite der Überstrukturreflexe mit den Gitterkon-

stanten $a = 38,4 \text{ \AA}$ und $b = 34,9 \text{ \AA}$ lassen weiterhin erkennen, daß die laterale Ausdehnung der Oktafibrillenpakete mindestens über 5 Übergitterzellen läuft, also 200 Å oder mehr beträgt. Die Langperiode von 670 Å dagegen läßt noch Reflexe der 10. Ordnung und mehr erkennen, woraus folgt, daß die Parakristalle in Faserrichtung Ausdehnungen größer als 6000 Å haben mit relativen statistischen Fluktuationen der 670 Å Periode $g < 3\%$. Diese weit ausgedehnte Überstruktur setzt sich nun aus Mikroparakristallen zusammen, gebildet von Weich- und Hartsegmenten, die man erst bei Einbauverbindungen, nicht also aus Abb. 1 erkennen kann [4]. Wir behandeln nun gesondert den Einbau im verstreckten und unverstreckten Zustand.

Einbau im verstreckten Zustand

In den Abbns. 6a, 7a, 8, 9, 10 und 11a sind Phosphorwolframsäure (PWS) bzw. HgCl_2 bzw. $(\text{UO}_2)\text{-}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, OsO_4 und Hydroxylapatit in um 4% verstrecktes Kollagen nach dem in Abschnitt III erläuterten Verfahren eingebaut worden. In all die-

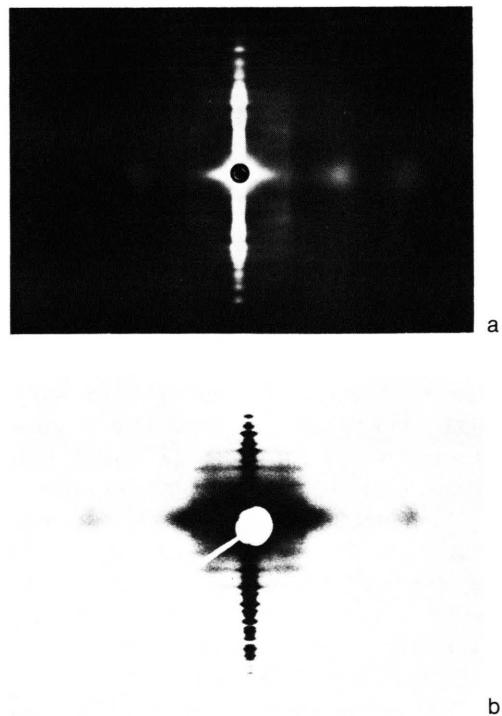


Abb. 6. Rattenschwanz-Kollagen mit PWS-Lösung behandelt. a) in gedehntem Zustand; b) in ungedehntem Zustand.

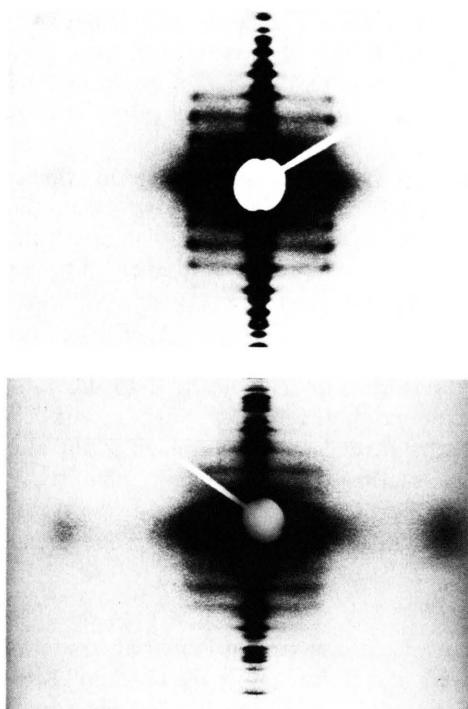


Abb. 7. Rattenschwanz-Kollagen mit HgCl_2 -Lösung behandelt. a) in gedehntem Zustand; b) in ungedehntem Zustand.

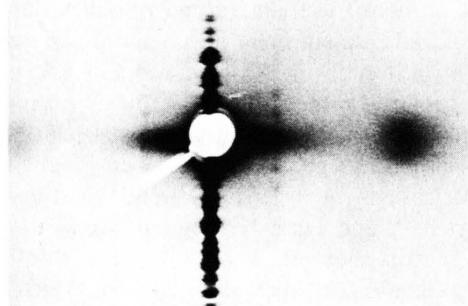


Abb. 8. Rattenschwanz-Kollagen in gedehntem Zustand mit Uranylnitrat-Lösung behandelt.

sen Fällen beobachtet man dasselbe Bild: Es treten parallel zum Meridian oberhalb des innersten Äquatorreflexes äquidistante Punktreihen auf mit einem mittleren Abstand von 135 Å, was einem Fünftel der 670 Å-Periode entspricht. Wie man aus Abb. 4 entnimmt, hat dieses Gitter also Kanten von 38,5 Å, 35 Å und 135 Å Länge. Nach dem oben Gesagten haben sich die Einschlußpartikel in den Kanälen der Oktafibrillen immer nur dort eingelagert, wo gerade

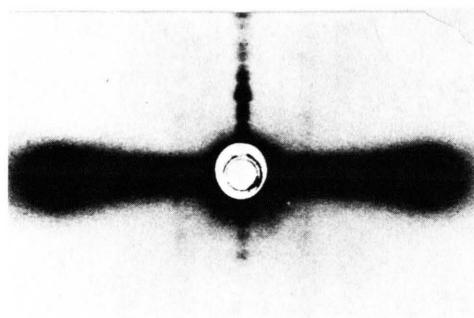


Abb. 9. Rattenschwanz-Kollagen in gedehntem Zustand mit Kobaltnitrat-Lösung behandelt.

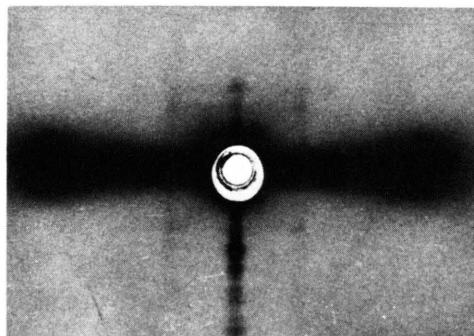


Abb. 10. Rattenschwanz-Kollagen in gedehntem Zustand mit Osmiumoxyd-Lösung behandelt.

Weichsegmente sind, wo sie also lateral von außen eindringen können [2]. Dieses Lochgitter ist von beachtlicher Regelmäßigkeit. Aus der Schärfe der Reflexe kann man schließen, daß es sich in allen drei Dimensionen um 400 Å oder mehr ausgedehnt hat. Deshalb treten manchmal auch nicht nur die Reflexe 101 bzw. 011 auf, sondern bei PWS-Einlagerung in gedehnter Faser – wenngleich auch sehr diffus – die Reflexe 111 (Abb. 6a). Interessant ist ferner, daß in diesem einzigen bisher beobachteten Fall auch der 19 Å-Reflex (110) auf dem Äquator außerordentlich stark ist. Das spricht für das Auftreten einer Elementarzelle von $19 \times 19 \text{ \AA}^2$, wie sie von Ripamonti [24] im Fall des mit $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Cl}$ behandelten Kollagens vorgeschlagen wurde. Sie verträgt sich ohne weiteres mit dem Oktafibrillenmodell. Man braucht dazu lediglich in Abb. 2 oben die Tripelhelixzwillinge 1,2 um 45° nach links, die Paare 3,4 um 45° nach rechts zu drehen. Dies ist im schematischen Bild 12 dadurch angedeutet, daß in den Hartsegmenten jeweils nur die beiden hintereinander liegenden Zwillingspaare angedeutet sind, währenddem in

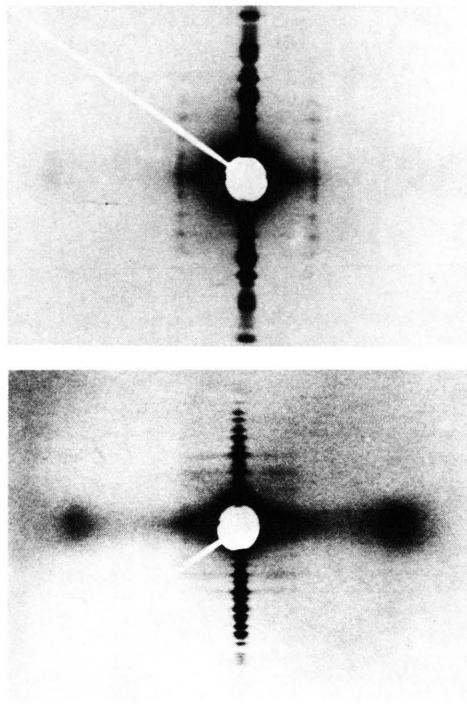


Abb. 11. Rattenschwanz-Kollagen mit eingeschlossenem Hydroxylapatit. a) gedeihnt behandelt; b) ungedehnt behandelt.

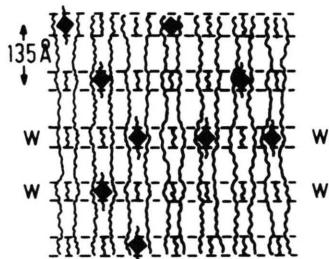


Abb. 12. Statistisch in den Weichsegmentabschnitten W der Oktafibrillen im gedeihnten Zustand eingebaute Einschluß-Komplexe.

den Weichsegmenten eine Oktafibrillenprojektion in Richtung B angedeutet ist (vgl. Abb. 2). Im parakristallinen Kollagenmodell sind aufgrund der aus dem Röntgendiagramm ersichtlichen großen Störungen entsprechend der Theorie des Parakristalls [22] derartige Varianzen leicht in Oktafibrillen einzubauen, ohne damit Wesentliches über die Strukturaussagen zu ändern. Warum nur im mit PWS behandelten verstreckten Kollagen derartige Umstrukturierungen erfolgen, bleibt allerdings noch eine offene Frage.

Beachtlich ist ferner ein diffuser Untergrund zwischen den beiden Punktreihen rechts und links vom Meridian. M. v. Laue [25] hat als erster diskutiert, was geschieht, wenn sich zwei verschiedene Atomsorten rein statistisch auf den Gitterplätzen eines Kristalls verteilen. Die Reflexe sind dann proportional zum Quadrat des Mittelwertes der Atomformamplitude f einer Atomsorte, also proportional zu \bar{f}^2 , und es tritt allseitig im reziproken Raum ein diffuser Untergrund proportional zu

$$\Delta^2 f = \bar{f}^2 - \bar{f}^2 \quad (2)$$

auf. Die Atomsorten sind in diesem Fall die Einschlußpartikel und die Leerstellen. Sind sie wirklich rein statistisch mit der Zahlenhäufigkeit α auf alle verfügbaren Oktafibrillenlöcher verteilt, dann ist die Intensität der Eckpunkte der Streifen proportional zu $\alpha \bar{f}^2$ und der diffuse Untergrund ist proportional zu

$$\alpha(1-\alpha)\bar{f}^2 + \alpha^2(\bar{f}^2 - \bar{f}^2) = \alpha(\bar{f}^2 - \alpha\bar{f}^2). \quad (3)$$

Er nimmt außerhalb der beiden Punktreihen merklich ab, weil die Einschlußpartikel schon Ausdehnungen erreicht haben, die die Röhrchen auseinander drücken. Dieses Phänomen beobachtet man besonders deutlich bei Uranylnitrat (Abb. 8) und Apatit (Abb. 11a), währenddem bei PWS nur angedeutet (Abb. 6a), bei $HgCl_2$ aber besonders ausgeprägt dieser diffuse Untergrund zwischen den beiden Punktreihen nicht mehr gleichmäßig verteilt ist, sondern in Streifen im Abstand von 135 Å verläuft. Die Erklärung ist einfach gegeben: Die Einschlußpartikel sind nach wie vor rein statistisch längs eines Weichsegments gegeben, sind aber in allen anderen Weichsegmenten genau dieselben. Mit anderen Worten: Wenn einmal in einem Kanal das Material eingedrungen ist, verteilt es sich sofort längs dieser Oktafibrillen auch in die anderen Weichsegmente. Das entspricht elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Höhling [26] an der Truthahnsehne, wo parallel zur Faserachse Nadelchen sichtbar werden, die etwa 500 Å lang sind, also vier kohärente streuenden Hartsegmenten entsprechen, die jeweils ein Lochgitter aufbauen. Auf die Größe dieser Gitter hatten wir schon oben aus der Ausdehnung der Reflexe der beiden Punktreihen geschlossen. Sie begegnet uns hier wieder, wenn wir die Breite der Streifen zwischen den beiden Endpunkten betrachten. Wir nennen diese Bereiche „Mikroparakristalle“. Die Breite der Streifen in Faserrichtung verrät also, daß jeder Mikroparakristall etwa vier Hart-

segmente enthält, die kohärent miteinander streuen. Das legt nahe, daß das fünfte Weichsegment eine beachtliche Dickenstreuung hat und so die Kohärenz von Viererpackung zu Viererpackung vernichtet. Die Abstandsstatistik der Weichsegmente über den in Faserrichtung 6000 Å langen Parakristallen ist also „bimodal“, wie das auch bei Cerebrosiden schon beobachtet wurde [27]. Es liegt nahe (ist aber nicht bewiesen), daß dieser fünfte, etwas unregelmäßige Weichsegmentenabschnitt in der Überlappungszone benachbarter 2900 Å langer Moleküle liegt (Abb. 2).

Einbau im unverstreckten Zustand

In allen Fällen treten jetzt die 135 Å-Streifen auf. Offensichtlich sind jetzt die Kanäle der Oktafibrillen nicht mehr so wie beim Verspannen in den Weichsegmenten beengt, so daß das Einschlußmaterial, wenn es einmal in irgendeine Oktafibrille von der Seite durch das Weichsegment eingedrungen ist, schnell durch die Hartsegmente auch in die benachbarten Löcher eintreten kann. Ein weiteres interessantes Phänomen tritt auf – gleichgültig, welches der Einbaustoff ist: Sowohl bei PWS (Abb. 6b), als auch bei HgCl_2 (Abb. 7b) und Apatit (Abb. 11b), verschwinden die Eckpunkte, die Streifen verlieren ihre gleichförmige Schwärzung und haben eine maximale Intensität bei etwa der Hälfte des Punktabstandes vom Meridian. Auch hier ist die Antwort leicht zu geben: Wenn sich die Einbaumotive nicht wie oben rein statistisch auf alle Oktafibrillenkanäle innerhalb eines Weichsegments verteilen, sondern ihr Abstand $n a$ und ihre statistische Häufigkeit α_n ist, dann besteht also die Häufigkeitsverteilung

$$H(x) = \sum_{n=1}^{\infty} \alpha_n P(x - n a); \quad \sum_{n=1}^{\infty} \alpha_n = 1. \quad (4)$$

$P(x - n a)$ ist eine Punktfunktion am Orte $x = n a$. Die Theorie des Parakristalls lehrt, daß dann im eindimensionalen Fall die Intensität auf einem Streifen gegeben ist durch

$$I(b) = \frac{1 - |F|^2}{(1 - |F|)^2 + 4 F \sin^2 \bar{n} a b}; \quad b = 2 \sin \delta / \lambda \quad (5)$$

$$F(b) = \mathfrak{F} H(x - \bar{n} a); \quad \bar{n} = \sum_{n=1}^{\infty} n \alpha_n. \quad (6)$$

2δ ist der Streuwinkel quer zum Meridian, λ die Wellenlänge und $F(b)$ die Fouriertransformierte ($\mathfrak{F} = \int e^{-2\pi i b x} dx$) von $H(x)$. Der auf dem Streifen

auftretende Reflex hat sein Maximum etwa bei $b = 1/\bar{n} a$ und eine integrale Breite

$$\delta b = \frac{\sqrt{2 \pi}}{\bar{n} a} (\pi g)^2; \quad g^2 = (n^2 - \bar{n}^2)/\bar{n}^2. \quad (7)$$

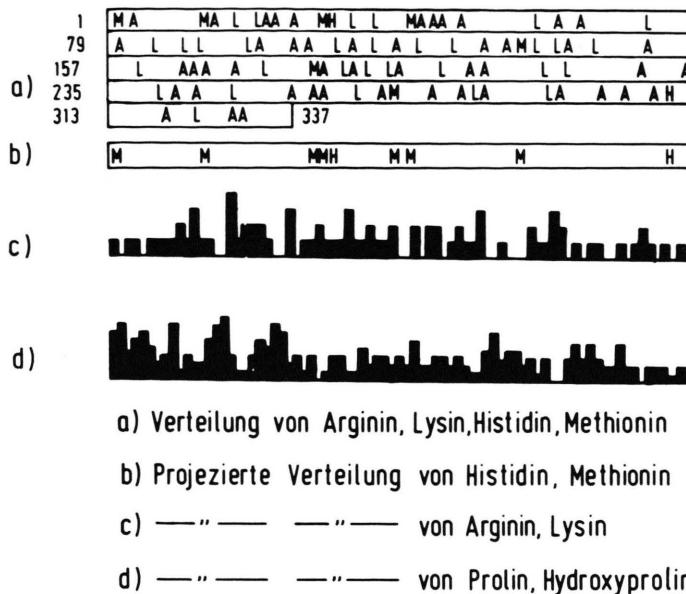
Sie hat bei den genannten Aufnahmen etwa den Wert $1/\bar{n} a$. Hieraus folgt $g \sim 20\%$ und $\bar{n} \sim 2,0$. Die folgende Statistik befriedigt z. B. diese Größen

$$\begin{aligned} \alpha_1 &= 1/12; \quad \alpha_2 = 10/12; \quad \alpha_3 = 1/12, \\ \bar{n} &= 1/12 (1 + 2 \times 10 + 3) = 2 \\ n^2 &= 1/12 (1 + 4 \times 10 + 9) = 50/12 \\ n^2 - \bar{n}^2 &= 2/12; \quad g^2 = 1/24; \quad g \cong 1/5 = 0,2. \end{aligned}$$

Die physikalische Erklärung für solch eine Abstandsstatistik zwischen besetzten Oktafibrillen ist leicht gegeben: Im ungespannten Zustand dringen die Ionen leichter durch die nur locker gepackten Seitenwände der Oktafibrillen ins Innere der Weichsegmente ein. Sobald eine solche Oktafibrille okkupiert ist, beginnt der Kristallisationsprozeß, wodurch sich die Dicke der Oktafibrille vergrößert und die Nachbarkanäle verengt. Die Wahrscheinlichkeit, daß dort über Keimbildung eine Bausteinvergrößerung einsetzen kann, ist dann auf $\alpha_1 = 1/2$ verringert. Nur bei gleichzeitiger Erzielung der kritischen Keimgröße in benachbarten Oktafibrillen sind dann beide besetzt, und hierfür ist die Wahrscheinlichkeit eben nur 8%. Im allgemeinen wird in den hier untersuchten Fällen im Schnitt nur jede vierte Oktafibrille zum Kristallisationszentrum eines Einbaustoffes.

V. Schlußfolgerungen

Die oben diskutierten Röntgenkleinwinkeldiagramme der auf verschiedene Art behandelten Kollagenfasern liefern einen weiteren Beweis für die Leistungsfähigkeit des parakristallinen Oktafibrillenmodells, das die verschiedenenartigen Vorgänge beim Einbau von Fremdkomplexen auf einfache Weise zu erklären vermag. Das Bindungsverhalten der hier untersuchten chemisch ziemlich unterschiedlichen Einschlußpartikel spielt offensichtlich nur eine untergeordnete Rolle bei der Art, wie sie sich durch die weichen Segmente eintretend auf die zur Verfügung stehenden Hohlräumen verteilen. Allen gemeinsam ist, daß ihre elektrolytische Dissoziationsstendenz intramolekular abgesättigt ist und sie im wesentlichen nach außen neutral wirken und nicht wie das Urynyacetat durch Abspalten von Essigsäure unfähig werden zur Komplexbildung mit der Kollagenumgebung. Hierbei kommt es offensichtlich darauf an,



daß die Komplexbildungskonstante p_K der Liganden, also des Kollagens, genügend klein ist. Eine Strukturspezifität einzelner Peptidgruppierungen des Kollagens kann keine Rolle spielen. Die Sequenzanalyse verrät nämlich, wie in Abb. 13 dargestellt, in keiner Weise eine 135 Å-Periodizität, ob es sich nun um die Häufigkeitsverteilung von Arginin, Lysin, Histidin und Methionin (Abb. 13a) oder nur von Histidin und Methionin (Abb. 13b) oder um die von Arginin und Lysin (Abb. 13c) oder die von Prolin und Hydroxyprolin (Abb. 13d) handelt. Es nimmt daher auch nicht Wunder, daß die in der Einleitung erwähnten epitaktischen Vorstellungen, die insofern auf unzureichenden metrischen Voraussetzungen beruhen, bezüglich der Kalzifikation von Kollagen zu keinem befriedigenden Ergebnis führten.

Wenngleich aus diesen Ergebnissen noch kein zusammenfassender Aspekt zur biogenen Kalzifikation kollagener Fasern möglich ist, können doch Analogien unserer Ergebnisse und der wichtigsten Theorien über die Einlagerung von Mineralkeimen in die initialen Kalzifikationsphasen aufgezeigt werden. Der Nukleationsschritt selbst – der bei unseren Experimenten in der Überschreitung der Aktivierungsenergie der „balanced salt solution“ gegeben ist – muß hierbei unberührt bleiben; unsere Ergebnisse tragen vielmehr zu den unter strukturellen Aspekten der Kollagenmineralisation besonders interessanten sog. „zweiten Phase“ bei, nämlich des Heraustretens

der Mineralsubstanz aus dem diese akkumulierenden Vesikel und ihr Einfleßen in die Kollagenfasern. Es ist dies jene Phase, in der Höhling [28] die ersten Mineraldeposits nicht mehr bloß mit den Vesikeln assoziiert sieht, sondern – ohne signifikante zeitliche Differenzierung – in Grundsubstanz (Urgel) und Kollagen findet, und zwar hier zunächst als punktförmige Nuklei, ursprünglich aus und im Kollagen gebildet, dann entlang der Fasern orientiert und verschmolzen bzw. weiter kristallisiert, bis sich im Elektronenmikroskop Nadelchen zeigen. Die im unverstreckten Zustand röntgenographisch beobachtete Füllung einzelner Oktafibrillen mit der Einschlußverbindung hat hier also ihr Endstadium erreicht. Die experimentellen Befunde unserer Arbeit zeigen, daß die Probleme in starker Weise sterisch bestimmt sind, und, um Worte von Wheeler zu gebrauchen, nur durch den parakristallinen Zustand der Kollagenfasern verständlich werden, der die nötigen Freiheitsgrade gewährt für das Zustandekommen biologischer Vorgänge: „Having more disordered arrangements than exist in the crystalline state, paracrystalline materials are more reactive, so that with a structure of this type, bone apatite will more readily be able to fulfil its biological role of calcium control“ [29]. Die parakristalline Struktur des Knochenapatits ist offensichtlich die notwendige Folge seines Entstehens in dem parakristallinen Milieu des Kollagens bzw. β -Keratins [30].

- [1] H. Newesely, Coll. Intern. du C. N. R. S., No **230**, 203 (1975).
- [2] R. Hosemann, R. Bonart u. Th. Nemetschek, Colloid and Polymer Sci. **252**, 912 (1974).
- [3] A. Weiß, A. Mehler u. U. Hofmann, Z. Naturforsch. **11 b**, 431 (1956).
- [4] Th. Nemetschek u. R. Hosemann, Koll. Z. u. Z. Polym. **251**, 1044 (1973).
- [5] A. Miller u. J. S. Wray, Nature **230**, 437 (1971).
- [6] G. Marx u. H. Nitsche, Z. Naturforsch. **32 a**, 187 (1977), u. **33 a**, 251 (1978).
- [7] H. Newesely, Fortsch. chem. Forsch. **5**, 688 (1966).
- [8] J. D. Termine u. E. D. Eanes, Calc. Tiss. Res. **15**, 81 (1974).
- [9] H. Newesely, Z. Biominerisation (Fortschr. Ber. Akademie d. Wissenschaft., Mainz, mathem.-naturwiss. Kl.) **2**, 38 (1970).
- [10] M. Boulet u. J. R. Marier, Arch. Biochem. Biophys. **93**, 157 (1961).
- [11] C. Guegan, Contribution à l'étude cinétique de l'évolution de l'état amorphe à l'état apatitique des orthophosphates trimétalliques (Ca,Mg) précipites. Thèse, Toulouse 1978.
- [12] E. Hayek, H. Newesely, W. Hassenteufel u. B. Krismer, Monatsh. f. Chemie **91**, 249 (1960).
- [13] G. H. Nancollas u. J. S. Wefel, J. Dent. Res. **55**, 617 (1976).
- [14] E. D. Eanes u. J. L. Meyer, Min. Tiss. Res. Communic. **3**, 5 (1977).
- [15] J. C. Heughebaert, Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipites amorphes en orthophosphates apatitiques. Thèse, Toulouse 1978.
- [16] H. Newesely, Mechanisms and Action of Trace Elements in the Mineralization of Hard Tissues, pp. 104, Nyon 1972, 2. Aufl., Tokyo 1975.
- [17] E. D. Eanes u. J. L. Meyer, Calc. Tiss. Res. **23**, 259 (1977).
- [18] T. Aoba u. Y. Moriwaki, J. Dent. Res. **56**, 698 (1977).
- [19] H. Newesely, Monatsh. Chemie **91**, 1020 (1960), und **95**, 94 (1963).
- [20] Th. Rothe, W. Rathje u. H. Newesely, Min. Tiss. Res. Communic. **2**, 13 (1976).
- [21] R. Hosemann, Z. Physik **128**, 1, 465 (1950).
- [22] R. Hosemann u. S. N. Bagchi, Direct Analysis of Diffraction by Matter, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1962.
- [23] R. Hosemann, W. Dreißig u. Th. Nemetschek, J. Mol. Biol. **83**, 275 (1974).
- [24] A. Ripamonti, im Druck.
- [25] M. v. Laue, Röntgenstrahl-Interferenzen, 3. Aufl., Akademische Verlagsges. Frankfurt am Main 1960.
- [26] H. J. Höhling, B. A. Ashton u. H. D. Köster, Cell. Tiss. Res. **148**, 11 (1974).
- [27] S. Fernandez-Bermudez, J. Loboda-Čačković, H. Čačković u. R. Hosemann, Z. Naturforsch. **32 c**, 362 (1977).
- [28] H. J. Höhling, H. Steffens, B. A. Ashton u. A. P. Nicholson, Verh. Dtsch. Ges. Pathol. **58**, 54 (1974).
- [29] E. J. Wheeler u. D. Lewis, Calc. Tiss. Res. **24**, 243 (1977).
- [30] S. Lees, Calc. Tiss. Intl. **27**, 53 (1979).