

Untersuchungen der Hydratation von Collagen Sorptionsmessungen und Röntgenweitwinkeldiffraktion an Tropocollagen

Von MADELEINE LÜSCHER*, R. GIOVANOLI und P. HIRTER

Institut für organische Chemie und Institut für anorganische, analytische und physikalische Chemie der Universität Bern

Professor Rudolf Signer zum 70. Geburtstag gewidmet

Summary

The amount of structurally sorbed water was determined for calf skin collagen by wide angle X-ray diffraction under defined water vapour pressures and by sorption measurements.

- The intensity of the helical 2,8 Å meridional reflex increases in a sigmoid curve up to a water content of 260 ± 40 mg H₂O/g dry protein. Sorption of water in helical structures is completed at this water content, while the interfibrillar sorption continues up to 1,2 g H₂O/g dry protein (*d* values of the 10,6 Å equatorial reflex).
- Heat denaturation was found to decrease the water sorption capacity of tropocollagen. This finding points to a structure dependent water uptake.

Structural and kinetic data seem to indicate a two step sorption mechanism.

1. Einleitung

Zahlreiche Untersuchungen, die in den letzten Jahren an Collagen und synthetischen Polypeptiden der Collagen-gruppe ausgeführt wurden, erbringen Evidenz für die Theorie, daß Wasser ein nicht unbedeutender Faktor für die Bildung und Stabilisierung der nativen Collagenstruktur sei.

- HARRINGTON und v. HIPPEL¹ sowie TRAUB und PIEZ² geben ausführliche Übersicht über diesen Problemkreis.
- Im folgenden seien nur kurz diejenigen Arbeiten erwähnt, die sich mit einer detaillierteren Untersuchung der Primärhydratation des Collagens befaßten:

Bereits 1944 nahm BULL³ Sorptionsisothermen von Collagen und andern Proteinen auf. – ROUCVIE und BEAR⁴ wandten dann vor allem die Methode der Kleinwinkelröntgendiffraktion an zur Abklärung des Einflusses der Hydratation auf die Collagenstruktur. – ESIPOVA *et al.*⁵ befaßten sich mit demselben Problem unter Anwendung der Röntgenweitwinkeldiffraktion und Sorptionsmessungen. Diese Autoren untersuchten absolute und relative Intensitätsänderungen der charakteristischen Collagenreflexe. Ohne direkte Bezugnahme auf die Collagenstruktur folgerten sie aus ihren Daten, daß die Wassermolekel sich in gegenseitigen Abständen von je 3 Å kettenförmig – im Abstand von etwa 3 Å – entlang der zentralen Helixachse einlagern.

1968 schlugen RAMACHANDRAN *et al.*⁶ ein Collagen-II-Strukturmodell vor mit zwei intercatenaren HOH-Brücken pro Tripeptideinheit im Abstand von 3 Å.

Über NMR-Untersuchungen der Wasserbindung an Collagen geben LALOWICZ *et al.*⁷ eine kritische Übersicht. SUSI *et al.*⁸ untersuchten die Collagenhydratation mit IR-Spektroskopie, HALY und SNAITH⁹ mit kalorimetrischen Messungen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Menge des primären Hydratwassers zu ermitteln sowie Hinweise auf den Mechanismus des Wassereinbaues zu erbringen.

* Autorin, an die Anfragen zu richten sind. Adresse: Institut für organische Chemie, Postfach 89, CH-3000 Bern 9.

2. Experimentelles

2.1. Material

- Für die Untersuchungen an nativem Tropocollagen wurde ein citratpufferlösliches Präparat verwendet, welches aus frischer Kalbshaut nach der von REICH¹⁰ angegebenen Vorschrift hergestellt wurde. Diese Tropocollagenpräparate weisen einheitliches Molekulargewicht und guten Reinheitsgrad auf¹¹.
- Für die Röntgenaufnahmen wurde das frisch ausgefällte Tropocollagen mit Pinzetten zu Faserbündeln gestreckt und bei + 1° luftgetrocknet.
- Denaturiertes Tropocollagen wurde durch 20minütiges Erhitzen der wäßrigen Suspension bei 80 bis 90°C und anschließend sofortiges Einfrieren und Lyophilisieren hergestellt.
- Ferner gelangte ein käufliches Collagenpräparat (Rinder-Achillessehnen-Collagen/Schuchardt) zur Anwendung für Sorptionsmessungen. Dieses Material ist citratpufferunlöslich (Quervernetzungen).

2.2. Debye-Guinier-Weitwinkeldiffraktionsmessungen

Es wurde eine fokussierende Guinier-Nonius-Kamera nach DE WOLFF¹² mit Quarzmonochromator und $\text{CuK}\alpha_{1,2}$ -Strahlung verwendet. Ein geschlossener Luftkreislauf versorgte das Kameragehäuse mit Luft definierter Feuchte und Temperatur (25°). - Bei vertikalem Einspannen der Faser in den Präparatehalter dieser Kamera werden Äquatorreflexe abgebildet, bei horizontalem Einspannen Meridianreflexe, eine ausgesprochene Fasertextur vorausgesetzt.

Alle Röntgenfilme wurden unter den gleichen Bedingungen entwickelt und auf einem DD2-Densitometer von Kipp & Söhne densitometriert. Zwei Reflexe waren auswertbar: einer bei etwa 2,8 Å, der andere bei etwa 12 Å. Der erste, ein Meridianreflex, diente zur Intensitätsmessung durch Planimetrieren; vom zweiten, einem Äquatorreflex, wurde die Lage bestimmt.

2.3. Sorptionsmessungen

Die Sorptionsisothermen wurden mit Hilfe einer von SIGNER, GÁL und BOLLIGER entwickelten, vollautomatischen Sorptionsapparatur aufgenommen. Für eine eingehende Beschreibung dieser Apparatur und der Meßtechnik sei verwiesen auf BOLLIGER, GÁL, SIGNER¹³.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Guinier-Weitwinkelröntgenbeugung

In Abb. 1 sind als Maß für die Intensität des helicalen 2,8-Å-Meridianreflexes* die Reflexflächen in Funktion des Wassergehaltes (WG)** aufgetragen.

Die Zunahme der Intensität des 2,8-Å-Meridianreflexes bei zunehmender Befeuchtung ist bekannt (ESIPOVA^{5a}). Der Verlauf der Intensitätsänderung dieses Reflexes wurde nun von uns systematisch in einem Sorptions/Desorptions-Zyklus zwischen $p/p_0 = 0$ bis 0,80 untersucht.

- Die absoluten Meßdaten für die Reflexflächen von drei Untersuchungsreihen unterscheiden sich um einen -

* Für die Zuordnung der Weitwinkelröntgenreflexe zur Collagenstruktur sei verwiesen auf RAMACHANDRAN¹⁴.

** WG = mg H₂O/g Trockenprotein.

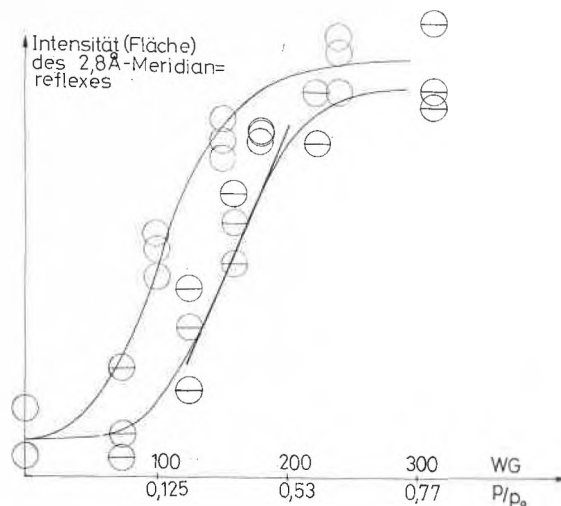


Abb. 1. Ordnung des Procollagens in Funktion des Wassergehalts. Abszisse: Wassergehalt (WG) in mg Wasser pro g Trockensubstanz. Unter diesen linearen Maßstab sind drei Werte für p/p_0 eingetragen. Diese Funktion verläuft auf der Abszisse jedoch nicht linear. Ordinate: Reflexintensität in willkürlichen Einheiten

für jede Meßreihe konstanten - Betrag, da die Collagenproben in Menge und Ordnungsgrad voneinander verschieden sind. Durch Verschieben längs der Ordinate können die Punkte innerhalb einer gewissen Fehlerbreite zur Deckung gebracht werden.

- Trotz möglicher Standardisierung der Aufnahme- und Auswertungsbedingungen verbleiben verschiedene, nicht kontrollierbare Fehlerquellen. Der relative Fehler der Reflexintensität am oberen Ende der Ordinate in Abb. 1 beträgt $\pm 10\%$.
- Innerhalb dieses recht großen Meßfehlers läßt sich jedoch aus Abb. 1 ablesen, daß die Intensität des 2,8-Å-Reflexes von 0 bis 60 mg H₂O/g Prot. ($p/p_0 = 0$ bis 0,10) konstant und praktisch gleich Null ist, zwischen 60 und 220 mg H₂O/g Prot. ansteigt und bei einem WG von 220 bis 300 mg H₂O/g Prot. (Mittel 260 ± 40 mg), (bzw. $p/p_0 = 0,58$ bis 0,74; Mittel $\pm 0,66$) innerhalb des Meßfehlers wieder konstant wird.

¹ W. HARRINGTON und H. P. v. HIPPEL, *Adv. Prot. Chem.* 16 (1961) 1.

² W. TRAUB und A. PIEZ, *Adv. Prot. Chem.* 25 (1971) 320 f.

³ H. B. BULL, *J. Amer. Chem. Soc.* 66 (1944) 1499.

⁴ M. A. ROUCVIE und R. S. BEAR, *J. Amer. Chem. Leather Assoc.* 48 (1953) 735.

⁵ a) N. G. ESIPOVA, N. S. ANDREEVA und T. V. GATOVSKAJA, *Biophysika* 3 (1958) 505. b) N. G. ESIPOVA und YU. N. CHIRGADZE, *Water in Biological Systems*, ed. L. P. KAYUSHIN, New York 1969.

⁶ G. N. RAMACHANDRAN und R. CHANDRASEKHARAN, *Biopolymers* 6 (1968) 1649.

⁷ Z. F. LALOWICZ und M. REMIN, *Inst. Med. Phys. Cracov* 75 (1971) 85.

⁸ H. SUSI, J. S. ARNDT und J. R. CARROLL, *Biopolymers* 10 (1971) 1597.

⁹ A. R. HALY und J. W. SNAITH, *Biopolymers* 10 (1971) 1681.

¹⁰ G. REICH, *Kollagen*, Verlag Steinkopff, Dresden 1966.

¹¹ K. RIEDER, Lizentiatsarbeit, Bern 1971.

¹² P. M. DE WOLFF, *Acta Crystallogr.* 1 (1948) 207.

¹³ W. BOLLIGER, S. GÁL und R. SIGNER, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 2659.

– Bei Durchlaufen eines Sorptions/Desorptions-Zyklus tritt Hysterese im helicalen Ordnungsgrad auf: bei Desorption ist die Reflexintensität für gleiche WG-Werte durchwegs größer als bei Sorption*.

Bei Desorption geht die Gitterordnung stellenweise verloren, ohne daß das Reflexprofil breiter wird: die umgebenden Bereiche beugen durchaus noch in Phase. Der dazwischenliegende, weniger gut geordnete Bereich wird jedoch Anlaß zur Untergrundschwärzung geben. In der Tat nimmt die Untergrundschwärzung der Collagenaufnahmen im oberen Teil der Desorptionskurve stark zu, während die Intensität des 2,8-Å-Reflexes sich nur wenig verändert**.

Damit drängt sich eine Möglichkeit auf, die Hystereschleife mit realen Strukturänderungen zu deuten. Die ungeordnete Collagenfaser besteht aus zahlreichen, nicht kohärent beugenden, sehr kleinen Bezirken mit Nahordnung. Sie erscheint demnach «röntgenamorph». Im gleichen Maße, wie sie Wasser aufnimmt, werden von einem bestimmten Schwellenwert an die geordneten (kohärent beugenden) Bezirke größer.

Umgekehrt kann aus der optimal mit Wasser gesättigten Collagenfaser ein Teil des Wassers abgegeben

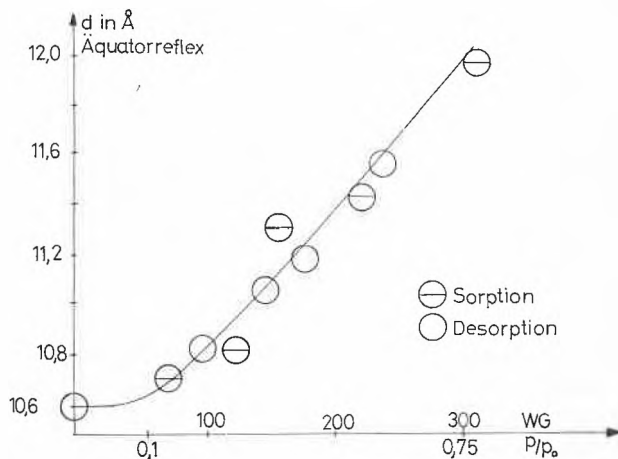


Abb. 2. Lage des 10,6-Ångström-Äquatorreflexes in Funktion des Wassergehalts. Abszisse: Wassergehalt (WG) wie in Abb. 1. Darunter sind zu Vergleichszwecken zwei Werte von p/p_0 eingetragen. Diese Funktion verläuft auf der Abszisse jedoch nicht linear. Ordinate in Ångström

* In diesem Zusammenhang sei kurz erwähnt, was das Auftreten bzw. Verschwinden der Collagenreflexe in Begriffen von Gitterdimensionen bedeutet: Scharfe Reflexe treten bei Röntgenbeugung auf, wenn 100 bis 400 Gitterabstände kohärent beugen. Darunter erscheinen verbreiterte Reflexe, und wenn weniger als etwa 20 Gitterperioden in Phase beugen, verschwinden die Reflexe in der Untergrundschwärzung. Am oberen Ende der Kurve in Abb. 1 beugen demnach einige Dutzend Gitterabstände in Phase; d. h. die geordneten Bezirke sind einige wenige 100 Å groß.

** Neben der erwähnten Kristallitgrößenverbreiterung, die eine Funktion von $\tan \theta$ ist, spielt in makromolekularen organischen Stoffen auch die Fehlorderungsverbreiterung (prop. $1/\cos \theta$) eine bedeutende Rolle für die Reflexverbreiterung. Da hier stets ein und derselbe Reflex betrachtet wird, ist die θ -Abhängigkeit der Reflexintensität nicht überprüfbar. Wir beschränken uns daher auf die Diskussion der Vorgänge in Begriffen der Kristallitgröße und verwenden den Oberbegriff der Gitterordnung.

werden, ohne daß die geordneten Bezirke vorerst kleiner werden. Der kristallographische Ordnungsgrad hinkt mithin bei einem Sorptions/Desorptions-Zyklus hinter dem Wassergehalt nach.

Abb. 2 zeigt das Verhalten des 10,6-Å-Äquatorreflexes in einem Sorptions-Desorptions-Zyklus.

Der d -Wert von 10,6 Å dieses Reflexes bleibt bis WG 60 mg H_2O/g Prot. $p/p_0 = 0$ bis 0,1) konstant, verschiebt sich dann mit zunehmendem WG auf 12 Å bei 300 mg H_2O/g Prot. Dieser Befund stimmt befriedigend mit demjenigen von ROUGVIE⁴ überein. Mittels Regressionsrechnung wurde für den linearen Teil der Kurve in Abb. 2 ein Korrelationskoeffizient von 0,961 gefunden.

Die Verschiebungen dieses Reflexes zeigen bei Sorption und Desorption keine Hysterese.

3.2. Ergebnisse der Sorptionsmessungen

3.2.1. Sorptionsisothermen

Abb. 3 gibt die 25°C-Isothermen wieder von:

- nativen, luftgetrockneten Tropicollagenfasern,
- nativem lyophilisiertem Tropicollagen,
- hitzenaturiertem Tropicollagen,
- Achillessehnen-Collagen der Firma Schuchardt.

Das Trockengewicht aller Proben wurde bei $p/p_0 = 0,00025$ (= 0,006 Torr) ermittelt.

Von Interesse ist vor allem ein Vergleich der Isothermen von nativem und denaturiertem Tropicollagen (Kurven 2 und 3, Abb. 3): Im ganzen p/p_0 -Bereich 0,1 bis 0,9 bindet die denaturierte Form signifikant weniger Wasser als die native. Bei gleichbleibender Primärstruktur – bei Hitzenaturierung zerfällt die Tripelhelix in einen Knäuel aus Einzelsträngen – äußert sich der Verlust an Sekundär/Tertiär- und Quartär-Struktur in einer Herab-

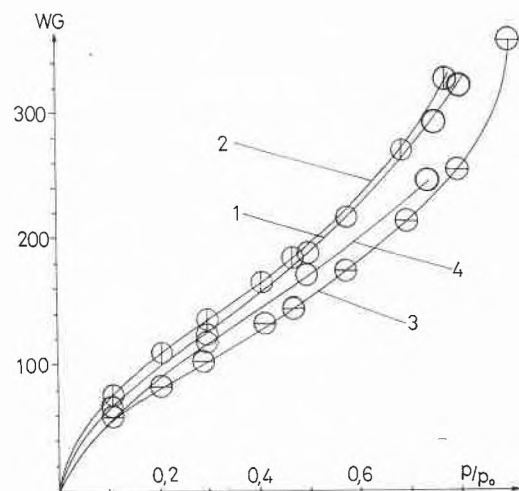


Abb. 3. 25°-Sorptionsisothermen von 1. luftgetrockneten Fasern von nativem Tropicollagen, 2. lyophilisiertem nativem Tropicollagen, 3. denaturiertem Tropicollagen (lyophilisiert), 4. Collagen/Schuchardt

setzung der Wasserbindefähigkeit. Dieser neue Befund weist auf einen strukturabhängigen Wassereinbau hin.

Die Isothermen von nativem, lyophilisiertem und faserluftgetrocknetem Tropocollagen unterscheiden sich nur sehr geringfügig. Diese weitgehende Unabhängigkeit der sorbierten Wassermenge von der inneren Oberfläche des Sorbens wurde von BENSON¹⁵ an Bovin Serum Albumin und Ovalbumin sowie von SIGNER und GÁL¹⁶ an Casein festgestellt.

– Für Proteine (u. a. quellbare Sorbentien) stellt also die Wassersorption eine spezifische molekulare Eigenschaft dar.

Ein Vergleich der Isothermen von nativem, praktisch unvernetztem Tropocollagen mit derjenigen von Achillessehnen-Collagen (Kurve 4, Abb. 3) zeigt, daß die Wasserbindefähigkeit des quervernetzten Collagens im mittleren und höheren p/p_0 -Bereich signifikant geringer ist.

– Der Vernetzungsgrad (Quartärstruktur) bestimmt in diesem Dampfdruckgebiet den Quellungsdruck und somit den Isothermenverlauf.

3.2.2. Kinetik der Wassersorption

– Strukturelle Veränderungen im Sorbens bei Wassersorption können sich in einer Beeinflussung der Sorptionskinetik äußern (BRANDT und BUDRYS¹⁷, CRANK und PARK¹⁸).

Die Halbwertszeiten* ($T_{1/2}$) der einzelnen Sorptionsstufen (von je $\Delta p/p_0 = 0,1$) sind in Abb. 4, die Initialgradienten* ($\Delta G/\Delta T = 30$ min) derselben Stufen in Abb. 5 aufgetragen, für die native und denaturierte Form des Tropocollagens.

– Der Gang der Kurven 1 (native Form) unterscheidet sich in beiden Darstellungen signifikant von demjenigen der Kurven 2 (denaturierte Form). In Abb. 5 durchlaufen beide Kurven zwischen p/p_0 0,40 und

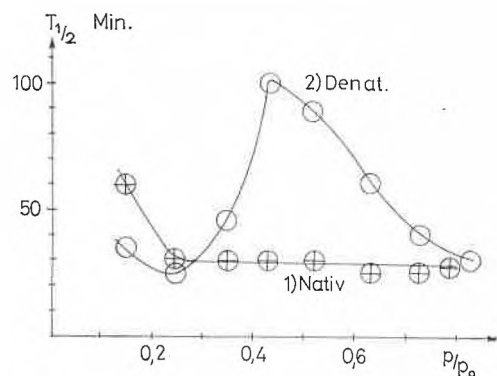


Abb. 4. Halbwertszeiten ($T_{1/2}$) der Sorptionsstufen p/p_0 0,1 → 0,2 ... 0,7 → 0,8. Kurve 1: natives Tropocollagen (lyophilisiert), Kurve 2: denaturiertes Tropocollagen (lyophilisiert)

* Beide Größen sind nur innerhalb einer Meßreihe vergleichbar, da sie an verschiedenen Proben ermittelt wurden.

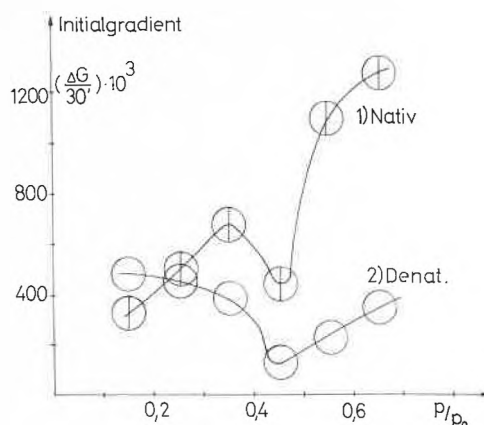


Abb. 5. Initialgradient [initiale Gewichtszunahme pro Zeiteinheit $\{\Delta G(\text{mg})/\Delta T (= 30 \text{ min})\}$] der Sorptionsstufen p/p_0 0,1 → 0,2 ... 0,7 → 0,8. Kurve 1: natives Tropocollagen (lyophilisiert). Kurve 2: denaturiertes Tropocollagen (lyophilisiert)

0,50 ein Minimum. Während die Werte für die denaturierte Form (Kurve 2) oberhalb dieses Dampfdruckgebietes stets unter dem Ausgangswert bleiben, steigt die Sorptionsgeschwindigkeit in der nativen Form auf das 3- bis 4fache des Ausgangswertes an, um zwischen p/p_0 0,5 bis 0,6 wieder abzuflachen. Eine Paralleltät in der p/p_0 -Abhängigkeit der Sorptionsgeschwindigkeit zu derjenigen der Intensität des 2,8-Å-Meridianreflexes (Abb. 1) wird hier deutlich.

4. Diskussion

Von p/p_0 0 bis 0,10 (WG 60 mg/g) verändert sich weder der 2,8-Å-Meridianreflex noch der 10,6-Å-Äquatorreflex. In diesem Dampfdruckbereich wird das sorbierte Wasser nicht in die geordneten Bezirke der Collagenmolekel eingelagert, sondern in die ungeordneten «Fibrillar bands» (ROUGVIE und BEAR⁴), welche mit der Weitwinkeldiffraktion nicht erfaßt werden, sich aber in variabler Untergrundschwärzung manifestieren (vgl. S. 114).

– Von 60 bis 260 ± 40 mg $\text{H}_2\text{O/g}$ ($p/p_0 = 0,1$ bis 0,75) wird Wasser sowohl in die Tripelhelix als auch interfibrillär in die geordneten Bezirke («interbands») eingebaut. Bei einem WG von etwa 300 mg $\text{H}_2\text{O/g}$ Protein sind die helicalen Strukturen voll ausgebildet, und weitere Wasseraufnahme findet nur noch interfibrillär statt.

– Dieser Befund ist in guter Übereinstimmung mit Resultaten aus IR-Messungen (SUSI *et al.*⁸), welche kontinuierliche und charakteristische Verschiebungen der Collagen-IR-Banden (Amid II) im Dampfdruckgebiet von $p/p_0 = 0$ bis 0,75 zeigen. Kalorimetrische Mes-

¹⁴ G. N. RAMACHANDRAN, *Treatise on Collagen*, Academic Press, London/New York 1967.

¹⁵ S. W. BENSON und D. A. ELLIS, *J. Amer. Chem. Soc.* 72 (1950) 2105.

¹⁶ R. SIGNER und S. GÁL, *Makromol. Chem.* 64/66 (1961) 259.

¹⁷ W. W. BRANDT und R. S. BUDRYS, *J. phys. Chem.* 69 (1964) 600.

¹⁸ P. CRANK und G. S. PARK, *Diffusion in Polymers*, Academic Press, London 1968.

sungen von HALY und SNAITH⁹ hatten bereits gezeigt, daß in Collagen/Wasser-Systemen bis zu einem WG von 300 mg/g kein ausfrierbares Wasser feststellbar ist.

Bei Durchlaufen eines Sorptions/Desorptions-Zyklus zeigt der helicale Ordnungsgrad Hysterese. Hierzu bietet sich eine strukturelle Deutung an (siehe S. 114). Die Verschiebungen des 10,6-Å-Äquatorreflexes dagegen verlaufen bei Sorption und Desorption ohne Hysterese proportional zu ΔWG .

Das in helicale Strukturen eingelagerte Wasser wird zwischen p/p_0 0 bis 0,75 sorbiert; das Energiespektrum der wasseraktiven Haftstellen ist also ein sehr breites. Der sigmoide Verlauf der Kurve in Abb. 1 mit einem Maximum der Neigungstangente zwischen WG 140 und 180 mg H₂O/g zeigt jedoch, daß im p/p_0 -Bereich 0,35 bis 0,48 (Mittel 0,415) der Wassereinbau in helicale Strukturen der geordneten Bezirke am intensivsten ist.

Denaturiertes Tropocollagen bindet signifikant weniger Wasser als die native Form. – Von Interesse ist die Tatsache, daß neben der Primärstruktur höhere konformative Ordnungszustände die Wasserbindefähigkeit entscheidend beeinflussen können. – Diese Beobachtung weist eher auf einen Wassereinbau in Form von spezifischen inter- oder intracatenaren HOH-Brücken hin als auf Bildung von Wasserketten entlang den Peptidbindungen.

Die Halbwertszeit $T_{1/2}$ ist oberhalb $p/p_0 = 0,25$ praktisch unabhängig vom Dampfdruckgebiet bei geordnetem Wassereinbau unter Kristallisation des Proteins, während $T_{1/2}$ bei Wasseraufnahme in die denaturierte, amorphe Form unter Quellung stark p/p_0 -abhängig ist.

Der Initialgradient durchläuft für beide Formen zwischen p/p_0 0,40 bis 0,50 ein Minimum, zeigt jedoch oberhalb dieses Dampfdruckgebietes einen signifikant unterschiedlichen Verlauf für die native Form (Abb. 5). Hier zeichnet sich eine Parallelität zur Bildung helicaler Strukturen ab (vgl. 3.1).

Im Dampfdruckgebiet $p/p_0 = 0,4$ bis 0,5 ist approximativ die Hälfte des strukturell gebundenen Wassers sorbiert, durchläuft die Intensitätszunahme des helicalen 2,8-Å-Reflexes *vs.* WG ein Maximum und beginnt ein signifikanter Anstieg der Sorptionsgeschwindigkeit. Diese Koinzidenz weist auf einen zweistufigen Wassereinbau in die Helix hin.

- Das bereits erwähnte Collagenstrukturmodell von RAMACHANDRAN⁶ zeigt, daß zwei unterschiedliche HOH-Brücken pro Tripeptideinheit ($=O_{1A}HOH \cdot O_{0B}$ und $=O_{1A}HOH \cdot N_{1B}$) stereochemisch möglich sind.
- Experimentelle Evidenz für die Richtigkeit dieses Modelles liegt nur wenig vor.
- Die hier beschriebenen Untersuchungen leisten einen Beitrag zur Abklärung des Mechanismus der Primärhydratation von Collagen und scheinen mit dem Ramachandran-Modell im Einklang zu stehen.

Für wertvollen Rat, Diskussion und Interesse an dieser Arbeit sei Herrn Professor R. SIGNER, Professor Hs. NITSCHMANN und Professor E. SCHMIDT der herzlichste Dank ausgesprochen.

Der röntgenographische Teil dieser Arbeit entstammt der Lizentiatsarbeit von P. HIRTER, Bern 1972, unter Leitung von R. Giovanoli.

Die Sorptionsmessungen wurden durch Kredite des Schweizerischen Nationalfonds und der CIBA-GEIGY AG ermöglicht.