

Aneliya Petrova¹, Günter Westphal¹, Rafael Valbuena¹ und Jochen Ringe²

Struktur und technofunktionelle Eigenschaften von Kollagenen tierischen Ursprungs

Kollagenhaltiges Bindegewebe von Därmen wird traditionell zur Einhüllung von Wurstbrät genutzt. Seit etwa 20 Jahren findet man Kollagene in verschiedenen kosmetischen Formulierungen, dann in Form sog. „pads“ zur Wundauflage bzw. als Zellträger für die regenerative Medizin. Dabei wird als Rohstoff häufig die Haut von Kälbern verwendet. Gemeinsam mit der Charité, der Gruppe Tissue Engineering, haben wir Einsatzmöglichkeiten für in größerer Menge anfallende Schweinehaut im Bereich der regenerativen Medizin eröffnet. Sowohl für die Kollagengewinnung als auch für die Anwendung dieses Proteins sind die Kenntnisse über intra- und intermolekulare Quervernetzungen – cross linkings – essentiell. So sind im Besonderen die technofunktionellen Eigenschaften und dabei die physiologischen Funktionen der Kollagene von spezifischen Quervernetzungen abhängig. In unseren experimentellen Arbeiten, über die wir in Kürze berichten werden, waren und sind die Strukturen der vernetzten Kollagene bedeutsam.

Die Vorstufen von Kollagenen, sog. Prokollagenen, werden in ihrer unikaten Aminosäurezusammensetzung in Bindegewebszellen in Form von linkshändigen alpha-Polypeptidketten synthetisiert. Danach erfolgt extrazellulär über die Abspaltung der terminalen Propeptide die Herausbildung von rechtshändigen tripelhelikalen Tropokollagenen. In der Literatur findet man jedoch auch Hinweise auf eine intrazelluläre Abspaltung der Propeptide. Tropokollagene weisen zudem N- bzw. C-terminale, nichthelikale Sequenzen – Telopeptide genannt – auf (Abbildung 1)³. Werden die nichthelikalen Strukturanteile aus technologischen Gründen, z.B. enzymatisch, abgespalten, erhält man die Atelokollagene. Die Stabilität der Tropokollagene wird im Besonderen durch die große Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen, entropiegesteuert, hervorgerufen. In den C- bzw. N-terminalen Tripelhelix-Enden und in den entsprechenden Telopeptiden werden altersabhängig kovalente Bindungen (Quervernetzungen) unter Vernetzung der Peptidstränge eingebaut. [1], [2]

Die skizzierten Strukturelemente in den Tropokollagenen finden sich schließlich, gewebetypisch, in den Fibrillen und Fasern, Netzwerken, fibrillen- bzw. membranassoziierten Kollagenen sowie in multiplen Tripelhelices wieder. Bisher wurde über 29 Vertreter solcher Kollagene berichtet. [3]

Nach der Expression der Tropokollagenmoleküle und der Herausbildung ihrer Endform außerhalb der Zelle tritt spontan eine Selbstanordnung zu Mikrofibrillen ein, die dann mechanisch stabilere

1 Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte an der Humboldt-Universität zu Berlin

2 Tissue Engineering Lab & Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies, Dept. of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité-Universitätsmedizin Berlin

3 Alle Abbildungen siehe im Block am Textende.

Fibrillen bilden. Während dieses Prozesses der Selbststrukturierung finden enzymatisch und nicht enzymatische („Glykierung“) Quervernetzungen statt. Diese Quervernetzungen sind hauptsächlich intermolekular, aber auch intramolekulare Quervernetzungen (innerhalb der Tropokollagenmoleküle) sind bekannt.

Die enzymatische Quervernetzung in fibrillären Kollagenen basiert auf der oxidativen Bildung von Aldehydgruppen. Lysin oder Hydroxylysin werden dabei mittels Lysyloxidase (ein durch Cu-Ionen aktiviertes Enzym) zu Allysin bzw. Hydroxyallysin oxidiert (Abbildung 2).

Die entsprechende Quervernetzung findet in der tripelhelikalen Region in den Positionen 87 und 930 statt. Charakteristisch für diese Positionen sind die Aminosäuresequenzen Lys-Gly-His-Arg-Gly oder Hyl-Gly-His-Arg-Gly. In Position 9 der N-terminalen Telopeptide aus Lysin- oder Hydroxylysinresten entstandene Aldehydgruppen reagieren mit Lysin oder Hydroxylysin in der o.g. Sequenz der Tripelhelix und bilden Schiff'sche Basen [4], wie zum Beispiel Dehydro-hydroxylysino-norleucin (deH-HLNL) oder Dehydro-lysino-norleucin (deH-LNL), die auch als Aldimine bekannt sind. [5] Erstere wird zwischen Allysin aus der Telopeptid-Region und Hydroxylysin aus der tripelhelikalen Region gebildet. Die zweite ist das Produkt aus der Reaktion zwischen der Aldehydgruppe von Allysin in der Telopeptid-Region und Lysin in der tripelhelikalen Region (Abbildung 3).

Diese beiden Quervernetzungen sind divalent und kommen am häufigsten vor, da sie thermodynamisch stabile Produkte darstellen. Sie sind charakteristisch für Bindegewebe wie die Haut oder die Sehnen und werden bei sauren pH-Werten leicht aufgespalten. Aus diesem Grund ist die Kollagenengewinnung mit sauren Lösungen einfach zu realisieren, wenn diese aus der Haut junger Tieren erfolgt. Dieser Rohstoff enthält nämlich nur divalente Quervernetzungen. Mit zunehmendem Alter treten tri- und tetravalente Quervernetzungen auf, die dann säurestabil sind. Die divalenten Schiff'schen Basen können über eine milde Reduktion mit Borhydrid für Analysen stabilisiert werden. Dabei entsteht Hydroxylysinonorleucin (HLNL) bzw. Lysinonorleucin (LNL) (siehe Abbildung 3). [4] HLNL kommt reichlich in den meisten Kollagenen vor, während LNL sowohl in Kollagen als auch in Elastin zu finden ist. [6]

Eine zweite Gruppe von divalenten Quervernetzungen stellen AMADORI-Produkte, also α -Amino-Ketone, dar. Diese entstehen zunächst aus der Reaktion zwischen der Aldehydgruppe von Hydroxyallysin (siehe Abbildung 2) in einem Telopeptid und Hydroxylysin in der tripelhelikalen Region. [4] Die gebildete Schiff'sche Base unterliegt einer AMADORI-Umlagerung zu Hydroxylysino-5-ketonorleucin (HLKNL). Dieses kann nachfolgend zu Dihydroxy-lysino-norleucin (DHLNL) reduziert werden (Abbildung 4). Letzteres kommt häufig in mineralisierten Geweben wie Knochen und Knorpel vor [6] und ist säure- und wärmestabil. Die entsprechenden Gewebe sind dann unlöslich.

Beide Gruppen von divalenten Quervernetzungen können durch weitere Reaktionen noch stabilere trivalente Quervernetzungen bilden. Beispielweise reagiert Dehydro-hydroxylysino-norleucin (deH-HLNL) mit Histidin zu Histidino-hydroxylysino-norleucin (HHLNL) (Abbildung 5). [3]

Andere häufig vorkommende trivalente Quervernetzungen (Abbildung 6), die vorwiegend in reifen Bindegeweben (außer in der Haut) zu finden sind, führen unter Beteiligung von drei Hydroxylysin-Resten zu Hydroxylsypyridinolinen (HP) bzw. unter Einbeziehung von zwei Hydroxylysin-Resten und einem Lysin-Rest zu Lysyl pyridinolin (LP) [7].

Quervernetzungen zwischen zwei Allysins-Resten, bekannt als Aldolkondensationsprodukte (ACP), finden bei Kollagen nur in der Nähe des Endes des N-Terminus statt. Sie gehören zu den intramolekularen Quervernetzungen in Kollagen und Elastin. [6] Über nachfolgende Reaktionen bilden die ACP tri- und tetravalente Quervernetzungen. Die Wechselwirkung mit Histidin führt zu einem Aldol-Histidin-Produkt (AH), eine trivalente Quervernetzung, die nach Tanzer [6], in Rinderhaut vorhanden ist. Bei Wechselwirkung mit Histidin und Hydroxylysin entsteht Histidinohydroxymerodesmosin (HHMD), eine tetravalente Quervernetzung (Abbildung 7).

Die enzymatische Quervernetzung kann also, zusammengefasst, abhängig von den Lysin- und Hydroxylysinresten in den Telopeptiden, über zwei Wege verlaufen. Quervernetzungen unter Beteiligung von Lysin sind typisch für die Haut und die Kornea, und wenn sie divalent vorliegen, können sie mit sauren Lösungen für die Kollagengewinnung in diesen Geweben aufgespalten werden. Sind tri- und tetravalente Quervernetzungen vorherrschend, ein Hinweis für reifes und alternes Kollagen, wird die Kollagenextraktion schwieriger und ist mit sauren Lösungen wegen der Kollagenunlöslichkeit nicht mehr möglich. Andererseits gehen die Quervernetzungen in mineralisierten Geweben wie Knochen und Knorpel von Hydroxylysin aus. In diesem Fall können selbst divalente Quervernetzungen wie Dihydroxy-lysino-norleucin (DHLNL) mit sauren Lösungen nicht aufgespalten werden, und die Gewinnung von löslichem Kollagen ist auf diesem Wege nicht realisierbar.

Die folgende Zusammenstellung bietet einen Überblick über die Art und das Vorkommen der verschiedenen Quervernetzungen in den Geweben:

- Divalent – HLNL und LNL – hauptsächlich in der Haut und in der Kornea;
- Divalent – DHLNL – vorwiegend in mineralisierten Geweben wie Knochen und Knorpel;
- Trivalent – HHLNL – hauptsächlich in der Haut und in der Kornea;
- Trivalent – LP und HP – vorwiegend in reifen Bindegeweben (außer in der Haut);
- Tetravalent – HHMD – überwiegend in der Haut und in Knorpel.

In Abbildung 8 werden noch einmal zusammenfassend die enzymatischen Quervernetzungen in Abhängigkeit von den bei ihrer Bildung beteiligten Aminosäurenresten, Lysin oder Hydroxylysin, dargestellt.

Die zweite Art von Quervernetzungen, die nichtenzymatische, die auch als „Glykierung“ bekannt ist, erfolgt unter Einbeziehung von Kohlenhydraten (vor allem Glucose und Galactose). Dabei werden Lysin- oder Hydroxylysin-Reste mit fortschreitendem Alter der Gewebe durch Kohlenhydrate glycosidiert, und die Glycoside folgen den üblichen nichtenzymatischen Bräunungsmechanismen, so z.B. der MAILLARD-Reaktion. Es bilden sich vor allem intramolekular, unter Einbeziehung der Tripelhelices, wenig lösliche, aber widerstandsfähige Kollagenetze. [4], [5]

Über die Separierung der Kollagene in lösliche und wenig lösliche Fraktionen wird in einem weiteren Beitrag berichtet.

Danksagung

Die für diese Publikation notwendigen Recherchen und experimentellen Arbeiten wurden im Rahmen des Verbundprojekts „Hochadhäsives lösliches Kollagen“ durchgeführt, das mit Mitteln des Landes Berlin und des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) über die Investitionsbank Berlin gefördert wurde.

Abbildungen

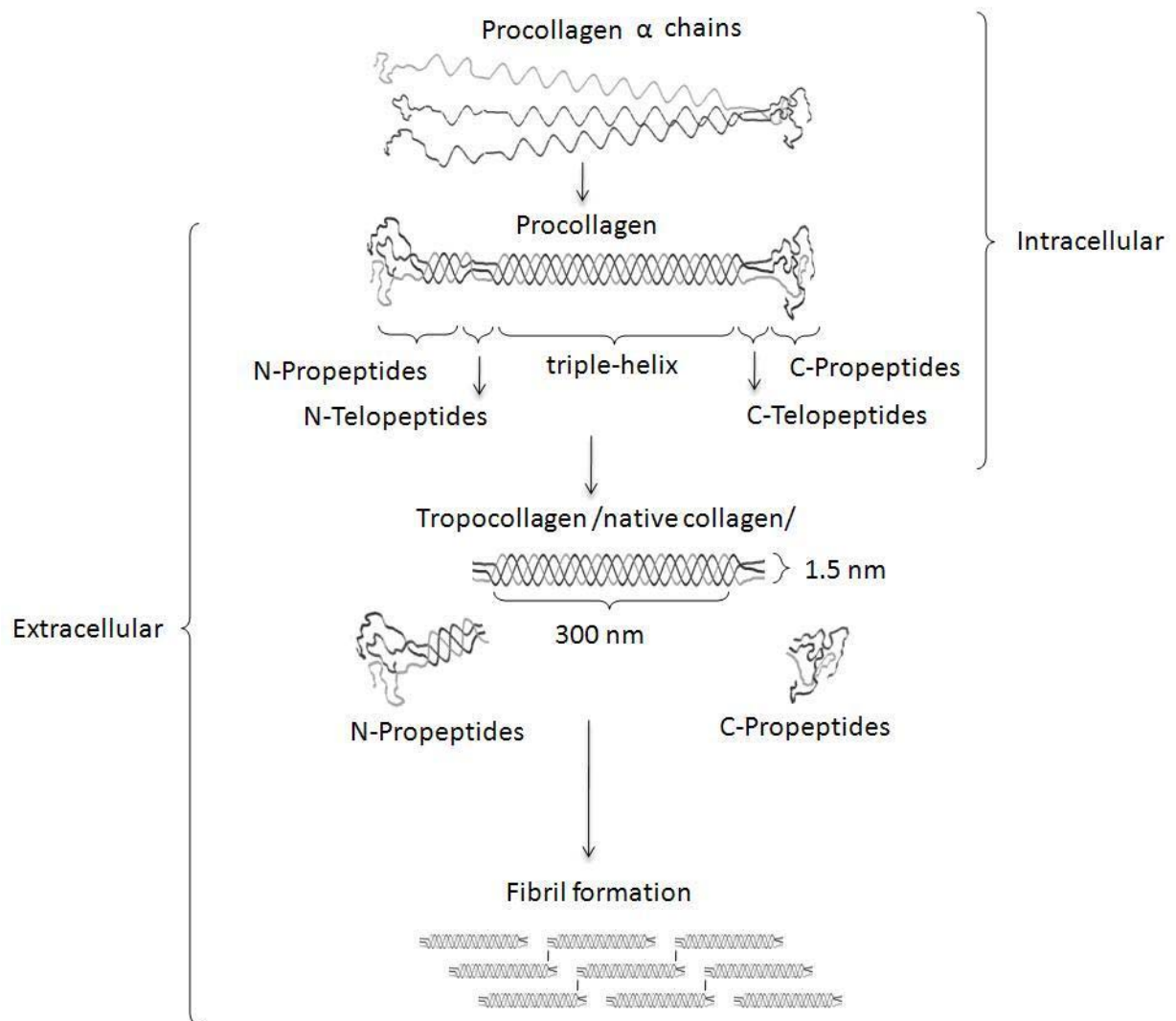


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kollagenbiosynthese

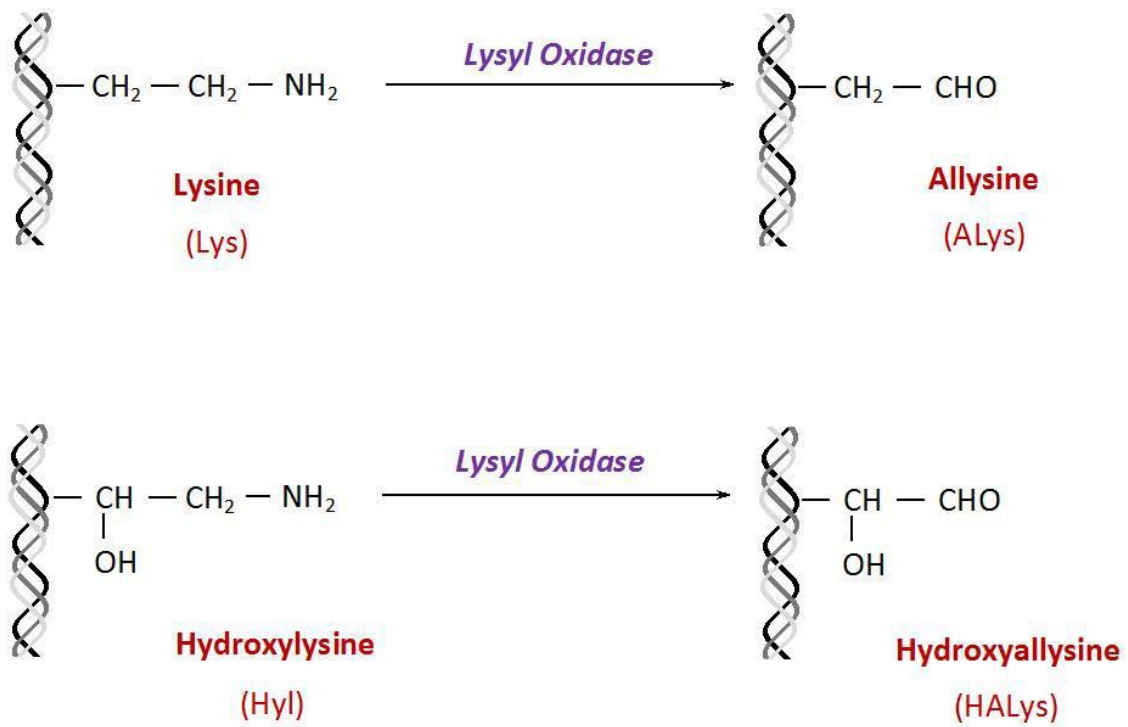


Abbildung 2: Oxidation von Lysin und Hydroxylysin mittels Lysyloxidase

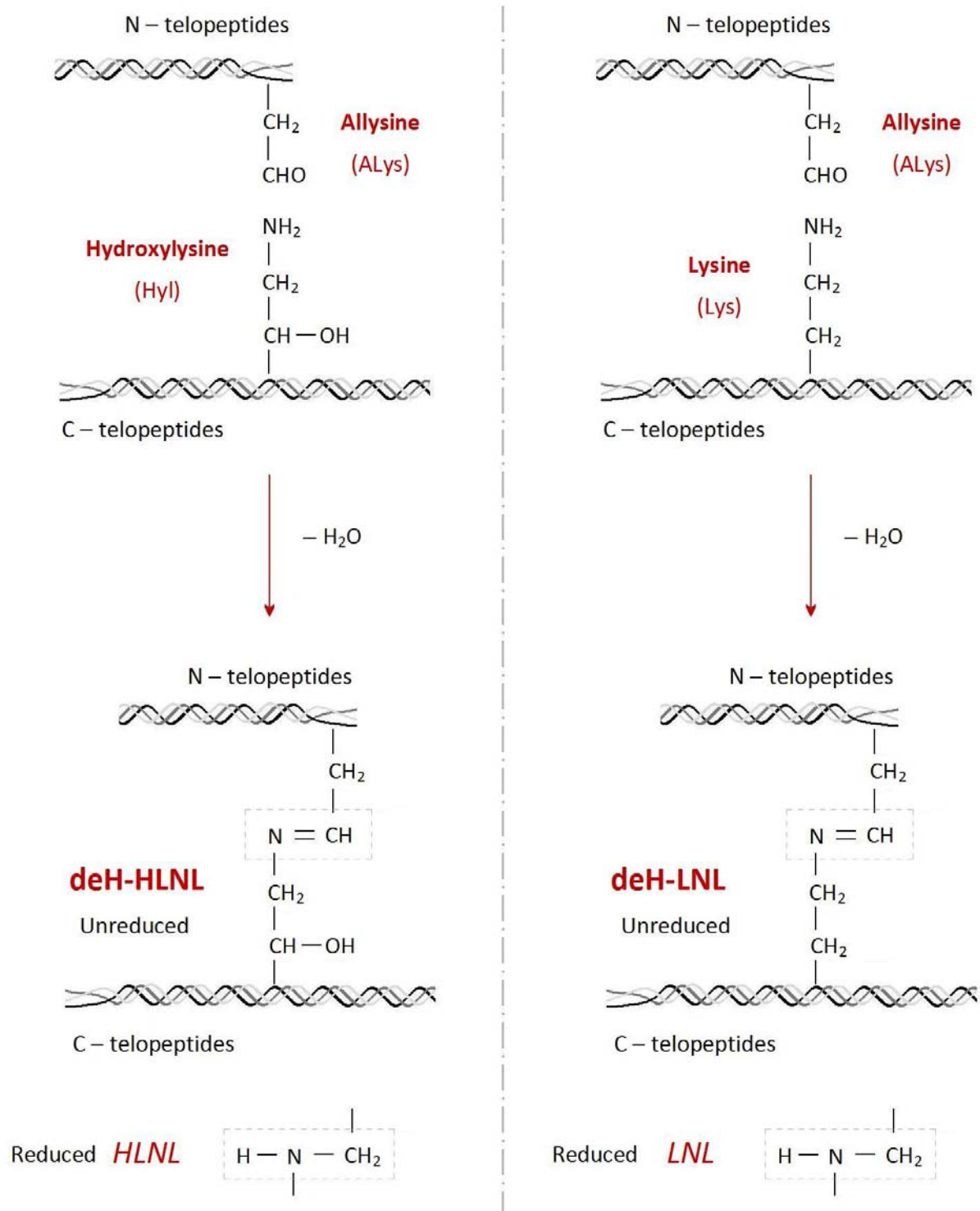


Abbildung 3: Bildung der reduzierbaren Schiff'schen Basen Dehydro-hydroxylysino-norleucin (deH-HLNL) und Dehydro-lysino-norleucin (deH-LNL)

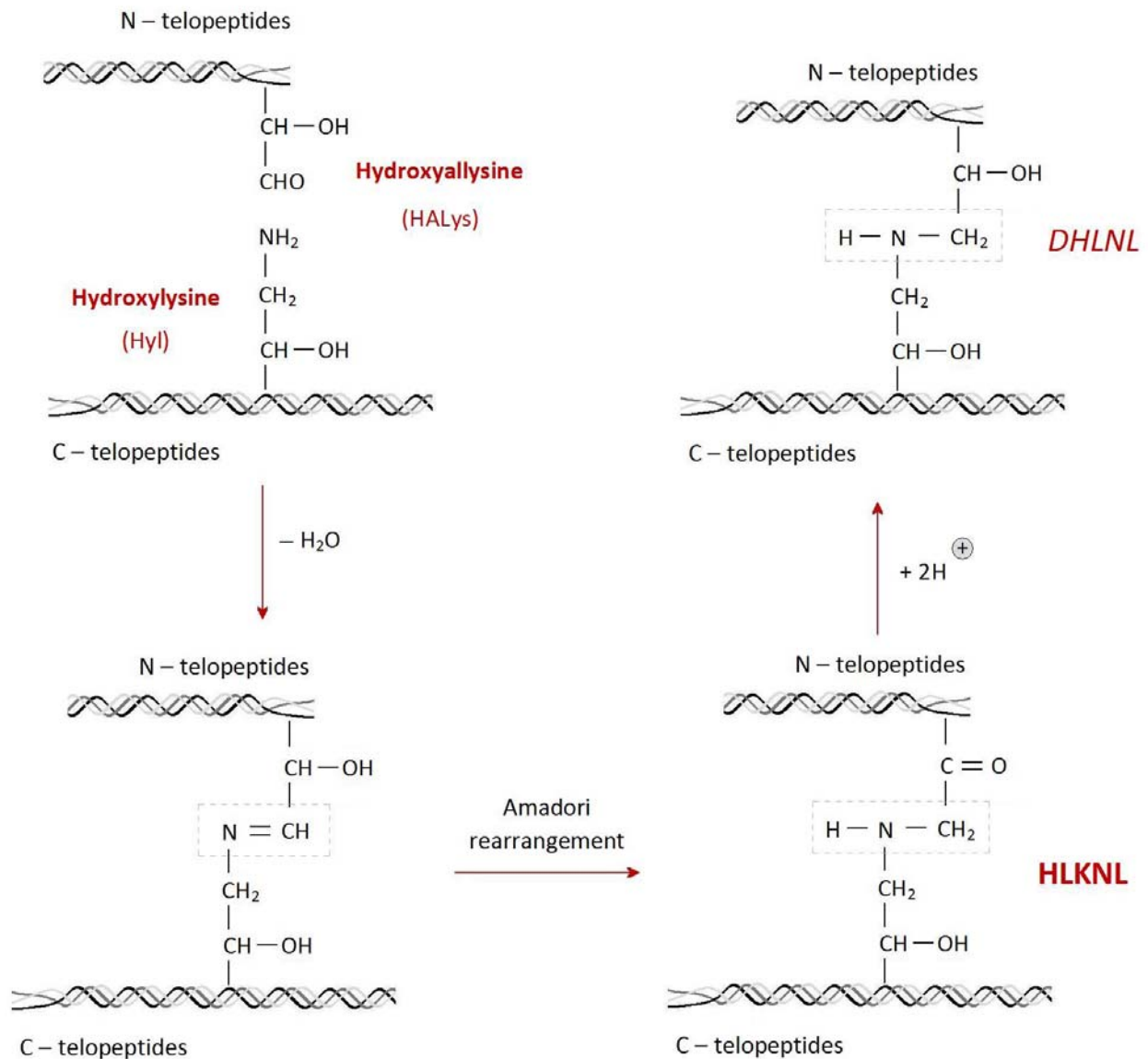


Abbildung 4: Bildung von divalenten Quervernetzungen in mineralisierten Geweben. Hydroxylysino-5-ketonorleucin (HLKNL) und seine reduzierte Form Dihydroxy-lysino-norleucin (DHLNL)

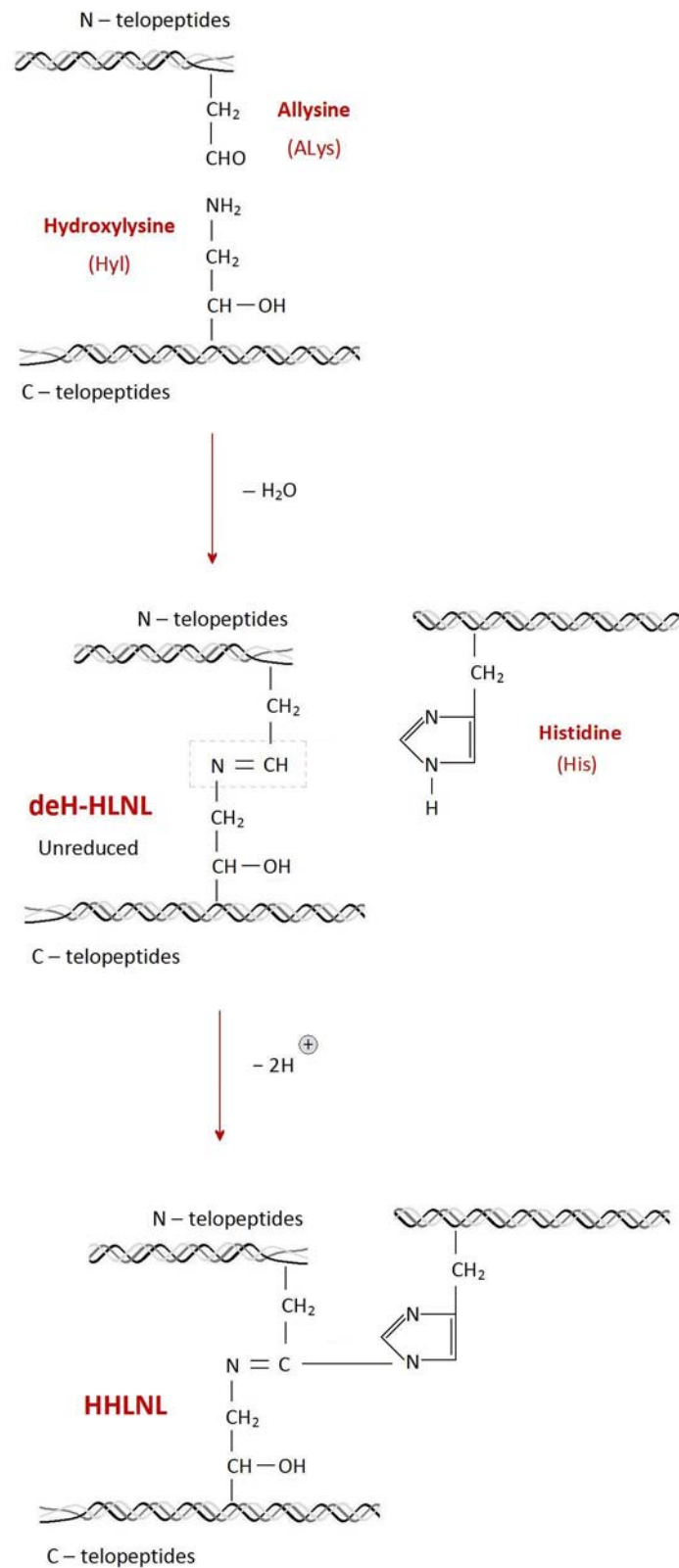


Abbildung 5: Bildung der trivalenten Quervernetzung Histidino-hydroxylysino-norleucin (HHLNL)

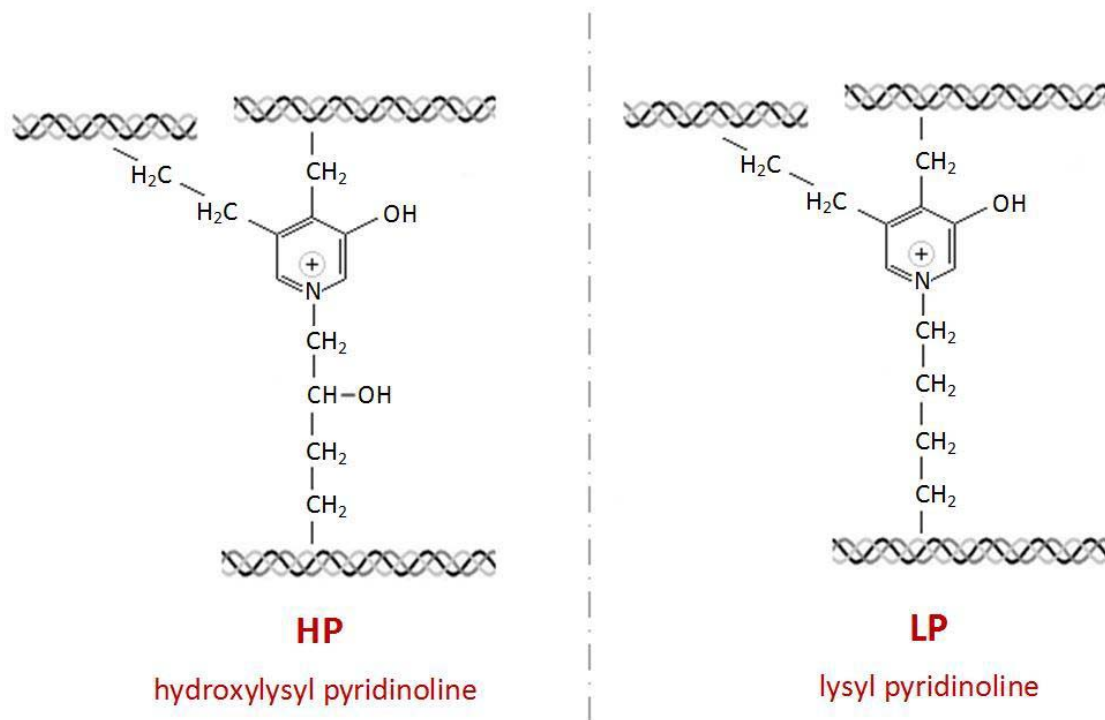


Abbildung 6: Trivalente Quervernetzungen Hydroxylysyl pyridinolin (HP) und Lysyl pyridinolin (LP)

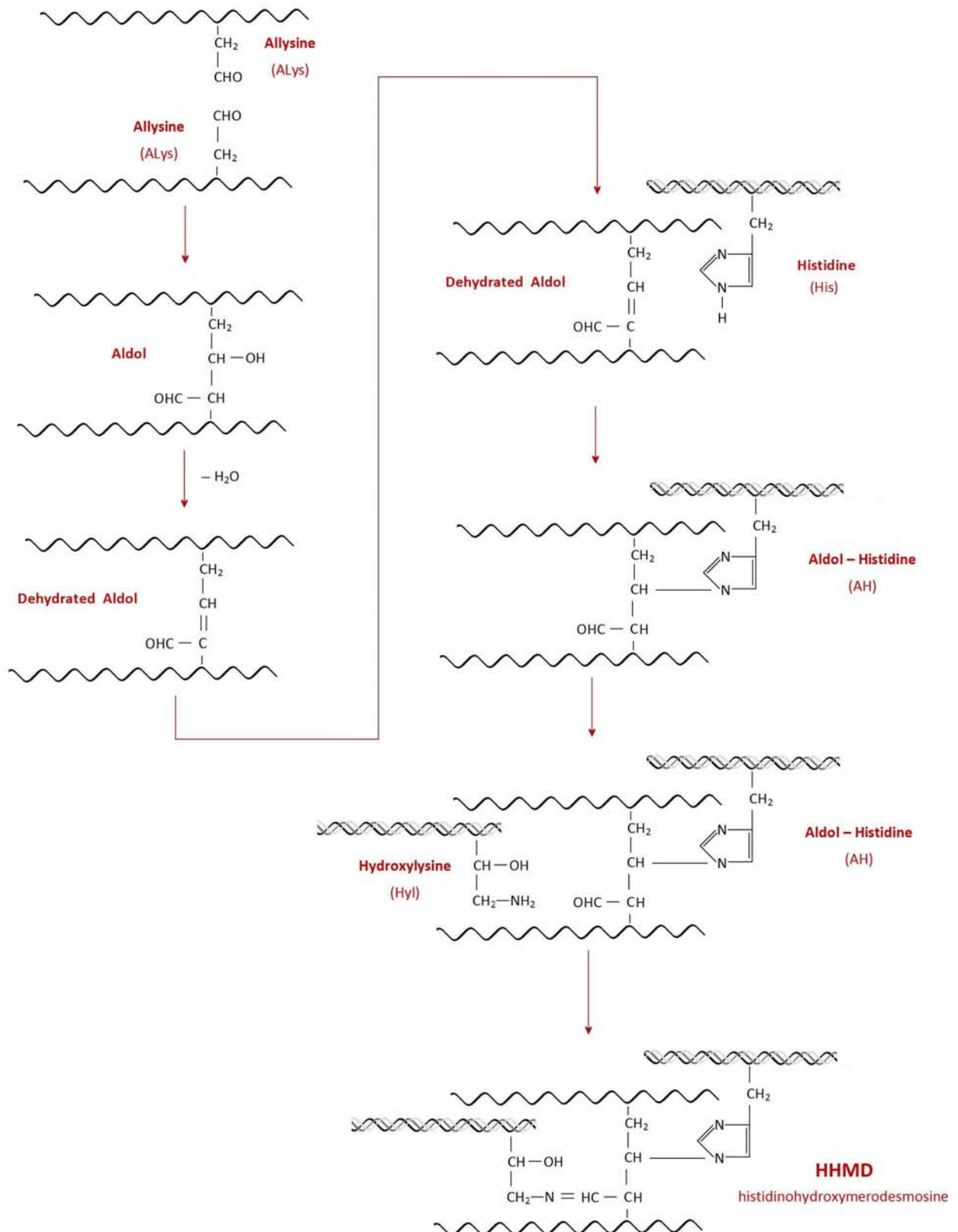


Abbildung 7: Bildung von trivalentem Aldol - Histidine (AH) und tetravalentem Histidinohydroxymerodesmosine (HHMD)

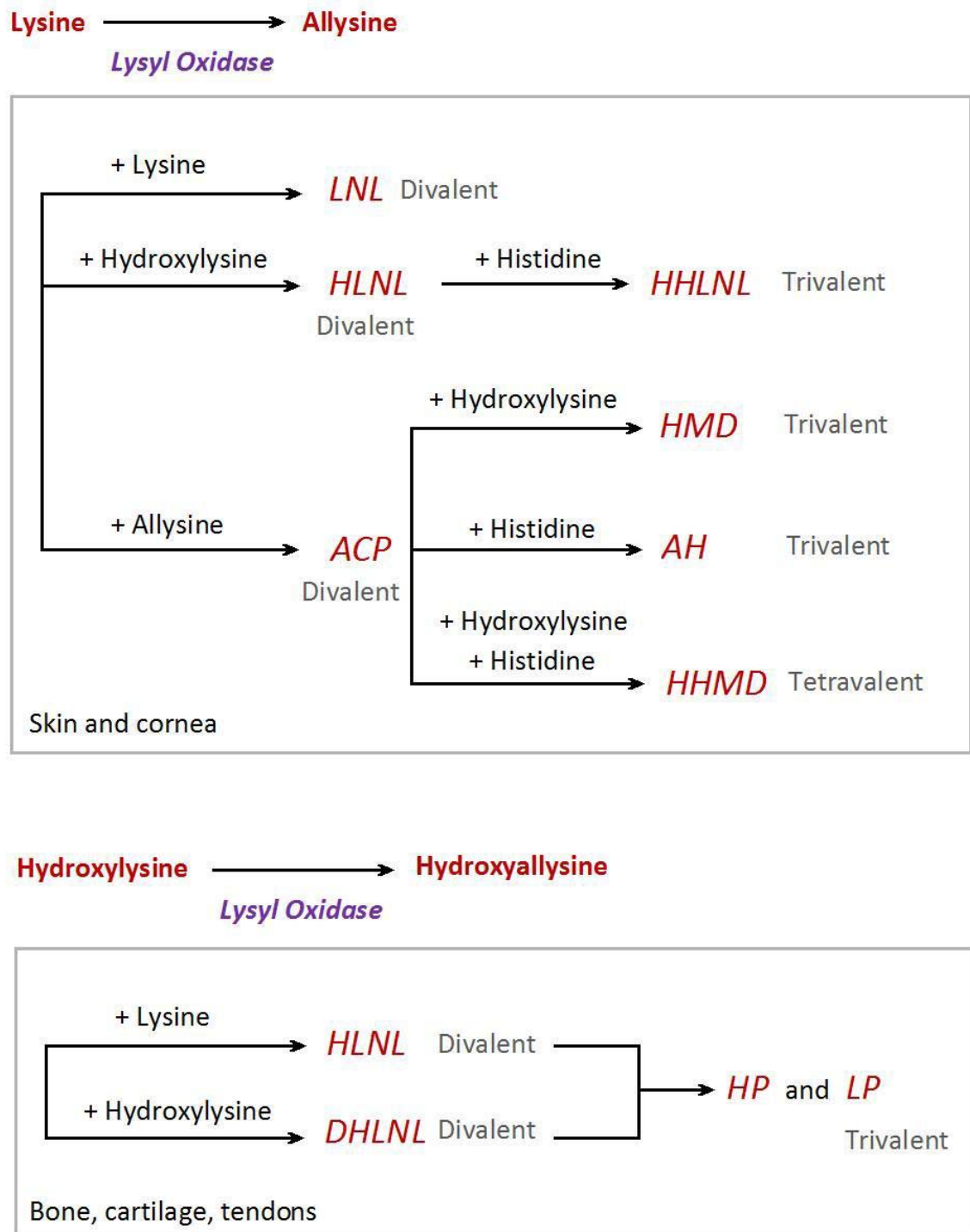


Abbildung 8: Überblick über die enzymatischen Quervernetzungen

Literatur

- [1] Hulmes, D. J. S.: Collagen Diversity, Synthesis and Assembly; in „Collagen Structure and Mechanics”, Herausgeber Fratzl, P.; Springer Science+business Media, 2008
- [2] Hulmes, D. J. S.: Building Collagen Molecules, Fibrils and Suprafibrillar Structures. Journal of Structural Biology, 137 (2002), 2-10
- [3] Shoulders, D. M., und Raines, T. R.: Collagen structure and stability. Ann. Rev. Biochem., 78 (2009), 929-958
- [4] Bailey, A. J.; Paul, R. G.; Knott, L.: Mechanisms of maturation and ageing of collagen. Mechanisms of Ageing and Development, 106 (1998), 1-56
- [5] Reiser, K.; McCormick, R. J.; Rucker, R. B.: Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. The FASEB Journal, 6 (1992), 2439-2449
- [6] Tanzer, M. L.: Cross-linking of collagen. The SCIENCE Journal, 180 (1973), 561-566
- [7] Eyre D. R.; Paz, M. A.; Gallop, P. M.: Cross-linking in Collagen and Elastin. Ann. Rev. Biochem., 53 (1984), 717-748

[13.09.11]

Kontakt:

Dr. Rafael Valbuena
Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte
an der Humboldt-Universität zu Berlin
Philippstraße 13, Haus 16
D – 10115 Berlin
rafael.valbuena@agrar.hu-berlin.de

