

Über ein aus menschlichen und tierischen Geweben isoliertes Nucleoprotein mit Kollagen-fällenden Eigenschaften II

Die Kollagen-fällenden Eigenschaften des Nucleoproteins

G. WILHELM

Max-Planck-Institut für Biophysik Frankfurt, Main (Direktor: Professor B. RAJEWSKY)

(Z. Naturforschg. 21 b, 797—798 [1966]; eingegangen am 19. April 1966)

Das in der I. Mitteilung beschriebene Nucleoprotein führt bei Zugabe zu Tropokollagen-Lösungen zur Bildung von kollagenen Fibrillen. Die Fibrillen-bildende Potenz des Nucleoproteins ist sehr groß. Die gebildeten Fibrillen zeigen eine sehr gute Feinstruktur und weisen eine 640 Å Hauptperiodik auf. Es ist zu vermuten, daß dem ubiquitär im Organismus vorkommenden Nucleoprotein eine bedeutende oder gar ausschlaggebende Rolle bei der Bildung von kollagenen Fibrillen aus Tropokollagen im Organismus zukommt.

Die kollagenen Fibrillen des Bindegewebes setzen sich aus großen Bausteinen, den Tropokollagen-Einheiten zusammen¹. Die Länge dieser Bausteine beträgt 2800 Å, ihr Durchmesser 14 Å. Diese Untereinheiten können sich in verschiedener Weise aggregieren. Durch eine Viertelüberlappung dieser Bausteine entsteht eine Fibrille mit einer 640 Å-Periodik.

Setzen sich die Bausteine in ihrer ganzen Länge einheitlich zusammen, so entsteht eine 2800 Å-Periodik. Im menschlichen und tierischen Organismus werden lediglich Fibrillen mit einer 640 Å-Periodik gefunden. Kollagene Fibrillen zerfallen in sauren Lösungen (z. B. 0,05 M Essigsäure) in die Tropokollagen-Einheiten. Solche Untereinheiten lassen sich auch durch Extraktion von noch nicht ausgereiftem Kollagen mit Neutralsalzlösungen bei einer Temperatur von 2 °C gewinnen. Durch Zusatz einer Reihe von Stoffen und Veränderungen des p_{H} -Wertes bei den sauren Lösungen lassen sich aus den Tropokollagen-Lösungen Fibrillen fällen²⁻⁴. Die Fibrillen können je nach Zusatz eine verschiedene Periodik aufweisen. So bewirkt zum Beispiel Zusatz von ATP die Bildung von Fibrillen mit einer 2800 Å-Periodik. Dialyse der Lösung in Gegenwart von Serumglykoproteiden bewirkt die Bildung von z. T. normalen 640 Å, z. T. sogenannter fibrous longspacing Fibrillen. Da im menschlichen und tierischen Organismus lediglich 640 Å-Perioden-Fibrillen gefunden werden, ist abzuleiten, daß Stoffe, die in vivo an der Fibrillenbildung beteiligt sein könnten, die Voraussetzung erfüllen müssen, nur 640 Å-

Perioden-Fibrillen zu bilden. Da Kollagen überall im Körper vorkommt (30% des Körpereiwisses ist Kollagen), besteht die weitere Bedingung, daß dieser Stoff in allen Organsystemen nachzuweisen ist. Es konnte gefunden werden, daß das in der I. Mitteilung beschriebene Nucleoprotein diese beiden Bedingungen erfüllt. Aus sämtlichen untersuchten Organen (Muskulatur, Leber, Niere, Milz, Darm, Thymus, Gehirn, Herzmuskulatur, Haut) konnte die Substanz isoliert werden.

1. Fällungen von Kollagen aus sauren Tropokollagen-Lösungen

Tropokollagen wurde auf folgende Weise hergestellt: Kalbssehne wird mit der Schere vorzerkleinert und im Ultraturax mit 0,05 M Essigsäure homogenisiert, danach 2 Tage bei 4 °C gerührt und anschließend 30 Min. bei 2000 g zentrifugiert und durch Glasfilter G 2 gesaugt = ungereinigtes Tropokollagen. Der Eiweißgehalt betrug 2,5 mg/ml (Biuretmethode). Diese Lösung wird mit 30-proz. NaCl-Lösung auf 7-proz. NaCl-Gehalt eingestellt, danach 30 Min. bei 50 000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wird dreimal mit dest. H₂O gründlich gewaschen und der Rückstand mit 0,05 M Essigsäure homogenisiert (Methode nach Curtis und Steinsby). Anschließend wird durch Glasfilter G 2 gesaugt, der Eiweißgehalt mit der Biuretmethode bestimmt und mit 0,05 M Essigsäure wieder auf 2,5 mg/ml ($\pm 0,5$ mg) eingestellt = gereinigtes Tropokollagen.

Von der aus Kalbsdarm hergestellten Proteinfraction werden 10 mg in 1 ml dest. H₂O gelöst (= 0,56 mg Gesamt-P/ml) und die Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen angesetzt.

¹ J. GROSS, J. H. HIGHBERGER, and F. O. SCHMITT, Proc. nat. Acad. Sci. USA 40, 679 [1954]; 41, 1 [1955].

² J. H. HIGHBERGER, J. GROSS, and F. O. SCHMITT, Proc. nat. Acad. Sci. USA 37, 286 [1951].

³ F. O. SCHMITT, J. GROSS, and J. H. HIGHBERGER, Symposia Soc. exp. Biol. 9, 148 [1955].

⁴ F. O. SCHMITT, C. E. HALL, and M. A. JAKUS, J. cellular comparat. Physiol. 20, 11 [1942].

Der p_H -Wert der Tropokollagen-Lösungen wird mit 0,1-n. NaOH unter ständigem Rühren (Magnetriührer) eingestellt, Temperatur 22 °C.

Ansatz: In ein Glasröhrchen von 6 mm Durchmesser und 65 mm Länge wurden nacheinander 0,01 ml Proteinlösung und 1 ml Tropokollagen-Lösung gegeben, mit Parafilm verschlossen und umgeschüttelt. Die Fällung makroskopisch sichtbarer Fibrillen wurde beobachtet und gleichzeitig mit einer Probe Tropokollagen unter Zusatz von 0,01 ml dest. H₂O ohne Proteinzusatz verglichen.

Fällungsversuch

Gereinigtes Tropokollagen (1 Tag im Eisschrank aufbewahrt) 2,5 mg Eiweiß/ml. Ausgangswert p_H 3,3, 22 °C.

g-% d. Protein- substanz	Verdünnungen in					
	p_H 3,3	3,5	3,8	4,0	4,1	4,2
$1 \cdot 10^{-3}$	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	?	?	+	+	+	+
10^{-5}	-	-	+	+	+	+
10^{-6}			wenig	+	+	+
10^{-7}			+	+	+	+
10^{-8}			?	++	+	+
10^{-9}			-	++	+	+
10^{-10}				?	+	+
10^{-11}				?	+	+
10^{-12}				-	+	+
10^{-13}					+(?)	+(?)
10^{-14}					+(?)	+(?)

Bei p_H 4,1 und 4,2 finden sich in der Kontrolle makroskopisch sichtbare Fibrillen. Die Proben zeigen nach Proteinzugabe jedoch eine sichtbar stärkere Bildung von Fibrillen bis zu den angeführten Verdünnungen (Beobachtung 5 Min. nach Zugabe der Proteinlösung).

2. Fällungen aus Neutralsalzlösungen

a) Bei Zusatz des Nucleoproteins zu Tropokollagen-Lösungen, die aus der Haut von neugeborenen Mäusen durch Neutralsalz-Extraktion bei 2 °C gewonnen wurden

Hierbei ist eine sofortige Fällung von kollagenen Fibrillen zu beobachten, die im Elektronenmikroskop eine normale 640 Å-Periodik aufweisen.

b) Fällung von Kollagen in Neutralsalzlösungen bei p_H 7

Zu 3 ml eisgekühltem M/7,5 Phosphatpuffer (p_H 7,0) wurden 0,1 ml Nucleoprotein (0,1 mg) gegeben und 1 ml Kollagenlösung ($c = 0,38\%$) in 0,1-proz. Essigsäure zugesetzt. Zu einer zweiten Lösung wurde an Stelle des Nucleoproteins 0,1 ml Chondroitinsulfat-Lösung (0,2 mg) zugesetzt. Zu einer Kontrolllösung

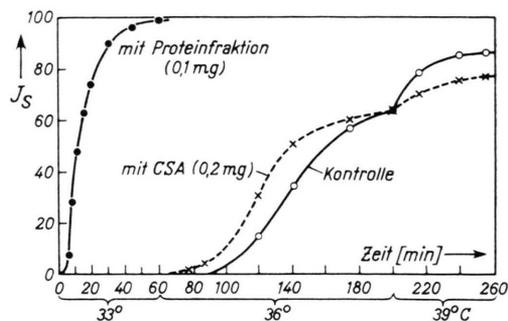


Abb. 1. Fällungen aus Neutralsalzlösungen.

wurde die entsprechende Menge Wasser gegeben. Alle drei Lösungen wurden in Thermostaten auf 33 °C erwärmt. Die Lösung mit dem Nucleoprotein-Zusatz begann nach 5 Min. Fibrillen abzuscheiden, die beiden anderen Lösungen blieben klar.

Die Fibrillenbildung war nach 60 Min. bei der mit Nucleoprotein versetzten Lösung beendet. Bei den beiden anderen Lösungen (mit Chondroitinsulfat versetzte Lösung bzw. Kontrollösung) erfolgte die Fibrillenbildung erst bei 36 °C und die Abscheidung wurde vermutlich erst vollständig bei 39 °C. Die durch die Nucleoprotein-Fraktion gebildeten Fibrillen zeigten eine gute, regelmäßige 640 Å-Periodik. Auch die Feinstruktur erwies sich als gut ausgebildet.

Wenn auch die Abscheidung von Fibrillen aus sauren Tropokollagen-Lösungen interessant erscheint, so ist doch die Abscheidung von Fibrillen aus Neutralsalzlösungen bei normalen p_H -Werten wesentlicher, da sie den Bedingungen im Organismus entspricht. Um zu überprüfen, ob das Nucleoprotein auch andere faserbildende biologische Systeme beeinflusst, wurde eine Gerinnungsanalyse durchgeführt. Es ergab sich hierbei keinerlei Einfluß auf Gerinnungszeit, Thrombelastogramm, Retraktionszeit und Trombocytenfestigkeit.

Es läßt sich also insgesamt sagen, daß die Nucleoprotein-Fraktion in hohen Verdünnungen vor allem auch in Neutralsalzlösungen sehr gut strukturierte Fibrillen ergibt. Die Wirkung ist der von Chondroitinsulfat beträchtlich überlegen. Das Nucleoprotein besitzt keinen Einfluß auf die Blutgerinnung und damit auf die Bildung von Fibrin.

Herrn Professor Dr. KÜHN und Herrn Dr. ADELMANN vom Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung München (Direktor: Professor Dr. GRASSMANN) habe ich für die Überprüfung der Versuche und insbesondere für die Überlassung der Fällungskurve und elektronenoptischen Aufnahme herzlich zu danken.