turell nicht sehr spezialisiert sind, kann beim Menschen und bei anderen Wirbeltierorganismen das essentielle Vitamin B₁₂-Bedürfnis nur mit einer kleinen Zahl von Vitamin B₁₂-Analoga befriedigt werden. Da die Vitamin B₁₂-Resorption beim Wirbeltierorganismus hochgradig strukturspezifisch ist und die Darmbakterien vorwiegend für den Wirtsorganismus nicht verwertbare Vitamin B₁₂-Faktoren produzieren, außerdem die vom Intrinsic Factor abhängige Vitamin B₁₂-Resorption im Dünndarm stattfindet im Gegensatz zu der im Caecum lokalisierten bakteriellen Biosynthese, kann der Vitamin B₁₂-Bedarf des Menschen und anderer Wirbeltierorganismen wohl kaum auf dem Wege einer endogenen Vitamin B₁₂-Synthese durch die Darmflora gedeckt werden.

Wenn auch nach den vorliegenden Ergebnissen die Nichtverwertbarkeit der endogen gebildeten Vitamin B₁₂-Strukturen für die Deckung des Vitamin

B₁₂-Bedarfes des Menschen und des Säugetierorganismus geklärt sein dürfte, so ist die Bedeutung ihres Vorkommens im Darm jedoch noch weitgehend ungeklärt. Es wird der Gegenstand zukünftiger Forschungen sein, festzustellen, inwieweit den vom Wirtsorganismus nicht resorbierbaren, intestinal biosynthetisierten Vitamin B₁₂-Analoga eine Bedeutung als essentielle und regulativ auf die übrige, den Vitaminhaushalt des Wirtes beeinflussende Darmflora wirkende Biotika zukommt.

Den Herren Dr. CH. ROSENBLUM und Dr. H. MOLITOR (Forschungslaboratorien Merck & Co., Rahway/N.J., USA) verdanken wir die freundliche Überlassung biosynthetisch markierter Vitamin B₁₂-Analoga und den Herren Prof. K. BERNHAUER und Dr. W. FRIEDRICH (Aschaffener Zellstoffwerke, Stockstadt/Main) die chemische Umwandlung einiger Vitamin B₁₂-Analoga. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die gewährte Sachbeihilfe.

Chemische und elektronenoptische Untersuchungen über die Reaktion von Chrom (III)-komplexen mit Kollagen

VON K. KÜHN UND ELISABETH GEBHARDT

Aus dem Eduard-Zintl Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

(Z. Naturforsch. 15 b, 23—30 [1960]; eingegangen am 20. November 1959)

Kollagenfibrillen zeigen nach Behandeln mit gerbenden Chrom(III)komplexen im Elektronenmikroskop ein unterteiltes Querstreifungsmuster.

Es wird gezeigt, daß dabei die Ausbildung der Querstreifen auf eine ordnende Quervernetzung der Protofibrillen über die Seitenketten der sauren Aminosäuren zurückzuführen ist.

Kollagenfibrillen zeigen sowohl nach Behandeln mit Phosphorwolframsäure (PWS) als auch nach Behandeln mit gerbend wirkenden Chrom(III)-salzlösungen im Elektronenmikroskop eine hochunterteilte Querstreifung¹. Die relativen Lagen der einzelnen Querstreifen längs der Periode sind nach PWS- und nach Chrombehandlung gleich², obwohl die PWS eine Polysäure ist, während die für die Gerbung bevorzugten Sulfatochrom(III)-komplexe Polybasen sind und obwohl bei PWS-Behandlung über zehnmal mehr Masse eingelagert wird als bei Behandlung mit Chrom(III)-salzlösungen^{1,3}.

Nach Untersuchungen von KÜHN, GRASSMANN und HOFMANN¹ über die Bindung der PWS an Kollagen

ist die Ausbildung einer unterteilten Querstreifung nicht so sehr ein Masseffekt, durch die Einlagerung von Kontrastmitteln in die Dunkelteile verursacht, sondern mehr ein Ordnungseffekt.

Die Grundeinheiten oder die dünnsten Fibrilleneinheiten des Kollagens bestehen nach den Vorstellungen von RICH und CRICK⁴ sowie COWAN und MCGAVIN⁵ aus drei zusammengewundenen Polypeptidspiralen, die durch Wasserstoffbrücken-Bindungen miteinander verbunden sind und deren Aminosäure-Seitenketten nach außen ragen. Diese dünnsten Fasereinheiten des Kollagens werden nach SCHMITT „Protofibrillen“ genannt⁶. Die Aminosäuren sind längs der Peptidketten der Protofibrillen so

¹ K. KÜHN, W. GRASSMANN u. U. HOFMANN, Z. Naturforsch. 13b, 154 [1958].

² K. KÜHN, U. HOFMANN u. W. GRASSMANN, Naturwissenschaften 45, 521 [1958].

³ K. KÜHN, Leder 9, 217 [1958].

⁴ A. RICH u. F. H. C. CRICK, Nature [London] 176, 915 [1955].

⁵ P. M. COWAN u. S. MCGAVIN, Nature [London] 176, 501 [1955].

⁶ F. O. SCHMITT, C. E. HALL u. M. A. JAKUS, J. cellular comp. Physiol. 20, 11 [1942].

angeordnet, daß im charakteristischen Rhythmus Anhäufungen von leichten und Anhäufungen von schweren und polaren Aminosäuren aufeinander folgen^{2, 7, 8, 9}.

Bei unseren Versuchen reagieren die Protofibrillen als ungeteiltes Ganzes und werden durch die salzartige Bindung der PWS an die Guanidogruppen des Arginins so quervernetzt und geordnet, daß die Anhäufungen der schweren und polaren Aminosäuren nebeneinander zu liegen kommen und in Register gebracht werden. Es ist wahrscheinlich, daß die Querstreifung nach Chrombehandlung auf einem ähnlichen Wege zustande kommt. Vermutlich geschieht hier die ordnende Quervernetzung über die Carboxylgruppen der sauren Aminosäuren.

Die Reaktion zwischen Chrom(III)-komplexen und Kollagen ist für die Chromlederherstellung von Bedeutung. Als Maßstab für eine gute Durchgerbung des chrombehandelten Kollagens gilt die Erhöhung des Schrumpfungspunktes. Unbehandelte Fibrillen schrumpfen bei 66°, mit Chrom behandelte zwischen 90 und 100°. Diesen Effekt führt man ebenfalls auf eine Quervernetzung der Polypeptidketten über die sauren Aminosäuren zurück, deren Carboxylgruppen koordinativ in die Chromkomplexe mit einbezogen werden.

Zur Klärung dieser Zusammenhänge haben wir die Bindung kationischer und anionischer Chrom(III)-komplexe an Kollagen, ihre Gerbwirkung und die dabei entstehende Querstreifung untersucht. Wir hofften so, unsere Vorstellungen über die Entstehung der unterteilten Querstreifung zu bestätigen und etwas tiefer in die Theorie der Chromgerbung einzudringen.

Besonders wichtig war die Frage, durch welche funktionellen Gruppen des Kollagens (Carboxyl-, Guanido-, ϵ -Amino- und Hydroxylgruppen) die kationischen und anionischen Chrom(III)-komplexe gebunden werden und welche von ihnen für die Ausbildung einer unterteilten Querstreifung verantwortlich sind. Die von GUSTAVSON¹⁰⁻¹² vertretene Auffassung, daß die Bindung der kationischen Chromkomplexe hauptsächlich durch die Carboxylationen

geschieht, ist in der Literatur allgemein anerkannt (vgl. dazu l. c.^{11, 13, 14}). Nach BOWES und KENTEN¹³, SYKES¹⁴ und GREEN¹⁵ beeinflussen aber auch die Amino- und Hydroxylgruppen die Chrombindung, sie sollen jedoch für die Quervernetzung der Protofibrillen keine Rolle spielen.

Über die Bindung der anionischen Chromkomplexe gehen die Meinungen auseinander. Für die Bindung der Sulfitochrom(III)-komplexe hat GUSTAVSON die Hydroxylgruppen, aber auch die Peptidbindungen verantwortlich gemacht¹², während er für die Oxalatokomplexe eine Bindung an die Aminogruppen des Kollagens annimmt^{12, 16}. Dagegen halten SHUTTLEWORTH¹⁷ und SYKES¹⁴ auch bei den anionischen Chromkomplexen eine Bindung an die Carboxylgruppen für wahrscheinlicher.

Ergebnisse

1. Chromaufnahme, Schrumpfungspunkt und Querstreifung bei Behandlung von Kollagen mit Chrom(III)-salzlösungen verschiedener Zusammensetzung

Zunächst untersuchten wir, unter welchen Bedingungen der Chromgerbung eine unterteilte Querstreifung auftritt. Da reine Chromchlorid- und Chromsulfatlösungen infolge ihrer sauren Reaktion nicht gerbend wirken, müssen sie zunächst mit Natronlauge oder, wie es in der Praxis geschieht, mit Soda „basisch gestellt“ werden. Der Gerber spricht bei Zugabe von $1/2$ Äquivalent NaOH oder $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{Cr}$ von 16-proz., bei Zugabe von 1 Äquivalent NaOH bzw. Na_2CO_3 von 33-proz. basisch gestellten Lösungen, in denen „basische Chrom(III)-komplexe“ vorliegen. Infolge der Alkalizugabe treten zunächst Hydroxylgruppen in die Chromkomplexe ein. Anschließend bilden sich mehrkernige Chromkomplexe, welche man für die gerbende Wirkung verantwortlich macht.

Die von uns verwendeten, mit NaOH versetzten Chromchloridlösungen enthalten reine *Hydroxokomplexe*, da die Chloranionen eine zu geringe Komplexaktivität besitzen, um bei normalen Konzentra-

⁷ R. S. BEAR, *Advances Protein Chem.* **7**, 69 [1952].

⁸ W. GRASSMANN, K. HANNIG, H. ENDRES u. A. RIEDEL, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **306**, 123 [1956].

⁹ K. KÜHN, U. HOFMANN u. W. GRASSMANN, *Naturwissenschaften* **46**, 512 [1959].

¹⁰ K. H. GUSTAVSON, *J. Amer. Leather Chemists Assoc.* **19**, 479 [1924].

¹¹ K. H. GUSTAVSON, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 4608 [1952].

¹² K. H. GUSTAVSON, *J. Soc. Leather Trades' Chemists* **39**, 2 [1955].

¹³ J. H. BOWES u. R. H. KENTEN, *Biochem. J.* **44**, 142 [1949].

¹⁴ R. L. SYKES, *J. Soc. Leather Trades' Chemists* **39**, 56 [1955].

¹⁵ R. W. GREEN, *Biochem. J.* **54**, 187 [1953].

¹⁶ K. H. GUSTAVSON, *J. Amer. chem. Soc.* **48**, 2963 [1926].

¹⁷ S. G. SHUTTLEWORTH, *J. Amer. Leather Chemists Assoc.* **47**, 387 [1952].

Abb. 1. Kollagenfibrille, behandelt mit Chromchloridlösung (1 Mol NaOH/Cr, 20 mg Cr/cm³) 61 mg Cr/g Kollagen, 5- bis 6-fach unterteilte Querstreifung. Nr. 1222/59, elektr.-opt. Vergr. 24 100 : 1.

Abb. 2. Kollagenfibrille, behandelt mit Chromsulfatlösung (1 Mol NaOH/Cr, 5 mg Cr/cm³) 54 mg Cr/g Kollagen, 12-fach unterteilte Querstreifung. Nr. 1126/58, elektr.-opt. Vergr. 50 000 : 1.

Abb. 3. Kollagenfibrillen, mit Säure gequollen. Keine unterteilte Querstreifung. Nr. 926/57, elektr.-opt. Vergr. 14 200 : 1.

Abb. 4. Kollagenfibrille, mit Säure gequollen, behandelt mit Chromsulfatlösung (6 Äquivalente Na₂SO₃/Cr, 1,25 mg Cr/cm³) 246 mg Cr/g Kollagen, 6-7-fach unterteilte Querstreifung. Nr. 900/59, elektr.-opt. Vergr. 24 100 : 1.

Abb. 5. Methylkollagen, behandelt mit Chromsulfatlösung (6 Äquivalente Na₂SO₃/Cr, 1,25 mg Cr/cm³), 56 mg Cr/g Kollagen. Keine unterteilte Querstreifung. Nr. 952/59, elektr.-opt. Vergr. 24 100 : 1.

Abb. 6. Desamino-acetylkollagen, behandelt mit Chromsulfatlösung (6 Äquivalente Na₂SO₃/Cr, 1,25 mg Cr/cm³), 74 mg Cr/g Kollagen, 7-8-fach unterteilte Querstreifung. Nr. 953/59, elektr.-opt. Vergr. 24 100 : 1.

Abb. 1. Mit *Rickettsiella* infizierte Zelle (Spätstadium) (Fixation: saures OsO_4 ; nicht kontrastiert)
Abb. M.: a) 12 800 : 1; b) 25 400 : 1. Völlig von Rickettsiellen erfülltes Cytoplasma.

Abb. 2. *Rickettsiella melolontha* (Fixation: veronal-gepuffertes OsO_4 ; nicht kontrastiert) Abb. M.: a) 32 000 : 1; b) 120 000 : 1.

Abb. 3. Mit *Rickettsiella* infizierte Zelle (Frühstadium)
(Fixation: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; nicht kontrastiert) Abb. M.:
12 800 : 1. — Initialkörper (homolog den NR-bodies) mit
Rickettsien gefüllt.

Abb. 4. Mit *Rickettsiella* infizierte Zelle (Spätstadium) Fixa-
tion: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; Kontrastierung: $\text{P}_2\text{O}_5(\text{WO}_3)_{24} +$
 $\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$. Abb. M.: 12 800 : 1 — Cytoplasma von
Rickettsien erfüllt; A=Albuminoidsphären;
K=Begleitkristalle.

tionen in die Komplexe mit einzutreten (Formel I)¹⁸. Bei den mit Soda versetzten Lösungen können auch noch CO_3^{2-} -Anionen in die Komplexe aufgenommen werden.

Die in den basisch gestellten Chromsulfatlösungen vorliegenden Chromkomplexe enthalten neben den Hydroxylgruppen auch noch Sulfatanionen. Formel II gibt den nach KÜNTZEL und Mitarbb.¹⁹ formulierten Grundtyp solcher *Sulfatochromkomplexe* wieder.

I. Hydroxochrom-Komplex formuliert nach KÜNTZEL¹⁸.

II. Sulfatochrom-Komplex formuliert nach KÜNTZEL u. Mitarbb.¹⁹.

III. Sulfatochrom-Komplex formuliert nach ERDMANN²⁰.

IV. Tetraoxalatodioldichromat(III) nach WERNER²¹.
Tab. 1–3.

Die von uns verwendeten *Sulfatochromkomplexe* wurden durch Zugabe von 6 Äquivalent $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{Cr}$ zu Chromchloridlösungen hergestellt. Nach ERDMANN²⁰ treten dabei mehrere Sulfitanionen auf Grund ihrer großen Komplexaktivität in den Chromkomplex ein, so daß dieser anionisch wird (Formel III).

Aus demselben Grunde sind auch *Oxalatochromkomplexe* anionisch. Formel IV gibt das von uns verwendete und nach WERNER²¹ kristallisiert hergestellte Na-tetraoxalatodioldichromat-(III) wieder.

Es ergab sich, daß alle von uns angesetzten Chrom(III)-salzlösungen, bis auf die Lösung des Na-tetraoxalatodioldichromats, eine im Elektronenmikroskop sichtbare, unterteilte Querstreifung erzielten. Unterteilung und Schärfe der Querstreifungsmuster waren aber verschieden (Tab. 1 a und 1 b). So zeigten die Perioden von 600–700 Å nach Behandeln mit basischen Chromchlorid- und Chromsulfatlösungen vier bis acht, nach Behandeln mit basischen Chromsulfatlösungen vier bis zwölf Querstreifen (Abb. 1* und 2).

Chrombrühe	Konz. d. Lösg. [mg Cr/cm ³]	1/2 Äquiv. OH ⁻ bzw. $\text{CO}_3^{2-}/\text{Cr}$			1 Äquiv. OH ⁻ bzw. $\text{CO}_3^{2-}/\text{Cr}$			1 1/2 Äquiv. OH ⁻ bzw. $\text{CO}_3^{2-}/\text{Cr}$			2 Äquiv. OH ⁻ bzw. $\text{CO}_3^{2-}/\text{Cr}$		
		[mg Cr/g]	Ts	Qu	[mg Cr/g]	Ts	Qu	[mg Cr/g]	Ts	Qu	[mg Cr/g]	Ts	Qu
Cr-chlorid + NaOH	20	46	83	++	61	87	++	73	96	++	117	98	++
Cr-chlorid + Na_2CO_3	20	14	78	++	18	85	++	25	90	++	34	96	++
Cr-alaun + NaOH	20	33	90	+++	48	97	+++	—	—	—	—	—	—
Cr-alaun + NaOH	10	42	92	+++	71	96	+++	89	90	+++	—	—	—
Cr-alaun + NaOH	5	51	91	+++	54	89	+++	96	93	+++	—	—	—
Cr-alaun + Na_2CO_3	20	31	77	++	34	81	++	50	96	++	—	—	—
Cr-alaun + Na_2CO_3	10	39	94	++	67	97	+++	92	93	+++	—	—	—

Tab. 1 a. Chromaufnahme, Schrumpfungspunkt und Querstreifung von Kollagen bei Behandlung mit kationischen Chrom(III)-komplexen verschiedener Zusammensetzung.

Chromaufnahme in mg Cr/g Kollagen. Ts = Schrumpfungspunkt, bei unbehandeltem Kollagen ca. 66 °C. Qu = Querstreifung +++ = 8–12, ++ = 4–8, + = 2–4 Querstreifen.

¹⁸ A. KÜNTZEL, Colloquiumsberichte d. Inst. f. Gerbereichem. Darmstadt, Heft 2, 31 [1948].

* Abb. 1–6 s. Tafel S. 24 a.

¹⁹ A. KÜNTZEL, H. ERDMANN u. H. SPAHRKÄS, Leder 3, 73 [1952].

²⁰ H. ERDMANN, Leder 7, 198 [1956].

Chrombrühe	Konz. d. Lösung [mg Cr/cm ³]	[mg Cr/g]	Ts	Qu
Cr-chlorid + 6 Äquiv. Na ₂ SO ₃ /Cr	1,25	61	80	++
Na-tetraoxalatodioldichromat (III)	3,50	5	68	+

Tab. 1 b. Chromaufnahme, Schrumpfungspunkt und Querstreifung von Kollagen bei Behandlung mit anionischen Chrom (III)-komplexen.

Chromaufnahme in mg Cr/ Kollagen. Ts = Schrumpfungspunkt, bei unhandeltem Kollagen ca. 66 °C. Qu = Querstreifung
++ = 4—8, + = 2—4 Querstreifen.

Dies stimmt mit den Erfahrungen in der Gerberei überein, wo man ebenfalls mit Chromsulfatgerbbrühen die besten Leder erhält.

Von den in Tab. 1 a angegebenen Gerblösungen mit kationischen Chromkomplexen verwendeten wir zu den weiteren Gerbversuchen nur noch die mit NaOH 33-proz. basisch gestellte Chromalaunlösung mit 5 mg Cr/cm³, da wir mit dieser Lösung die best-

unterteilte Querstreifung und die am wenigsten verschmutzten Fibrillen erhielten.

Es ist bemerkenswert, daß die Erhöhung des Schrumpfungspunktes und die Ausbildung einer unterteilten Querstreifung im großen und ganzen parallel miteinander verlaufen. Je höher der Schrumpfungspunkt, desto schärfer unterteilt ist im allgemeinen auch die Querstreifung.

Stöchiometrische Beziehungen zwischen den funktionellen Gruppen im Kollagen ließen sich nicht feststellen. Die Chromaufnahme variiert mit der Zusammensetzung, Konzentration und Basizität der Lösungen.

2. Die Reaktion zwischen kationischen und anionischen Chrom(III)-komplexen und Kollagenpräparaten mit veränderten funktionellen Gruppen

Um festzustellen, welche funktionellen Gruppen des Kollagens für die Ausbildung der unterteilten

	mMol/g Kollagen							
	ε-Amino- gruppen	Guanido- gruppen	Hydroxyl- gruppen	Carboxyl- gruppen				
Kollagen	0,38	0,50	1,70	0,90	R-NH ₂	$\text{R-NH}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array}$	R-OH	$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$
Guanidokollagen	0,13 ¹	0,75 ¹	1,70	0,90	$\text{R-NH}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{R-NH}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array}$	R-OH	$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$
Desaminokollagen pH 4, 4 Stdn.	0,02 ¹	0,49	1,70	0,90	R-OH	$\text{R-NH}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array}$	R-OH	$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$
Desaminokollagen pH 2, 6 Tage	0,04 ¹	0,18 ¹	1,70	0,90	R-OH	R-NH-C≡N ⁴	R-OH	$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$
Desamino- (pH 2, 6 Tage)- acetylkollagen	0,04 ¹	0,18 ¹	0,00 ²	0,90	$\text{R}-\text{OC} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{CH}_3 \end{array}$	R-NH-C≡N ⁴	$\text{R}-\text{OC} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{CH}_3 \end{array}$	$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$
Methylkollagen	0,38	0,50	1,70	0,00 ³	R-NH ₂	$\text{R-NH}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array}$	R-OH	$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OCH}_3 \end{array}$
Desamino- (pH 2, 6 Tage)- methylkollagen	0,04 ¹	0,18 ¹	1,70	0,00 ³	R-OH	R-NH-C≡N ⁴	R-OH	$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OCH}_3 \end{array}$
Desamino- (pH 2, 6 Tage)- acetyl-methylkollagen	0,04 ¹	0,18 ¹	0,00 ²	0,00 ³	$\text{R}-\text{OC} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{CH}_3 \end{array}$	R-NH-C≡N ⁴	$\text{R}-\text{OC} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{CH}_3 \end{array}$	$\text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OCH}_3 \end{array}$

Tab. 2. Veränderung der sauren und basischen Gruppen und der Hydroxylgruppen im Kollagen. 1. Werte von KÜHN, HOFMANN und GRASSMANN¹ übernommen. 2. Acetylgehalt bestimmt nach BOSE und JOSEPH²⁴. 3. Methoxylgruppen bestimmt nach ZEISEL²⁶. 4. Formuliert nach BOWES und KENTEN¹³.

Querstreifung nach Chromgerbung verantwortlich sind, veränderten wir systematisch die basischen und sauren Seitenketten des Kollagens (Tab. 2).

Im *Guanidokollagen* sind die schwach basischen ϵ -Aminogruppen in die stärker basischen Guanidogruppen umgewandelt, im *Desaminokollagen* p_H 4, 4 Std., sind alle ϵ -Aminogruppen und im *Desaminokollagen* p_H 2, 6 Tage, auch noch ein großer Teil der Guanidogruppen durch nicht basische Gruppen ersetzt.

Im *Acetylkollagen* wurden die Hydroxylgruppen blockiert und im *Methylkollagen* die Carboxylgruppen verestert. So enthält das Desamino-acetylkollagen keine basischen Gruppen und keine Hydroxylgruppen, aber noch die Carboxylgruppen und das Desamino-acetyl-methylkollagen praktisch keine Gruppen mehr, die das Chrom zu binden vermögen.

In der rechten Hälfte der Tab. 2 kann man an Hand von Formelbildern die chemischen Veränderungen der funktionellen Gruppen erkennen.

Zur Gerbung dieser Präparate wurden 1. als kationische Chromkomplexe Sulfatochrom(III)-komplexe, 2. die diesen ähnlich aufgebauten anionischen Sulfatochrom(III)-komplexe und 3. das kristallisierte Na-tetraoxalatodioldichromat(III) verwendet.

Der obere Teil der Tab. 3 zeigt, daß bei der Behandlung der Präparate mit Sulfatochrom(III)-komplexen die Vermehrung der Guanidogruppen, das Beseitigen der basischen Gruppen und die Block-

kierung der Hydroxylgruppen nur unwesentliche Veränderungen der Schrumpfungspunkte und der unterteilten Querstreifungsmuster zur Folge hatte. Es findet also eine Gerbung statt, auch wenn die Chromaufnahme bis auf die Hälfte vermindert wird. Sobald jedoch die Carboxylgruppen des Kollagens blockiert sind (unterer Teil der Tab. 3), findet keine Gerbung mehr statt. Die durch die Veresterung der Carboxylgruppen bedingte Quellung der Kollagenfibrillen geht durch die Chromgerbung nicht zurück. Die Bestimmung der Schrumpfungspunkte ist daher nicht möglich. Im Elektronenmikroskop erkennt man nur noch eine sehr verschwommene Querstreifung. Die Chromaufnahme nimmt stark ab (Tab. 3).

Die anionischen Sulfatochrom(III)-komplexe verhalten sich ähnlich wie die kationischen Sulfatokomplexe. Alle Kollagenpräparate mit intakten Carboxylgruppen zeigen erhöhte Schrumpfungspunkte und gut unterteilte Querstreifungsmuster. Sind die Carboxylgruppen aber blockiert, tritt keine Gerbung mehr ein (Tab. 3).

Nach GUSTAVSON hängt die Chromaufnahme nach Gerbung mit Sulfatokomplexen sehr von dem Quellungszustand der Kollagenfibrillen ab¹². Auch in unseren Versuchen nimmt säuregequollenes Kollagen ein Vielfaches an Chrom auf als natives Kollagen. Obwohl säuregequollenes Kollagen und Methylkollagen ungefähr denselben Quellungszustand aufweisen, bindet das letztere bedeutend weniger

	unbehandelt		Chromalaun + 1 Mol OH ⁻ /Cr			Chromchlorid + 6 Äquiv. Na ₂ SO ₃ /Cr			Na-tetraoxalatodioldichromat (III)					
	Ts	Qu	[mg Cr/g]	Ts	Qu	[mg Cr/g]	Ts	Qu	[mg Cr/g]	Ts	Qu	m. Säure hydrolys. [mg Cr/g]	Ts	Qu
Kollagen	66	+	54	89	+++	61	80	++	5	68	+	43	70	++
Guanidokollagen	59	+	37	80	+++	46	100	++	5	57	+	40	76	++
Desaminokollagen p_H 4, 4 Std.	58	+	28	96	+++	36	78	++	5	58	+	43	72	++
Desaminokollagen p_H 2, 6 Tage	51	+	27	83	++	53	80	++	5	56	+	48	76	++
Desamino (p_H 2, 6 Tage)- acetylkollagen	45	+	30	88	++	74	83	++				30	78	++
mit Säure gequollenes Kollagen	—	(+)	67	100	++	246	100	++				49	98	++
Methylkollagen	—	(+)	9	—	(+)	56	—	(+)				21	—	(+)
Desamino (p_H 2, 6 Tage)- methylkollagen	—	(+)	5	—	(+)	40	—	(+)				9	—	(+)
Desamino (p_H 2, 6 Tage)- acetyl-methylkollagen	—	(+)	2	—	(+)	18	—	(+)				9	—	(+)

Tab. 3. Einfluß der basischen und sauren Gruppen und der Hydroxylgruppen auf die Chrombindung des Kollagens.

Chromgehalt in mg Chrom/g Kollagen. Ts = Schrumpfungspunkt, Qu = Querstreifung +++ = 8–12, ++ = 4–8, + = 2–4 Querstreifen.

Chrom. Die Chromaufnahme geht von 246 auf 56 mg Chrom/g Kollagen zurück (Tab. 3).

Behandelt man Kollagen mit dem kristallisiert hergestellten und in Wasser wieder aufgelösten N-tetraoxalatodioldichromat(III), so wird fast kein Chrom aufgenommen. Nach 4 Wochen ist die Chromaufnahme mit 5 mg Chrom/g Kollagen minimal. Schrumpfungspunkt und Querstreifung unterscheiden sich nicht von unbehandeltem Kollagen. Wird dagegen durch Ansäuern der Lösung die Diolbrücke des Oxalatokomplexes aufgespalten, so daß eine Umbildung des Komplexes möglich wird, stellt man schon nach einigen Tagen eine Chromaufnahme fest. Der umgelagerte Oxalatokomplex verhält sich wie die Sulfato- und Sulfitokomplexe. Sobald die Carboxylgruppen blockiert sind, findet auch bei jenem keine Gerbung mehr statt. Der Einfluß der basischen Gruppen auf die Chromaufnahme ist gering. Auffallend ist die geringe Schrumpfungspunkt-Erhöhung bei der Chromoxalatgerbung (Tab. 3).

Im Elektronenmikroskop erkennt man besonders gut, ob eine Gerbung stattgefunden hat, wie an Hand von den mit Sulfitochrom(III)-komplexen behandelten Kollagenpräparaten gezeigt werden soll. In Abb. 3 sieht man die typisch verschwommene Querstreifung einer mit *Säure gequollenen Kollagenfibrille*. Nach Behandeln des gequollenen Kollagens mit Sulfitochrom(III)-komplexen erkennt man im Elektronenmikroskop eine unterteilte Querstreifung (Abb. 4). Die Quellung ist durch die quervernetzende, gerbende Wirkung der Chromkomplexe beseitigt. Behandelt man dagegen die ebenfalls gequollenen Fibrillen aus *Methylkollagen* mit Sulfitochromkomplexen, geht die Quellung nicht zurück (Abb. 5). Eine Quervernetzung ist also auch bei anionischen Chrom(III)-komplexen nur über die Carboxylgruppen möglich. An der unterteilten Querstreifung der mit Sulfitochromkomplexen behandelten Fibrille aus *Desamino-acetylkollagen* (Abb. 6) erkennt man sofort, daß auch in Abwesenheit der basischen Gruppen und der Hydroxylgruppen eine Quervernetzung stattgefunden hat.

Diskussion

Aus dem parallelen Verlauf der Schrumpfungspunkt-Erhöhung und der Ausbildung der unterteilten Querstreifung nach Behandeln mit Chromsalzlösungen geht hervor, daß die Gerbwirkung und die Entstehung einer unterteilten Querstreifung auf dieselben Ursachen zurückzuführen sind. Eine festere

Quervernetzung durch die Chromkomplexe hat auch eine bessere Ordnung der aus den Polypeptidspiralen gebildeten Protofibrillen zur Folge.

Ein weiteres Ergebnis dieser Untersuchungen ist der Nachweis, daß die für diese verfestigende und ordnende Quervernetzung der Protofibrillen verantwortliche Bindung der kationischen und anionischen Chromkomplexe ausschließlich über die Carboxylgruppen des Kollagens erfolgt. Die Reaktion ist insoweit also unabhängig von der Ladung der Komplexe^{14, 17}. Die basischen Gruppen des Kollagens sind für die Quervernetzung der Protofibrillen entbehrlich.

Eine weitere Stütze für die Annahme einer koordinativen Bindung der Chromkomplexe an die Carboxylgruppen des Kollagens ist der Befund, daß nur solche Komplexe mit dem Kollagen quervernetzend reagieren können, die koordinative Stellen für die Aufnahme von mindestens zwei Carboxylgruppen aus benachbarten Protofibrillen frei haben, was der Fall ist, wenn die Komplexe über locker gebundene Wassermoleküle verfügen. Diese Voraussetzung ist bei den Hydroxo-, Sulfato- und Sulfitochrom(III)-komplexen gegeben. An den nach KÜNTZEL und MITARBB.¹⁹ und ERDMANN²⁰ formulierten Grundtypen dieser Komplexe erkennt man einige nur mit H₂O besetzte Koordinationsstellen, die leicht durch Carboxylationen des Kollagens besetzt werden können (Formel II und III).

Anders ist es bei dem Tetraoxalatodioldichromat(III)-anion²¹. Hier sind sämtliche Koordinationsstellen durch stark komplexaktive Oxalationen und Hydroxylgruppen besetzt (Formel IV). Die Carboxylationen können nicht in den Komplex eintreten, und es findet trotz der negativen Ladung des Komplexes fast keine Reaktion mit den basischen Gruppen des Kollagens statt (vgl. dagegen l. c.¹²). Erst wenn durch Säure eine Hydrolyse der Diolbrücken und damit eine Umlagerung des Komplexes, bei der wahrscheinlich H₂O-Moleküle aufgenommen werden, möglich wird, tritt eine Gerbung ein.

Die durch Chromgerbung bewirkte Erhöhung der Schrumpfungspunkte ist bei ein und demselben Präparat am größten bei Sulfatokomplexen, ein wenig geringer bei Sulfito- und am geringsten bei Oxalatokomplexen. Die Ausbildung der unterteilten Querstreifung zeigt einen ähnlichen Gang. Dies deutet darauf hin, daß die Gegenwart der Sulfito- und vor allem der Oxalatoliganden den Eintritt der Carboxylgruppen in den Chromkomplex erschwert. Aus

dem gleichen Grunde steigt die Reaktionszeit der Chromkomplexe mit Kollagen in der Reihenfolge Sulfato-, Sulfito- und Oxalatokomplex (s. experimenteller Teil).

Auf welche Art die basischen Gruppen an der Chromaufnahme beteiligt sind, läßt sich aus unseren Versuchen nicht erkennen. Da nach SHUTTLEWORTH²² die Aminogruppen bei den p_H -Bedingungen der Chromgerbung nicht koordinativ gebunden werden können, nimmt SYKES²³ an, daß sie indirekt an der Chrombindung beteiligt sind. Die Aminogruppen sollen durch Übernahme eines Protons die Dissoziation der Carboxylgruppen fördern und so mehr Carboxylationen zur Bindung des Chroms freimachen.

Die Reaktion zwischen Kollagen und Chrom(III)-komplexen wird dadurch unübersichtlich, daß sich keine stöchiometrischen Beziehungen zwischen der Chromaufnahme und den Carboxylgruppen des Kollagens finden lassen. Dies hat mehrere Gründe: 1. liegen in den Chromlösungen Gemische verschiedenen großer und verschieden zusammengesetzter Chromkomplexe vor, die unterschiedliche Affinität zum Kollagen besitzen, 2. sind bei dem p_H -Wert ($p_H 3 - p_H 5$) der Chromgerbung nicht alle Carboxylgruppen dissoziiert, so daß nur ein Teil von ihnen an der Chrombindung teilnehmen kann, 3. kann die Aufnahme der Chromkomplexe neben der quervernetzenden Bindung an die Carboxylationen vielleicht auch durch andere, keine Gerbung bewirkende Bindungen, z. B. durch Wasserstoffbrücken-Bindungen und van der Waalsche Kräfte, erfolgen.

Ein Beispiel dafür ist die starke Erhöhung der Chromaufnahme bei Gerbung des säuregequollenen Kollagens mit Sulfitochromkomplexen. So kann man auch verstehen, warum Schrumpfungspunkt-Erhöhung und Ausbildung einer unterteilten Querstreifung nicht immer parallel mit der Chromaufnahme verlaufen.

Abschließend können die Ergebnisse dieser Arbeit folgendermaßen zusammengefaßt werden: Bei der Reaktion von Chrom(III)-komplexen mit Kollagen erfolgt die Gerbung durch eine koordinative, verfestigende Quervernetzung der Protofibrillen über

die Carboxylgruppen der Asparagin- und Glutaminsäure. Diese verfestigende Quervernetzung verursacht gleichzeitig eine Ordnung der Protofibrillen im Sinne eines „In-Register-bringens“ der Anhäufungen der polaren und schweren Aminosäuren und damit die Ausbildung einer im Elektronenmikroskop sichtbaren unterteilten Querstreifung.

Experimenteller Teil

Material

Als Ausgangsmaterial diente Achillessehne vom Rind. Die Sehnen wurden mit dem Gefriermikrotom geschnitten und anschließend in einem Homogenisator fein verteilt. Die Kollagenfibrillen bleiben bei dieser Präparation nativ und sind so, im Gegensatz zu Hautpulver, zu elektronenmikroskopischen Untersuchungen geeignet. Gegenüber kompakten Hautstücken erreicht man eine schnellere Durchreaktion und vermeidet eine Einlagerung von vielkernigen Chromkomplexen in die Zwischenräume des Fasergeflechtes, so daß die Chromanalysen nicht so stark verfälscht werden.

Veränderung der funktionellen Gruppen des Kollagens

Die in Tab. 2 wiedergegebenen Kollagenpräparate mit veränderten sauren und basischen Seitenketten wurden wie folgt hergestellt:

Guanidokollagen, Desaminokollagen ($p_H 4$, 4 Stdn.) und *Desaminokollagen* ($p_H 2$, 6 Tage) wurden nach der von KÜHN, GRASSMANN und HOFMANN angegebenen Methode erhalten¹.

Desamino($p_H 2$, 6 Tage)-*acetylkollagen*: Nach einer Vorschrift von BOSE und JOSEPH²⁴ wurden 5 g Desaminokollagen in 50 ml Äthylacetat aufgeschlämmt, mit 30 ml 90-proz. Ameisensäure (als Katalysator) versetzt und 30 ml Essigsäureanhydrid zugegeben. Der Erlenmeyer-Kolben wurde gut verschlossen und unter wiederholtem Umschütteln 7 Tage stehen gelassen. Danach wurde das Präparat gut gewaschen und mit Aceton getrocknet.

Methylkollagen: Einer Vorschrift von BURTON und Mitarbb. entsprechend²⁵, wurde etwa 1 g Kollagen nach vorheriger Trocknung mit Methanol in eine etwa 0,2-n. methanolische Salzsäure gebracht und im verschlossenen Kolben unter öfterem Umschütteln stehen gelassen. Nach 6 Tagen wurde mit Methanol und Äther gewaschen und über P_2O_5 und KOH (zur Bindung der HCl) getrocknet.

Desamino($p_H 2$, 6 Tage)-*methylkollagen*: In der oben beschriebenen Weise wurde auch Desaminokollagen methyliert.

Desamino($p_H 2$, 6 Tage)-*methylacetylkollagen*: Des-

²¹ A. WERNER, Liebigs Ann. Chem. **406**, 261 [1914].

²² S. G. SHUTTLEWORTH, J. Soc. Leather Trades' Chemists **34**, 410 [1950].

²³ R. L. SYKES, J. Soc. Leather Trades' Chemists **38**, 51 [1954].

²⁴ S. M. BOSE u. K. T. JOSEPH, Arch. Biochem. Biophysics **74**, 46 [1958].

²⁵ D. BURTON, J. P. DANBY u. R. L. SYKES, J. Soc. Leather Trades' Chemists **37**, 219 [1953].

²⁶ L. GATTERMANN, Praxis d. org. Chemikers, 32. Aufl., 1947, S. 76.

amino-methylkollagen wurde, wie bei Desamino-acetylkollagen beschrieben, in Äthylacetat mit Essigsäureanhydrid behandelt.

Analyse der chemisch veränderten Kollagenpräparate

Die Analysenwerte für Guanidokollagen und Desaminokollagen wurden von KÜHN, GRASSMANN und HOFMANN¹ übernommen.

Zur Bestimmung des Acetylgehaltes der acetylierten Kollagenpräparate wurde nach der von BOSE und JOSEPH²⁴ benutzten Umesterungsmethode verfahren:

0,5 g Acetylkollagen wurden in einem mit 35 ml wasserfreiem Methanol beschickten Reaktionskolben gebracht. Nach Zugabe einer 0,2-n. Lösung von Na-methylat wurde 2 Stdn. am Rückfluß erhitzt, sodann 25 ml 2-n. H₂SO₄ in Methanol zugegeben, überdestilliert und in einer abgemessenen Menge *n*/10-NaOH aufgefangen. Nach dem Überdestillieren von weiteren 40 ml Methanol wurde 1/2 Stde. am Wasserbad erhitzt und nach dem Abkühlen die überschüssige NaOH mit HCl gegen Phenolphthalein zurücktitriert. Auf die gleiche Weise wurde eine Blindprobe mit normalem Kollagen durchgeführt und der Blindwert vom gefundenen Acetylgehalt abgezogen.

Die quantitative Bestimmung der Methoxylgruppen in den methylierten Kollagenpräparaten wurde nach der Methode von ZEISEL durchgeführt²⁶.

Zur Gerbung wurden folgende Chromsalzlösungen verwendet:

1. Chromchloridlösungen ($[\text{CrCl}_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl} + 2\text{H}_2\text{O}$), Chromgehalt 20 mg Cr/cm³ H₂O, mit 1/2, 1, 1 1/2 und 2 Äquivalenten NaOH bzw. Na₂CO₃/Cr versetzt (16, 33, 50 und 66% basisch), (Hydroxochromkomplexe).

2. Chromalaunlösungen ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), Chromgehalt 5, 10 und 20 mg Cr/cm³ H₂O, mit 1/2, 1 und 1 1/2 Äquivalenten NaOH bzw. Na₂CO₃/Cr versetzt (Sulfatochromkomplexe).

3. Chromchloridlösung ($[\text{CrCl}_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl} + 2\text{H}_2\text{O}$) mit 6 Äquivalenten Na₂SO₃/Cr versetzt, Chromgehalt 1,25 mg Cr/cm³ H₂O (Sulfatochromkomplexe). Um während der Gerbung eine Oxydation der Sulfitanionen zu vermeiden, wurde unter Stickstoff gearbeitet²⁰.

4. Wäßrige Lösung des nach WERNER²¹ kristallisiert hergestellten Na-tetraoxalatodioldichromats-(III), Chromgehalt 3,5 mg Cr/cm³ H₂O (Oxalatochromkomplex). Zur Untersuchung wurde die Lösung geteilt. Teil A wurde unverändert verwendet (pH 5,8), Teil B wurde auf pH 3 angesäuert und stehen gelassen, bis der pH-Wert konstant blieb (nach 3 Tagen pH 5,2).

Der Eintritt der Hydroxylgruppen (Verolung) und die Bildung der mehrkernigen Chromkomplexe geht

nur langsam vor sich. Um stets mit gleichartig zusammengesetzten Chromlösungen arbeiten zu können, wurden von jeder Lösung größere Mengen angesetzt, die ca. 3 Monate stehen gelassen wurden (Alterung). Erst dann wurden sie zur Gerbung verwendet.

Die Gerbdauer betrug bei Hydroxo- und Sulfatokomplexen 24 Stdn., bei Sulfitokomplexen 48 Stdn. und bei Oxalatkomplexen 4 Wochen (Teil A) bzw. 14 Tage (Teil B).

Chrombestimmung

Es wurde nach der Methode der Society of Leather Trades Chemists (SLTC) gearbeitet²⁷, die wir in den Halbmikromaßstab übertrugen: Etwa 30 mg des mit Chrom behandelten Kollagens wurden mit 1 cm³ rauchender HNO₃ und 2 cm³ eines Gemisches von HClO₄ (60%) und H₂SO₄ (98%) (3 : 1) versetzt und bis zur vollständigen Oxydation des Cr(III) erhitzt. Nach raschem Abkühlen wurden 5 cm³ 50-proz. H₂SO₄ zugegeben und zur Entfernung des Chlors 10 Min. gekocht. Nach dem Abkühlen wurde gegen *n*/100-Eisen(II)-ammonsulfatlösung und Ferroin als Indikator titriert. Der Chromgehalt wurde in mg Cr/g Kollagen angegeben.

Die Menge des Kollagens wurde aus dem Stickstoffgehalt (nach Kjeldahl) der chromgegerbten Präparate berechnet, nachdem vorher die Stickstoffgehalte der mit Alkohol und Äther gewaschenen und über P₂O₅ getrockneten ungegerbten Kollagenpräparate bestimmt worden waren.

Die Schrumpfungspunkte wurden ähnlich der Methode von BORASKY und NUTTING²⁸ bestimmt: Die mit Aufschlämmungen von Kollagenfäserchen beschickten Schmelzpunktröhrchen wurden in eine mit H₂SO₄ gefüllte Schmelzpunktapparatur gebracht und das Verhalten der Fäserchen beim langsamen Erhitzen durch ein Stereomikroskop betrachtet. Als Schrumpfungstemperatur (*T*_s) wurde der Wert angegeben, bei dem sich die Hauptmenge der Fäserchen zu einer Masse zusammengeballt hat. Die Schrumpfungspunkte lagen durchschnittlich um 5–10% der Celsiusgrade tiefer als im Faserverband.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden die Fasern in Wasser aufgeschlämmt und auf mit Kollodium befilmte und mit Kohle bedampfte Blenden aufgebracht. Die Untersuchungen wurden mit einem Siemens UM 100 e und bei einer Strahlspannung von 80 kV durchgeführt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für großzügige Unterstützung.

Besonderen Dank schulden wir Herrn Prof. Dr. U. HOFMANN für wertvolle Anregungen und Diskussionen sowie für die Unterstützung mit den Mitteln des Institutes.

²⁷ Soc. Leather Trades' Chemists, Official Methods of Analysis, 1957, S. 86.

²⁸ R. BORASKY u. G. C. NUTTING, J. Amer. Leather Chemists Assoc., 44, 830 [1949].