

# Struktur­dynamik isocyanatvernetzter Kollagenfasern; Anwendung der Synchrotronstrahlung in der Makromolekularen Chemie\*\*

Von Erika Mosler, Hans Dieringer, Peter P. Fietzek, Waltraud Folkhard, Ernst Knörzer, Michel H. J. Koch und Theobald Nemetschek\*

Professor Klaus Kühn zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Umsetzung von Kollagen mit Mono- und Dialdehyden<sup>[1]</sup> sowie mit bifunktionellen Reaktivgerbstoffen<sup>[2]</sup> führt infolge zusätzlicher Vernetzungen zum Anstieg der Thermostabilität (Schrumpfungstemperatur  $T_m$ ), der mechanischen Festigkeit und der enzymatischen Resistenz fibrillär organisierter Makromoleküle. Eine Unterscheidung zwischen intermolekularen und interfibrillären Vernetzungen bereitete jedoch bislang nicht nur chemisch-analytisch, sondern auch strukturanalytisch Schwierigkeiten. Eine strukturanalytische Erfassung vernetzungsrelevanter Modifikationen wäre im Röntgen-Kleinwinkeldiagramm der Fasern auf der Basis dynamisch induzierter Intensitätsänderungen im Prinzip denkbar, denn diese Änderungen ste-

hen in Beziehung zu einem experimentell beeinflussbaren Gleitvorgang parallel assoziierter Kollagenmoleküle<sup>[3,4]</sup>. Entsprechende Analysen waren jedoch erschwert, da schon die Vernetzungen mit Aldehyden zu Intensitätsänderungen im Faserdiagramm<sup>[5]</sup> führen.

Diisocyanate<sup>[6]</sup> wie Hexamethylendiisocyanat (HMDI) wirken ebenfalls vernetzend auf Kollagen<sup>[7]</sup>. Wie aus Abbildung 1a und b ersichtlich, führt jedoch die mit HMDI umgesetzte Probe bei sonstiger Übereinstimmung mit aldehydvernetzten Fasern im Röntgen-Kleinwinkeldiagramm zu Reflexen, deren Intensitäten  $I$  und Periodizität mit denen nativer Sehnenfasern vergleichbar sind. Dieser zunächst unerwartete Befund kann auf die praktisch gleiche Elektronendichte von HMDI und dem Hydratwasser nativ feuchter Kollagenfasern zurückgeführt werden. Das Ausbleiben eines Einflusses von HMDI auf das Röntgen-Kleinwinkelspektrum der Fasern eröffnet damit erstmals einen experimentellen Weg, die Struktur­dynamik<sup>[9]</sup> auch künstlich vernetzter Kollagenfasern zu quantifizieren<sup>[10]</sup>.

Die in Abbildung 2 im Kasten eingetragene Schrumpfungstemperatur  $T_m$  läßt eine Abhängigkeit von der Vernetzungsdauer erkennen; dieser Befund ließ erwarten, daß das Gleitvermögen parallel angeordneter Kollagenmoleküle vermindert ist. Tatsächlich wird durch die in Abbildung 2 groß dargestellte verzögerte Zunahme von  $I_2/I_3$  eine als Funktion von  $T_m$  reduzierte molekulare Gleitfähigkeit und somit ansteigende intermolekulare Vernetzung angezeigt.

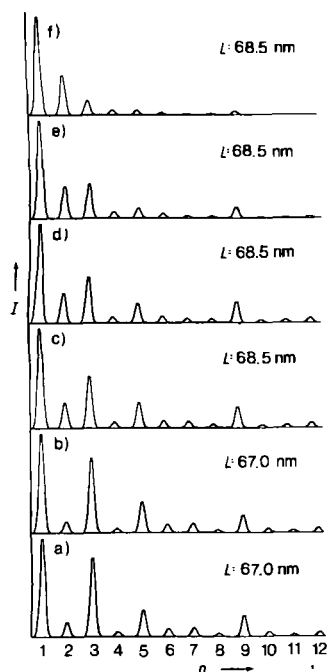


Abb. 1. Meridionale Röntgen-Kleinwinkelspektren von ungedehnten (a, b) und gedehnten (c-f) Kollagenfasern (KF); „molekulare Länge“  $\Delta L$  bei c-f: 2,24%. a) Native KF;  $\sigma=0$ ;  $I_2/I_3=0.2$ ; b) KF 60 min mit HMDI vernetzt;  $\sigma=0$ ;  $I_2/I_3=0.15$ ; c) KF 60 min mit HMDI vernetzt;  $\sigma>0$ ;  $I_2/I_3=0.48$ ; d) KF 30 min mit HMDI vernetzt;  $\sigma>0$ ;  $I_2/I_3=0.65$ ; e) KF 15 min mit HMDI vernetzt;  $\sigma>0$ ;  $I_2/I_3=0.95$ ; f) native KF;  $\sigma>0$ ;  $I_2/I_3=2.8$ . Die Fasern (Rattenschwanzsehn) wurden nach Vernetzung mit Ringerlösung gewaschen oder befanden sich in dieser während der Messung.  $I$  = Intensität;  $n$  = Ordnung;  $L$  = Langperiode;  $\sigma$  = Faserspannung; die Intensität der 1. Ordnung wurde um den Faktor 10 verkleinert dargestellt; Meßzeit: 3 s je Spektrum; Anpassung der Maxima und Abzug des Untergrundes durch eine nichtlineare Regressionsanalyse [8]; man beachte die Intensität der Reflexe 2. und 3. Ordnung ( $I_2$  und  $I_3$ ).

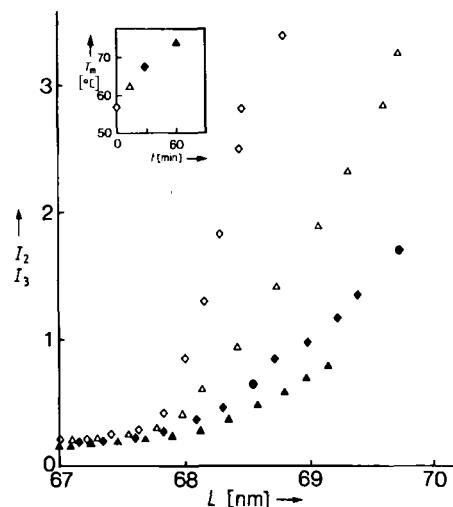


Abb. 2. Kasten: Schrumpfungstemperatur  $T_m$  von Sehnenfasern (aus Rattenschwanz) in Ringerlösung; nativ (◇) und als Funktion der Vernetzungsdauer  $t$  (Δ: 15 min; ◆: 30 min; ▲: 60 min). Groß: Aus meridionalen Röntgen-Kleinwinkelspektren bestimmte dehnungsinduzierte Änderung des Intensitätsverhältnisses von 2. und 3. Ordnung ( $I_2/I_3$ ) als Funktion der Langperiode  $L$  und der Schrumpfungstemperatur  $T_m$ ; Bedeutung von ◇, Δ, ◆ und ▲ siehe oben.

Durch Vergleich der in Abbildung 1c-f gegenübergestellten Kurzzeitbeugungsspektren besteht weiter die Möglichkeit, an den verschieden lang mit HMDI behandelten Kollagenfasern aus dem  $I_2/I_3$ -Wert im Verhältnis zu  $\Delta L$ , eine als Funktion der Reaktionszeit differenzierte Analyse des Vernetzungsgrads durchzuführen.

Diese Befunde dürften beispielhaft nicht nur für Kollagenfasern, sondern auch für andere, einer strukturdynamischen Röntgenbeugungsanalyse zugängliche faserige Bio- und Hochpolymere sein.

Eingegangen am 20. Januar 1987 [Z. 2058]

\* Prof. Dr. T. Nemetschek, Dr. E. Mosler, Dr. W. Folkhard, Chem.-Ing. E. Knörzer, Pathologisches Institut der Universität, Abteilung für Ultrastrukturforschung, Im Neuenheimer Feld 326, D-6900 Heidelberg  
Dr. H. Dieringer, Prof. Dr. P. P. Fietzek, Carl Freudenberg GB Bioproducte, D-6940 Weinheim  
Dr. M. H. J. Koch, EMBL-Außenstelle DESY, D-2000 Hamburg

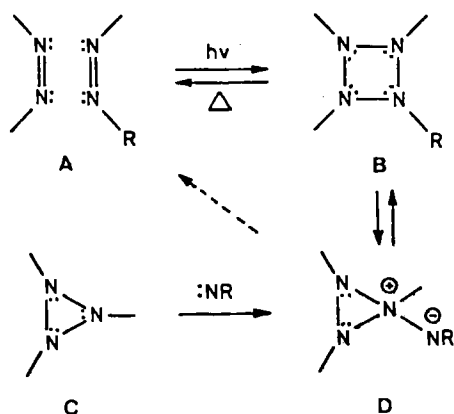
\*\* Struktur­dynamik, 6. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert. - 5. Mitteilung: [9].

- [1] K. H. Gustavson (Hrsg.): *The Chemistry and Reactivity of Collagen*, Academic Press, New York 1956.  
 [2] H. Zahn, D. Wegerle, *Kolloid.-Z.* 172 (1960) 29.  
 [3] E. Mosler, W. Folkhard, E. Knörzer, H. Nemetschek-Gansler, T. Nemetschek, M. H. J. Koch, *J. Mol. Biol.* 182 (1985) 589.  
 [4] Eine beugungsanalytische Erfassung dieses molekularen Gleitvorganges wurde erst durch Einsatz der Synchrotronstrahlung (wegen der um den Faktor  $10^3$  kürzeren Expositionszeit) möglich, da eine Relaxation der Fasern, gleichbedeutend mit einer Rückstellung der Moleküle, innerhalb von Sekunden einsetzt. Die Anzeige erfolgt im Röntgen-Beugungsdiagramm durch einen Reflex bei ca. 67 nm sowie dessen höheren Ordnungen mit Aussagekraft für eine dynamisch modifizierbare axiale Langperiode, die auf einer gestaffelten Parallelaggregation der ca. 300 nm langen Kollagenmoleküle beruht. Die Registrierung der Kleinwinkelspektren erfolgte mit der Kamera X33 vom EMBL in Kombination mit einem ortsempfindlichen Detektor [3].  
 [5] R. Jonak, H. Nemetschek-Gansler, T. Nemetschek, H. Riedl, J. Bordas, M. H. J. Koch, *J. Mol. Biol.* 130 (1979) 511.  
 [6] O. Bayer, *Angew. Chem.* 59 (1947) 257.  
 [7] K. Eitel, *Leder* 4 (1953) 234.  
 [8] V. Schilling, R. Jonak, T. Nemetschek, H. Riedl, C. Pöppe, E. Schwaner, *Z. Naturforsch. C36* (1981) 333.  
 [9] W. Folkhard, W. Geercken, E. Knörzer, M. H. J. Koch, E. Mosler, H. Nemetschek-Gansler, T. Nemetschek, *J. Mol. Biol.* 193 (1987) 405.  
 [10] W. Folkhard, E. Mosler, W. Geercken, E. Knörzer, H. Nemetschek-Gansler, T. Nemetschek, M. H. J. Koch, *Int. J. Biol. Macromol.* 9 (1987), im Druck.

## Außergewöhnlich stabile *cis,cis*-Trialkyltriaziridine durch Azo/Nitren-Addition\*\*

Von Otmar Klingler und Horst Prinzbach\*

Alle Versuche, Tetrazetidine **B** durch Photo-Azo/Azo-Cycloaddition (**A** → **B**) zugänglich zu machen, blieben bislang erfolglos; nur im Falle eines Azoxy/Azo-Substrats konnte das Tetrazetidinoxid als Intermediat der Photo-Metathesereaktion wahrscheinlich gemacht werden<sup>[1]</sup>. Als alternativen Zugang zu kinetisch stabilisierten Tetrazetidinen **B** verfolgen wir die Ringerweiterung der durch Nitren-Addition an Triaziridine **C** angestrebten Ylide **D**. Hier berichten wir über die Herstellung von *cis,cis*-Trialkyltriaziridinen.

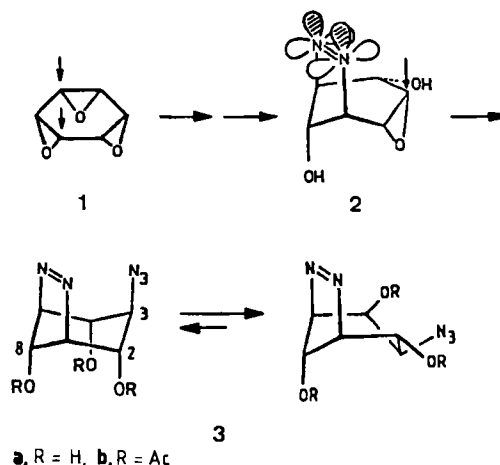


Die von Dreiding et al. beschriebenen, thermisch labilen Triaziridine<sup>[2]</sup>, wie auch nachfolgende Beispiele<sup>[3]</sup>, wurden durch Photocyclisierung acceptorsubstituierter Azimine gewonnen. Bei früheren Versuchen zur hier verfolgten in-

[\*] Prof. Dr. H. Prinzbach, Dipl.-Chem. O. Klingler  
 Chemisches Laboratorium der Universität  
 Institut für Organische Chemie und Biochemie  
 Albertstraße 21, D-7800 Freiburg

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der BASF AG gefördert.

tra- oder intermolekularen Azo/Nitren-Addition konnten bestenfalls Azimine isoliert werden<sup>[2,4]</sup>. Der dafür mitverantwortlichen Labilität des Triaziridinringes wird bei unserem Vorgehen<sup>[5]</sup> durch Einbau des  $N_3$ -Ringes in ein starres Molekülskelett entgegengewirkt; dieses garantiert zugleich eine hohe Nahordnung der Azo/Azid-Chromophore und die Platzierung des potentiellen Nitrens in der  $N=N$ - $\pi$ -Ebene.



Ausgehend von *cis*-Benzotrioxazol 1 ist über ein Zwischenprodukt der Streptamin-Synthese<sup>[6]</sup> das Azoepoxydiol 2 zugänglich<sup>[7]</sup>. Die Epoxidöffnung in 2 durch  $N_3^-$  ( $NaN_3$ ,  $Al_2O_3$ ,  $CH_3OH/H_2O$ , Raumtemp.) verläuft auch unter Katalyse langsam, doch ausreichend selektiv an C-4 zum kristallinen  $C_s$ -symmetrischen Triol 3a, (50–60%,  $J_{1,8} = 5.3$ ,  $J_{2,3} = 8.8$  Hz), welches, wie auch das Triacetat 3b ( $\lambda_{max}(CH_3CN) = 346$  nm ( $\epsilon = 150$ );  $J_{1,8} = 5.3$ ,  $J_{2,3} = 7.0$  Hz), bevorzugt in einer abgeflachten Bootkonformation mit quasi-äquatorialem Azidrest vorliegt. Aus 3a gewinnt man mit Orthoameisensäuretrimethylester das Trioxaadaman- tan 4a (Fp = 174°C, 70%), mit Orthoessigsäuretrimethylester 4b (Fp = 135°C, 66%), mit  $POCl_3$  4c (Fp = 211°C (Zers.), 60%) und mit  $P(OPh)_3$  4d (Fp = 175°C (Zers.), 70%)<sup>[8]</sup>. Die in 4a–d erzwungene axiale Stellung des Azidrestes und damit dessen Nähe zur Azogruppe ist unter anderem durch die kleinen  $J_{1,11}$ - und  $J_{10,11}$ -Kopplungen (ca. 3 Hz) sowie die relativ langwelligen UV-Absorptionen (z. B. 4a:  $\lambda_{max}(CH_3CN) = 361$  nm ( $\epsilon = 530$ )) bewiesen.

