

Strukturodynamik 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^[1] sowie mit bifunktionellen Reaktivgerbstoffen^[2] 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 bereite 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-

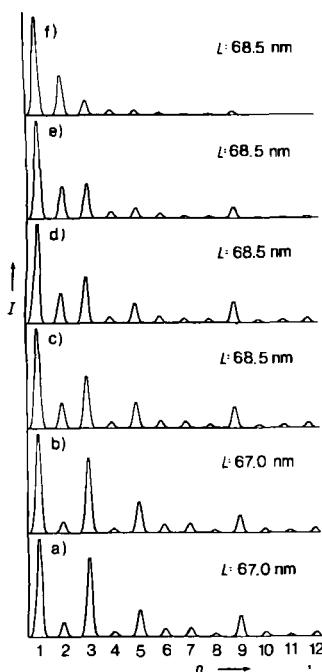


Abb. 1. Meridionale Röntgen-Kleinwinkelspektren von ungedehnten (a, b) und gedeckten (c-f) Kollagenfasern (KF); „molekulare Längung“ ΔL bei c-f: 2.24%; a) Native KF; $\sigma=0$; $I_2/I_3=0.2$; b) KF 60 min mit HMDI vernetzt; $\sigma=0$; $I_2/I_3=0.15$; c) KF 60 min mit HMDI vernetzt; $\sigma>0$; $I_2/I_3=0.48$; 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 (Rattenschwanzsehnen) wurden nach Vernetzung mit Ringerlösung gewaschen oder befanden sich in dieser während der Messung. I = Intensität; n = Ordnung; L = Langperiode; σ = 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).

[*] 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 Bioprodukte, D-6940 Weinheim

Dr. M. H. J. Koch
EMBL-Außenstelle DESY, D-2000 Hamburg

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

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

Diiisocyanate^[6] wie Hexamethylendiisocyanat (HMDI) wirken ebenfalls vernetzend auf Kollagen^[7]. 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 Strukturodynamik^[9] auch künstlich vernetzter Kollagenfasern zu quantifizieren^[10].

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.

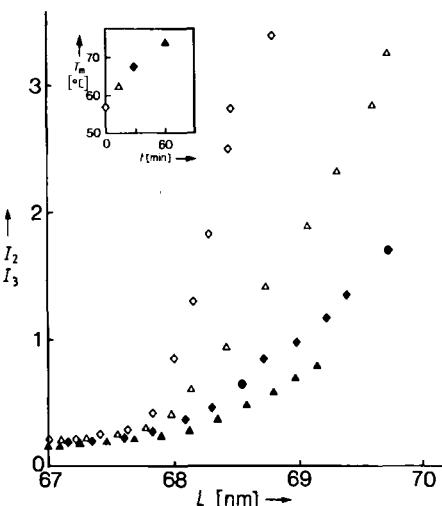


Abb. 2. Kasten: Schrumpfungstemperatur T_m von Sehnenfasern (aus Rattenschwanz) in Ringerlösung; nativ (\diamond) und als Funktion der Vernetzungsdauer t (Δ : 15 min; \bullet : 30 min; \blacksquare : 60 min). Grob: Aus meridionalen Röntgen-Kleinwinkelspektren bestimmte dehnungsinduzierte Änderung des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

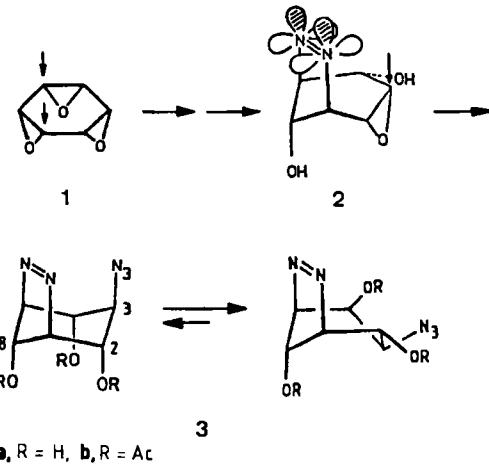
Durch Vergleich der in Abbildung 1c-f gegenübergestellten Kurzzeitbeugungsspektren besteht weiter die Möglichkeit, an den verschieden lang mit HMDI behandelten Kollagenfasern aus dem I_2/I_3 -Wert im Verhältnis zu ΔL , eine als Funktion der Reaktionszeit differenzierte Analyse des Vernetzungsgrads durchzuführen.

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

Eingegangen am 20. Januar 1987 [Z 2058]

- [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 Expositionzeit) 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 X 33 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. Pöppel, E. Schwaner, *Z. Naturforsch.* C 36 (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.

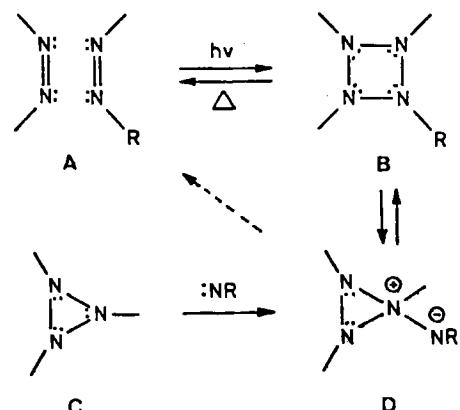
tra- oder intermolekularen Azo/Nitren-Addition konnten bestenfalls Azimine isoliert werden^[2,4]. Der dafür mitverantwortlichen Labilität des Triaziridinringes wird bei unserem Vorgehen^[5] durch Einbau des N₃-Ringes in ein starres Molekülskelett entgegengewirkt; dieses garantiert zugleich eine hohe Nahordnung der Azo/Azid-Chromophore und die Plazierung des potentiellen Nitrens in der N=N- π -Ebene.



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

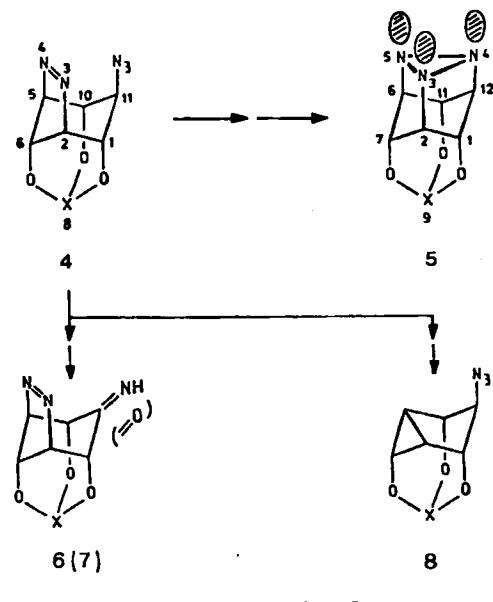
Von *Otmar Klingler* und *Horst Prinzbach**

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^[11]. Als alternativen Zugang zu kinetisch stabilisierten Tetrazetidinen **B** verfolgten 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^[2], wie auch nachfolgende Beispiele^[3], wurden durch Photocyclisierung acceptorsubstituierter Azimine gewonnen. Bei früheren Versuchen zur hier verfolgten in-

Ausgehend von *cis*-Benzoltrioxid **1** ist über ein Zwischenprodukt der Streptamin-Synthese^[6] das Azoepoxydiol **2** zugänglich^[7]. Die Epoxidöffnung in **2** durch N₃⁺ (NaN₃, Al₂O₃, CH₃OH/H₂O, Raumtemp.) verläuft auch unter Katalyse langsam, doch ausreichend selektiv an C-4 zum kristallinen *C*-symmetrischen Triol **3a**, (50–60%, $J_{1,8} = 5.3$, $J_{2,3} = 8.8$ Hz), welches, wie auch das Triacetat **3b** ($\lambda_{\max}(\text{CH}_3\text{CN}) = 346$ 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 Trioxadamantan **4a** ($F_p = 174^\circ\text{C}$, 70%), mit Orthoessigsäuretrimethyl-ester **4b** ($F_p = 135^\circ\text{C}$, 66%), mit POCl₃ **4c** ($F_p = 211^\circ\text{C}$ (Zers.), 60%) und mit P(OPh)₃ **4d** ($F_p = 175^\circ\text{C}$ (Zers.), 70%)^[8]. Die in **4a–d** erwogene 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**: $\lambda_{\max}(\text{CH}_3\text{CN}) = 361$ nm ($\epsilon = 530$)) bewiesen.



* 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.