

Caroline Vogler

„Quantifizierung verschiedener Kollagentypen in Gewebeproben mittels  
elektrophoretischer und chromatographischer Methoden“

eingereicht als

DIPLOMARBEIT

an der

HOCHSCHULE MITTWEIDA

---

UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Fachbereich Mathematik/Physik/Informatik

Freiberg, 2009

Erstprüfer: Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

Zweitprüfer: Dr. rer. nat. Michael Meyer

Vorgelegte Arbeit wurde verteidigt am: 19.10.2009

**Bibliographische Beschreibung:**

Vogler, Caroline:

Quantifizierung verschiedener Kollagentypen in Gewebeproben mittels elektrophoretischer und chromatographischer Methoden. – 2009. - 105 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fachbereich Mathematik/Physik/Informatik,  
Diplomarbeit, 2009

**Referat:**

Ziel der Diplomarbeit ist es, verschiedene Gewebeproben in Bezug auf Art und Anteil der in ihnen enthaltenen Kollagentypen zu charakterisieren. Im ersten Teil dieser Arbeit werden unterschiedliche Kollagentypen aus verschiedenen Gewebematerialien mit Hilfe einer fraktionierten Salzfällung extrahiert. Die gewonnenen Fraktionen werden gesammelt und anschließend durch eine Bromcyanspaltung in definierte Peptide gespalten. Im zweiten Teil der Arbeit soll überprüft werden, inwiefern die einzelnen Kollagentypen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Elektrophorese und Western Blot identifiziert sowie quantifiziert werden können. Zum Schluss erfolgt eine Bewertung der Praxistauglichkeit dieser Methoden zur Bestimmung der unterschiedlichen Kollagentypen.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Petra Radehaus von der Fachhochschule Mittweida für die freundliche Betreuung und Unterstützung während meines Studiums an der FH Mittweida und speziell während der Diplomarbeit.

In gleicher Weise danke ich Herrn Dr. Michael Meyer, Leiter des Fachbereiches Leder / Biopolymere im Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen in Freiberg, für die Möglichkeit, dieses interessante Thema bearbeiten zu können und seine stets kompetente und freundliche Betreuung.

Mein besonderer Dank geht aber an Frau Dipl.-Lebensmittelchemikerin Ines Stachel. Sie war mir durch ihre motivierende Art und ihre Hilfe bei organisatorischen, technischen und wissenschaftlichen Fragen eine sehr große Unterstützung bei der Umsetzung und dem Schreiben dieser Arbeit.

Frau Rita Sachse gebührt mein Dank für ihre geduldige Hilfestellung während der chromatographischen Untersuchungen.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Sabine Kleinwechter für die Messungen mit dem Verfahren der Dynamischen Differenzkalorimetrie sowie für die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Sandra, Marit und Diana für die stetige Ermutigung und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Fachbereiches Leder / Biopolymere danke ich für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre sowie für ihre Hilfestellung und Unterstützung.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meinem Freund René danken, die immer für mich da sind und mich in jeder Hinsicht unterstützen.

# **Inhaltsverzeichnis**

## **Abkürzungsverzeichnis**

## **Abbildungsverzeichnis**

## **Diagrammverzeichnis**

## **Tabellenverzeichnis**

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen.....	3
2.1	Kollagen .....	3
2.1.1	Die Struktur der Kollagentripelhelix .....	3
2.1.2	Die Biosynthese .....	5
2.1.3	Die Kollagenfamilie.....	8
2.2	Gewinnung und Anwendung von Kollagen .....	18
2.2.1	Extraktionsmethoden .....	20
2.2.2	Enzymatischer Abbau .....	22
2.2.3	Reduktion .....	23
2.2.4	Fraktionierte Salzfällung.....	25
2.3	Charakterisierung von Kollagen.....	26
2.3.1	Bromcyanspaltung .....	26
2.3.2	Elektrophorese.....	29
2.3.3	Western Blot.....	34
2.3.4	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie .....	41
3	Experimenteller Teil.....	46
3.1	Chemikalien.....	46
3.2	Verbrauchsmaterial .....	47
3.3	Geräte .....	48
3.4	Untersuchungssubstanzen .....	48

3.5	Methoden.....	49
3.5.1	Methoden zur fraktionierten Salzfällung der einzelnen Kollagentypen .....	49
3.5.2	Doppel-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	51
3.5.3	Western Blot.....	54
3.5.4	HPLC-Methoden .....	57
4	Ergebnisse und Diskussion .....	60
4.1	Entwicklung und Optimierung der Doppel-SDS-Gelelektrophorese .....	60
4.1.1	Erste Elektrophorese .....	60
4.1.2	Zweite Elektrophorese .....	63
4.2	Extraktion von Schweine- und Rindshaut mit anschließender fraktionierter Salzfällung .....	69
4.2.1	NaCl-Fällung nach Neutralsalz-Extraktion.....	69
4.2.2	NaCl-Fällung von bereits aus Haut isoliertem Kollagen .....	71
4.2.3	NaCl-Fällung nach saurer Extraktion .....	72
4.2.4	NaCl-Fällung nach saurer Extraktion mit Pepsin .....	76
4.3	Größenausschlusschromatographie .....	80
4.3.1	Kollagenstandards.....	80
4.3.2	Reduktion .....	84
4.3.3	Analyse der einzelnen Fraktionen nach verschiedenen Extraktionsmethoden von Rinderhaut .....	85
4.4	Ionenaustauschchromatographie .....	92
4.5	Western Blot.....	94
5	Zusammenfassung.....	102
6	Ausblick.....	104
7	Anlagen.....	105

**Literaturverzeichnis**

**Erklärung zur selbständigen Anfertigung der Arbeit**

**Abkürzungsverzeichnis**

AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat
BrCN	Bromcyan
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CB	Kurzbezeichnung für Bromcyanpeptid
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
COO <sup>-</sup>	Carboxylat-Ion
DDK	Dynamische Differenzkalorimetrie
dest.	destilliert
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DTT	Dithiothreitol
E	elektrisches Feld
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACITs	fibril-associated collagens with interrupted triple helices (Fibrillenassoziierte Kollagene)
Gly	Glycin
HCl	Salzsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie)
Hyp	Hydroxyprolin
IgG	Immunglobulin G
K	Kraft
Met	Methionin
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion

NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau Tetrazolium
NR <sub>3</sub> <sup>+</sup>	quartäre Ammoniumgruppen
PAG	Polyacrylamidgel
pI	Isoelektrischer Punkt
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q	geladenes Teilchen
r	Radius der Teilchen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
SLK	Säurelösliches Kollagen
SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Sulfit-Ion
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
v	Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens
V <sub>0</sub>	Ausschlussvolumen
V <sub>e</sub>	Elutionsvolumen
α <sub>1</sub> , α <sub>2</sub> , α <sub>3</sub> , α <sub>4</sub> , α <sub>5</sub> , α <sub>6</sub>	monomere α-Ketten des Kollagens
β	dimere Komponente des Kollagens
γ	trimere Komponente des Kollagens
η	Viskosität der Flüssigkeit

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung der Struktur einer einzelnen linksgängigen Kollagen-Helix (Koolman und Röhm, 2002) .....	3
Abbildung 2:	Aufbau der Kollagentripelhelix (Alberts et al., 2004) .....	4
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der intra- und extrazellulären Vorgänge bei der Kollagenbiosynthese (Gerok et al., 2007).....	6
Abbildung 4:	Schema der Fibrillenbildung (Gelse et al., 2003) .....	7
Abbildung 5:	Die Strukturebenen des Kollagens (1) Faserbündel, (2) Faser, (3) Fibrillen, (4) Mikrofibrille, (5) Tropokollagen, (6) $\alpha$ -Helix, (Schwaller, 2009) .....	8
Abbildung 6:	Die Entdeckung der Kollagenfamilie (Ricard-Blum, et al., 2005) .....	9
Abbildung 7:	Die Anordnung von nicht-fibrillären Kollagenen (Fratzl, 2008).....	16
Abbildung 8:	Struktur des Kollagentyp VI (Schulze, 2005).....	17
Abbildung 9:	Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit von Trypsin in Abhängigkeit vom pH-Wert im Vergleich zum Enzym Pepsin (Peri, 2009) .....	23
Abbildung 10:	Reduktive Spaltung der Disulfidbrücken durch Dithiothreitol, 2-Mercaptoethanol und Tributylphosphin (Schäfer, 2007).....	24
Abbildung 11:	Reaktionsschema der Bromcyanspaltung (Lottspeich und Engels, 2006) .....	27
Abbildung 12:	Darstellung der Bromcyan-Peptide der $\alpha_1$ - und $\alpha_2$ -Kette des Kollagentyp I (Nimni, 1974) .....	28
Abbildung 13:	Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (Häfner et al., 2009) .....	31
Abbildung 14:	Das Prinzip der diskontinuierlichen Elektrophorese (Westermeier, 1990) .....	32



---

Abbildung 15: Aufbau eines Blotsandwichs beim Semidry-Blotting (Lottspeich und Engels, 2006) .....	38
Abbildung 16: Verwendung eines mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpers zur Detektion (Häfner et al., 2009).....	41
Abbildung 17: Schematische Darstellung eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (Lindsay, 1996).....	42
Abbildung 18: Darstellung eines typischen Elutionsdiagrammes (Richter, 2003) .....	45
Abbildung 19: Darstellung der einzelnen Kollagentypen und Kollagen-Proben in einem 12 %igen Polyacrylamidgel.....	61
Abbildung 20: Darstellung der einzelnen reduzierten Kollagentypen und Kollagen-Proben in einem 8 %igen Polyacrylamidgel .....	62
Abbildung 21: Darstellung des Bandenmusters vom Rinder-SLK auf einem 8-16 % Gel vor dem Ausschneiden der beiden $\alpha$ -Banden für die BrCN-Spaltung. ....	63
Abbildung 22: Darstellung der Bromcyanpeptide der beiden $\alpha$ -Banden vom Rinder-SLK bei einer Inkubationszeit von fünf Stunden und einer Temperatur von 30 °C (12 %iges Gel) .....	64
Abbildung 23: Darstellung der entsalzten Bromcyanpeptide von den Proben Fisch-SLK (Spur 1) und Rinder-SLK (Spur 2) (12 %iges Gel).....	65
Abbildung 24: Densitometrische Auswertung der Bromcyanpeptide des Rinder-SLK.....	67
Abbildung 25: Densitometrische Auswertung des Typ III-Kollagens .....	68
Abbildung 26: Darstellung der ersten (linke Spur) und zweiten (rechte Spur) Fraktion aus dem Neutralsalz-Extrakt von Schweinehaut (12 %iges Gel) .....	70
Abbildung 27: Darstellung der ersten Fraktion aus der Fällung von bereits isoliertem Kollagen im Vergleich zu verschiedenen Kollagenstandards ...	71
Abbildung 28: Darstellung der drei unterschiedlichen Fraktionen (Spur 1: erste Fraktion, Spur 2: zweite Fraktion, Spur 3: dritte Fraktion) aus dem sauren Extrakt der Schweinehaut (8 %iges Gel) .....	72

---

Abbildung 29: Darstellung der ersten Fraktion (Spur 1: unreduziert; Spur 2: reduziert) nach der sauren Extraktion von Rindshaut (12 %iges Gel) .....	73
Abbildung 30: Darstellung der Bromcyanpeptide der ersten Fraktion aus dem sauren Extrakt von Schweinehaut (12 %iges Gel) .....	75
Abbildung 31: Densitometrische Auswertung der Bromcyanpeptide der ersten Fraktion aus dem sauren Extrakt von Schweinehaut .....	76
Abbildung 32: Darstellung der ersten (Spur 1), zweiten (Spur 2) und dritten (Spur 3) Fraktion nach saurer Extraktion mit Pepsin von Schweinehaut sowie des Fisch-SLK-Markers (Spur 4) (12 %iges Gel) ....	77
Abbildung 33: Darstellung der ersten (mittlere Spur) und dritten (rechte Spur) Fraktion nach der sauren Extraktion mit Pepsin von Rindshaut im Vergleich zum Rinder-SLK (linke Spur) (8 %iges Gel) .....	79
Abbildung 34: Darstellung des ersten Versuchsansatzes von mit Anti-Kollagentyp I behandelten Proben .....	95
Abbildung 35: Darstellung des ersten Versuchsansatzes von mit Anti-Kollagentyp III behandelten Proben .....	96
Abbildung 36: Darstellung des zweiten Versuchsansatzes von mit Anti-Kollagentyp I behandelten Proben .....	97
Abbildung 37: Darstellung des zweiten Versuchsansatzes von mit Anti-Kollagentyp III behandelten Proben .....	98
Abbildung 38: Darstellung der mit dem Primärantikörper Anti-Kollagentyp I behandelten Bromcyanpeptide .....	99
Abbildung 39: Darstellung der mit dem Primärantikörper Anti-Kollagentyp III behandelten Bromcyanpeptide .....	100
Abbildung 40: Vergleich von verschiedenen reduzierten und unreduzierten Kollagen-Proben und Standards. ....	105
Abbildung 41: Darstellung der entsalzten Bromcyanpeptide von verschiedenen Probe.....	105

**Diagrammverzeichnis**

Diagramm 1:	Vergleich der Kollagentypen I, III und V .....	81
Diagramm 2:	Vergleich von Rinder-SLK mit den Kollagentyp-Standards.....	83
Diagramm 3:	Vergleich von Fisch-SLK mit dem Kollagentyp I-Standard.....	84
Diagramm 4:	Vergleich von unreduziertem mit reduziertem Typ III-Kollagen.....	85
Diagramm 5:	Vergleich der zweiten Fraktion nach Neutralsalz- Extraktion mit Typ I-Kollagen.....	86
Diagramm 6:	Vergleich der ersten Fraktion (reduziert/unreduziert) mit den Kollagentypen I und III.....	87
Diagramm 7:	Darstellung der ersten und dritten abgenommenen Fraktion im Vergleich zum Kollagentyp V-Standard .....	88
Diagramm 8:	Vergleich der ersten Fraktion nach saurer Extraktion und Zugabe von Pepsin mit Kollagentypen I und III .....	89
Diagramm 9:	Darstellung der ersten und dritten Fraktion nach saurer Extraktion mit Pepsin sowie des Kollagentyp V-Standards.....	90
Diagramm 10:	Darstellung der dritten Fraktionen nach saurer Extraktion mit und ohne Pepsin .....	91
Diagramm 11:	Darstellung des sauren Extraktes im Vergleich zum Rinder-SLK.....	92
Diagramm 12:	Vergleich der unterschiedlichen Kollagentyp- Standards mit der isolierten $\alpha$ -Fraktion .....	93
Diagramm 13:	Vergleich der $\alpha$ -Fraktion mit dem verwendeten Laufpuffer .....	94

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Einteilung der Kollagene nach Strukturmerkmalen und Funktion (nach Lotz, 2005; Benninghoff und Drenkhahn, 2008; Kadler et al., 2007) .....	10
Tabelle 2:	Der molekulare Aufbau und Besonderheiten der einzelnen Kollagentypen (Nokelainen,2000) .....	12

# 1 Einleitung

Kollagen stellt das in der Natur am häufigsten vorkommende Protein dar und ist mit Ausnahme der Einzeller im gesamten Tierreich zu finden. Dabei werden etwa 20-25 % des gesamten Proteinanteils von Wirbeltieren dem Skleroprotein Kollagen zugerechnet (Belitz et al., 2007; Reich, 2003). Neben dem Wassergehalt ist Kollagen der Hauptbestandteil der Bindegewebe, vor allem von der Haut, den Knochen und den Gefäßen.

Die Kollagene bilden eine Superfamilie extrazellulärer Matrixproteine mit zurzeit 28 verschiedenen Typen (Kadler et al., 2007). Ein typisches Merkmal aller Kollagentypen ist zum einen die sich wiederholende Sequenzeinheit Gly-X-Y, wobei in der Position X häufig Prolin und in der Position Y häufig Hydroxyprolin nachgewiesen werden kann. Zum anderen wird die Tertiärstruktur des Kollagens, die Tripelhelix, durch drei Peptidketten gebildet (Reich, 2003).

Die verschiedenen Kollagentypen unterscheiden sich im Aufbau und in der Sequenz der  $\alpha$ -Ketten, wobei das entsprechende Kollagenmuster für das jeweilige Gewebe spezifisch ist. Dementsprechend zeigen die verschiedenen Kollagene unterschiedliche Funktionen, wie die Bildung von Mikrofibrillen, Fibrillen und membranösen Netzen (Matthijs et al., 2003).

Kollagen besitzt als ein Strukturprotein eine hohe Festigkeit und Dehnbarkeit und ist aufgrund seiner Herkunft biokompatibel und biologisch abbaubar. Genau diese Eigenschaften machen das Protein Kollagen für viele Anwendungen als Biopolymer in der Leder- und Lebensmittelindustrie sowie verstärkt auch in der Medizintechnik interessant (Reich, 2003).

Bei der medizinischen Kollagenanwendung gewinnen die unterschiedlichen Kollagentypen immer mehr an Bedeutung und stellen einen Schwerpunkt innerhalb der medizinisch orientierten Kollagenforschung dar. Dabei zeigt Kollagen eine beispiellose Vielseitigkeit hinsichtlich seiner Eigenschaften. Um diese besser miteinander vergleichen zu können, ist eine Charakterisierung des Kollagens von Vorteil. Besonders im Bereich der Zellkultivierung ist die Unterscheidung der einzelnen Kollagentypen von großer Bedeutung. Je nach Anwendung werden hier unterschiedliche kollagene Gewebe zur Züchtung bestimmter Zellen verwendet. Für den Knorpelersatz werden zum Beispiel vorwiegend Gewebe bestehend aus Typ II-Kollagen und für Kollagenvliese mit hämostyptischer Wirkung hauptsächlich Gewebe bestehend aus Typ I-Kollagen verwendet. Die grundlegenden Voraussetzungen für kollagene Trägermaterialien sind im ASTM-

Standard F2212-02 festgehalten, der von der internationalen Standardisierungsorganisation American Society for Testing and Materials veröffentlicht wurde. In Anlehnung an diesen Standard ist das Ziel dieser Arbeit verschiedene kollagene Gewebeprouben qualitativ und quantitativ bezüglich der in ihnen enthaltenen Kollagentypen zu analysieren. Dabei werden die einzelnen Kollagentypen mittels fraktionierter Salzfällung aus verschiedenen Rohmaterialien isoliert. Die Analyse dieser verschiedenen Typen erfolgt anschließend elektrophoretisch mit einer optimierten Methode sowie mittels Western Blot und chromatographisch mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie sowie der Ionenaustauschchromatographie.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Kollagen

Die Bezeichnung „Kollagen“ ist auf das griechische Wort Kolla (= Leim) zurückzuführen, da Kollagenfasern beim Kochen quellen und dabei zu Leim werden (Moll et al., 2005). Das sogenannte Kollagen zählt zu den Faserproteinen, die in allen vielzelligen Organismen vorkommen. Es ist das wichtigste Strukturprotein und zeichnet sich durch eine sehr typische Struktur aus (Linnemann und Kühl, 2004).

Als ein Bestandteil des Bindegewebes ist Kollagen für den Zusammenhalt der Zellen zuständig. Zudem ist das Skleroprotein ein wichtiger Strukturbestandteil von Haut, Knorpel und Knochen, Sehnen sowie Blutgefäßen (Linnemann und Kühl, 2004).

Das Kollagen vom Typ I ist ein sehr dominanter Vertreter und Hauptkomponente von Haut, Knochen, Sehnen und Gefäßen. Deshalb wird dieser Typ beispielhaft verwendet, um die chemische Zusammensetzung, Struktur und Entstehung der Kollagene zu erklären.

#### 2.1.1 Die Struktur der Kollagentripelhelix

Ein Kollagenmolekül enthält drei linksgängige  $\alpha$ -Polypeptidketten, die zu einer rechtsgängigen Superhelix ineinander verdrillt vorliegen (van der Rest et al., 1993). Jede der drei linksgängigen  $\alpha$ -Ketten weist drei Aminosäurereste pro Umdrehung, eine Ganghöhe von 0,96 nm und einen Anstieg pro Aminosäurerest von 0,29 nm auf (Koolman und Röhm, 2002) (Abbildung 1).

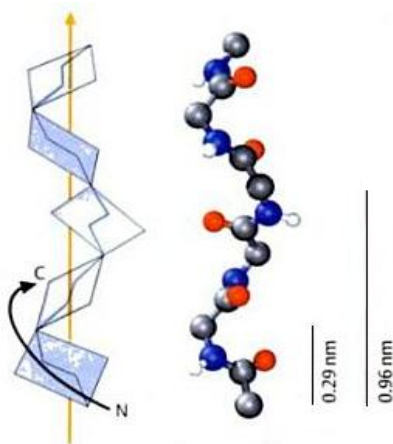


Abbildung 1: Darstellung der Struktur einer einzelnen linksgängigen Kollagen-Helix (Koolman und Röhm, 2002)

Infolgedessen besitzt die Kollagen-Helix eine gestrecktere Gestalt als eine  $\alpha$ -Helix und wird somit als Polyprolin-Helix bezeichnet (Gossauer, 2006). Neben der helikalen Struktur besitzt das Kollagenmolekül auch nicht-helikale Bereiche, dabei befinden sich speziell beim Kollagentyp I 16 an den C- und 25 Aminosäuren an den N-terminalen Enden, die sog. Telo peptide (Kühn, 1987).

Ihre Stabilität erhält die Kollagentripelhelix durch die Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Polypeptidketten. Die Aminosäuresequenz des Kollagens setzt sich aus vielfach wiederholten (-Gly-X-Y)-Einheiten zusammen. Die Aminosäure Prolin ist sehr häufig an Position X zu finden und die Position Y wird meistens vom Prolinderivat 4-Hydroxyprolin besetzt (Abbildung 2) (Prockop und Kivirikko, 1995).

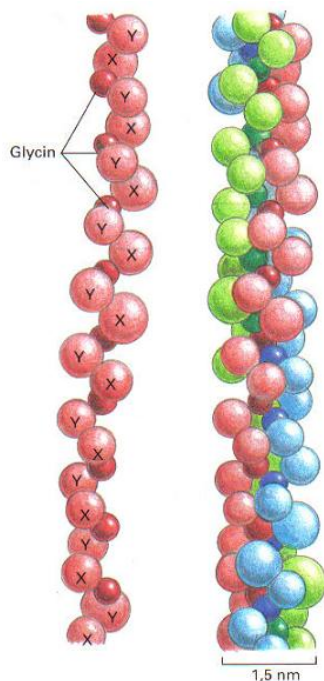


Abbildung 2: Aufbau der Kollagentripelhelix (Alberts et al., 2004)

Hydroxyprolin ist nahezu spezifisch für Kollagen, weshalb der Nachweis dieses Prolinderivates bei der Identifizierung und Quantifizierung von Kollagen von großer Bedeutung ist. Des Weiteren ist Hydroxyprolin maßgeblich verantwortlich für die hydrothermische Stabilität nativen Kollagens (Reich, 1966). Die konformative Flexibilität von Prolin- und Hydroxyprolinresten ist begrenzt und verhindert die Bildung von normalen  $\alpha$ -Helices in den Kollagenketten. Infolgedessen zeigen die Kollagenmoleküle eine gewisse Starrheit. Aufgrund der dichten Packung der Polypeptidstränge entlang der zentralen



Achse der Tripelhelix können an jeder dritten Position nur Glycinreste angeordnet werden, da Glycin die kleinste Aminosäure ist (Kucharz, 1992). Diese Tatsache ermöglicht die Faltung der drei Polypeptidketten des Kollagens zu einer eng gewundenen, rechtsgängigen Tripelhelix (Horton et al., 2008). Zudem ist jedes (-Gly-X-Y)-Triplet über eine Wasserstoffbrücke mit einem anderen Polypeptidstrang verknüpft. Zusätzlich zu Hydroxyprolin enthält Kollagen auch eine geringe Menge der Aminosäure 5-Hydroxylysin. An einige dieser Hydroxylysinreste können sich Kohlenhydratreste binden, wodurch Kollagen zu einem Glycoprotein wird.

Des Weiteren wird die Stabilität der Kollagentripelhelix durch kovalente Quervernetzungen (engl. cross-links) im Bereich der Telopeptide erhöht. Hierzu werden die  $-\text{CH}_2\text{NH}_3^{\oplus}$ -Gruppen in den Seitenketten einiger Lysin- und Hydroxylysinreste enzymatisch zu Aldehydgruppen umgesetzt. Durch diese Reaktion werden Allysin- und Hydroxyallysinreste gebildet. Weiterhin reagieren die Aldehydgruppen der Allysin- und Hydroxyallysinreste mit den Aminogruppen von Lysin- und Hydroxylysinresten zu Schiff'schen Basen. Diese Schiff'schen Basen verknüpfen in der Regel verschiedene Kollagenmoleküle miteinander, so dass kovalente Quervernetzungen entstehen. Zusätzlich können Allysinreste aber auch untereinander durch Aldolkondensation kovalente Quervernetzungen bilden. Dies geschieht meistens zwischen den einzelnen Ketten der Tripelhelices (Horton et al., 2008). Diese kovalenten Quervernetzungen sind bei jungem Kollagen säurelabil und können durch milde Reduktionsmittel, wie Natriumborhydrid, gespalten werden. Mit dem normalen Alterungsprozess der Haut gehen die unreifen Vernetzungen allmählich zu reifen Quervernetzungen über. Damit verbunden ist die gewonnene Stabilität gegenüber Säuren und verschiedenen Reduktionsmitteln (Meyer, 2002).

### 2.1.2 Die Biosynthese

Die Biosynthese des Kollagens beginnt innerhalb der Zelle und endet im extrazellulären Raum. Zunächst findet an den Polyribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) die Bildung der Pro- $\alpha$ -Kollagenketten statt. Diese Polypeptidketten enthalten eine Signalsequenz und sind reich an den Aminosäuren Prolin und Lysin. Mit Hilfe der Signalsequenz gelangen die Polypeptidketten in das Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums. An diesem Ort erfolgen gleichzeitig mit der Translation viele weitere

Reaktionen. Zu Beginn wird die Signalsequenz durch eine spezifische Signalpeptidase abgespalten und die Enzyme Peptidyl-Prolin-Hydroxylase und Peptidyl-Lysin-Hydroxylase katalysieren die Hydroxylierung von Prolin und Lysin unter Anwesenheit von Eisen sowie molekularem Sauerstoff. Im nächsten Schritt werden die Hydroxylgruppen glykosyliert, indem ein spezieller Zuckerrest (Galaktose und Glucose) angebaut wird (Minuth et al., 2003). Danach findet die Bildung der Tripelhelix beginnend am C-terminalen Ende der drei Polypeptidketten statt (Abbildung 3). Die Voraussetzung für den Erfolg der helikalen Vereinigung ist eine korrekte Struktur des C-Propeptids und seiner Disulfidbrücken (Gerok et al., 2007).

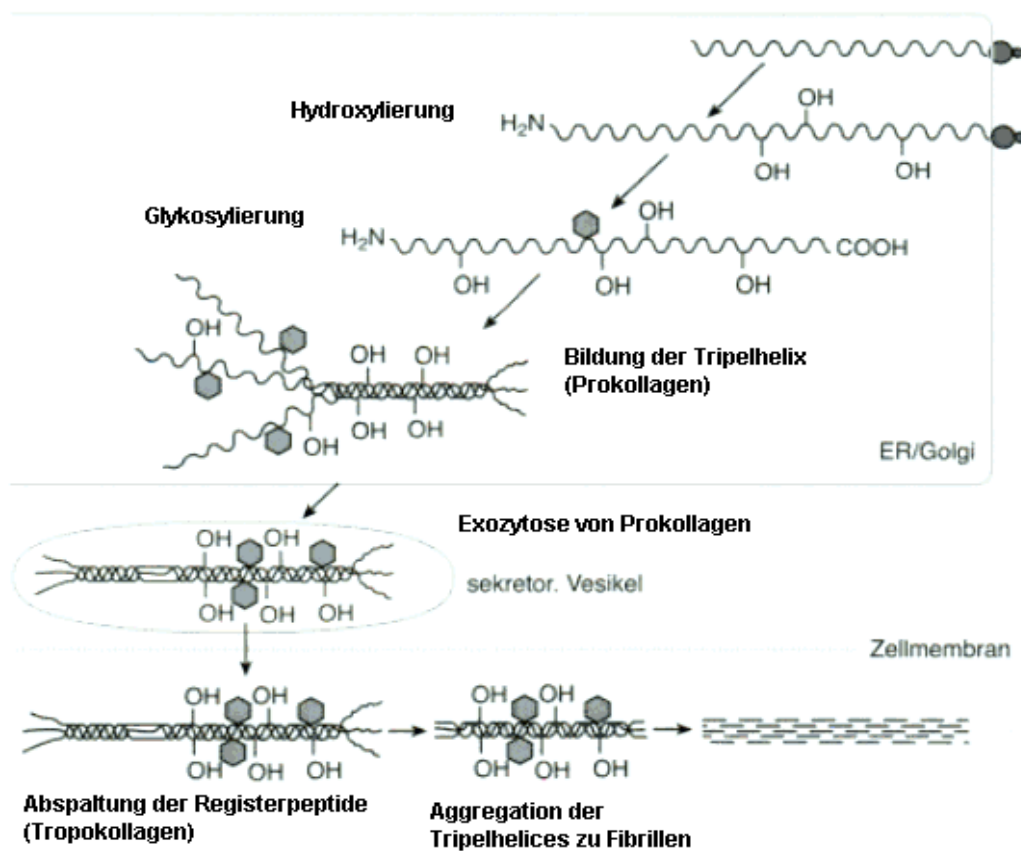


Abbildung 3: Schematische Darstellung der intra- und extrazellulären Vorgänge bei der Kollagenbiosynthese (Gerok et al., 2007)

Da Kollagene sehr schwer lösliche Proteine sind, werden den Pro- $\alpha$ -Ketten schon während der Synthese am endoplasmatischen Retikulum zusätzliche Aminosäuren (Registerpeptide) an den Enden angehängt. Diese Aminosäuren erhöhen die Löslichkeit der Ketten und verhindern deren Aggregation. Erst dadurch kann das synthetisierte Propeptid aus der Zelle

ausgeschleust werden. Die Registerpeptide sorgen zusätzlich dafür, dass sich die drei Ketten in der richtigen Position befinden und die Tripelhelix löslich bleibt.

Die neu synthetisierten Tripelhelices werden mit Hilfe von sekretorischen Vesikeln zur Zellmembran transportiert und dort durch Exozytose aus der Zelle ausgeschleust. Nach der Sekretion der Tripelhelix werden die C- und N-terminalen Propeptidsequenzen durch eine Prokollagen-C- bzw. -N-Proteinase abgespalten, wodurch das Molekül unlöslich wird (Prockop und Kivirikko, 1995). Ab diesem Zeitpunkt wird es auch als Tropokollagen bezeichnet. Durch parallele Aggregation und kovalente Vernetzungen von vermutlich fünf dieser Tropokollagenmolekülen entstehen sogenannte Mikrofibrillen (Buddecke, 1981). Mehrere dieser Mikrofibrillen lagern sich wiederum, abhängig von ihrem Ladungsmuster, um ein Viertel ihrer Länge versetzt lateral aneinander und wachsen longitudinal unter Aussparung einer Lücke (gap) von 40 nm scheinbar endlos. Daraus resultieren Fibrillen, die das für Kollagen so typische Querstreifungsmuster mit einer Periodizität von 65-67 nm („D“) aufweisen (Gelse et al., 2003) (Abbildung 4).

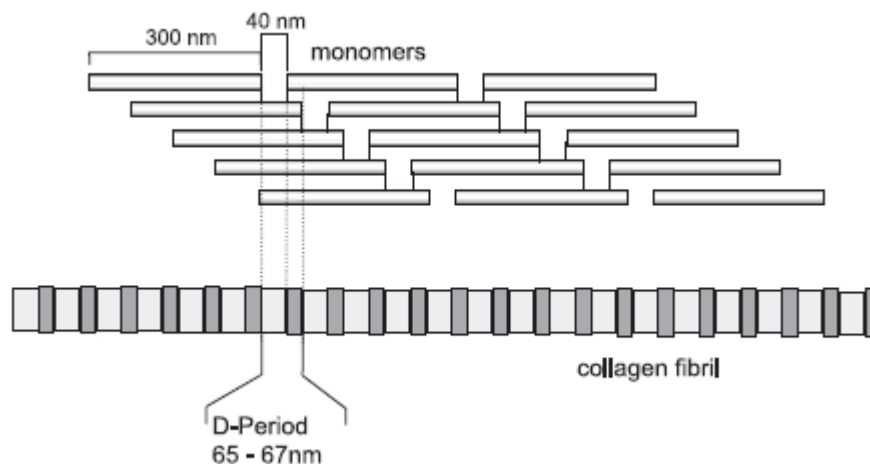


Abbildung 4: Schema der Fibrillenbildung (Gelse et al., 2003)

Schließlich wachsen die Fibrillen zu Elementarfasern weiter. Aus den Elementarfasern werden letztendlich Fasern mit einem sehr breiten Spektrum an Faserdurchmessern und Verzweigungen. Diese bilden das Fasergeflecht, welches charakteristisch für die mechanischen Eigenschaften der verschiedenen Gewebearten ist.

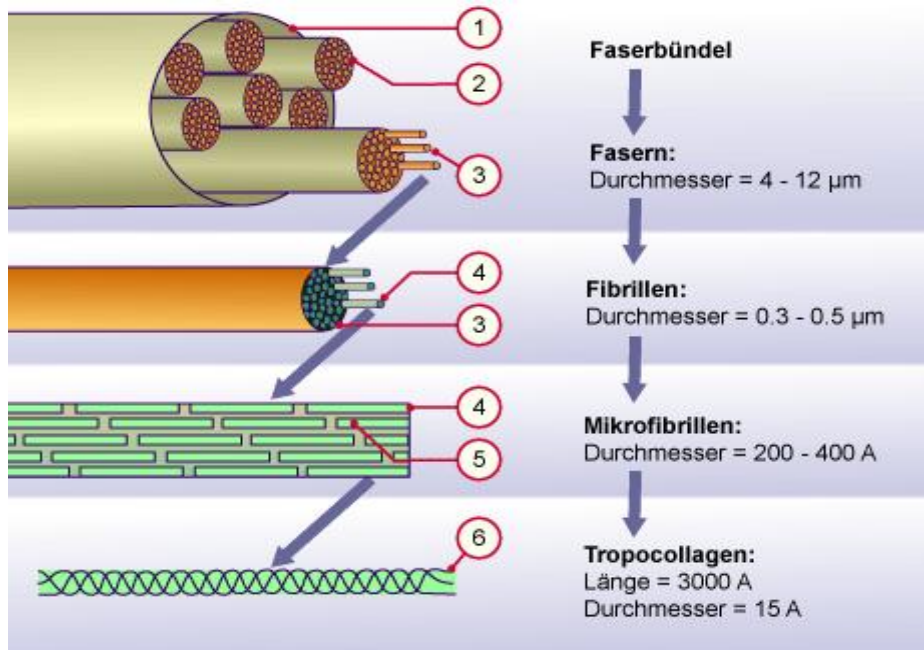


Abbildung 5: Die Strukturebenen des Kollagens (1) Faserbündel, (2) Faser, (3) Fibrillen, (4) Mikrofibrille, (5) Tropocollagen, (6)  $\alpha$ -Helix ( Schwaller, 2009)

Allgemein kann man sagen, dass Kollagen aus verschiedenen Strukturebenen besteht (Abbildung 5). Bis zu dem Stadium der Fibrillenbildung handelt es sich dabei um eine Mikrostruktur, ab den Elementarfasern um die Makrostruktur des Kollagens. Im Bereich der Makrostruktur gibt es deutliche Unterschiede bezüglich Gewebeart, Herkunft und Alter. Somit nimmt der Faserdurchmesser mit dem Alter zu (Reich, 2003). Außerdem setzen sich die unterschiedlichen Gewebe aus verschiedenen Kollagentypen zusammen. Dementsprechend besteht z. B. Haut vorwiegend aus Kollagentyp I und Knorpel aus Kollagentyp II. Diese verschiedenen Kollagentypen zeigen wiederum unterschiedliche Eigenschaften und erfüllen jeweils andere Funktionen im entsprechenden Gewebe.

### 2.1.3 Die Kollagenfamilie

Kollagene bilden eine Superfamilie extrazellulärer Matrixproteine, von denen bereits 28 verschiedene Typen identifiziert wurden (Kadler et al., 2007). Ein charakteristisches Merkmal der gesamten Kollagenfamilie ist der Aufbau in Form von einer Tripelhelix. Die rechtsgedrehte Tripelhelix wird aus drei linksgedrehten  $\alpha$ -Ketten aufgebaut. Derzeit sind bereits 42 verschiedene  $\alpha$ -Ketten bekannt (Brinckmann, 2005). Die Nomenklatur der Kollagene ist etwas verwirrend, denn es gibt keine eindeutigen Kriterien. Prinzipiell sollte

ein Protein, das Kollagen genannt wird, eine tripel-helikale Domäne enthalten, in der extrazellulären Matrix vorkommen und supramolekulare Strukturen bilden können. Die meisten Mitglieder der Kollagenfamilie erfüllen diese drei Kriterien. Jedoch besitzen auch andere Proteine charakteristische Eigenschaften der Kollagene, sie sind aber nicht als solche benannt. Diese Proteine sind über andere Strukturmerkmale oder Domänen anderen Proteinfamilien zugeordnet (Ricard-Blum et al., 2005).

Die ersten Kollagene wurden aus Gewebe extrahiert und konnten mit Hilfe von biochemischen Methoden charakterisiert werden. Die meisten der in den letzten 20 Jahren entdeckten Kollagene wurden zuerst als cDNA Klone identifiziert. Das Kollagen XXVI wurde erst kürzlich durch DNA-Sequenzierung mit Hilfe von Hybridisierung erforscht (Abbildung 6) (Ricard-Blum et al., 2005).

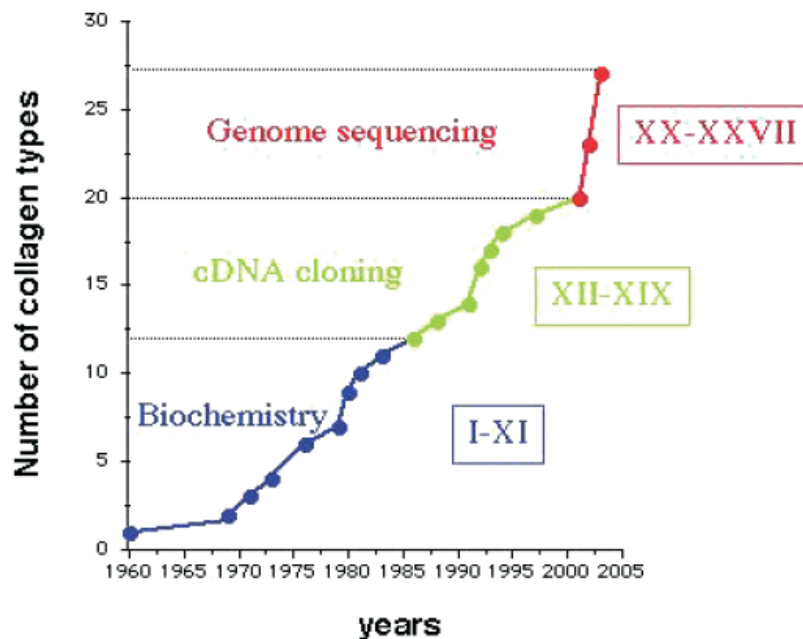


Abbildung 6: Die Entdeckung der Kollagenfamilie (Ricard-Blum, et al., 2005)

Aufgrund unterschiedlicher Strukturen bzw. Funktionen kann man die einzelnen Kollagene in verschiedene Unterfamilien einteilen (Tabelle 1) (Lotz, 2005).

Tabelle 1: Einteilung der Kollagene nach Strukturmerkmalen und Funktion (nach Lotz, 2005; Benninghoff und Drenkhahn, 2008; Kadler et al., 2007)

Unterfamilie	Kollagentyp
Fibrilläre Kollagene	I, II, III, V, XI, XXIV und XXVII
FACITs (Fibrillen-assoziierte-Kollagene mit unterbrochener Tripelhelix)	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI und XXII
Netzwerkbildende Kollagene	IV, VIII und X
„beaded-filament-forming collagen“	VI, XXVI und XXVIII
Transmembranäre Kollagene	XIII, XVII, XXIII und XXV
Verankerungsfibrillenbildende Kollagene der Basalmembran	VII
Multiplexin-Kollagene	XV und XVIII

### Fibrilläre Kollagene

Die fibrillären oder Fibrillen-bildenden Kollagene wurden zuerst entdeckt und sind somit auch die ersten Mitglieder der Kollagenfamilie. Im Jahr 1953 wurden erste Erfolge bei der Aufklärung der Primärstruktur von Kollagen erzielt (Schroeder et al., 1953). Hierbei wurde Kollagen durch partielle alkalische und saure Hydrolyse in einzelne Fragmente gespalten. Auf diese Weise konnten Tri- und Tetrapeptide des Kollagens isoliert werden. Diese Ergebnisse brachten erste Hinweise auf die gleichmäßige Verteilung von Glycin entlang der Peptidkette und das Vorhandensein der Sequenz Gly-Pro-Hyp. *Grassmann et al.* entdeckten im Jahr 1965 einzelne Peptide durch eine Verdauung von denaturiertem Rinderkollagen mit Trypsin. Durch die Arbeiten von *Piez et al.* (1963) wurde gezeigt, dass die Kollagenmoleküle während der Denaturierung in ein komplexes Gemisch aus monomeren  $\alpha$ -Ketten, di- und trimeren Komponenten sowie höhermolekularen Fraktionen zerfallen. Des Weiteren beschrieben *Piez et al.* (1963) die Trennung dieser einzelnen Komponenten mit Hilfe von Chromatographie an Carboxymethylcellulose und zeigten damit, dass das Kollagenmolekül von Typ I Kollagen aus zwei  $\alpha_1$ -Ketten und einer  $\alpha_2$ -Kette besteht. Im weiteren Verlauf entwickelten *Bornstein und Piez* (1966) eine Methode, wobei Kollagenketten durch Bromcyan an den Methionin-Resten gespalten werden. Die entstandenen Fragmente wurden anschließend für eine systematische Sequenzanalyse der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Ketten verwendet. Im Jahr 1972 wurde die Primärstruktur einer vollständigen  $\alpha_1$ -Kette aufgeklärt (Kühn, 1987). Das exakte Fachwissen über die Bromcyan-Darstellung

der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Ketten bildete die Informationsbasis für die Entdeckung von Kollagentyp II und III durch *Miller et al.* (1971). Außerdem entdeckte die Arbeitsgruppe trotz der deutlichen Homologien bezüglich der Aminosäuresequenz, charakteristische Unterschiede zwischen den Typen I und II. Der Kollagentyp III wurde von *Miller et al.* im Jahr 1971 identifiziert. Dabei entdeckte die Forschungsgruppe auch, dass das Kollagenmolekül III aus drei sequenziell gleichen Ketten aufgebaut wird (*Miller et al.*, 1971).

Seit der Entdeckung des Kollagen XI im Jahr 1979 zählen heute zu der Gruppe der fibrillären Kollagene fünf Mitglieder: die Kollagentypen I, II, III, V und XI. Im Jahr 2004 wurden zusätzlich noch zwei neue Mitglieder der Gruppe der fibrillären Kollagene, die Typen XXIV und XXVII entdeckt. Beide zeigen die charakteristische Struktur der fibrillären Kollagene.

Charakteristische Strukturmerkmale der Fibrillen-bildenden Kollagene sind große tripel-helikale Domänen mit über 1000 Aminosäuren bzw. 330 (Gly-X-Y)-Sequenzen pro Kette sowie die N- und C-Propeptide an den Kettenenden (*Prockop und Kivirikko*, 1995). Das C-Propeptid wird als NC1 Domäne bezeichnet und das N-Propeptid wird in zwei unterschiedliche Domänen aufgeteilt: eine kurze Sequenz (NC2) sowie ein globuläres N-terminales Ende (NC3) (*Fratzl*, 2008). Das N-Propeptid der klassischen fibrillären Kollagene repräsentiert dabei die Domäne, welche die wichtigsten sequenziellen und strukturellen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Typen zeigt (*Ricard-Blum*, 2005). Bei den Kollagenen I, II und III grenzen zudem an beiden N- und C-Enden der tripel-helikalen Domänen kurze nicht-helikale Regionen, die sog. Telo peptide, an.

Die fibrillären Kollagenmoleküle können aus drei identischen  $\alpha$ -Ketten (Homotrimer), wie z.B. die Kollagene II und III, oder heterotypisch aus bis zu drei genetisch unterschiedlichen  $\alpha$ -Ketten aufgebaut sein. Die individuellen  $\alpha$ -Ketten werden dabei in Form von  $\alpha_n(N)$ , wobei N als römische Ziffer für den jeweiligen Kollagentyp und n für die Nummer der  $\alpha$ -Kette steht, dargestellt und identifiziert (*Fratzl*, 2008).

Die jeweiligen Ketten und deren molekulare Anordnung in den Kollagentypen I-V sind in Tabelle 2 dargestellt (*Nokelainen*, 2000).

Tabelle 2: Der molekulare Aufbau und Besonderheiten der einzelnen Kollagentypen (nach Nokelainen,2000)

Kollagentyp	$\alpha$ -Ketten	molekularer Aufbau	Vorkommen	Besonderheiten
I	$\alpha_1(I)$ $\alpha_2(I)$	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$	Haut, Knochen, Bänder und Sehnen	am häufigsten vorkommender Kollagentyp
		$[\alpha_1(I)]_3$	Haut und Dentin	von geringerer Bedeutung
II	$\alpha_1(II)$	$[\alpha_1(II)]_3$	Knorpel, Bandscheiben	wichtigstes Kollagen der Knorpel
III	$\alpha_1(III)$	$[\alpha_1(III)]_3$	Blutgefäße, Haut und Darm	oft in Verbindung mit dem Typ I vorkommend
V	$\alpha_1(V)$ $\alpha_2(V)$ $\alpha_3(V)$	$[\alpha_1(V)]_3$ $[\alpha_1(V)]_2\alpha_2(V)$ $\alpha_1(V) \alpha_2(V) \alpha_3(V)$	weit verbreitet in geringen Mengen; kommt in Verbindung mit dem Typ I vor	assoziiert mit Typ I- Fibrillen

Die beiden neu entdeckten Kollagentypen XXIV und XXVII beinhalten im Gegensatz zu den klassischen Kollagenen eine kürzere tripel-helikale Domäne und einige Fehler in der regelmäßigen Wiederkehr der Sequenz  $(Gly-X-Y)_n$ . Die Bedeutung dieser tripel-helikalen Abweichungen ist leider zum heutigen Zeitpunkt noch nicht erforscht, aber nur kleinste Veränderungen in der Sequenz Gly-X-Y führen bei den klassischen Kollagenen zu schweren Krankheiten. Der Typ XXIV ist in Knochen sowie Augenhornhaut zu finden und das Kollagen XXVII ist im Knorpel vorhanden (Ricard-Blum et al., 2005).

### *Typ I*

Der wichtigste Vertreter der fibrillären Kollagene ist das Typ I-Kollagen. Es macht ca. 80 % allen Kollagens aus und wurde bereits in Haut, Sehnen, Knochen, Augenhornhaut, Lunge und Blutgefäßen entdeckt (van den Berg und Cabri, 2003). Des Weiteren repräsentiert dieses Kollagenmolekül die charakteristische Primärstruktur aller Kollagene. Dazu gehören der Aufbau der Tripelhelix aus drei  $\alpha$ -Ketten und der damit verbundene,



sich ständig wiederholende, charakteristische Sequenzabschnitt Gly-X-Y (Linnemann und Kühl, 2004). Diese Sequenz ist der massivste Teil eines Kollagenmoleküls und für die Stabilisierung der Struktur von großer Bedeutung. Außer Glycin, Prolin und Hydroxyprolin sind noch weitere Aminosäuren am Aufbau der Kollagene beteiligt. Diese zeigen oft biologische Funktionen in Form von Rezeptoren und Liganden für Zell-Matrix-Kontakte. Der Kollagentyp I weist zwei nicht-helikale Regionen an beiden Enden auf, wobei die N-terminale Domäne stabiler als die C-terminale Domäne ist. Demnach ist die C-terminale Region auch anfälliger gegenüber enzymatischer Spaltung, insbesondere durch Kollagenasen (Xiong, 2008). Typ I besteht aus zwei identischen  $\alpha_1$ -Ketten und einer davon abweichenden, dritten  $\alpha_2$ -Kette. Mit der Molekülstruktur  $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$  ist dieser Typ ein sogenannter Heterotrimer (Ricard-Blum, 2005). In verschiedenen Geweben und kultivierten Zellen konnte aber auch ein geringer Anteil eines Homotrimers mit der Molekülstruktur  $[\alpha_1(I)]_3$  nachgewiesen werden (Jimenez et al., 1977; Moro und Smith, 1977). Die Synthese des Typ I Kollagens erfolgt durch Fibroblasten, Osteoblasten und Odontoblasten. Der Kollagentyp I verleiht dem Gewebe vor allem Zugkraft mit Hilfe von breiten, kompakten Fasern (Moll, 2005).

### ***Typ II***

Der Kollagentyp II ist die hauptsächliche strukturelle Komponente von Knorpel (Cao und Xu, 2008). Der Anteil an der Knorpelmatrix beträgt dabei zwischen 80 – 95 % (Gelse et al., 2003; Srinivas et al., 1993; Salter, 1998). Weiterhin kommt dieser Typ aber auch in einem Teil der Bandscheibe (Nucleus pulposus), im Glaskörper des Auges und in einigen Geweben während deren Entwicklung vor (Moll, 2005; Nokelainen, 2000). Die Tripelhelix des Typ II Kollagens ist dem Typ I Kollagen in Bezug auf die Größe und biomechanischen Eigenschaften sehr ähnlich. Das sog. Homotrimer wird im Unterschied zum Typ I aus drei identischen  $\alpha_1(II)$ -Ketten aufgebaut und zeigt einen höheren Gehalt an Hydroxylysin (Robins, 1988). Die dünnen und locker verbundenen Fibrillen werden in den Chondroblasten synthetisiert. Weiterhin zeichnet sich dieser Kollagentyp besonders durch seine Widerstandsfähigkeit gegenüber intermittierenden Drücken aus (Moll, 2005).

Kollagen vom Typ II wird unter anderem in der Nahrungsmittelbranche z. B. als Emulgator und Verdünnungsmittel, im Industriesektor für die Produktion von Shampoo oder Lippenstiften und für pharmazeutische Zwecke als Mikroinkapselung oder Material

für das Tissue-Engineering verwendet (Cao und Xu, 2008). Die Nachfrage nach Kollagentyp II zu Forschungszwecken ist stark steigend, da der Typ II womöglich Rheumatoide Arthritis unterbinden kann (Cao und Xu, 2008).

### *Typ III*

In Verbindung mit dem Typ I tritt in elastischem Gewebe immer ein geringer Anteil an Typ III-Kollagen auf. Letzteres ist eine wichtige Komponente von retikulären Fasern in interstitiellen Geweben von Lunge, Leber, Haut, Milz und Blutgefäßen (Gelse et al., 2003). Die dünnen und locker verbundenen Fasern werden in Myofibroblasten (Endothel der Gefäße und Umhüllung glatter Muskelzellen), Retikulumzellen (lymphatisches Gewebe, Knochenmark und Milz) und Hepatozyten (Leberzellen) gebildet. Kollagen vom Typ III wirkt (z. B. in Gefäßen) wechselnden Drücken und bei sich dehnenden Organen der Dehnung entgegen (Moll, 2005). Der Kollagentyp III bildet ein Homotrimer, bestehend aus drei identischen  $\alpha_1(\text{III})$ -Ketten. Im Unterschied zu den Kollagentypen I und II enthält der Typ III zwischen den einzelnen Ketten Disulfidbrückenbindungen am C-terminalen Ende der tripel-helikalen Region (Epstein und Munderloh, 1975). Zudem beinhaltet der Kollagentyp III innerhalb der tripel-helikalen Region eine einzelne Spaltungsstelle für Trypsin (Miller et al., 1976).

### *Typ V*

Der Kollagentyp V zählt zu den fibrillären Kollagenen und kommt in verschiedenen Geweben nur in sehr geringen Mengen vor. Dieser Typ bildet zusammen mit dem Typ I oder mit den Typen I und III heterotypische Fibrillen in Knochen, Augenhornhaut, Haut, Blutgefäßen, Leber, Lunge und Plazenta (Ayad et al., 1998). Die bekannteste Kettenanordnung des Typ V, die in Gewebe gefunden wurde, ist  $[\alpha_1(\text{V})]_2\alpha_2(\text{V})$ . Jedoch wurde in der Plazenta Kollagen V auch mit drei unterschiedlichen Ketten ( $\alpha_1(\text{V})$   $\alpha_2(\text{V})$   $\alpha_3(\text{V})$ ) entdeckt (Ricard-Blum, 2005).

### **Wichtige nicht-fibrilläre Kollagenunterfamilien**

Die Gruppe der FACITs ist eine relativ große Subfamilie und besteht aus acht verschiedenen Kollagentypen. Diese Kollagene sind teilweise mit Kollagenfibrillen assoziiert, wobei das bisher nur für die „klassischen“ FACITs (IX, XII und XIV) bewiesen werden konnte (Schulze, 2005). Die Kollagene sind an der Bildung quergestreifter Kollagenfasern beteiligt, jedoch nur in Zusammenhang mit Kollagenen anderer Gruppen (Matthijs et al., 2003). Die FACITs zeigen einen typischen modularen Aufbau aus alternierenden nicht-tripel-helikalen Regionen (non-collagenous, NC) und tripelhelikalen (collagenous, COL) Domänen. Durch Sequenzvergleiche zwischen den einzelnen Mitgliedern der Proteinfamilie konnte festgestellt werden, dass die sogenannten COL Domänen von kleineren NC-Abschnitten oder Fehlern in einzelnen Gly-X-Y Triplets unterbrochen sind (van der Rest und Garrone, 1991). Diese Unterbrechungen in den COL Domänen sind für die Flexibilität der Kollagenmoleküle verantwortlich (Myers et al., 2003). Am Übergang der letzten NC Domäne vor dem C-Terminus in die COL Domäne befinden sich zwei Cysteinreste. Diese Cysteinreste stabilisieren die tripelhelikale Struktur mit Hilfe von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken (Dublet und van der Rest, 1991). Durch die unterschiedliche Anzahl und Größe der NC Domänen besitzen die FACITs ein sehr breites Größenspektrum (Schulze, 2005).

Kollagen IX ist zusammen mit den Kollagentypen II und XI eine bedeutende Komponente der Kollagenfibrillen des Knorpels. Das Kollagenmolekül IX ist aus drei relativ kurzen tripel-helikalen Domänen (mit Unterbrechungen) und vier nicht-tripel-helikalen Domänen aufgebaut. Es bildet ein Heterotrimer bestehend aus  $\alpha_1(\text{IX})$ ,  $\alpha_2(\text{IX})$  und  $\alpha_3(\text{IX})$ . Die Kollagenmoleküle vom Typ IX überziehen die Oberfläche von Kollagenfibrillen (II/XI) des Knorpels, wobei die große N-terminale NC4-Domäne der  $\alpha_1(\text{IX})$ -Kette in Wechselwirkung mit anderen Komponenten der extrazellulären Matrix treten kann (Wu et al., 1992).

Im Gegensatz zum Kollagentyp IX verbinden sich die Kollagene XVI, XIX und XXII nicht mit Kollagenfibrillen und haben somit keine gleichmäßige Verteilung im Gewebe. Kollagen XXII ist zum Beispiel besonders an Gewebeübergängen zu finden.

Das Kollagen XII verbindet sich, wie das Kollagen IX auch, mit Kollagenfibrillen und wurde in Kollagentyp I- reichem Bindegewebe, wie Sehnen, Bänder, Haut und Augenhornhaut entdeckt. Das Kollagenmolekül XII ist ein Homotrimer, es besteht somit

aus drei identischen  $\alpha 1(\text{XII})$ -Ketten. Jede dieser drei Ketten weist zwei tripel-helikale Domänen und drei nicht-tripel-helikale Domänen auf (Fratzl, 2008).

Das Hühnchenkollagen XX ist sehr eng mit dem Kollagentyp XIV verknüpft und wurde im Hornhautepithel gefunden. Der Kollagentyp XXI ist eng mit den Kollagenen XII, XIV und XX verbunden und kommt in verschiedenen Geweben, wie Herz, Magen, Niere und Muskel vor. Weiterhin ist das Kollagen XXI eine sehr bedeutende Komponente der extrazellulären Matrix von Gefäßwänden und wird von glatten Muskelzellen produziert (Fratzl, 2008).

Eine weitere Gruppe der nicht-fibrillären Kollagene sind die Basalmembran-Kollagene, wobei das Typ IV-Kollagen am besten erforscht ist. Basalmembranen sind spezialisierte Strukturen, welche bei Gewebegrenzen, Fett, Muskel- und Nervenzellen zu finden sind. Das Kollagenmolekül IV ist mit einer Länge von 400 nm länger als fibrilläre Kollagenmoleküle und enthält verschiedene Diskontinuitäten in der (Gly-X-Y)-Sequenz (Matthijs et al., 2003). Im Gegensatz zu fibrillären Kollagenen gibt es für das Kollagenmolekül IV keine Precursorform und die N- und C- terminalen Erweiterungen, welche 7S und NC1 Domänen genannt werden, sind in den supramolekularen Aufbau stark involviert. Die Kollagenmoleküle des Typ IV verknüpfen sich durch die Bildung von Tetrameren aus 7S-Domänen, die Bildung von Dimeren aus NC1-Domänen, tripelhelikalen Wechselbeziehungen und Verbindungen mit anderen Basalmembran-Komponenten zu einer offenen Netzwerkstruktur (Abbildung 7).

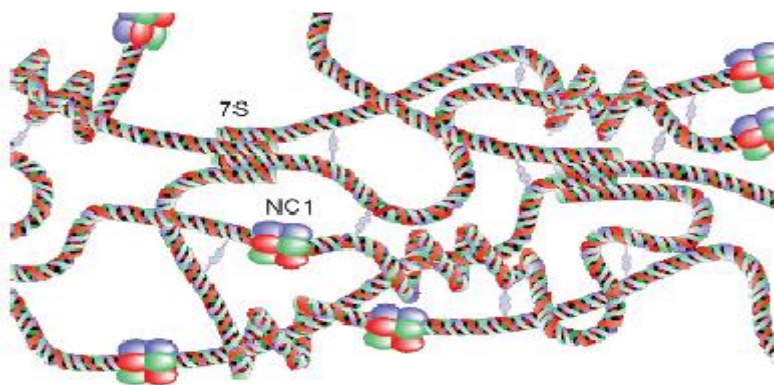


Abbildung 7: Die Anordnung von nicht-fibrillären Kollagenen (Fratzl, 2008)

Diese Struktur wird durch Disulfidbrückenbindungen in der 7S-Region stabilisiert. Der Kollagentyp IV weist sechs verschiedene  $\alpha$ -Ketten auf, die zu drei unterschiedlichen Heterotrimeren aggregieren:  $[\alpha_1(\text{IV})]_2\alpha_2(\text{IV})$ ,  $\alpha_3(\text{IV})\alpha_4(\text{IV})\alpha_5(\text{IV})$  und  $[\alpha_5(\text{IV})]_2\alpha_6(\text{IV})$ .

Kollagen VII gehört ebenfalls zu den Basalmembran-Kollagenen und weist die längste tripel-helikale Domäne unter den Wirbeltierkollagenen auf. Dieses Kollagenmolekül wurde, unterhalb der Basalmembran liegend, an der Verbindung von Dermis und Epidermis gefunden. Mutationen innerhalb des Kollagentyps VII sind die Ursache für stark schmerzende Blasenbildungen auf der Haut, auch Epidermolysis bullosa genannt (Fratzl, 2008)

Das Kollagen Typ VI ist charakteristisch für die Gruppe der Kollagene, die perlenschnurförmige Filamente bilden („beaded-filament-forming collagen“) und ebenfalls eine Untergruppe der nicht-fibrillären Kollagene darstellen. Es ist ein ubiquitäres Kollagen mit großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung von intaktem Gewebe (Baldock et al., 2003). Abbildung 8 zeigt, dass sich zwei Kollagenmoleküle verbinden und ein Dimer ausbilden. Zwei Dimere fügen sich wiederum zu einem Tetramer zusammen. Nachfolgend lagern sich die Tetramere zu perlenschnurförmigen Filamenten mit einer Periodizität von ungefähr 110 nm zusammen. Diese Assemblierungen werden durch Disulfidbrücken stabilisiert (van der Rest und Garrone, 1991).

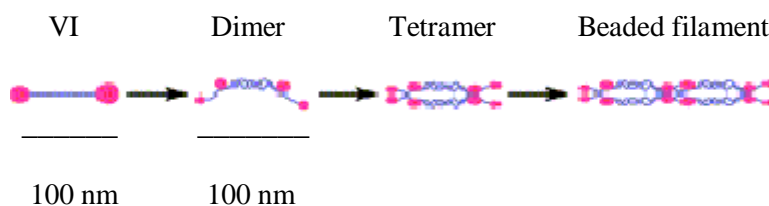


Abbildung 8: Struktur des Kollagentyp VI (Schulze, 2005)

Die Kollagenmoleküle des Typ VI enthalten relativ kurze tripel-helikale Regionen und große N- und C-terminale Regionen. Jedes dieser Moleküle ist ein Heterotrimer, aufgebaut aus  $\alpha_1(\text{VI})$ ,  $\alpha_2(\text{VI})$  und  $\alpha_3(\text{VI})$  (Fratzl, 2008).

## 2.2 Gewinnung und Anwendung von Kollagen

Kollagen wird vorwiegend aus dem Bindegewebe, der Haut, den Knochen oder den Sehnen von Säugetieren gewonnen, beispielsweise von Rindern, Pferden oder Schweinen. Dabei unterscheidet man zwei Verfahren zur Gewinnung von löslichem Kollagen. Einerseits gibt es die unmittelbare Extraktion von Bindegeweben (säurelösliches und neutralsalzlösliches Kollagen) und andererseits wird das lösliche Kollagen aus unlöslichem, reifen Kollagen durch eine chemische, enzymatische oder mechanische Vorbehandlung gewonnen (Reich, 1966).

Das älteste und gleichzeitig wichtigste Einsatzgebiet für Kollagen ist die Lederherstellung. Das Eiweiß Kollagen befindet sich in großen Mengen in der Haut zum Beispiel von Schweinen und Rindern. Für die Lederherstellung muss die Haut abgezogen und anschließend konserviert bzw. getrocknet werden. Danach schließt sich mit der sogenannten Weiche eine Grobreinigung von nichtkollagenen Anteilen an. Anschließend findet eine Feinreinigung, das sogenannte Äscherverfahren statt. Hierbei wird die Oberhaut von der ausschließlich zur Lederherstellung benötigten Lederhaut gelockert, damit sie anschließend mitsamt den Haaren mechanisch leicht entfernt werden kann. Desweiteren erfolgt das Beizen, eine Feinstreinigung der Haut von Epidermis-, Haar- und Fettresten. Als nächster Schritt schließt sich die Gerbung, welche zu einer Strukturstabilisierung führt, an. Mit Hilfe der Nasszurichtung, das heißt zum Beispiel die Fettung von Leder, erhöht sich die Faserbeweglichkeit. Danach wird das Leder getrocknet und es schließt sich der Prozess der Zurichtung an, wobei es zur endgültigen Faserversiegelung kommt (Reich, 2003; Stather, 1957).

Leder dient dabei nicht nur zum Schutz (Schuhe und Bekleidung), sondern hat auch eine technische Funktion (Textil- und Musikleder). Auch heute noch schätzt man die Schmuckfunktion des Leders zum Beispiel bei einem mit Leder ausgestatteten Auto.

Neben der Lederproduktion wird Kollagen vor allem zur Herstellung von Gelatine und Leim (Bsp.: Knochenleim) verwendet. Gelatine ist dabei von besonderer Bedeutung. Diese wird vorzugsweise aus Schweineschwarten nach dem sauren (acid) Aufschlussverfahren (Typ-A-Gelatine) oder nach dem klassischen basischen (basic) Äscherverfahren aus Rinderspalten (Typ-B-Gelatine) hergestellt (Reich, 2003).

Gelatine selbst ist ein wichtiger Grundstoff für Lebensmittel (Bsp.: Verdickungsmittel und Geliermittel), Pharmaka (Bsp.: Mikrokapseln und Diätkost), sowie Fotofilme und – papiere.

Ein weiteres großes Anwendungsgebiet von Kollagen stellt die Medizin dar. Seit einigen hundert Jahren zählen Kollagenfäden, hergestellt aus der Muskelschicht von Schafsdärmen, zum chirurgischen Handwerkszeug. Weiterhin werden zur Wundabdeckung sog. „Kollagenflächen“ verwendet, diese können entweder als naturgewachsenes Fasergeflecht (Hautspalte), als Vliese oder fixierte Schäume (Schwämme) angewendet werden. In der Humanmedizin erwies sich das Schweinhautkollagen als besonders geeignet. Kollagenfaservliese werden gut durch körpereigene Bindegewebszellen besiedelt und fördern somit die Revitalisierung der Haut. Bei derartigen Vliesen steht der blutstillende Effekt im Vordergrund. Auch im Bereich der Gefäß- und Organprothesen wird immer wieder eine Kombination mit (löslichem) Kollagen angestrebt, da das Zellwachstum angeregt wird (schnellere Wundheilung) und die Körperverträglichkeit verbessert wird. Die Kombination aus Kollagenfasern und Calciumphosphat eignet sich zum Beispiel für einen künstlichen Knochen- und Zahnersatz (Reich, 2003).

Außerdem verschaffte die Werbung für Kosmetik sowie für die Haar- und Körperpflege dem Eiweiß Kollagen großes Ansehen. Die Aufschrift „ MIT KOLLAGEN“ stellte den neuen Werbeslogan der Kosmetikhersteller dar. Die Wirkung des Kollagenzusatzes soll den Feuchtehaushalt der Haut verbessern, Faltenbildung verhindern und sogar schon bestehende Fältchen beseitigen. Im Bereich der Schönheitschirurgie kann nun auch höchstreines lösliches Kollagen nach vorherigem Allergietest in die Haut injiziert werden, damit gelingt sogar eine Entfernung selbst sehr ausgeprägter Falten (Reich, 2003).

Selbst die modernen Biodünger und Blattgrüner auf „rein biologischer“ Grundlage enthalten immer etwas Kollagen, da sie anteilig aus Schlachtabfällen hergestellt werden.

Keinesfalls zu vergessen ist das traditionsreiche „Freiberger Hautpulver“. Dieses wird für die gravimetrische Analyse von vegetabilen Gerbmitteln und Extrakten seit 1905 in Freiberg produziert und setzte sich als ein weltweit anerkanntes Produkt durch (Reich, 2003).

### 2.2.1 Extraktionsmethoden

Obwohl Kollagen ubiquitär im Körper aller Säugetiere vorkommt, werden nur die Gewebe mit einem hohen Anteil an fibrillärem Kollagen, wie Haut, Sehnen, Knochen und Gefäße als Rohstoff für die Gewinnung dieses Proteins genutzt. Das so gewonnene Kollagen wird weiterhin für die Anfertigung von Implantaten, als Verbandmaterial für Wunden oder zur Pharmakotherapie verwendet (Friess, 1998).

Kollagen ist unlöslich in organischen Lösemitteln. Wasserlösliches Kollagen hat nur einen sehr geringen Anteil am gesamten Kollagen. Weiterhin ist der Gehalt an Kollagen abhängig vom Alter des Tieres bzw. vom Grad der Vernetzung und dem Gewebe, aus welchem das Protein extrahiert wird (Friess, 1998).

Durch die großen Unterschiede innerhalb der Gewebearten und Kollagentypen gestaltet sich die Entwicklung einer Standardmethode für alle 28 Kollagentypen aus verschiedenen Geweben sehr schwierig. Die beiden gebräuchlichsten Extraktionsmethoden werden mit Hilfe von Neutralsalzlösungen und sauren Lösungen durchgeführt (Xiong, 2008).

#### **Extraktion mit Natriumchloridlösungen**

Diese Extraktionsart ist normalerweise der erste Schritt um Kollagen aus einer Probe des Bindegewebes zu solubilisieren. Beispielsweise kann Hautkollagen mit Hilfe einer 0,20 M Natriumchloridlösung extrahiert werden (Jackson, 1956). Einige Autoren nutzen 0,15 M Natriumchlorid, welches in einem Puffer (pH 7,4) aus 0,05 M Tris und 0,02 M EDTA gelöst wird (Byers et al., 1974). Mit einer Extraktion bei 4 °C über 24 Stunden kann die größte Ausbeute an neutralsalzlöslichem Kollagen erreicht werden. Dabei variiert die Molarität der Natriumchloridlösung von 0,15 M bis 2,0 M (Bornstein und Piez, 1964; Friess, 1998). *Anesey et al.* (1975) führten eine doppelte Extraktion mit 0,15 M und anschließend mit 1,0 M NaCl durch. Jedoch ist in normalem Gewebe wenig neutralsalzlösliches Kollagen vorhanden, sodass die Ausbeute nach der Extraktion normalerweise sehr gering ausfällt. Außerdem haben auch Proteinasen des Gewebes einen Einfluss auf die Ausbeute bei der Extraktion. Daher können für die Hemmung der enzymatischen Spaltung bestimmte Inhibitoren (z.B. EDTA und DFP) zum Extraktionsansatz hinzugegeben werden (Xiong, 2008). Das extrahierte Material wird



mittels Dialyse gereinigt und danach erfolgen eine Salzfällung sowie eine Zentrifugation zur Abtrennung der ausgefällten Bestandteile (Friess, 1998).

### **Extraktion mit Essigsäure**

Die essigsäure Extraktion bei Haut wird normalerweise nach einer neutralsalzlöslichen Extraktion durchgeführt. Die Extraktion von Kollagen aus Sehnen erfolgt komplett in einer 0,1 M Essigsäurelösung (Rosen et al., 1960). Die Menge an extrahiertem Kollagen steigt mit der Molarität der Essigsäurelösung an, aber zu hohe Molaritäten sind wiederum aufgrund der hohen Säurestärke und dementsprechenden sauren Hydrolyse des Kollagenmoleküls zu vermeiden (Kessler et al., 1960).

Mit Hilfe von Essigsäure, Citrat-Puffer oder Salzsäure (pH 2-3) kann deutlich mehr Kollagen solubilisiert werden als mit der neutralsalzlöslichen Extraktion, jedoch ist das Verfahren vorwiegend für jüngeres, unvernetztes Gewebe geeignet. Durch die Extraktion mit verdünnten Säurelösungen können ungefähr zwei Prozent des gesamten im Gewebe enthaltenen Kollagens solubilisiert werden (Friess, 1998). Aus diesem Grund wird häufig Pepsin in den Extraktionsansatz gegeben, um auch älteres, stark vernetztes Kollagen zu extrahieren. Pepsin greift dabei vorrangig die Peptidbindungen zu den Aminosäuren Phenylalanin, Methionin, Leucin und Tryptophan an (siehe 2.2.2). Dennoch ist die Menge an Pepsin, die ausreicht um das Kollagen zu lösen, stark von dem jeweiligen Gewebe abhängig. Bedauerlicherweise kann die Zugabe von Pepsin zum Extraktionsansatz aber auch zu einer Spaltung des Kollagens führen. Trotzdem hat sich diese Methode gut etabliert und ist damit das am weitesten verbreitete Verfahren in der Forschung und der industriellen Produktion (Chandrakasan et al., 1976).

Obwohl die saure Extraktionsmethode schon vor über 40 Jahren genormt wurde, weist sie zwei Hauptprobleme auf. Zum einen ist die Löslichkeit des Kollagens ungenau bestimmt aufgrund des unterschiedlichen Vernetzungsgrades der verschiedenen Gewebe und zum anderen sind die Peptide, insbesondere die kurzen nicht-helikalen Regionen des Kollagens, anfällig gegenüber Proteolyse bzw. Hydrolyse während der Isolierung (Chandrakasan et al., 1976).

### **weitere Extraktionsmethoden**

Die Extraktion von löslichem Kollagen ist auch in neutralem Phosphatpuffer möglich. Beispielsweise wurde lösliches Kollagen aus der Haut eines jungen Rindes mit einem 0,2 M Phosphatpuffer bei pH 7,4 und 5 °C extrahiert (Borel und Randoux, 1985).

Die essigsäure Extraktion kann auch durch eine Extraktion mit Citratpuffer ersetzt werden. So wurde beispielsweise eine Extraktion mit 10 Volumenteilen eines 0,1 M Citratpuffers bei pH 3,5 und einer Temperatur von 5 °C durchgeführt (Borel und Randoux, 1985).

### **2.2.2 Enzymatischer Abbau**

Wie jedes andere Protein kann Kollagen durch Proteasen in einzelne Fragmente gespalten werden, was zum Beispiel beim Kollagenstoffwechsel im Körper oder bei der Analyse von unterschiedlichen Kollagentypen eine Rolle spielt. Des Weiteren wird auch der biologischen Abbaubarkeit von Kollagenmaterialien immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Wenn beispielsweise Kollagen in der Medizintechnik als Wundpflaster verwendet wird, ist es wichtig, dass das Pflaster im Körper zunächst gegenüber einem proteolytischen Angriff stabil bleibt, später aber durch körpereigene Enzyme komplett abgebaut wird (Reich, 1966).

#### ***Trypsin***

Trypsin ist ein Enzym, welches in der Bauchspeicheldrüse von Menschen und Wirbeltieren gebildet wird. Im menschlichen Körper dient es zur Verdauung von Proteinen. Gegenüber Trypsin ist natives Kollagen völlig beständig. Nur durch stärkere Denaturierung, wie zum Beispiel nach Hitzeschrumpfung, wird Kollagen auch durch Trypsin und andere proteolytische Enzyme mehr oder weniger vollständig abgebaut (Reich, 1966).

Trypsin (23 kDa) katalysiert die Spaltung der Peptidbindungen C-terminal von Arginin und Lysin sowie deren Amide und Ester. In der Proteinanalytik ist Trypsin die am häufigsten verwendete Serinprotease. Zudem zeigt Trypsin sein Wirkungsoptimum bei einem pH-Wert von 7 bis 8 (Abbildung 9) (Reich, 1966).

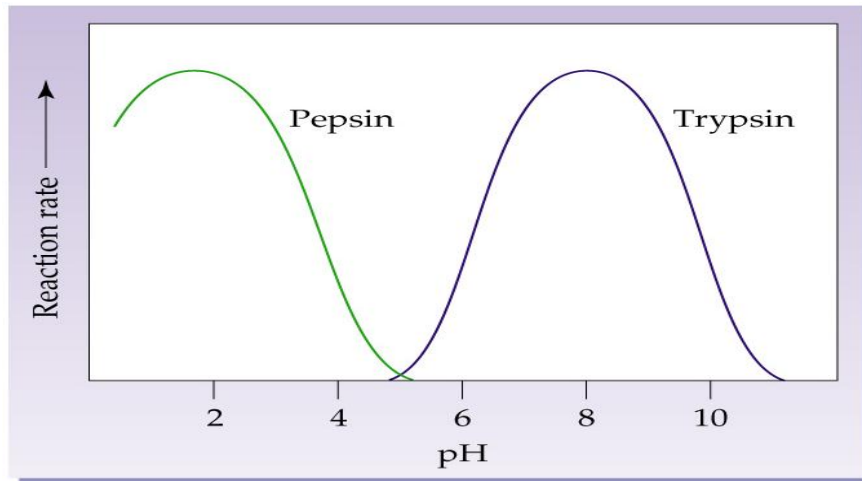


Abbildung 9: Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit von Trypsin in Abhängigkeit vom pH-Wert im Vergleich zum Enzym Pepsin (Peri, 2009)

Das Enzym wird vor allem zur Erstellung von „peptide maps“ im Hinblick auf die Auswertung mit Hilfe der Massenspektrometrie eingesetzt. Weiterhin kommt Trypsin auch beim Solubilisieren von Membranproteinen oder bei Topologiestudien zum Einsatz (Lottspeich und Engels, 2006).

### ***Pepsin***

Pepsin ist eine Aspartatprotease mit einer relativ hohen Spezifität. Diese Protease spaltet bevorzugt Bindungen von Phenylalanin, Methionin, Leucin oder Tryptophan zu anderen hydrophoben Resten. Im Fall von nativem Kollagen spaltet das Enzym die nicht-helikalen Anteile (Telopeptide) des Kollagenmoleküls ab und lässt den helikalen Anteil intakt (Struck und Pillukat, 1989). Pepsin ist eines der seltenen Enzyme, das in einem sauren pH-Bereich die Hydrolyse von Peptidbindungen durchführt. Dabei liegt das pH-Optimum bei 2,0 (Abbildung 9).

### **2.2.3 Reduktion**

Die Reduktion von Disulfidbrücken ist für die Solubilisierung von Kollagen der Basalmembran, in welcher die Untereinheiten neben den Kollagenvernetzungen auch durch Disulfidbrückenbindungen miteinander verbunden sind, von großer Bedeutung. Somit ist die Reduktion der Disulfidbrücken in einigen Geweben, wie in der Arterienwand,

für die Extraktion von Kollagen unerlässlich. Wahrscheinlich liegt es daran, dass sich die interstitiellen Kollagene mit anderen Proteinen, die Disulfidbrücken enthalten, verflechten. Wiederum in anderen Fällen wird durch die Reduktion der Disulfidbrücken eine Trennung der  $\alpha$ -Ketten des Kollagens erreicht. Dies betrifft beispielsweise Prokollagene und den Kollagentyp III (Borel und Randoux, 1985).

Für die Reduktion werden Dithiothreitol (DTT), 2-Mercaptoethanol oder Tributylphosphin verwendet. DTT bzw. Cleland's Reagens wird am häufigsten verwendet, da es ein sehr niedriges Redoxpotenzial besitzt und Cystine innerhalb von kurzer Zeit vollständig reduziert (Lottspeich und Engels, 2006). Dabei werden bevorzugt stabile cyclische Disulfide gebildet (Abbildung 10). Die Reduktion mit Dithiothreitol findet in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,2 M in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4 - 8,5) statt. Jedoch gelingt diese Reduktion auch in 8 M Harnstoff oder in 1 % SDS-Lösung. Die Zugabe des Harnstoffes bewirkt dabei eine vollständige Entfaltung der Polypeptidketten und der enthaltene Stickstoff verhindert die Reoxidation der SH-Gruppen (Schäfer, 2007). Die entsprechende Inkubationzeit für diese Reaktion beträgt vier Stunden bei einer Temperatur von 22 bis 37 °C. Eine schnellere Durchführung der Methode wird durch die Inkubation für drei Minuten und bei 100 °C erreicht (Borel und Randoux, 1985).

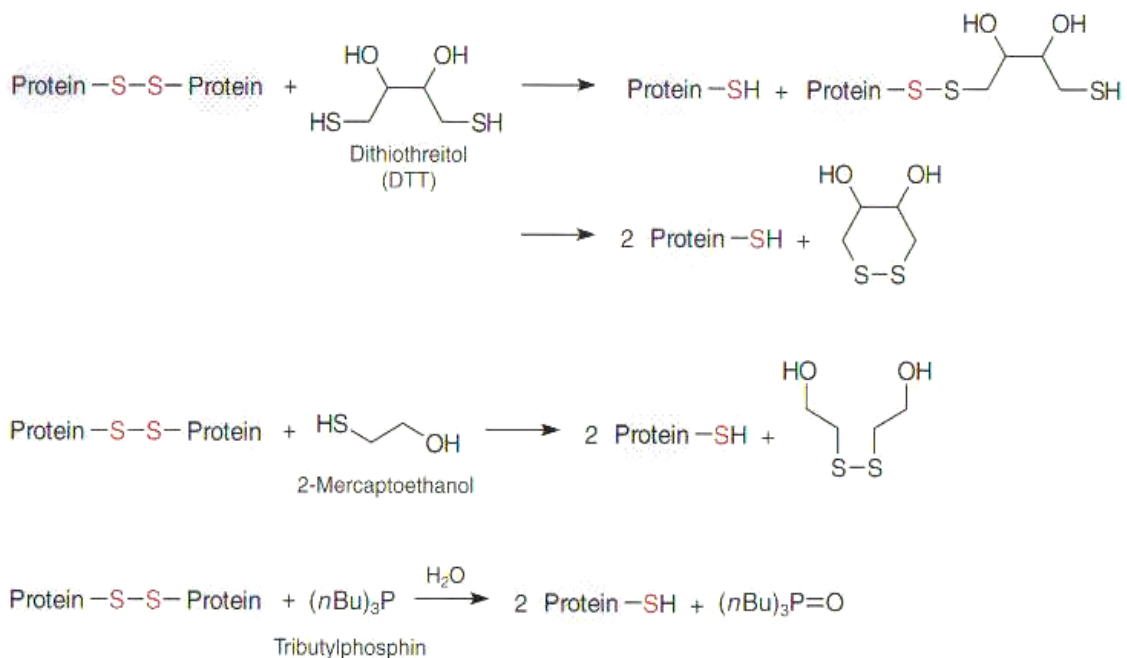


Abbildung 10: Reduktive Spaltung der Disulfidbrücken durch Dithiothreitol, 2-Mercaptoethanol und Tributylphosphin (Schäfer, 2007)

Ein weiteres beliebtes Reduktionsmittel ist 2-Mercaptoethanol. Die Reduktion wird mit Hilfe von 1 % 2-Mercaptoethanol in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) und 1 % SDS oder mit 1 % 2-Mercaptoethanol in 8 M Harnstofflösung durchgeführt. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 2 und 15 Stunden. Die Temperatur wird normalerweise auf 37 °C eingestellt, jedoch nutzen einige Wissenschaftler auch eine dreiminütige Inkubation bei 100 °C (Borel und Randoux, 1985). *Lillie et al.* (1987) zeigten mit ihren Experimenten, dass eine Reduktion der Disulfidbrücken mit 5 % 2-Mercaptoethanol in destilliertem Wasser für 30 Minuten und bei einer Temperatur von 70 °C möglich ist.

Weiterhin kann für die Reduktion der Disulfidbrücken Tributylphosphin verwendet werden. Dieses Reduktionsmittel ist flüchtig und wird deshalb unmittelbar vor einem Edmann-Abbau verwendet (Lottspeich und Engels, 2006). Die Reaktionen sind in Abbildung 10 dargestellt.

### **2.2.4 Fraktionierte Salzfällung**

Die Salzfällung ist eine häufig angewandte Methode zur Trennung und Reinigung von Makromolekülen. Mit Neutralsalzen, wie Natriumchlorid, Kaliumchlorid oder Ammoniumsulfat ist eine gute Fraktionierung möglich (Geckeler und Eckstein, 1998).

Die Löslichkeit von Kollagen ist stark von der Salzkonzentration (Ionenstärke) des Mediums abhängig. In reinem Wasser ist das Protein schlecht löslich. Mit zunehmender Ionenstärke erhöht sich jedoch die Löslichkeit des Kollagens, weil an der Proteinoberfläche mehr hydratisierte anorganische Ionen gebunden werden. Dadurch wird die Aggregation der Moleküle verhindert (Einsalzeffekt). Im Fall von sehr hohen Ionenstärken wird dem Kollagen durch das zugegebene Salz zusätzlich das Hydrat-Wasser entzogen. Dies führt zu einer Aggregation und schließlich zur Ausfällung der Moleküle (Aussalzeffekt). Bei dieser Art der Fällung ist jedoch die Geschwindigkeit der Salzzugabe entscheidend, sie sollte sehr langsam erfolgen (Koolman und Röhm, 2002).

Die einzelnen Typen sind bei verschiedenen Salzkonzentrationen unterschiedlich gut löslich. Daher ist es möglich sie durch Fällung bei nacheinander ansteigenden Salzkonzentrationen zu trennen. Nach jedem Schritt der Salzzugabe wird das Präzipitat abzentrifugiert und in einem entsprechenden Behältnis gesammelt.

### **NaCl-Fällung nach saurer Extraktion**

Diese Art der Salzfällung wird in einer 0,5 M Essigsäure-Lösung durchgeführt. Dabei kann in dieser Lösung auch schon ein Pepsin-Verdau stattgefunden haben. Mit der Zugabe von Natriumchlorid bis zu einer Konzentration von 0,7 M werden die Kollagentypen I und III ausgefällt. Mit einer Konzentration von 0,9 M NaCl ist die Präzipitation des Typ II-Kollagen möglich. Eine Konzentration von 1,2 M NaCl führt zur Ausfällung des Typ V (Borel und Randoux, 1985).

### **NaCl-Fällung nach Neutralsalz-Extraktion**

Die neutrale Fällung wird in einem Tris-HCl-Puffer mit 1,0 M NaCl bei 4 °C durchgeführt. Bei einer Salzkonzentration von 1,5 – 1,7 M NaCl fällt zuerst das Typ III-Kollagen aus. Mit der Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 2,4 M kann danach Typ I isoliert werden. Schließlich wird der Kollagentyp V mit einer NaCl-Konzentration von 3 – 4,5 M ausgefällt (Borel und Randoux, 1985).

## **2.3 Charakterisierung von Kollagen**

### **2.3.1 Bromcyanspaltung**

Die Bromcyanspaltung wurde 1965 in der Proteinanalyse eingeführt (Borel und Randoux, 1985). Bromcyan spaltet nahezu quantitativ und sehr spezifisch die Bindung Met-Xaa, für die es sonst kein passendes Enzym gibt. Bei Met-Thr- und Met-Ser-Bindungen können jedoch nur sehr schlechte Spaltausbeuten erzielt werden. Methionin kommt in Proteinen eher selten vor, deshalb können auch nur wenige große Fragmente gebildet werden. Diese Fragmente können aufgrund ihrer begrenzten Anzahl eindeutig bestimmt werden. Daher stellt die Bromcyanspaltung eine Vorstufe für weitere Sequenzanalysen dar. Die Reaktion wird in 70 %iger Ameisensäure, einem für den Großteil der Proteine guten Lösungsmittel, ausgeführt. Als Nebenreaktion findet eine partielle saure Hydrolyse von Asparagin-Prolin-Bindungen statt. Das Reagens Bromcyan (BrCN) ist flüchtig und somit für die weitere Aufarbeitung des Proteins geeignet (Lottspeich und Engels, 2006).

Die Selektivität von Bromcyan geht aus dem elektrophilen Angriff von Bromcyan am Schwefel der Methioninseitenkette unter Bildung eines Sulfonium-Ions hervor. Die weitere Freisetzung von Methylthiocyanat verursacht die Bildung eines intermediären Iminorings

in Verbindung mit der Carbonylgruppe des Methionins. Schließlich führt die Zugabe von Wasser zur Hydrolyse des Iminolactonrings und zur Spaltung der vorhandenen Peptidbindung unter Freisetzung einer neuen Aminogruppe. Als C-terminale Aminosäure der bereits gespaltenen Bindung entsteht Homoserin, das in Homoserin-Lacton umgewandelt werden kann und mit diesem im Gleichgewicht ist (Abbildung 11) (Lottspeich und Engels, 2006).

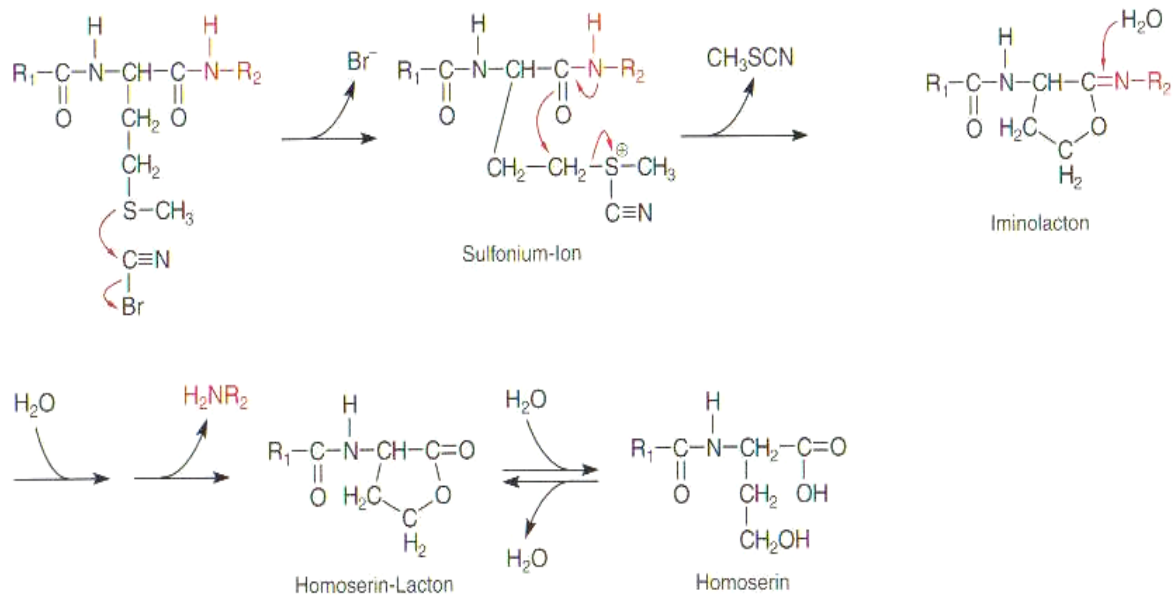


Abbildung 11: Reaktionsschema der Bromcyanspaltung (Lottspeich und Engels, 2006)

Mit Hilfe der Bromcyanspaltung kann die primäre Struktur der  $\alpha$ -Ketten des Kollagens sehr gut untersucht werden, denn aufgrund der Größe dieser Ketten ist die Bestimmung der Aminosäuresequenz des Proteins ohne vorherige Fragmentierung praktisch unmöglich. Durch die begrenzte Anzahl der Methioninreste (6–15), welche wiederum vom Kollagentyp und der Spezies abhängig sind, kann das Kollagen in genau definierte Peptide gespalten werden (Borel und Randoux, 1985). Dies ermöglicht, zum Beispiel nach dem Anschluss einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese an die Bromcyanspaltung, die Unterscheidung der einzelnen Kollagentypen voneinander. Die Peptide, die durch die Spaltung des Kollagens mit Bromcyan entstanden sind, werden als Bromcyan-Peptide mit dem Kürzel CB bezeichnet. Jedes dieser Peptide erhält eine spezifische Abkürzung, in welcher zuerst der Kollagentyp und anschließend die jeweilige  $\alpha$ -Kette erwähnt wird:  $\alpha_1(\text{I})\text{CB}$ ,  $\alpha_2(\text{I})\text{CB}$ ,  $\alpha_1(\text{II})\text{CB}$ ,  $\alpha_1(\text{III})\text{CB}$ , etc.. Die Bromcyan-Peptide, die bei der Spaltung der  $\alpha$ -Ketten entstehen, werden nach der Reihenfolge ihrer Elution an einer

Carboxymethylcellulose-Säule geordnet und mit der entsprechenden Ziffer versehen (Miller, 1976). In Abbildung 12 sind die Bromcyan-Peptide beider  $\alpha$ -Ketten des Kollagentyp I dargestellt.

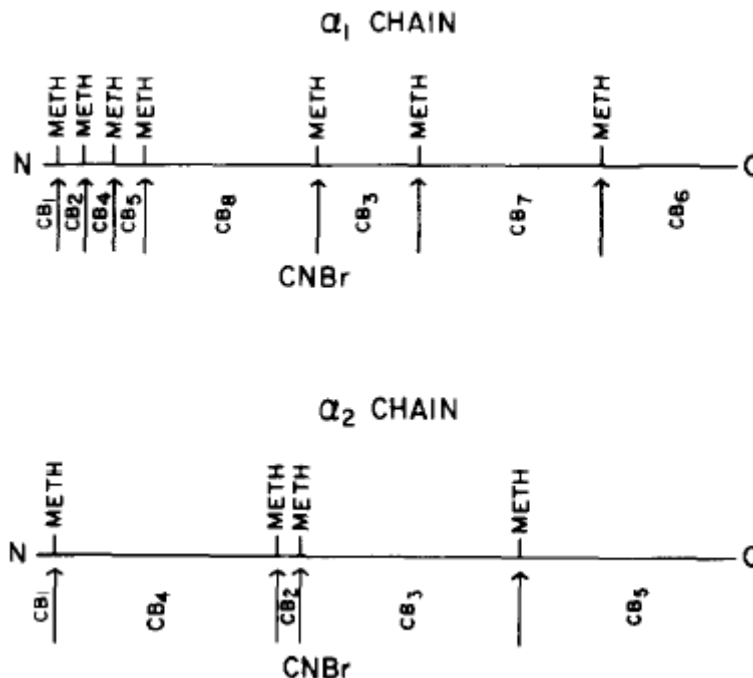


Abbildung 12: Darstellung der Bromcyan-Peptide der  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Kette des Kollagentyp I (Nimni, 1974)

Die Bromcyan-Spaltung erfolgt normalerweise mit einem 100 - 1000 fachen molaren Überschuss an Bromcyan über Methionin in 70 %iger Ameisensäure über einen Zeitraum von 4 - 24 Stunden. Nach *Borel und Randoux* (1985) wird die Spaltung mit Bromcyan für 4 Stunden und bei 30 °C unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Aufgrund der Giftigkeit von Bromcyan muss die Reaktion unter einem Abzug durchgeführt werden (Pingoud und Urbanke, 1997). Ein größerer Überschuss an Bromcyan oder längere Inkubationszeiten führen zu Nebenreaktionen.

Die Spaltung mit Bromcyan kann auch mit geblotteten Proteinen auf PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membranen oder mit Proteinen, die sich in einer Polyacrylamidgelmatrix befinden, erfolgen (Lottspeich und Engels, 2006). Eine elektrophoretische Trennung macht es möglich den Reinheitsgrad und das Molekulargewicht der Bromcyan-Peptide (in Verbindung mit einem Standard) abzuschätzen. Des Weiteren wurde die Methode für die Entdeckung neuer Kollagentypen



und zur Bestimmung der Verhältnisse der einzelnen Typen aus unterschiedlichen Proben verwendet (Bornstein und Sage, 1980).

### 2.3.2 Elektrophorese

Der Begriff Elektrophorese bezeichnet die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld (Helm und Wölfl, 2007). Dabei führen verschiedene Ladungen und Größen der Teilchen zu einer unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit. Ein Substanzgemisch kann somit in einzelne Zonen aufgetrennt werden. Bei der Elektrophorese finden im Wesentlichen drei verschiedene Verfahren ihre Anwendung. Hierbei werden die Zonenelektrophorese (mit Träger oder trägerfrei) mit einem homogenen Puffersystem, die Isotachophorese mit einem diskontinuierlichen Puffersystem und die isoelektrische Fokussierung mit pH-Gradienten voneinander unterschieden. Alle drei elektrophoretischen Verfahren zeigen ein sehr hohes Auflösungsvermögen und konnten sich vor allem in der Biochemie und Molekularbiologie, in klinischer und forensischer Medizin sowie in der Taxonomie von Mikroorganismen, Tieren und Pflanzen etablieren (Lottspeich und Engels, 2006).

Da in der vorliegenden Arbeit nur die Disk-Elektrophorese nach dem Prinzip der Isotachophorese zur Anwendung kam, soll im Folgenden genauer auf diese Methoden eingegangen werden.

#### *Physikalische Grundlagen*

In einem elektrischen Feld werden geladene Teilchen bewegt. Sobald sich ein geladenes Teilchen  $q$  in einem elektrischen Feld  $E$  befindet, wirkt auf das Teilchen eine Kraft  $K$  mit

$$K = q \cdot E.$$

Wenn sich das Teilchen in einem Medium bewegt, so wirkt zusätzlich auf dieses eine Reibungskraft. Das Stokes'sche Gesetz beschreibt dabei die Kraft, die auf ein kugelförmiges Teilchen in einer Flüssigkeit wirkt:

$$K = 6 \cdot \eta \cdot v \cdot r \cdot \pi$$

mit  $\eta$  = Viskosität der Flüssigkeit,  $v$  = Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens und  $r$  = Radius des Teilchens. Im nächsten Schritt können die beiden Kräfte gleichgesetzt werden:

$$q \cdot E = 6 \cdot \eta \cdot v \cdot r \cdot \pi.$$

Aus der Gleichsetzung folgt:

$$v = (q \cdot E) / (6 \cdot \eta \cdot r \cdot \pi) \text{ (Michov, 1995).}$$

Die Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens ist somit proportional zu dessen Ladung  $q$  sowie der elektrischen Feldstärke  $E$  (Spannung und Elektrodenabstand) und umgekehrt proportional zu seiner Größe (Radius  $r$ ) sowie der Viskosität  $\eta$  des vorhandenen Mediums. Weiterhin ist die Ladung eines Teilchens von vielen Parametern abhängig: Dielektrizitätskonstante des Mediums, pH-Wert des Puffers, Ionenstärke sowie Anzahl und Art der geladenen Gruppen. Aufgrund der elektrophoretischen Beweglichkeit eines Moleküls ist es bei der klassischen Elektrophorese nicht möglich, Aussagen über Eigenschaften wie Molekulargewicht zu treffen (Häfner et al., 2009).

### ***Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)***

Heutzutage wird die Elektrophorese vorwiegend in stabilisierenden Medien, in der Regel in Gelen durchgeführt. Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde im Jahr 1959 von Raymond und Weintraub entdeckt und spielt seit dem eine sehr große Rolle unter anderem in der Proteinbiochemie (Häfner et al., 2009).

Das Polyacrylamidgel ist derzeit der am weitesten verbreitete elektrophoretische Träger. Es hat im Gegensatz zu anderen Trägern zwei wichtige Vorteile. Zum einen zeigt es keine Wechselwirkungen mit den zu trennenden Polyionen, da es chemisch inert ist und keine elektrischen Ladungen besitzt, die Elektroosmose verursachen. Zum anderen entsteht durch das Gel ein Siebeffekt, der eine zusätzliche Trennung nach Massen gewährleistet (Michov, 1995).

Das Polyacrylamidgel (PAG) stellt ein Copolymer zwischen dem Monomer Acrylamid und dem Comonomer N,N'-Methylenbisacrylamid dar. Durch die Polymerisation des Monomers und des Comonomers entsteht ein klares durchsichtiges Gel mit einer sehr guten chemischen und mechanischen Stabilität. Die Polymerisation erfolgt radikalisch, wobei Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalspender dient. Freie Radikale werden

durch Tetramethylethyldiamin (TEMED) stabilisiert (Häfner et al., 2009) (Abbildung 13).

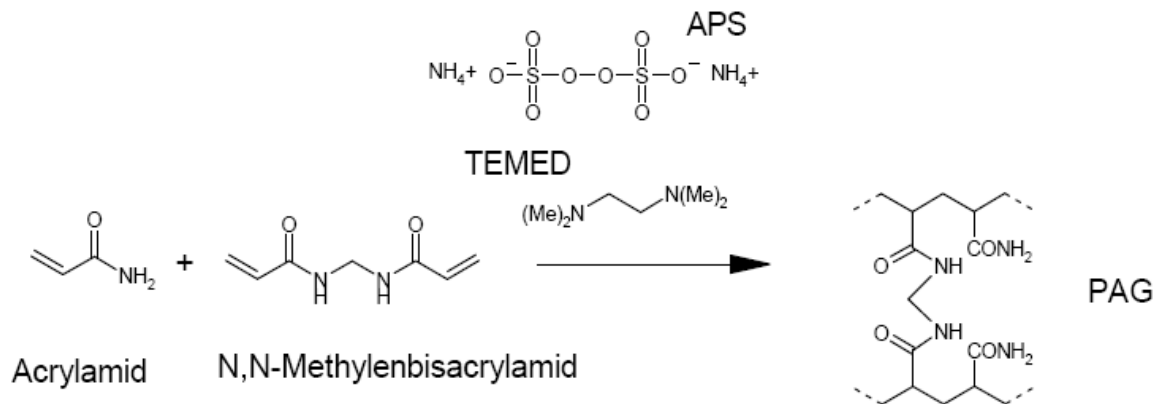


Abbildung 13: Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (Häfner et al., 2009)

Beim längeren Aufbewahren polymerisiert das neurotoxische Acrylamid spontan, weswegen die Monomerlösung nur begrenzt haltbar ist. Im polymerisierten Zustand ist das Gel nicht giftig, falls es keine Reste von Acrylamid enthält (Michov, 1995).

Die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese wurde 1964 durch *Ornstein und Davis* eingeführt. Die Diskontinuität bezieht sich auf die vier Parameter Gelstruktur sowie pH-Wert, Ionenstärke und Art der Ionen im Gel- und im Elektroden-Puffer. Die Gelmatrix besteht aus zwei unterschiedlichen Bereichen: das engporige Trenngel und das weitporige Sammelgel. Das Trenngel enthält 0,375 M Tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 8,8 und das Sammelgel 0,125 M Tris-HCl-Puffer mit pH 6,8 (Westermeier, 1990). Im Elektrodenpuffer finden als Anionen ausschließlich langsame Folge-Ionen, wie Glycin ihre Anwendung. Im Gel werden ausschließlich Leit-Ionen, wie Cl<sup>-</sup> mit einer sehr hohen Mobilität verwendet. Der pH-Wert des Sammelgels liegt sehr nahe beim isoelektrischen Punkt des Glycins, somit ist das Folge-Ion zu Beginn der Trennung nicht geladen. Die Chlorid-Ionen in den Gelpuffern zeigen hingegen eine sehr hohe Mobilität. Mit dem Auftragen des Proteingemisches auf das weitporige Sammelgel liegen die Mobilitäten der Protein-Ionen zwischen denen der Leit- und Folge-Ionen (Lottspeich und Engels, 2006).

Beim Anlegen eines elektrischen Feldes beginnen alle Ionen im Gel mit der gleichen Geschwindigkeit zu wandern. Dieser Vorgang wird auch als Isotachophorese bezeichnet. Da sich sonst eine Lücke zwischen den Ionen ergeben würde, kann keines der Ionen schneller oder langsamer als die anderen wandern. Im Bereich der Leit-Ionen (hohe

Mobilität) stellt sich eine niedrige und innerhalb des Bereiches der Folge-Ionen (niedrige Mobilität) eine hohe Feldstärke ein. Somit bewegen sich die Protein-Ionen in einem Feldstärkegradienten und bilden während ihrer Wanderung durch das Polyacrylamidgel einen Stapel in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten („Stacking“-Effekt) aus. Die Protein-Ionen mit der höchsten Mobilität folgen dem Leit-Ion und die mit der geringsten Mobilität werden vor den Folge-Ionen her geschoben. Auf Grund der weitporigen Gelmatrix des Sammelgels sind die einzelnen Mobilitäten nur von den Ladungen und nicht von den Molekulargewichten abhängig (Westermeier, 1990).

Der vorhandene Proteinstapel bewegt sich langsam mit einer konstanten Geschwindigkeit in die Richtung der Anode, bis er an die Grenzschicht des Trenngels gerät. Die Proteine müssen in dieser Grenzschicht einen hohen Reibungswiderstand ertragen, so dass ein Stau entsteht, der zu einer weiteren Bandenverschärfung führt. Das niedermolekulare Glycin wird dadurch jedoch nicht beeinflusst und überholt somit die Proteine. Anschließend befinden sich die Proteine in einem homogenen Puffermilieu, wodurch der Proteinstapel aufgelöst wird. Die einzelnen Proteinkomponenten beginnen sich aufzutrennen. Im Trenngel ist die Mobilität der Protein-Ionen sowohl von den Ladungen als auch von dem Molekulargewicht abhängig. Daraufhin arrangiert sich die Folge der Protein-Ionen im Gel neu. Mit dem Anstieg des pH-Wertes auf 9,5 erhalten die Proteine zudem höhere Nettoladungen (Westermeier, 1990) (Abbildung 14).

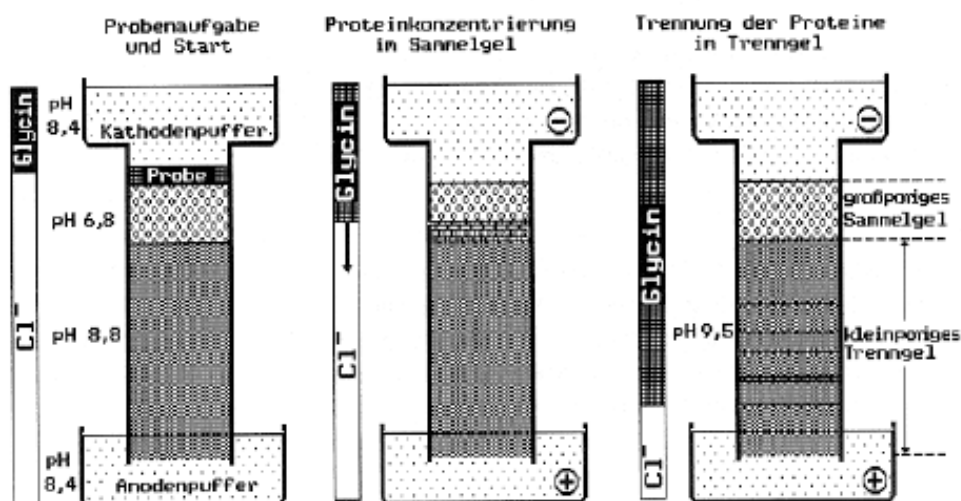


Abbildung 14: Das Prinzip der diskontinuierlichen Elektrophorese (Westermeier, 1990)

Zur Trennung von basischen Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt (pI) > 6,8 muss jedoch ein anderes Puffersystem verwendet werden, da die Proteine sonst in Richtung der Kathode transportiert werden und somit verloren gehen (Lottspeich und Engels, 2006).

Bei der Trennung von Biopolymeren wird zusätzlich noch zwischen nativen und denaturierenden Elektrophoresebedingungen unterschieden. Für ein natives Elektrophoreseverfahren werden die Bedingungen so gewählt, dass die Biopolymere ihre natürliche dreidimensionale Faltung behalten. Dazu werden denaturierende Chemikalien sowie Hitze vermieden. Im Gegensatz dazu werden bei der denaturierenden Elektrophorese chaotrope Agentien, wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid, verwendet. Diese lösen die native Struktur von Proteinen größtenteils auf. Anschließend liegen diese Biopolymere als ungeordnete kugelförmige Knäuel (random coil) vor (Helm und Wöfl, 2007).

### ***SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)***

SDS (Abkürzung für sodium dodecyl sulfate) bzw. Natriumdodecylsulfat ist ein anionisches Detergens und überdeckt die Eigenladungen von Proteinen. Dadurch entstehen anionische Mizellen mit einer konstanten Nettoladung pro Masseneinheit. Es werden im Schnitt 1,4 g SDS pro Gramm Protein gebunden (Häfner et al., 2009). Zusätzlich werden unterschiedliche Molekülformen ausgeglichen, indem die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch die Spaltung der Wasserstoffbrücken und durch die Streckung der einzelnen Moleküle beseitigt werden. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen können durch die Zugabe eines Reduktionsmittels, wie 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol aufgespalten werden (siehe Kapitel 2.2.3).

Die mit SDS beladenen und gestreckten Aminosäureketten nehmen eine ellipsoide Form mit gleich langen Mittelabständen an. Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese besteht wiederum eine feste Beziehung zwischen dem Teilchenradius und deren Masse bzw. dem Molekulargewicht. Aus diesem Grund erfolgt im Gel die elektrophoretische Trennung von SDS-beladenen Proteinen durch den Siebeffekt nur noch nach dem Molekulargewicht (Häfner et al., 2009). Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse. Mit Hilfe von ausgewählten Standards lassen sich die Molmassen der Proteine auf diese Weise bestimmen.

Die SDS-Elektrophorese bringt eine Reihe praktischer Vorteile mit sich. Beispielsweise gehen auch sehr hydrophobe und denaturierte Proteine mit Hilfe von SDS in Lösung.

Die anschließend gebildeten SDS-Protein-Komplexe sind hoch geladen und zeigen somit eine hohe elektrophoretische Mobilität. Aufgrund der einheitlichen negativen Ladung der SDS-Protein-Mizellen laufen alle Fraktionen in eine Richtung. Die Trennung der einzelnen Komponenten erfolgt nur nach einem physiko-chemischen Parameter, dem Molekulargewicht. Mit dieser Form der Elektrophorese wird ein sehr hohes Auflösungsvermögen erreicht (Lottspeich und Engels, 2006).

Lämmli hat die Disk-Elektrophorese-Methode nach *Ornstein und Davis* (1964) für SDS-beladene Proteine übernommen, obwohl der pH-Wert- und Ionenstärke-Sprung zwischen Sammel- und Trenngel nicht notwendig ist. Aufgrund der hohen negativen Nettoladung der Protein-SDS-Mizellen ist die Mobilität des Glycins zu Beginn der Elektrophorese auch bei pH 8,8 niedriger als die der Proteine. Außerdem erfolgt während des „stacking“ keine Auftrennung nach einem Feldstärkegradienten, weil es durch die Überdeckung der Eigenladungen mit Hilfe von SDS keine Ladungsunterschiede innerhalb der Probe gibt. Somit wird im Sammelgel keine niedrigere Ionenstärke benötigt. Jedoch ist erwiesen, dass die Diskontinuität zwischen Sammel- und Trenngel durch die unterschiedliche Gelporosität sowie die Diskontinuität der Anionen für die Trennung von Vorteil sind (Westermeier, 1990).

### 2.3.3 Western Blot

Der sogenannte Western Blot wurde von *Towbin und Renard* im Jahr 1979 eingeführt und bezeichnet den Vorgang des Transfers von Proteinen (Protein-„Flecken“ bzw. englisch: Blots) auf eine Membran mit anschließender Immundetektion (Häfner et al., 2009). Dabei werden die im Elektrophoresegel aufgetrennten Proteine über Elektrotransfer auf einen Träger (z.B. Nitrocellulose- oder PVDF-Membran) übertragen und für die anschließende Immundetektion immobilisiert. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine aus dem Polyacrylamidgel heraus und bleiben an der Membran haften. Hierbei ist besonders darauf zu achten, dass bei der Übertragung die Proteine auf dem Träger in derselben geometrischen Anordnung erscheinen, wie sie nach der elektrophoretischen Auftrennung im Gel vorliegen. Mit dem Western-Blotting-Verfahren werden die Nachweismöglichkeiten für elektrophoretisch getrennte Fraktionen erweitert, da die auf der Membranoberfläche adsorbierten Moleküle anders als im Polyacrylamidgel frei zugänglich sind für hochmolekulare Nachweisliganden, wie z.B. Antikörper, Antigene, Lectine oder

Nukleinsäuren (Michov, 1995). Vor dem spezifischen Nachweis müssen die unbesetzten Bindungsstellen jedoch noch mit bestimmten Substanzen blockiert werden, die nicht an der nachfolgenden Nachweisreaktion teilnehmen (Westermeier, 1990).

### **Blotmembranen**

Für den Western Blot stehen unterschiedliche Membranen als Träger zur Verfügung. Sie enthalten entweder Cellulose-Derivate oder Kunststoff. Die wichtigsten Membranen bestehen aus Nitrocellulose, Polyvinylidendifluorid (PVDF), positiv geladenem Nylon, Diazobenzylloxymethylcellulose, Diazophenylthioethercellulose oder aktiviertem Glasfaserpapier (Michov, 1995).

#### *Nitrocellulosemembran (NC)*

Die Nitrocellulosemembran ist die beliebteste und am häufigsten verwendete Blotmembran. Diese Membranen sind mit Porengrößen von 0,05 µm bis 0,45 µm erhältlich (Westermeier, 1990). Je kleiner die Poren sind, desto höher ist die Bindungskapazität der Blotmembran. Auf Nitrocellulose adsorbierte Proteine lassen sich reversibel anfärben, um vor dem spezifischen Nachweis das Proteinmuster begutachten zu können. Aufgrund der Vorteile bezüglich der guten Bindungskapazität und der Möglichkeit zur Färbung kommt die Nitrocellulosemembran im praktischen Teil dieser Arbeit zum Einsatz.

Nitrocellulose wird nicht nur für Proteinfärbung, Immunfärbung oder Lektinfärbung eingesetzt, sondern auch für präparative Methoden, da die Proteine auch wieder eluiert werden können. Aufgrund der chemischen Unbeständigkeit dieser Blotmembran ist der Einsatz für Aminosäureanalysen und Sequenzierungen nicht möglich. Im trockenen Zustand sind die Membranen sehr brüchig und zudem leichtentzündlich. Um die Proteinbindungsstellen der Membran zu aktivieren, wird der Blotpuffer zusätzlich mit 20 % Methanol versetzt (Rehm, 2000).

#### *Polyvinylidendifluorid-Papiere (PVDF)*

Die hydrophoben Polyvinylidendifluorid-Membranen auf Teflonbasis zeichnen sich durch eine hohe Bindungskapazität sowie eine hohe chemische und mechanische Stabilität aus

(Westermeier, 1990). Sie eignen sich unter anderem für Proteinfärbung, Immunfärbung und außerdem für Aminosäuresequenzierungen und Aminosäureanalysen. Im Gegensatz zur Nitrocellulose bindet die PVDF-Membran auch kleine Mengen von Proteinen nicht vollständig. Je nach der Art des Proteins passieren zwischen 10 und 50 % ungebunden die Blotmembran. Des Weiteren können die adsorbierten Proteine auf der Membran nicht reversibel angefärbt werden (Rehm, 2000).

### *Nylonmembranen*

Die Nylonmembranen zeigen eine gute mechanische Stabilität und hohe Bindungskapazitäten. Sie binden die Protein-Polyionen elektrostatisch und durch hydrophobe Wechselwirkungen. Im Vergleich zu Nitrocellulose binden Nylonmembranen drei bis vier – mal mehr Protein/cm<sup>2</sup>. Weiterhin ist der Zusatz von 20 % Methanol zum Blotpuffer nicht notwendig, wodurch der Proteintransfer vom Gel auf die Membran schneller und effizienter durchgeführt wird. Jedoch gibt es Schwierigkeiten bei der Anfärbung der Banden auf der Membran, da auch kleine Moleküle wie Farbstoffmoleküle gebunden werden (Michov, 1995).

### *Diazobenzylloxymethyl- und Diazophenylthioether-Papiere*

Diese Membranen werden vor dem Gebrauch chemisch aktiviert und ermöglichen eine zweistufige Bindung mit den Molekülen: elektrostatisch und kovalent. Sie werden aber immer mehr durch Nylonmembranen ersetzt (Rehm, 2000).

### *Aktivierte Glasfasermembranen*

Membranen aus mit Polybren beschichteten Glasfasern eignen sich für direkte Aminosäuresequenzierungen, da die Blotmembran inert gegen die bei der Sequenzierung verwendeten Chemikalien ist. Die Proteinbindungskapazität der beschichteten Glasfasermembran ist ähnlich der von Nitrocellulosemembranen (Westermeier, 1990).

Jedoch gibt es leider noch keine Blotmembran, die 100 % der Moleküle an sich bindet. Besonders beim elektrophoretischen Proteinblotting gibt es oft Probleme, da niedermolekulare Proteine bereits durch die Folie durchwandern, während hochmolekulare Proteine noch nicht vollständig das Polyacrylamidgel verlassen haben. Deshalb werden



weiterhin neue Alternativen für einen möglichst gleichmäßigen Transfer gesucht (Westermeier, 1990).

### **Transfermethoden**

Für den Transfer selbst sind zurzeit vier verschiedene Transferverfahren bekannt: Diffusionsblotting, Kapillarblotting, Vakuumblotting und Elektrobloiting. Bei den Nukleinsäuren werden vorwiegend Kapillar- oder Vakuumblotting verwendet. Im Fall der Proteine wird das Elektrobloiting bevorzugt, worauf sich auch diese Arbeit beschränken wird.

Das Elektrobloiting stellt die schnellste Art von Blotting dar. Es dauert von einer halben bis zu 24 Stunden. Dieses Blottingverfahren hat die beiden Ausführungen Tankblotting und Semidry-Blotting (Michov, 1995).

#### *Tankblotting*

Beim Tankblotting werden das Polyacrylamidgel mit den elektrophoretisch getrennten Proteinen und die Blotmembran zwischen Filterpapieren und Schwammtüchern in eine Gitterkassette geklemmt und in einen mit Puffer gefüllten Tank eingehängt. Anschließend wird das Gel zwischen zwei beidseitig aufgespannten Elektroden geblottet. Das Tankblotting von SDS-Gelen wird in einem kontinuierlichen Puffer, wie z.B. im Tris-Glycinat-Puffer pH 8,3 durchgeführt. Dabei muss der Puffer gekühlt werden, damit sich das Blotsandwich nicht erwärmt. Dieser Transfer wird meistens über Nacht durchgeführt (Michov, 1995).

#### *Semidry-Blotting*

Das Semidry- (halbtrockene) Blotting wird bei Proteinen bevorzugt eingesetzt. Bei diesem Verfahren werden das Gel und die Blotmembran zwischen Filterpapier, welches mit Transferpuffer getränkt ist, gelegt. Das gestapelte Blotsandwich wird zwischen die horizontal angeordneten Graphitplatten eines Blotters eingelegt (Abbildung 15). Neben den Graphitblottern gibt es auch Blotter mit Glaskohlenstoffplatten, die eine höhere Festigkeit aufzeigen. Graphit und Glaskohlenstoff sind sehr beliebte Elektrodenmaterialien für das

Semidry-Blotting, da sie eine hohe elektrische Leitfähigkeit haben. Des Weiteren ist das elektrische Feld zwischen den Platten homogen und hat eine hohe Feldstärke, da der Abstand zwischen den Elektroden gering ist. Aus diesem Grund kann das Blotting schneller und gleichmäßiger stattfinden. Außerdem kann auf eine Kühlung verzichtet werden (Michov, 1995). Das Semidry-Blotting kann, ähnlich wie bei der Elektrophorese, in einem kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt werden. Bei dem diskontinuierlichen Puffersystem tritt der Isotachophorese-Effekt auf. Dabei wandern die Anionen mit gleicher Geschwindigkeit, so dass ein gleichmäßigerer Transfer stattfindet. Die Transferzeit beträgt ca. eine Stunde und ist abhängig von Dicke und Konzentration des Gels (Westermeier, 1990). Als Transferpuffer wird am besten der gleiche Puffer, in dem die Elektrophorese durchgeführt wurde, verwendet. Des Weiteren sollte dieser Puffer SDS und Methanol enthalten. SDS führt zu einem besseren Transfer der hydrophoben Proteine. Um eine Quellung des Gels während des Transfers zu verhindern, wird Methanol zum Puffer hinzugegeben (Michov, 1995). Trotz der Vorteile des Semidry-Blotting kommt im praktischen Teil dieser Arbeit das Tankblotting zum Einsatz.

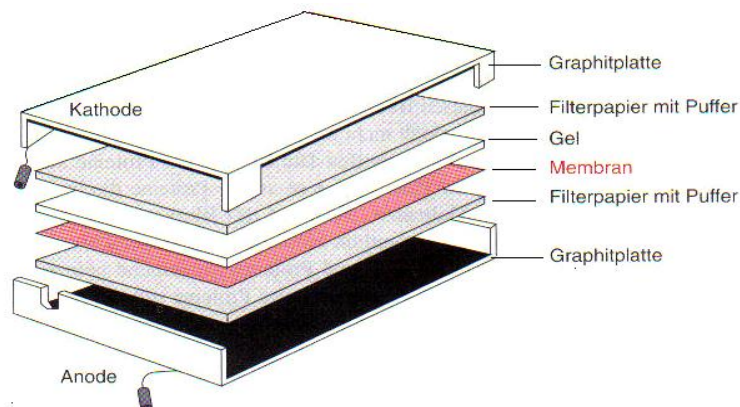


Abbildung 15: Aufbau eines Blotsandwichs beim Semidry-Blotting (Lottspeich und Engels, 2006)

Nach dem Transfer kann die Blotmembran angefärbt werden, damit noch vor dem spezifischen Nachweis das Transferergebnis begutachtet werden kann. Bei Blots mit Proteinmengen über 50 ng/Bande wird die Ponceaufärbung empfohlen. Bei geringeren Proteinmengen sollte Aurodye und Kupferiodid verwendet werden (Rehm, 2000).

In dieser Arbeit wird Ponceau S-Färbelösung zum Anfärben der Nitrozellulosemembran verwendet. Ponceaurot färbt die transferierten Proteine auf Nitrocellulose-Blots. Diese Färbung ist reversibel und kombinierbar mit einer anschließenden Immunfärbung. Die

Färbung mit Ponceaurot ist empfindlicher als die Coomassiefärbung des Gels. Der Färbelösung wird Trichloressigsäure zugesetzt, um die Proteine auf der Membran zu fixieren. Beim späteren Blockieren der restlichen Proteinbindungsstellen auf der Membran verschwindet die Farbe wieder (Rehm, 2000).

### **Blockieren der Blotmembran**

Zur Abdeckung der unbesetzten Bindungsstellen auf der Blotmembran werden geeignete makromolekulare Substanzen (Blockier-Reagenzien) verwendet. Dabei ist wichtig, dass diese nicht mit den transferierten Proteinen oder mit den spezifischen Nachweissubstraten an die Blotmembran binden und somit eine starke Hintergrundfärbung verursachen. Als Blockier-Reagenz für das Proteinblotting wird oft Rinderserumalbumin (BSA) verwendet (Michov, 1995). Für das Blotting werden große Mengen an BSA benötigt und dadurch wird diese Blockierungsmethode sehr preisintensiv. Weitere Blockier-Reagenzien sind 5 % Magermilchpulver, 3 % Fischgelatine oder 0,05 % Tween 20. Magermilchpulver ist sehr billig und zeigt eine gute Blockierung. Jedoch werden die Lösungen mit Magermilchpulver schnell von Bakterien befallen. Bei der Blockierung mit Tween 20 treten Probleme durch eine hohe Hintergrundfärbung der Membran und unspezifische Banden bei der Immunfärbung auf. Tween 20 lässt sich jedoch gut mit anderen Blockern, wie BSA kombinieren. Bei der Verwendung von Tween 20 ist auf die genaue Dosierung zu achten, da die Proteine teilweise vom Blot abgelöst werden können (Rehm, 2000). Die Blockierung erfolgt am schnellsten bei 37 °C.

Nach der Blockierung können die geblotteten Proteine spezifisch durch Sonden detektiert oder unspezifisch gefärbt werden (Michov, 1995).

### **Detektion durch Sonden und Farbstoffe**

Bei Verwendung von Sonden werden folgende Blotting-Verfahren unterschieden: Enzym-, Immun- und Lectinblotting (Michov, 1995). Für diese Arbeit ist jedoch nur das Verfahren des Immunblotting von Bedeutung.

Beim Immunblotting wird die Blotmembran nach dem Blockieren zuerst mit einem anti-Antigen-Antikörper (Primärantikörper) inkubiert. Dabei stellt das Antigen das gesuchte Protein dar. Danach folgen mehrere kurze Waschschriffe, um die ungebundenen anti-

Antigen-Antikörper zu entfernen. Anschließend wird der Blot mit einem markierten Antikörper (Sekundärantikörper) inkubiert. Dieser geht eine Bindung mit dem anti-Antigen-Antikörper ein. Nach weiteren Waschvorgängen wird die Blotmembran mit Hilfe der Markierung des zweiten Antikörpers entwickelt und somit die genaue Position des Antigens sichtbar.

Die Spezifität dieser Immunfärbung ist von der Spezifität des ersten und zweiten Antikörpers sowie von der Verdünnung, in der die Antikörper zum Einsatz kommen, abhängig. Die Inkubationszeiten der beiden Antikörper richten sich nach der Menge der Antigene und der Affinität der Antikörper. Sie betragen für den ersten Antikörper 1-2 Stunden und für den zweiten Antikörper ca. eine Stunde (Rehm, 2000).

Für die Markierungen des zweiten Antikörpers gibt es mehrere Möglichkeiten:

### *Radioiodiertes Protein A*

Das radioaktiv markierte Protein A lagert sich an spezifisch bindende Antikörper an und ermöglicht somit sehr hohe Nachweisempfindlichkeiten.  $^{125}\text{I}$ -Protein A kann sich aber nur an bestimmte IgG-Subklassen binden. Außerdem darf das Protein A wegen seiner Radioaktivität nicht in allen Labors verwendet werden (Michov, 1995).

### *Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper*

In diesem Fall wird ein gegen den spezifisch bindenden Antikörper gerichteter, mit einem Enzym markierter Antikörper verwendet. Die am häufigsten verwendeten Enzyme sind die Peroxidase und die alkalische Phosphatase (Michov, 1995).

Die alkalische Phosphatase katalysiert eine Reaktion an den Farbstoffen BCIP (= 5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat) und NBT (= Nitroblau Tetrazolium) (Abbildung 16). Mit Hilfe der alkalischen Phosphatase wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten. Im gleichen Moment wird durch das Enzym aber auch NBT reduziert. In der dephosphorylierten Form zeigt BCIP eine blaue Farbe. Die reduzierte Form von NBT bildet hingegen einen violetten schwerlöslichen Niederschlag. Die beiden Niederschläge zusammen ergeben ein blauviolettbraunes Präzipitat, das an der Stelle, an der das primär nachzuweisende Protein lokalisiert ist, ausfällt. Diese Art der Detektion kommt auch innerhalb dieser Arbeit zum Einsatz (Häfner et al., 2009).

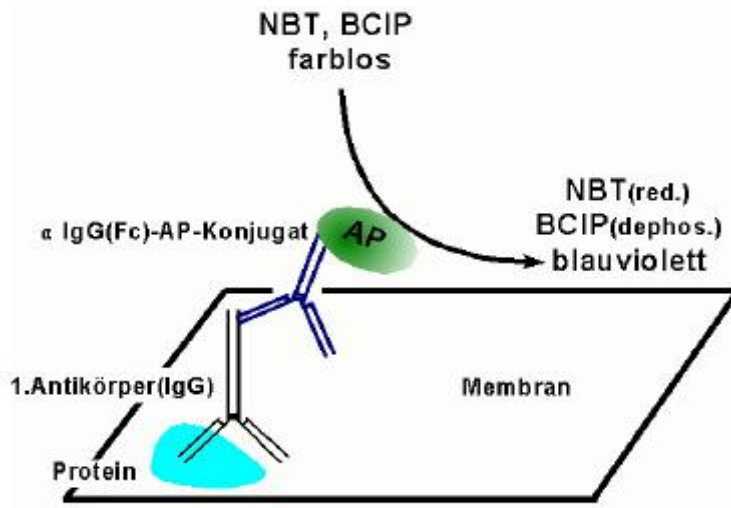


Abbildung 16: Verwendung eines mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpers zur Detektion (Häfner et al., 2009)

### *Avidin-Biotin-System*

Das Immunblotting kann auch mit einem Biotin-Avidin-System durchgeführt werden. Das Biotin-Avidin-System wird mit einem Enzym, wie z.B. Peroxidase und alkalische Phosphatase, und mit entsprechenden Antikörpern gekoppelt. Nach dem Transfer treten bestimmte Proteine auf der Blotmembran in Wechselwirkungen mit den Biotin-Antikörpern. Mit der Zugabe von markiertem Avidin entsteht ein nicht-kovalentes Netzwerk aus Biotin-Antikörper und markiertem Avidin. Das am Avidin gebundene Enzym katalysiert die Umwandlung des entsprechenden Substrats in ein Produkt, welches durch eine sichtbare Farbreaktion nachgewiesen werden kann.

### **2.3.4 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)**

Die Chromatographie wurde im Jahr 1906 vom russischen Botaniker *Michael Tswett* entwickelt (Helm und Wölfl, 2007). Die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography, Abkürzung HPLC) kann als physikalisch-chemische Trennmethode definiert werden, bei der eine gelöste Substanzmischung mithilfe eines Flüssigkeitsstromes über eine stationäre Phase geleitet und dabei in einzelne Bestandteile aufgetrennt wird. In Abhängigkeit vom verwendeten Trägermaterial werden Säulen-, Papier- und Dünnschichtchromatographie voneinander unterschieden. Aufgrund der vielseitigen Einsatzmöglichkeiten, der Automatisierbarkeit

und der höheren Nachweisempfindlichkeit setzte sich jedoch die Säulenchromatographie in vielen Bereichen durch und ist heute am weitesten verbreitet (Lottspeich und Engels, 2006).

Eine HPLC-Anlage ist aus einer Hochdruckpumpe und zwei oder mehreren Vorratsgefäßen für Komponenten der mobilen Phase, einer Trennsäule, einer Injektionseinheit für die Probenaufgabe, einem Detektor und einer Einheit zur Aufzeichnung des Detektorsignals aufgebaut. Abbildung 17 stellt den schematischen Aufbau einer HPLC-Anlage mit der Anordnung der verschiedenen Komponenten dar (Lindsay, 1996).

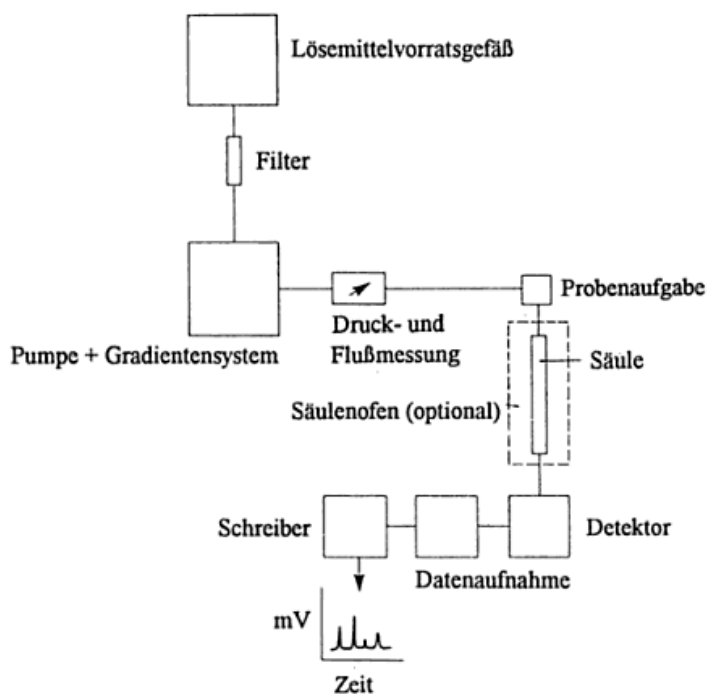


Abbildung 17: Schematische Darstellung eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (Lindsay, 1996)

Die Probe bzw. der Analyt wird entweder in einem schwachen Puffer oder in einer Mischung aus Wasser und organischem Lösungsmittel aufgenommen. Dies geschieht in Abhängigkeit von der Löslichkeit der Probe und dem verwendeten Laufmittel. Nach dem Auftragen der Probe werden die gelösten Komponenten von dem Laufmittel (mobile Phase) durch die Trennsäule transportiert, wobei die Probenmoleküle und der Eluent mit dem Füllmaterial der chromatographischen Säule (stationäre Phase) in Wechselwirkungen treten. Nach der Art der Wechselwirkung können bei der HPLC Ionenaustausch-, Affinitäts-, Ausschluss-, Adsorptions- und Verteilungs-Chromatographie unterschieden

werden. Die stattfindende Wechselwirkung führt zu einem verzögerten Transport der einzelnen Komponenten. Somit benötigt das Eluat eine charakteristische Zeit oder ein charakteristisches Volumen, die Retentionszeit oder das Retentionsvolumen, um die Säule wieder zu verlassen. Die Lösungsmittelzusammensetzung der mobilen Phase kann während der Trennung verändert werden, dabei wird von einer Gradiententrennung gesprochen. Diese Änderungen können schrittweise (Stufengradient) oder durch gleichmäßiges Mischen (linearer Gradient) von zwei oder drei verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Die verschiedenen Lösungsmittel unterscheiden sich beispielsweise im pH-Wert oder im Salzgehalt. Bleibt die Lösungsmittelzusammensetzung jedoch unverändert, so wird von einer isokratischen Trennung gesprochen (Lottspeich und Engels, 2006).

### **Ionenaustauschchromatographie**

Bei der Ionenaustauschchromatographie (engl. IEC - Ion Exchange Chromatography) werden Ionen mit Hilfe von Ionenaustauschern getrennt bzw. analysiert. Die stationären Phasen tragen an ihrer Oberfläche elektrische Ladungen, dies sind anionische  $\text{SO}_3^-$ - oder  $\text{COO}^-$ -Gruppen und kationische  $\text{NH}_3^+$ - oder  $\text{NR}_3^+$ -Gruppen. Diese elektrischen Gruppen werden an das Ionenaustauscherharz oder -gel kovalent oder elektrostatisch gebunden. Als Ionenaustauscher-Matrix kommen Polymere und Silicagele zum Einsatz (Gey, 1998). Die Ladung der auf der Ionenaustauscher-Matrix gebundenen Ionen wird durch bewegliche Gegenionen, wie z.B.  $\text{Na}^+$  bei  $\text{R-SO}_3^-$  oder  $\text{Cl}^-$  bei  $\text{R-N}^+\text{R}_3$ , kompensiert. Zu Beginn bindet das Probemolekül an den fixierten Ladungen der stationären Phase. Während des Ionenaustauschprozesses findet, wie es bereits der Name sagt, ein Austausch der Gegenionen  $\text{Na}^+$  durch die zu trennenden Probeionen  $\text{X}^+$  statt. Dieser Austausch ist eine Gleichgewichtsreaktion und kann durch folgende Beziehungen vereinfacht dargestellt werden:



Durch die steigende Salzkonzentration des Eluenten findet anschließend die Elution der Probe statt.

Proteine, wie Kollagen, tragen aufgrund der sauren und basischen Seitenketten einzelner Aminosäuren negative und positive Ladungen. Im sauren pH-Bereich sind die entsprechenden Aminogruppen protoniert und das Protein zeigt somit eine kationische Verhaltensweise. Im Gegensatz dazu tritt das Protein im basischen pH-Bereich als Anion mit einem Überschuss an negativen Ladungen auf. Der Ladungszustand des Proteins ist somit abhängig vom pH-Wert des umgebenden Eluenten. Die Aminosäurezusammensetzung ist entscheidend für den isoelektrischen Punkt (Neutralpunkt) des Proteins. Dabei führt ein Überschuss an negativ geladenen Aminosäureseitenketten zu einem niedrigen pI-Wert  $\leq 6$  und es wird von einem sauren Protein gesprochen. Dementsprechend wird ein Protein mit einem pI-Wert  $\geq 8$  als basisch bezeichnet. Die Wechselwirkungen des Proteins mit dem Ionenaustauscher sind sehr schwach, wenn der pI-Wert des Proteins nahe dem vorliegenden pH-Bereich ist. Je mehr sich diese beiden Werte unterscheiden bzw. je stärker das Protein geladen ist, desto stärker ist die Bindung an den Ionenaustauscher (Lottspeich und Engels, 2006).

### **Größenausschlusschromatographie**

Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (engl. Size Exclusion Chromatography) bzw. Gelchromatographie können gelöste Moleküle nach ihrer Größe getrennt werden. Diese Methode beruht auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit einer genau definierten Porengröße. Für die Trennung ist das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle verantwortlich. Ab einer bestimmten Größe der Moleküle können diese nicht mehr in die Poren des Trenngels eindringen und eluieren somit zusammen mit der mobilen Phase im Ausschlussvolumen  $V_0$  der Säule. Kleinere Moleküle dringen in die Poren der stationären Phase ein und erfahren dadurch eine Verzögerung in ihrer Wanderung durch die Phasenmatrix. Das Elutionsvolumen  $V_e$  dieser Moleküle entspricht dabei der Summe des internen Porenvolumens und des Partikelzwischenraums (Lottspeich und Engels, 2006). Die kleinsten Moleküle verweilen am längsten in den Poren und werden zuletzt eluiert. Großen Molekülen wird der Eintritt in das dreidimensionale Porensystem des Gels verwehrt, deshalb wandern sie mit der Front der mobilen Phase ziemlich schnell durch das Trenngel (Richter, 2003). Abbildung 18 zeigt ein charakteristisches Elutionsdiagramm.



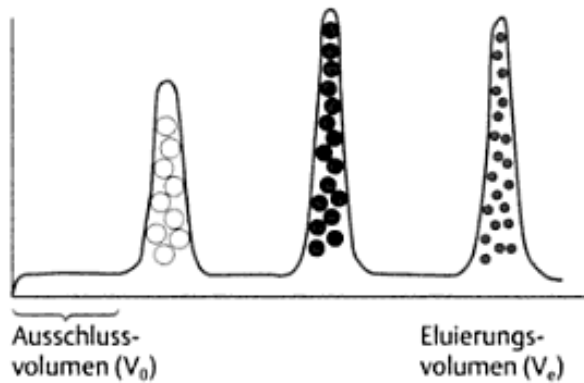


Abbildung 18: Darstellung eines typischen Elutionsdiagrammes (Richter, 2003)

Die mobile Phase dient ausschließlich als Lösungsmittel und übt somit keinen Einfluss auf den Trennungsvorgang aus.

Die Größenausschlusschromatographie wird vorwiegend für die Trennung von Proteinkomplexen, aber auch für die Abschätzung von Molmassen verwendet. Jedoch muss für die Molmassenbestimmung zuerst die Ausschluss säule mit verschiedenen Substanzen bekannter Molmassen kalibriert werden (Lottspeich und Engels, 2006).

### 3 Experimenteller Teil

#### 3.1 Chemikalien

Ameisensäure	Merck
Anti-Bovine Kollagentyp III aus Kaninchen (polyklonal)	Biozol
Anti-Bovine Kollagentyp I aus Kaninchen (polyklonal)	Biozol
Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege (polyklonal), AP gekoppelt	LifeSpan BioSciences
bidestilliertes Wasser	Destillation im Institut
Bromcyan	Merck
Bromphenolblau	Merck
Coomassie blue R 250	Merck
Densi Stain Blue G (2x)	SERVA
destilliertes Wasser	Destillation im Institut
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Essigsäure	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	SERVA
Harnstoff	Roth
Kollagenstandards	
Bornstein und Traub Typ I (aus Kalbshaut)	Sigma-Aldrich
Bornstein und Traub Typ II (aus Rinder-Trachealknorpel)	Sigma-Aldrich
Bornstein und Traub Typ III (aus menschlicher Plazenta)	Sigma-Aldrich
Bornstein und Traub Typ V (aus Plazenta)	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Saliter
2-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	KMF
Natriumchlorid	Roth

Natriumchlorid (HPLC grade)	Fisher Scientific
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumhypochloritlösung	Roth
Pepsin	Sigma-Aldrich
Ponceau S-Färbelösung	SERVA
Salzsäure	Fluka
SDS	SERVA
SIGMAFAST BCIP/NBT-Tabletten	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure	Fisher Scientific
Trizma base	Sigma-Aldrich
Trypsin	SERVA

### **3.2 Verbrauchsmaterial**

Blotting-Papier (thick)	Bio-Rad
Dialyseschlauch (MW: 12000-14000 Da)	SERVA
Faltenfilter	Schleicher und Schuell
Filter aus Mischzellulose Ester hydrophil (0,025 µm)	Millipore
HiTrap-Säule	GE Healthcare
Nitrozellulose-Membranen (0,2 µm)	Bio-Rad
SERVAGel <sup>TM</sup> -Fertiggele (TG 8% bzw. 12%)	SERVA
Sterilfilteraufsätze (0,2 µm)	Th. Geyer
Vials	Macherey-Nagel
Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (15 ml)	Roth

### 3.3 Geräte

Analysenwaage	Sartorius
Einkanalpipetten	Eppendorf
Elektrolysekammer BV 102	SERVA
Gefrierschrank	REVCO
Geldokumentationsanlage INGENIUS	SYNGENE
Mikroliterspritze (25 µl)	HAMILTON
HPLC-Anlage ÄKTA purifier	GE Healthcare
PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter Web™ S	PEQLAB
pH-Meter HI 221	HANNA
Rotationsverdampfer WB 2001	Heidolph
Rührwerk R3T	MLW
Schüttelbad SW-20C	Julabo
Spannungsquelle DESATRONIC 6000/100	DESAGA
Thermoblock MBT 250	ETG
Thermostat mit Eintauchkühler	Haake & Lauda
Ultraschallbad SONOREX SUPER	BANDELIN
Vakuum-Filtrationsgerät	Schleicher und Schuell
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf
Vortex Mixer VM-300	GEMMY
Zentrifuge 32 R	HETTICH

### 3.4 Untersuchungssubstanzen

Fisch-SLK	Herstellung im Institut
Rinder-SLK	Herstellung im Institut
Kollagenlösung Collaplex 1.0	GfN

Rinderhaut	Schlachthof (Memmendorf)
Schweinehaut	Schlachthof (Memmendorf)

### 3.5 Methoden

#### 3.5.1 Methoden zur fraktionierten Salzfällung der einzelnen Kollagentypen

##### verwendete Puffer und Reagenzien:

*Tris-HCl-Puffer (pH 7,4):*

Tris	0,05 M
Natriumchlorid	0,2 M

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl eingestellt.

Essigsäure	0,5 M
------------	-------

Pepsin

Die verwendeten Puffer und Reagenzien wurden nach *Borel und Randoux* (1985) hergestellt.

##### Probenvorbereitung:

Rohhaut von Schwein und Rind wurde vor der Extraktion zerkleinert bzw. gewolft. Von der zerkleinerten Rinder- und Schweinehaut wurden jeweils 20 g abgewogen. Die Haare der oberen Hautschicht wurden entfernt und die Haut nochmals mit destilliertem Wasser gewaschen.

##### NaCl-Fällung nach Neutralsalz-Extraktion:

Die Rinder- und Schweinehaut wurde mit 200 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) und 0,2 M Natriumchlorid versetzt und für 24 Stunden bei 4 °C kräftig gerührt. Nach der Reaktionszeit wurde die Haut durch Filtration von dem Extrakt getrennt. Aus diesem

Extrakt wurden die einzelnen Kollagentypen durch Zugabe unterschiedlicher Mengen Natriumchlorid ausgefällt. Dabei wurde die erste Fraktion (nach *Bornstein und Sage* (1980) Typ III entsprechend) mit einer NaCl-Konzentration von 1,5 bis 1,7 M aus dem entsprechenden Extrakt gewonnen. Für die Fällung der zweiten Fraktion (nach *Bornstein und Sage* (1980) Typ I entsprechend) wurde eine Konzentration von 2,4 M NaCl verwendet. Mit Hilfe der Konzentration von 3 bis 4,5 M NaCl wurde die dritte Fraktion (nach *Bornstein und Sage* (1980) Typ V entsprechend) abgetrennt. Der entstandene Niederschlag (Fraktion) wurde jeweils bei 4000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert, getrocknet und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert. Für diese Methode wurden sowohl die ungespaltenen Kollagenketten als auch die aus einer BrCN-Spaltung erhaltenen Peptide verwendet (Durchführung siehe Abschnitt 3.5.2).

Zusätzlich wurde säurelösliches Kollagen, das bereits aus Rinder- bzw. Fischhaut durch eine Extraktion mit 0,1 M Essigsäureextrakt und 5 % NaCl isoliert wurde, gegen Tris-HCl-Puffer über drei Tage dialysiert. Im Anschluss an die Dialyse folgte die fraktionierte Salzfallung mit dem gleichen Verfahren wie oben beschrieben.

#### NaCl-Fällung nach saurer Extraktion:

Im Anschluss an die Neutralsalz-Extraktion wurde die bereits neutral extrahierte Schweine- und Rinderhaut mit 200 ml Essigsäure versetzt und für 24 Stunden bei 4 °C kräftig gerührt. Nach der Reaktionszeit wurde die Haut von der Lösung durch Filtration getrennt. Durch die Zugabe von 0,7 M NaCl zum gewonnenen Extrakt wurde die erste Fraktion (entspricht nach *Bornstein und Sage* (1980) den Typen I und III) ausgefällt. Die zweite Fraktion (entspricht nach *Bornstein und Sage* (1980) dem Kollagentyp II) wurde mit einer Salzkonzentration von 0,9 M vom Extrakt abgetrennt. Mit der Erhöhung der Konzentration auf 1,2 M NaCl wurde schließlich die dritte Fraktion (entspricht nach *Bornstein und Sage* (1980) dem Typ V) ausgefällt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels einer Zentrifuge für 10 Minuten bei 4000 rpm abzentrifugiert. Dieser Niederschlag wurde in Eppendorf-Gefäßen gesammelt und getrocknet. Die anschließende SDS-PAGE sowie die BrCN-Spaltung erfolgten nach dem gleichen Prinzip wie bei der unter Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Doppel-Elektrophorese.

NaCl-Fällung nach saurer Extraktion mit Pepsin:

Die bereits verwendete Schweine- und Rinderhaut wurde bei 4 °C für 24 Stunden in 200 ml einer Lösung aus Essigsäure und 200 mg Pepsin kräftig gerührt. Nach der Reaktionszeit wurde die Haut mit Hilfe eines Siebes von dem Extrakt getrennt. Die Ausfällung der einzelnen Fraktionen bzw. Kollagentypen erfolgte bei den gleichen Salzkonzentrationen wie bei der Salzfällung nach saurer Extraktion. Nach der Zentrifugation wurde der Niederschlag in 15 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und in kleinen Mengen getrocknet. Bei der anschließenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sowie BrCN-Spaltung wurde wieder das Prinzip der Doppel-Elektrophorese angewandt.

Bei jedem einzelnen Schritt der fraktionierten Salzfällung war stets darauf zu achten, dass die Ansätze keiner Erwärmung ausgesetzt wurden.

**3.5.2 Doppel-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**verwendete Puffer und Reagenzien:

Essigsäure	0,1 M
Harnstoff	8 M
2-Mercaptoethanol	1 %
Ameisensäure	70 %
BrCN-Lösung	5 M in Acetonitril
Bromphenolblau-Lösung	0,25 g Bromphenolblau in 100 ml 0,05 % NaOH gelöst
Laufpuffer x10	72 g Glycin, 15 g Tris und 2,5 g SDS in 500 ml dest. Wasser gelöst
Trichloressigsäure	20 %

*Auftragspuffer:*

12,5 ml SDS	10 %
3,125 ml Tris-HCl-Puffer	1 M

5 ml Glycerin

1,875 ml Bromphenolblau-Lösung

*Laufpuffer:*

360 ml dest. Wasser

40 ml Laufpuffer x10

*Färbelösung 1:*

50 ml Densi Stain Blue G

50 ml dest. Wasser

*Färbelösung 2:*

1,25 g Coomassie blue R 250

40 ml Methanol

mit Trichloressigsäure auf 1 l auffüllen

Alle Puffer und Reagenzien wurden nach firmeneigenen Vorschriften hergestellt.

Probenvorbereitung:

Die verwendeten Proben wurden zu 1 mg/ml in Essigsäure gelöst.

Die einzelnen Fraktionen, die durch die fraktionierte Salzfällung der unterschiedlichen Hautextrakte gewonnen sowie anschließend getrocknet wurden, konnten durch die Zugabe von destilliertem Wasser bei erhöhter Temperatur wieder gelöst werden.

Bei einigen Ansätzen wurde zusätzlich eine Reduktion der Proben, insbesondere beim Kollagentyp III, mit 2-Mercaptoethanol durchgeführt (Borel und Randoux, 1985). Dementsprechend wurden je 50 µl der entsprechenden Probe mit 50 µl einer Lösung aus 1 % 2-Mercaptoethanol und 8 M Harnstoff versetzt. Danach erfolgte eine Inkubation der



Kollagenproben für 30 Minuten bei 80 °C. Anschließend wurden alle Proben mit Auftragspuffer versetzt und vor dem Auftragen erhitzt. Das Natriumdodecylsulfat im Auftrags- und Laufpuffer überdeckte die Eigenladung der Proteine, die dadurch eine negative Ladung erhielten. Die Wanderung der verschiedenen Kollagenmoleküle im elektrischen Feld war somit von der Molmasse abhängig.

#### Durchführung:

In dieser Arbeit wurden ausschließlich SERVAGel™-Fertiggel verwendet. Dabei wurde für die ungespaltenen Kollagenproben ein 8 %iges SERVAGel™-Fertiggel und für die BrCN-Peptide aufgrund ihrer geringeren Größe ein 12 %iges SERVAGel™-Fertiggel verwendet. Diese Gele wurden so in die Elektrophoresekammer eingesetzt bzw. eingespannt, dass die ausgeschnittene Seite der Gelkassette dem Kathodenpuffertank zugewandt war. Anschließend wurde der vorbereitete Laufpuffer in die Elektrophoreseapparatur gefüllt und der Kamm gleichmäßig aus dem Gel herausgezogen. Dabei war darauf zu achten, dass Luftblasen in den Geltaschen vermieden bzw. entfernt wurden. Nach der Vorbereitung der Elektrophoreseapparatur wurden die jeweiligen Proben auf das Gel aufgetragen. Um Geltaschen ohne Probe zu vermeiden, wurden diese mit Auftragspuffer beladen. Im Anschluss wurde die Elektrophoresekammer geschlossen und mit der Spannungsquelle verbunden. Mit dem Einschalten der Spannungsquelle startete die Elektrophorese. Für die Zeit von ca. 15 Minuten wurde die Stromstärke auf 15 mA und später auf 20 mA eingestellt. Die maximale Elektrophoreselaufzeit betrug zwei Stunden. Nach der Beendigung der Elektrophorese wurde die Spannungsquelle ausgeschaltet und die Verbindung zur Elektrophoresekammer unterbrochen. Desweiteren wurde der Laufpuffer entfernt und die Gelkassette entnommen. Zum Öffnen der Kassette diente der, dem Gel beigefügte, Schlüssel. Zur Entnahme des Gels wurden die Platten vorsichtig voneinander gelöst, so dass das Gel auf einer der beiden Platten verblieb. Daraufhin wurde das Gel angefärbt um die einzelnen Banden sichtbar zu machen.

Die Elektrophorese wurde anhand der Anleitung zu den SERVAGel™-Fertiggelen durchgeführt.

#### Anfärben der Gele:

Für das Anfärben der 8 %igen Gele wurde die Färbelösung 2 und für die 12 %igen Gele die Färbelösung 1 verwendet. Alle beiden Färbungen wurden auf einem Schüttler bei mäßiger Umdrehungszahl durchgeführt. Die Gele wurden in der Färbelösung 2 für ca. 15 Minuten und in der Färbelösung 1 für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfärben wurde das 8 %ige Gel in Essigsäure eingelegt und das 12 %ige Gel zweifach für je 30 Minuten in destilliertem Wasser geschwenkt.

Zur Dokumentation wurden die Gele mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage fotografiert.

#### BrCN-Spaltung der einzelnen $\alpha$ -Banden:

Für die weitere Charakterisierung wurden in einigen der 8 %igen Gele die den Kollagen  $\alpha$ -Ketten entsprechenden Banden nach dem Anfärben identifiziert und aus dem Polyacrylamidgel herausgeschnitten.

Je zwei Gelstücke wurden anschließend in einem Eppendorf-Gefäß mit 70  $\mu$ l Ameisensäure versetzt und mit 3  $\mu$ l BrCN-Lösung behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 30 °C im Thermoblock wurden die Gelstücke mit je 50  $\mu$ l Wasser versetzt, geschüttelt und abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Die bei den einzelnen Behandlungsschritten entstandene Lösung wurde abgenommen und mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Die Gelstücke wurden verworfen.

Mit den entstandenen Niederschlägen wurde eine zweite Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die Proben in 20  $\mu$ l Auftragspuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 80 °C erhitzt. Danach erfolgte das Auftragen dieser Proben auf das zweite Gel (12 %). Die Durchführung und Anfärbung des Gels entsprach dabei dem ersten Gel (siehe Durchführung und Anfärben der Gele).

### **3.5.3 Western Blot**

#### verwendete Puffer und Reagenzien:

*Transferpuffer (pH 8,3):*

*Towbin Puffer (Towbin et al., 1979)*

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %

Der Puffer wurde im Ultraschallbad entgast und im Kühlschrank auf 4 °C vorgekühlt.

Ponceau-S-Färbelösung: 0,2 % in 3 % TCA

*Waschpuffer (TBS, pH 7,6) (nach Huttenlocher, 2007):*

Tris	0,05 M
Natriumchlorid	0,15 M

*Blockierungslösung (nach Huttenlocher, 2007):*

Tris	0,05 M
Natriumchlorid	0,15 M
Magermilchpulver	2 %

*BCIP/NBT-Stammlösung:*

SIGMAFAST BCIP/NBT-Tablette in 10 ml deionisiertem Wasser, pH 9,5

#### Probenvorbereitung:

Zu Beginn wurden die verschiedenen Proben mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.5.2). Im Hinblick auf das weitere Verfahren wurde das Gel jedoch nicht angefärbt.

#### Durchführung:

Für die gesamte Durchführung des Western Blots waren Handschuhe zu tragen, um eine Verunreinigung der Membran durch Fremdeiweiße zu vermeiden.

Nach der elektrophoretischen Trennung der Proben wurden die Probentaschen sowie das Sammelgel vom Polyacrylamidgel abgetrennt und das restliche Trenngel in deionisiertem Wasser gewaschen. Daraufhin wurden die Filterpapiere und die verwendete Nitrozellulose-Membran auf Gelgröße zugeschnitten. Dabei wurde die Blotmembran an einer Seite markiert, um spätere Verwechslungen der Proben auszuschließen. Unter leichtem Schütteln wurden Gel, Membran und Filterpapiere jeweils für ungefähr 15 Minuten in Transferpuffer getränkt. Nach der Äquilibration der Blotbestandteile wurden diese zu einem Blotsandwich zusammengesetzt. Hierfür wurde die Blotting-Kassette mit der schwarzen Seite nach unten platziert. Anschließend wurde die erste getränkte Fasermatte auf die schwarze Seite der Kassette gelegt und darauf zwei getränkte Filterpapiere. Das Gel wurde luftblasenfrei in der Mitte der Filterpapiere platziert. Der wichtigste Bestandteil des Blotsandwichs, die Membran, wurde mit Hilfe einer Pinzette von der Mitte aus auf dem Gel positioniert. Hierbei war wieder darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Membran gelangen. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit zwei Filterpapieren und der zweiten Fasermatte abgedeckt. Nach dem Schließen und Einsetzen der Kassette in eine der Schienen des Puffertanks wurde dieser mit Transferpuffer bis zur oberen Kante der Elektrodenplatten gefüllt. Mit dem Anschluss des Tank-Elektroblotters an die Stromversorgung und den Thermostaten wurde der elektrische Transfer für zwei Stunden bei 300 mA und 4 °C durchgeführt. Diese Durchführung richtete sich nach der Anleitung des Tank-Elektroblotters.

Nach dem Blotvorgang folgte die Anfärbung der Membran unter leichtem Schütteln mittels Ponceau-S-Lösung für zehn Minuten. Danach wurde die Blotmembran für zehn Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen, um die Banden auf der Membran sichtbar zu machen.

Im Anschluss erfolgte der Nachweis der einzelnen Kollagentypen durch Immunodetektion. Zunächst wurde die Membran dreimal für zehn Minuten in Waschpuffer gespült und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit Blockierungslösung inkubiert. Danach wurde die Blockierungslösung vollständig entfernt und der primäre Antikörper (1:8000 mit Blockierungslösung verdünnt) hinzugegeben. Es folgte die Inkubation der Blotmembran über Nacht bei 4 °C. Nachdem die Membran dreimal für jeweils zehn Minuten in Waschpuffer geschwenkt wurde, schloss sich eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:8000 mit Blockierungslösung verdünnt) an. Anschließend erfolgten nochmals zwei Waschschrte in Waschpuffer für

jeweils zehn Minuten. Für die nachfolgende Detektionsreaktion wurde die Membran in BCIP/NBT-Stammlösung für 20 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert. Abschließend wurde die Nitrozellulose-Membran zweimal in deionisiertem Wasser gespült und dunkel gelagert.

### 3.5.4 HPLC-Methoden

#### Größenausschlusschromatographie

verwendete Puffer und Reagenzien:

*Laufpuffer (pH 7,0):*

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	0,05 M
di-Natriumhydrogenphosphat	0,05 M
Natriumchlorid	0,15 M

Vor der Anwendung wurde der pH-Wert des Laufpuffers eingestellt. Der Puffer wurde zusätzlich über einen Mischzellulose Ester-Filter filtriert sowie im Ultraschallbad entgast.

*Probenpuffer (pH 7,0):*

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	0,01 M
di-Natriumhydrogenphosphat	0,01 M
SDS	1 %

Vor der Anwendung wurde der pH-Wert des Probenpuffers kontrolliert.

Beide Puffer wurden nach firmeneigenen Vorschriften hergestellt.

Probenvorbereitung:

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer verdünnt. Anschließend erfolgte eine Erhitzung der Proben im Thermoblock für 5-10 Minuten bei 95 °C. Einige Proben

wurden zusätzlich reduziert mit 1 % 2-Mercaptoethanol und anschließender Erwärmung für 30 Minuten bei 80 °C. Im letzten Vorbereitungsschritt wurden die Proben über Einmalkanülen mit Sterilfilteraufsätzen filtriert (0,2 µm). Jeweils 100 µl der filtrierten Probenlösung wurden für die HPLC verwendet.

#### Durchführung:

Die Analyse der Proben erfolgte unter folgenden Chromatographiebedingungen:

System:	Äkta-System von GE Healthcare
Säule:	Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare)
Temperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	100 µl
Flussrate:	0,5 ml/min
Elution:	konstant 100 % Laufpuffer (mobile Phase)
Detektion:	UV 214 nm

#### **Ionenaustauschchromatographie**

##### verwendete Puffer und Reagenzien:

###### *Puffer A (pH 3,8):*

Natriumformiat	0,02 M
Harnstoff	2 M

###### *Puffer B (pH 3,8):*

Natriumformiat	0,02 M
Harnstoff	2 M
Natriumchlorid	1 M

Der pH-Wert beider Puffer wurde mit Ameisensäure eingestellt. Die Puffer wurden über einen Mischzellulose Ester-Filter filtriert und im Ultraschallbad entgast.

Beide Puffer wurden nach firmeneigenen Vorschriften hergestellt.

#### Probenvorbereitung:

Die während der Größenausschlusschromatographie gesammelten Fraktionen mit den  $\alpha$ -Banden des Rinder-SLK wurden mittels Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Anschließend wurde der restliche Niederschlag in 1,5 ml Puffer A aufgenommen und über eine HiTrap-Säule umgepuffert.

#### Durchführung:

Die Analyse der Proben erfolgte unter folgenden Chromatographiebedingungen:

System:	Äkta-System von GE Healthcare
Säule:	Mono S 5/50 GL (GE Healthcare)
Temperatur:	25 °C
Injektionsvolumen:	100 $\mu$ l bzw. 250 $\mu$ l
Flussrate:	1 ml/min
Detektion:	UV 225 nm

#### Gradient:

Kolonnenvolumen in ml	A in %	B in %
2	90	10
15	65	35
5	0	100
5	100	0

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Entwicklung und Optimierung der Doppel-SDS-Gelelektrophorese

Ziel der Arbeit war unter anderem die Erarbeitung einer elektrophoretischen Methode, bei der die Bromcyanspaltung der Proben innerhalb des ersten Polyacrylamidgels erfolgte. Dabei waren der geringe Einsatz von Probenmaterial und die gute Trennung der  $\alpha$ -Banden von den restlichen Kollagenmolekülen von Vorteil. Die Identifikation der jeweiligen Kollagentypen erfolgte anhand des Bandenmusters eines zweiten Polyacrylamidgels, auf das die Bromcyanpeptide aufgetragen wurden. Um den Erfolg der Doppel-SDS-Gelelektrophorese überprüfen zu können, wurden zum einen die Bromcyanpeptide direkt auf das Gel aufgetragen. Zum anderen erfolgte die Bromcyanspaltung an den ausgeschnittenen Gelstücken und diese wurden anschließend auf ein zweites Polyacrylamidgel aufgetragen.

#### 4.1.1 Erste Elektrophorese

Als Probenmaterial dienten käuflich erworbene Kollagenlösung (Collaplex, 1%) sowie säurelösliches Kollagen (SLK) von Fisch und Rind. Für den Vergleich mit diesen Proben wurden die Kollagenstandards der Typen I, III und V verwendet. Jede einzelne Probe wurde in Essigsäure gelöst, mit Auftragspuffer versetzt und anschließend kurz erhitzt. Durch die Zufuhr von Wärme wurden die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgebrochen.

In einem ersten Versuch zur Identifikation und Charakterisierung der einzelnen Kollagenproben bezüglich der vorhandenen Kollagentypen wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel (SERVA Fertiggel, 12 %) aufgetragen (Abbildung 19).



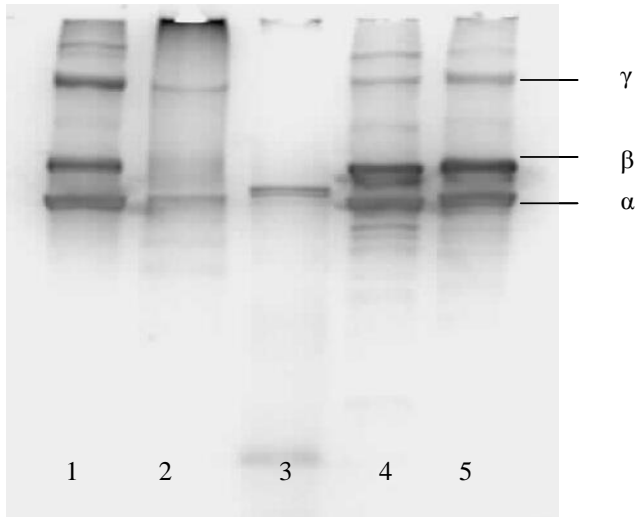


Abbildung 19: Darstellung der einzelnen Kollagentypen und Kollagen-Proben in einem 12 %igen Polyacrylamidgel (Spur 1: Kollagenlösung (Collaplex, 1%); Spur 2: Kollagentyp III-Standard; Spur 3: Kollagentyp V-Standard; Spur 4: Fisch-SLK; Spur 5: Rinder-SLK)

Innerhalb des Polyacrylamidgels erfolgte eine Auftrennung von den größten Molekülen, den  $\gamma$ -Trimeren, über die  $\beta$ -Dimere bis hin zu den kleinsten Kollagenmolekülen, den  $\alpha$ -Monomeren. Die Kollagenlösung und das Rinder-SLK zeigten ein sehr ähnliches Bandenmuster. Das säurelösliche Kollagen (SLK) wurde aus Haut, die vorwiegend aus Kollagentyp I besteht, isoliert. Somit waren zwei unterschiedliche, jedoch sehr dicht aneinander liegende  $\alpha$ -Banden ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ ) zu erkennen. Die charakteristischen  $\alpha$ -Banden des Fisch-SLK verliefen hingegen etwas unterhalb von denen der beiden anderen Proben. Zudem waren weitere Banden unterhalb der  $\alpha$ -Banden sichtbar. Dies ließ auf Abbauprodukte des Fisch-SLK schließen. Für eine bessere Trennung und Identifikation der zwei einzelnen  $\alpha$ -Banden des Kollagentyp I wurde bei den folgenden Versuchen ein Polyacrylamidgel mit einer Acrylamid-Konzentration von 8 % gewählt. Der Kollagentyp V-Standard zeigte eine  $\alpha$ -Bande leicht oberhalb vom Rinder-SLK und zusätzlich im unteren Bereich entsprechend einem sehr kleinen Kollagenmolekül. Laut *ChandraRajan* (1978) besteht der Kollagentyp III aus drei identischen  $\alpha_1$ -Ketten. Dieser Sachverhalt wurde auch auf dem Polyacrylamidgel ersichtlich, da im Gegensatz zum Rinder-SLK (Heterotrimer) nur eine  $\alpha$ -Bande zu erkennen war. Des Weiteren war eine große Menge des Probenmaterials in der Probentasche zurück geblieben. Dies lag vermutlich an den ungespaltenen Disulfidbrückenbindungen am C-terminalen Ende der tripel-helikalen

Regionen des Kollagentyp III (Epstein und Munderloh, 1975; Borel und Randoux, 1985). Daraufhin wurde eine Reduktion der Proben vorgenommen.

Die Reduktion der Proben wurde mit 2-Mercaptoethanol und Harnstoff durchgeführt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 80 °C wurden die Proben erneut auf ein Gel mit einer Acrylamid-Konzentration von 8 % aufgetragen.

Durch die Reduktion der Disulfidbrückenbindungen wurde eine deutlich stärkere  $\alpha$ -Bande vom Kollagenmolekül des Typ III erhalten (Abbildung 20). Dabei fiel besonders auf, dass die deutliche Bande des Kollagentyp III innerhalb der Probentasche (siehe Abbildung 19) verschwunden war. Durch die Reduktion der Proben waren mehr  $\alpha$ -Ketten vorhanden, die in das Gel wandern konnten.

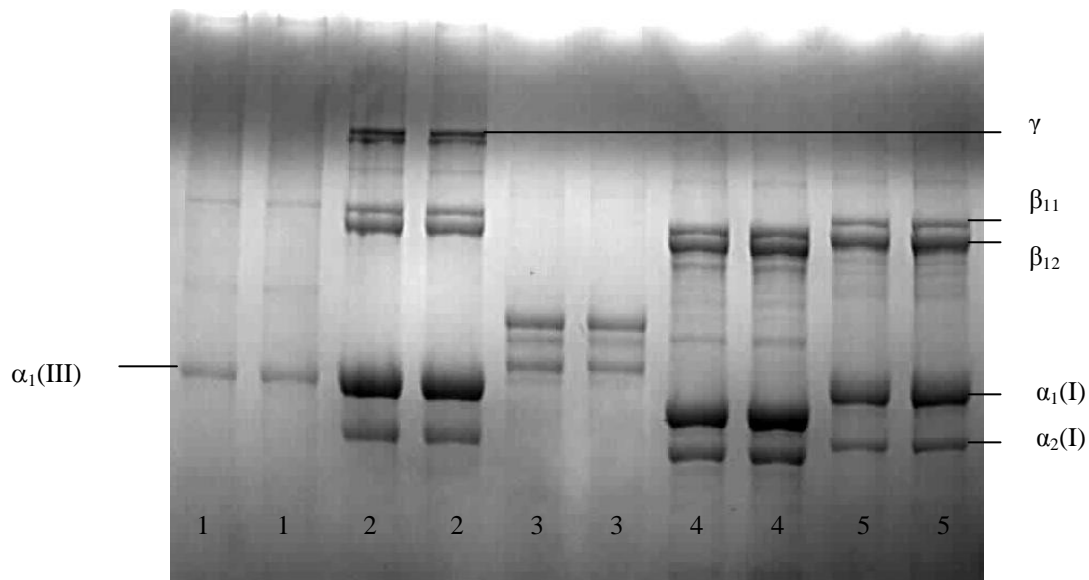


Abbildung 20: Darstellung der einzelnen reduzierten Kollagentypen und Kollagen-Proben in einem 8 % Polyacrylamidgel (Spur 1: Typ III-Standard; Spur 2: Kollagenlösung (Collaplex, 1 %); Spur 3: Kollagentyp V-Standard; Spur 4: Fisch-SLK; Spur 5: Rinder-SLK)

Bei den Proben Rinder-SLK und Fisch-SLK wurde deutlich, dass die Spaltung der Disulfidbrücken zu intensiveren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Banden und dementsprechend zu einer größeren Menge dieser führte (siehe auch Abbildung 40). Aufgrund der sehr breit laufenden  $\alpha_1$ -Banden der drei Proben Kollagenlösung, Fisch-SLK und Rinder-SLK konnte vermutet werden, dass die  $\alpha$ -Banden der beiden Typen I und III zusammen laufen. Die charakteristischen Banden des Fisch-SLK liefen wieder unterhalb von der Kollagenlösung und dem Rinder-SLK. Da die  $\alpha$ -Ketten der drei verschiedenen Proben jeweils die gleiche Molmasse aufwiesen und trotzdem getrennt wurden, könnte dies eventuell auf

elektrostatistische Wechselwirkungen dieser Moleküle mit dem Gel zurückzuführen sein. Die drei unterschiedlichen  $\alpha$ -Ketten ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$ ) des Kollagentyp V wurden bereits durch die Polyacrylamidgelelektrophorese gefunden. Dabei lagen die Molekulargewichte dieser  $\alpha$ -Banden zwischen 120.000 ( $\alpha_1(V)$ ) und 95.000 ( $\alpha_3(V)$ ) Dalton (Borel und Randoux, 1985). Das scheint sich hier zu bestätigen, da sie oberhalb von  $\alpha_1(I)$  laufen, das bei rund 90.000 Dalton liegt. Das Fisch-SLK wies eine zusätzliche Bande auf, die auf die  $\alpha_2$ -Bande des Typ V hindeuten ließ. Diesen Sachverhalt bestätigten auch *Aidos et al.* (1999) mit ihren Untersuchungen am Muskelgewebe von gezüchteten Atlantischen Lachsen. Die Autoren schlossen daraus, dass dieser die Kollagentypen I und V enthielt.

#### 4.1.2 Zweite Elektrophorese

Um die  $\alpha$ -Banden weiter zu charakterisieren und möglichst viel Probenmaterial einzusparen, wurde die Bromcyanspaltung direkt im Gel durchgeführt. Hierfür wurden die jeweiligen Proben für die erste Elektrophorese auf ein 8 % bzw. 8-16 % Gel aufgetragen und anschließend die beiden Banden  $\alpha_1$  sowie  $\alpha_2$  aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten (Abbildung 21).

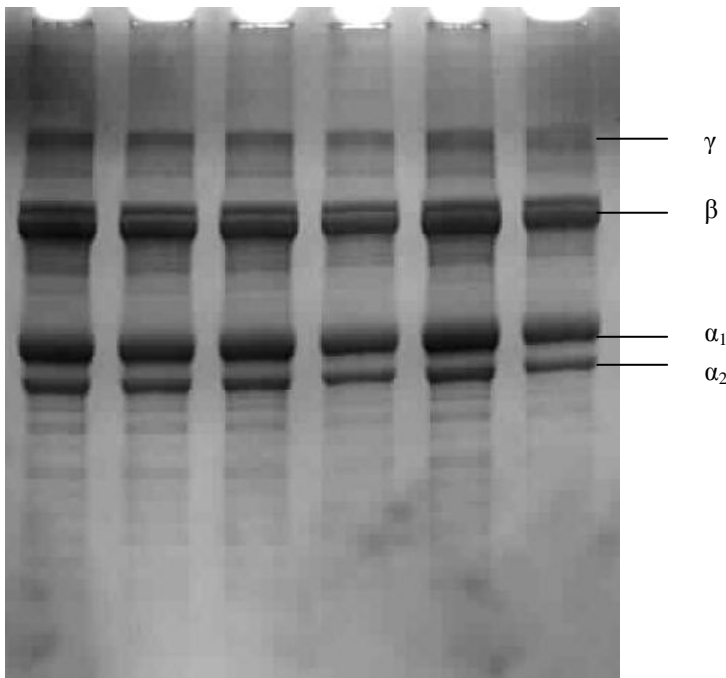


Abbildung 21: Darstellung des Bandenmusters vom Rinder-SLK auf einem 8-16 % Gel vor dem Ausschneiden der beiden  $\alpha$ -Banden für die BrCN-Spaltung.

Die abgetrennten Gelstücke wurden im nächsten Schritt mit Bromcyan gespalten. Nach einer Inkubation über fünf Stunden bei 30 °C wurde das beste Ergebnis erzielt. Durch die anschließende Zugabe von Wasser zu den jeweiligen Ansätzen wurde die Reaktion abgestoppt. Im nächsten Schritt wurden die im Gel eingeschlossenen und mit BrCN behandelten  $\alpha$ -Ketten direkt in die Probenaschen eines 12 %igen Gels überführt. Die Überführung der einzelnen Gelstücke in die Probenaschen des Polyacrylamidgels gestaltete sich sehr schwierig, da keine vollständige Verbindung zwischen den Gelstücken und dem Sammelgel in der Probenasche hergestellt werden konnte. Auch ein zusätzlicher Einsatz von Agarose konnte keinen besseren Kontakt zwischen den Gelstücken und dem Polyacrylamidgel schaffen. Parallel dazu wurde die Lösung aus der Bromcyanspaltung abgenommen, eingetrocknet und zusammen mit Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Dabei stellte sich heraus, dass die Bromcyanpeptide in die Lösung übergegangen waren und somit gut auf dem Gel darzustellen waren.

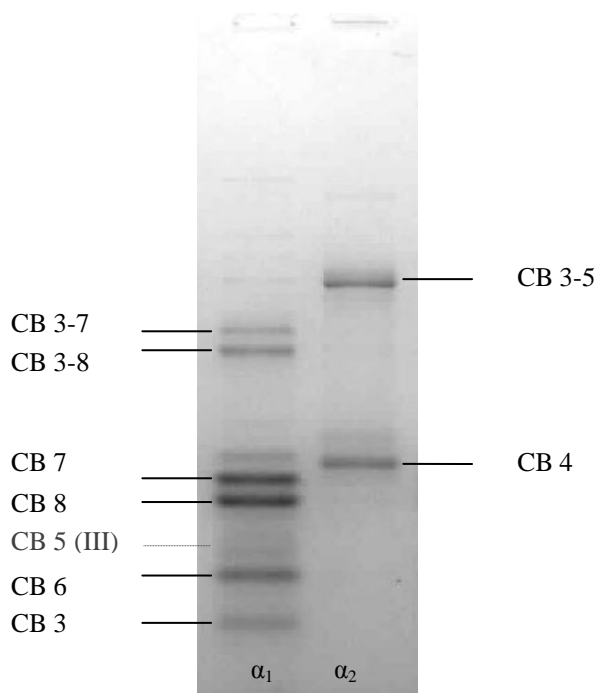


Abbildung 22: Darstellung der Bromcyanpeptide der beiden  $\alpha$ -Banden vom Rinder-SLK bei einer Inkubationszeit von fünf Stunden und einer Temperatur von 30 °C (12 %iges Gel).

Mit der Verwendung der Probenlösung aus der Bromcyanspaltung wurde eine Methode zur Darstellung der Bromcyanpeptide auf dem Polyacrylamidgel entwickelt. Bei der Spaltung von Rinder-SLK mit Bromcyan entstanden charakteristische Fragmente (Abbildung 22). Durch den Vergleich mit den bekannten Sequenzen für den jeweiligen Kollagentyp, in

diesem Fall Typ I-Kollagen, konnten die einzelnen Fragmente CB 3-5, CB 3-7, CB 3-8, CB 4, CB 7, CB 8, CB 6 sowie CB 3 zugeordnet werden (Bornstein und Sage, 1980). Jedoch konnte auch eine schwache Bande zwischen CB 8 und CB 6 gedeutet werden, die dem CB 5 des Typ III-Kollagens entsprechen konnte. Die Haut besteht neben dem Kollagentyp I (ca. 85-90%) mit ca. 8 bis 11% aus Typ III-Kollagen, daher war zu erwarten, dass auch die untersuchte Probe Typ III-Kollagen enthielt (van den Berg und Cabri, 2003). Unterhalb des CB 3 wären zusätzlich noch kleinere Peptide (CB 4 oder CB 8) zu erwarten gewesen, die aber nicht gefunden wurden. Des Weiteren konnten die beiden Banden  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  nicht vollständig beim Ausschneiden des ersten Polyacrylamidgels voneinander getrennt werden, dadurch erschienen innerhalb der Spur  $\alpha_1$  auch sehr schwach die Bromcyanpeptide CB 3-5 und CB 4 von der Spur  $\alpha_2$ .

Um den Erfolg dieser neuen Methode zu überprüfen, wurde die Bromcyanspaltung an den Proben Fisch-SLK und Rinder-SLK durchgeführt und das restliche BrCN über HiTrap-Säulen abgetrennt. Im nächsten Schritt wurden die Peptide auf ein 12 %iges Gel aufgetragen (Abbildung 23).

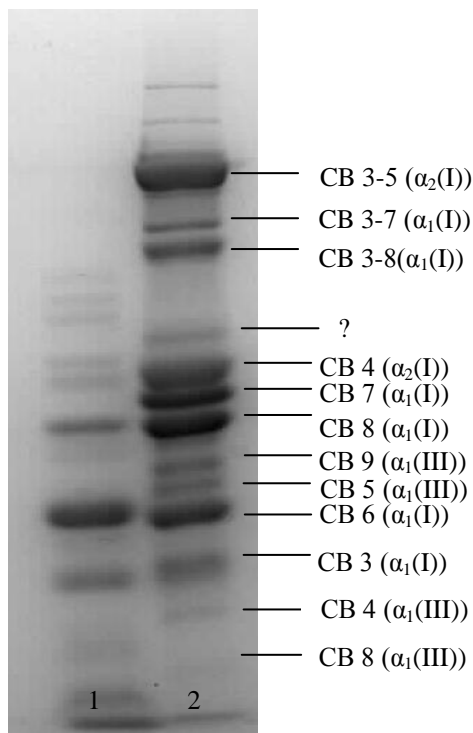


Abbildung 23: Darstellung der entsalzten Bromcyanpeptide von den Proben Fisch-SLK (Spur 1) und Rinder-SLK (Spur 2) (12 %iges Gel)

Neben den sehr charakteristischen Peptiden CB 3-5, CB 3-7, CB 3-8, CB 4, CB 7, CB 8, CB 6 und CB 3 des Typ I-Kollagen wurden durch den Vergleich mit den Untersuchungen von *Tanaka et al.* (1981) noch weitere Peptide identifiziert. Die zusätzlichen Peptide wurden vermutlich aufgrund einer größeren aufgetragenen Probenmenge erkennbar. Die Bromcyanpeptide CB 9, CB 5 und CB 4 und CB 8 konnten dabei wahrscheinlich dem Typ III-Kollagen zugeordnet werden. Die beiden letzten Peptide hatten nur eine sehr geringe Molmasse von ca. 12000-13000 Dalton (Chung et al., 1974) und waren zudem nur in sehr geringen Mengen vertreten, sodass diese Banden nur sehr schwach zu erkennen waren. Die unbekannte Bande deutete auf ein unvollständig gespaltenes Bromcyanpeptid hin. Infolgedessen sollte bei fortlaufenden Versuchen eine Verlängerung der Inkubationszeit für die Bromcyanspaltung über Nacht versucht werden.

Das Fisch-SLK zählt zum marinen Kollagen, dessen Bandenmuster noch nicht eindeutig bestimmt wurde. Laut *Aidos et al.* (1999) ist das Kollagen vom Atlantischen Lachs aus Typ I und V-Kollagen aufgebaut. In Bezug auf das im Institut hergestellte Fisch-SLK waren in dem obigen Bandenmuster die Bromcyanpeptide der Kollagentypen I und V zu vermuten. Die Bromcyanspaltung der Kollagenlösung (Collaplex, 1%) war nicht erfolgreich, da diese womöglich vom Hersteller vorbehandelt wurde und somit keine Reaktion mit Bromcyan stattfand (siehe Abbildung 41). Die Banden oberhalb des CB 3-5 deuteten auf eine unvollständige Spaltung mit Bromcyan hin.

Die Doppel-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese lieferte ähnliche Ergebnisse wie die herkömmliche einfache elektrophoretische Auftrennung der BrCN-Peptide. Alle Peptide konnten gefunden werden. Jedoch konnten die kleineren Peptide nur sehr unscharf und schwach gedeutet werden. Mit Hilfe dieser optimierten Methode konnte das Probenvolumen für die Bromcyanspaltung verringert werden. Ein weiterer Vorteil gegenüber der einfachen elektrophoretischen Auftrennung der Bromcyanpeptide war die zusätzliche Trennung der  $\alpha$ -Banden, die mit keiner anderen Methode möglich war.

Durch eine densitometrische Auswertung war es möglich die Absorption und dementsprechend die Intensität der einzelnen Banden genauer zu bestimmen. Zusätzlich konnten auch Banden detektiert werden, die mit dem bloßen Auge kaum zu erkennen waren. Dies wurde mit Hilfe der Gene Tools Analysensoftware (SYNGENE) durchgeführt. Über eine Integration der Fläche unterhalb der Intensitätspeaks der einzelnen Banden konnten Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Peptiden gezogen werden. Integriert

wurde dabei mit Hilfe der Integrationsmethode Track Borders, indem eine waagerechte Basislinie ausgewählt wurde.

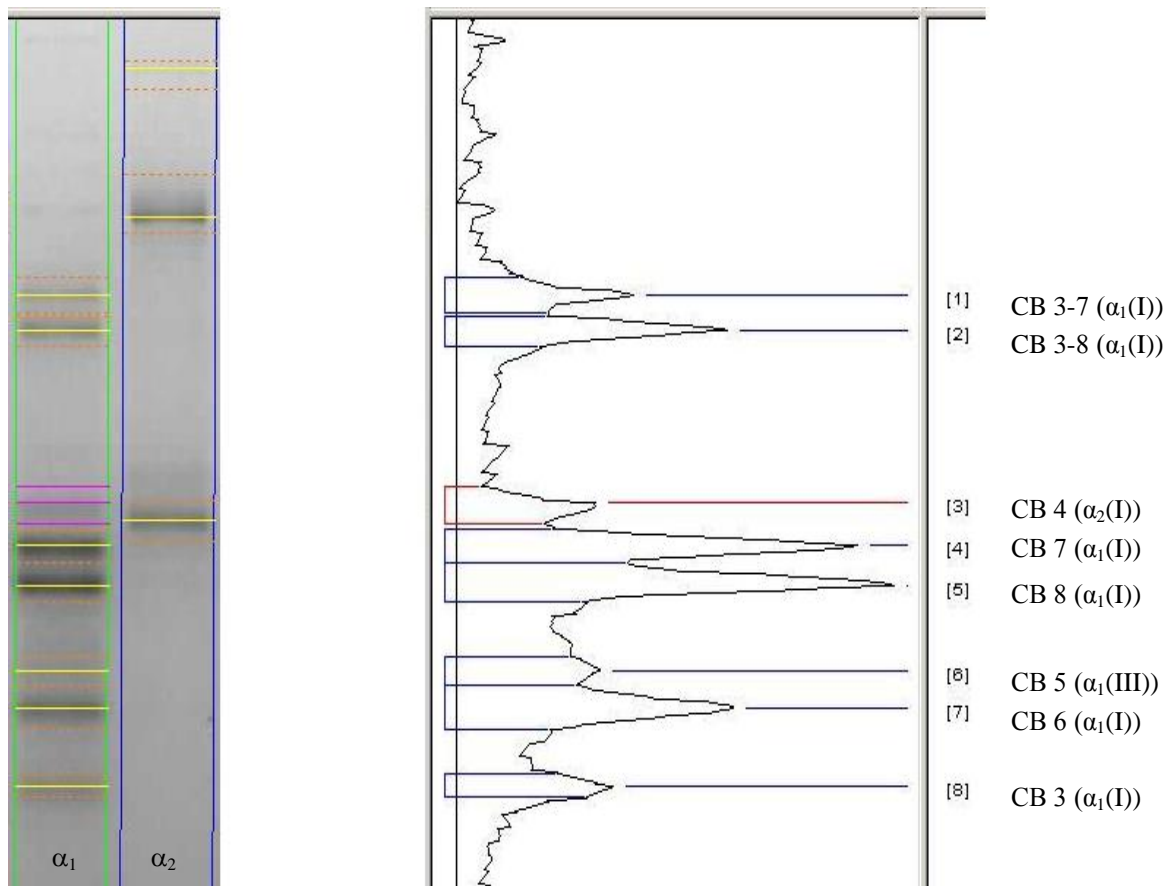


Abbildung 24: Densitometrische Auswertung der Bromcyanpeptide des Rinder-SLK (siehe auch Abbildung 22)

Die Auswertung des Bandenmusters erfolgte in diesem Beispiel nur für die Spur von  $\alpha_1$ , da zur Unterscheidung zwischen Typ I und III die  $\alpha_2$ -Spur nicht benötigt wurde. Mit Hilfe des densitometrischen Verfahrens wurden insgesamt acht Banden auf der Spur von  $\alpha_1$  identifiziert (Abbildung 24). Aufgrund der nicht ganz exakten Abtrennung der beiden  $\alpha$ -Banden erscheint innerhalb der  $\alpha_1$ -Spur wieder das CB 4 der  $\alpha_2$ -Bande. Weiterhin wurde eine Bande gefunden, die erneut auf das Vorhandensein vom Peptid CB 5 des Typ III-Kollagens hindeutete. Dabei entsprach die Intensität der Bande des CB 5 ungefähr der des CB 3 oder des CB 4. Kleinere Bromcyanpeptide konnten unter den gegebenen Umständen nicht nachgewiesen werden.

Die densitometrische Analyse der Bromcyanpeptide des Typ III-Kollagens ist in der Abbildung 25 dargestellt. Für diese Analyse wurde die Integrationsmethode Rolling Disk mit einer sich an die Kurve anschmiegenden Basislinie verwendet.

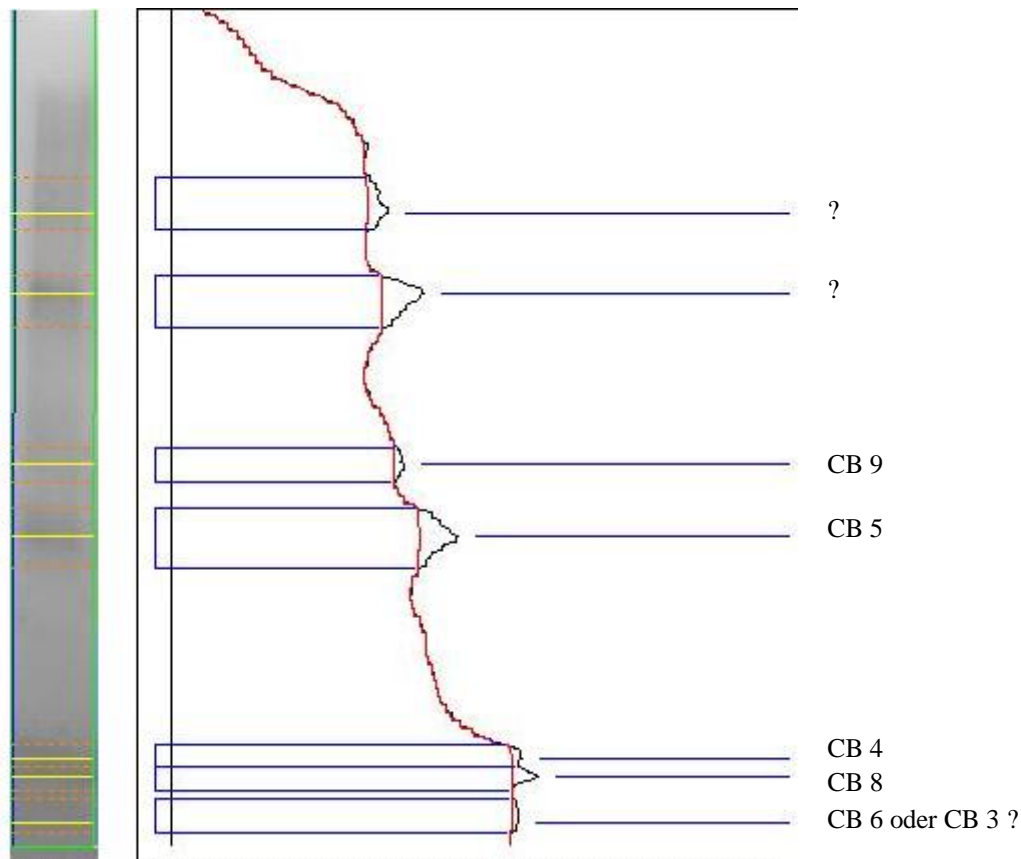


Abbildung 25: Densitometrische Auswertung des Typ III-Kollagens

Die Peptide CB 9, CB 5, CB 4 und CB 8 waren charakteristisch für diesen Kollagentyp und konnten in der vorliegenden Untersuchung gefunden werden (Tanaka et al., 1981). Da die kleineren Peptide (CB 6 und CB 3) im Polyacrylamidgel sehr weit unten liefen und somit sehr undeutlich waren, war deren Zuordnung sehr schwierig. Bei den zwei oberen Banden (mit ? gekennzeichnet) war zu vermuten, dass es sich dabei um unvollständig gespaltene Bromcyanpeptide handelte, da anhand der Sequenz das größte Bromcyanpeptid des Typ III-Kollagens das CB 5 war. Mit der densitometrischen Analyse des Typ III-Kollagens konnten weitere Hinweise für die Zuordnung der Banden in den Abbildungen 22 und 23 gefunden werden.



## **4.2 Extraktion von Schweine- und Rindshaut mit anschließender fraktionierter Salzfällung**

Für eine Identifikation und Quantifizierung der einzelnen Kollagentypen wurde Schweine- und Rindshaut mit Hilfe von drei verschiedenen Verfahren extrahiert. Durch die Extraktion wurde ein Teil des Kollagens aus der Hautstruktur herausgelöst. Um die einzelnen Kollagentypen voneinander zu trennen, wurden diese mit ansteigenden Salzkonzentrationen aus dem Extrakt gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde anschließend abzentrifugiert und mit Hilfe der Doppel-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.5.2) sowie mittels Größenausschlusschromatographie (siehe Abschnitt 3.5.4) untersucht.

### **4.2.1 NaCl-Fällung nach Neutralsalz-Extraktion**

Mit Hilfe der fraktionierten Salzfällung nach Neutralsalz-Extraktion konnten drei Fraktionen voneinander getrennt werden. Nach den Untersuchungsergebnissen von *Bornstein und Sage* (1980) sowie *Borel und Randoux* (1985) sollten dabei Kollagentyp III der ersten Fraktion, Typ I-Kollagen der zweiten Fraktion und Kollagentyp V der dritten Fraktion entsprechen.

Durch die fraktionierte Fällung des Neutralsalz-Extraktes konnte hier jedoch nur eine geringe Ausbeute an Niederschlag erzielt werden, da der neutralsalzlösliche Anteil im Kollagen sehr gering ausfällt. Bei den Extraktionen von Schweinehaut sowie Rindshaut konnte kein Niederschlag aus der dritten Fraktion abgenommen werden. Anhand der Veröffentlichung von *Bogduk* (2000) kommt der Kollagentyp V gewöhnlich in Verbindung mit dem Typ I-Kollagen vor, jedoch beträgt dessen Konzentration gegenüber Typ I nur 3%. Aufgrund des geringen Anteils des Typ V-Kollagen am Gesamtkollagenanteil der Hautproben wurde vermutlich zu wenig bzw. gar nichts aus der dritten Fraktion ausgefällt und war somit mit Hilfe der neu entwickelten Methode nicht nachweisbar. Des Weiteren konnte bei der ersten und zweiten Fraktion des Schweinehautextraktes kein Unterschied bezüglich der Menge des abgenommenen Niederschlages festgestellt werden. Abbildung 26 zeigt in diesem Zusammenhang den Vergleich zwischen der ersten und zweiten Fraktion aus dem Neutralsalz-Extrakt von Schweinehaut.

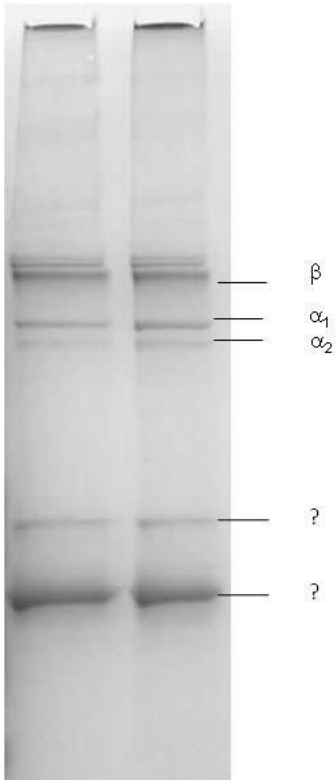


Abbildung 26: Darstellung der ersten (linke Spur) und zweiten (rechte Spur) Fraktion aus dem Neutralsalz-Extrakt von Schweinehaut (12 %iges Gel)

Auf dem Polyacrylamidgel konnte kein Unterschied zwischen den beiden Fraktionen erkannt werden. Bei der Betrachtung der beiden Spuren fiel auf, dass aufgrund der angewandten Extraktionsmethode keine Banden entsprechend den  $\gamma$ -Trimeren vorhanden waren. Des Weiteren waren jeweils beide  $\alpha$ -Banden dargestellt, wobei die Intensität der  $\alpha_2$ -Bande von der ersten zur zweiten Fraktion leicht zunahm. Dies entsprach dem Typ I-Kollagen, welcher nach *Bornstein und Sage* (1980) innerhalb der zweiten Fraktion hätte abgetrennt werden müssen. Deshalb musste davon ausgegangen werden, dass die erste Fraktion nicht vollständig getrennt von den anderen beiden Fraktionen ausgefällt bzw. abzentrifugiert wurde.

Die abgenommenen Fraktionen aus dem Rindshautextrakt zeigten nach dem Auftragen auf ein 8 %iges Gel keine charakteristischen Banden. Schlussendlich wurde die fraktionierte Salz-fällung im Neutralsalz-Extrakt nicht mehr in die folgenden Betrachtungen sowie Versuche einbezogen, da die Ausbeute des gewonnenen Kollagens zu gering war und außerdem keine vollständige Trennung der einzelnen Fraktionen möglich war.

Die Zugabe von Trypsin zum Extraktionsansatz wäre hingegen eine Möglichkeit um die Ausbeute des Kollagens in Form von ausgefälltem Niederschlag zu erhöhen.

#### 4.2.2 NaCl-Fällung von bereits aus Haut isoliertem Kollagen

Die Proben Rinder-SLK und Fisch-SLK wurden bereits mit einer einmaligen Salzfällung aus Haut isoliert. Dadurch wurden ein Teil der in der Haut enthaltenen Kollagentypen zusammen ausgefällt. Mit der Dialyse gegen einen Neutralsalz-Puffer und anschließender fraktionierter Salzfällung wurde versucht das Typ III-Kollagen vom Typ I-Kollagen zu trennen (siehe Abschnitt 4.2.1).

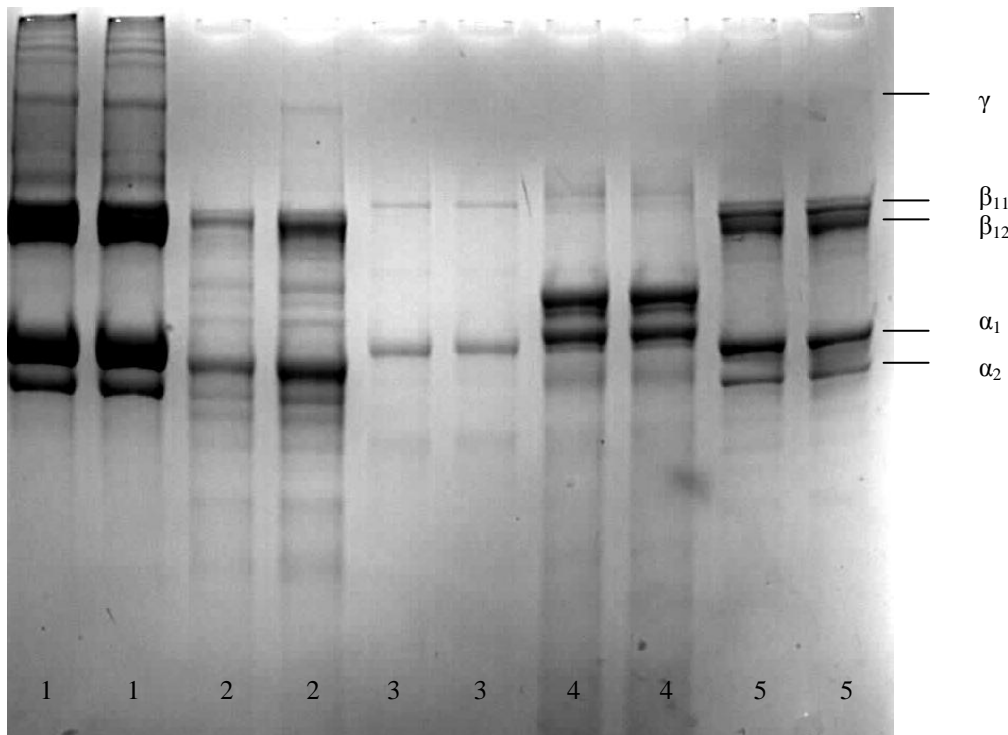


Abbildung 27: Darstellung der ersten Fraktion aus der Fällung von bereits isoliertem Kollagen im Vergleich zu verschiedenen Kollagenstandards (Spur 1: Rinder-SLK (erste Fraktion); Spur 2: Fisch-SLK (erste Fraktion); Spur 3: reduzierter Typ III-Standard; Spur 4: Kollagentyp V-Standard; Spur 5: Kollagentyp I-Standard)

Abbildung 27 zeigt die erste Fraktion von Rinder- und Fisch-SLK im Vergleich zu den Kollagenstandards I, III und V. Nach *Bornstein und Sage* (1980) entspricht die erste Fraktion dem Typ III-Kollagen. Jedoch zeigten sowohl das Rinder-SLK als auch das Fisch-SLK beide  $\alpha$ -Banden, was eher für den Kollagentyp I sprach. Damit wurde vermutet,

dass das Typ III-Kollagen mit der einmaligen Salzfällung ohne vorherige Reduzierung der Haut nicht oder nur in sehr geringen Mengen ausgefällt wurde.

Die nach der Methode der Doppel-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.5.2) durchgeführte Bromcyanspaltung sowie die Auftrennung der erhaltenen Peptide in einem 12 %igen Gel zeigten kein eindeutiges Ergebnis aufgrund der geringen Anzahl bzw. Konzentration der  $\alpha$ -Banden. Deshalb sollte bei folgenden Versuchen mehr Probenmaterial für die Spaltung vorhanden sein. Aufgrund der undeutlichen Ergebnisse wurde die Methode innerhalb dieser Arbeit nicht weiter optimiert.

#### 4.2.3 NaCl-Fällung nach saurer Extraktion

Im Vergleich zur fraktionierten Fällung nach Neutralsalz-Extraktion konnte bei der Salzfällung nach saurer Extraktion deutlich mehr Niederschlag erhalten werden. Dabei konnten drei unterschiedliche Fraktionen voneinander getrennt werden. Nach *Bornstein und Sage* (1980) sowie *Borel und Randoux* (1985) wurde zuerst die Fraktion, die den Kollagentypen I und III entsprach, ausgefällt. Bei dieser Methode war es, im Unterschied zur Fällung im neutralen Extrakt, nicht möglich die beiden Typen I und III voneinander zu trennen. Mit der zweiten Fraktion wurde laut *Bornstein und Sage* (1980) der Kollagentyp II und mit der dritten das Typ V-Kollagen ausgefällt. Das Typ II-Kollagen ist vorwiegend in Knorpel zu finden und somit für die Untersuchung der Haut irrelevant (Cao und Xu, 2008).

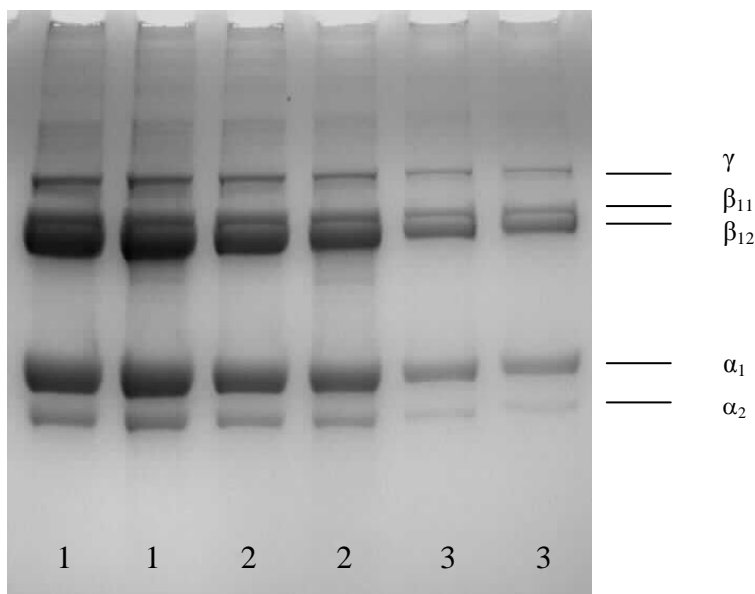


Abbildung 28: Darstellung der drei unterschiedlichen Fraktionen (Spur 1: erste Fraktion, Spur 2: zweite Fraktion, Spur 3: dritte Fraktion) aus dem sauren Extrakt der Schweinehaut (8 %iges Gel)

Abbildung 28 zeigt die drei unterschiedlichen Fraktionen aus dem sauren Extrakt von Schweinehaut. Bei allen drei Spuren waren jeweils beide  $\alpha$ -Banden zu erkennen, was ausschließlich auf das Vorhandensein von Typ I-Kollagen schließen ließ. Deshalb wurde von keinem Unterschied zwischen den einzelnen Fraktionen ausgegangen. Die Spur 3 zeigte nicht die nach *Bornstein und Sage* (1980) dem Typ V-Kollagen entsprechenden drei charakteristischen  $\alpha$ -Banden (siehe Abschnitt 4.1.1). Aufgrund des geringen Anteils vom Kollagentyp V in der Haut war es jedoch möglich, dass es in der dritten Fraktion nicht ausgefällt bzw. abgenommen werden konnte. In der Gesamtheit betrachtet, nahm die Konzentration des ausgefällten Kollagens von Spur 1 zu Spur 3 ab. Dies ließ darauf schließen, dass das Typ I-Kollagen auch bei höheren Salzkonzentrationen noch ausgefällt bzw. vorher nicht vollständig gefällt wurde und deswegen immer noch mitkam. Es wurde angenommen, dass mit dem abgenommenen Niederschlag auch Natriumchlorid aus dem Extrakt entfernt und damit die Salzkonzentration in der Lösung verringert wurde. Durch die nachfolgende Zugabe von Salz war es somit möglich weiteres Typ I-Kollagen auszufällen. Deshalb wären für folgende Untersuchungen verlängerte Fällungszeiten anzustreben.

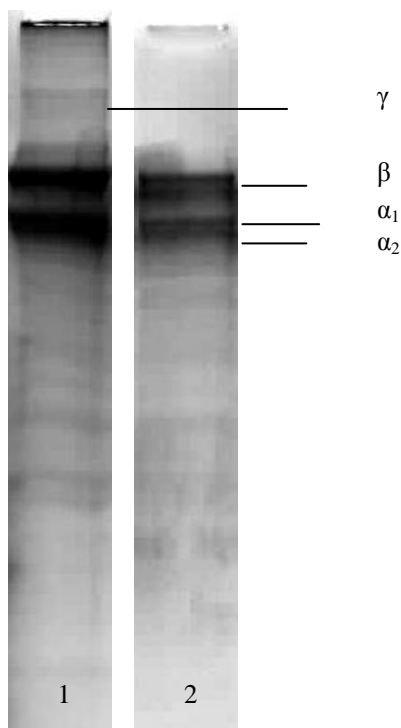


Abbildung 29: Darstellung der ersten Fraktion (Spur 1: unreduziert, Spur 2: reduziert) nach der sauren Extraktion von Rindshaut (12 % iges Gel)

Die fraktionierte Salzfällung nach der sauren Extraktion von Rindshaut zeigte im Vergleich zur Schweinehautprobe ein sehr ähnliches Ergebnis. Abbildung 29 stellt den Unterschied zwischen der reduzierten und unreduzierten ersten Fraktion aus dem sauren Extrakt der Rindshaut dar. Die linke Spur mit der unreduzierten Probe zeigte deutlich, dass in der Probentasche noch Material aus der ersten Fraktion verblieben ist. Weiterhin wurde die charakteristische Struktur des Kollagens mit  $\gamma$ -,  $\beta$ - und  $\alpha$ -Banden dargestellt. Im Unterschied dazu war auf der rechten Spur die reduzierte erste Fraktion zu sehen. Dabei war deutlich erkennbar, dass die verbliebene Probe aus der Probentasche in das Gel übergegangen war und die entstandenen  $\gamma$ -Trimere bei der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese weiter zu Dimeren und Monomeren abgebaut wurden. Dies deutete auf die Reduktion von Disulfidbrücken, die ausschließlich beim Typ III-Kollagen zu finden sind, hin.

Um die erste Fraktion besser charakterisieren zu können, wurden beide  $\alpha$ -Banden aus dem Gel ausgeschnitten (siehe Abbildung 28) und anschließend einer Bromcyanspaltung unterzogen. Die dabei entstandenen Peptide wurden mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 30). Die linke Spur zeigte die Bromcyanpeptide der  $\alpha_1$ -Bande, wobei die oberste Bande sowie weitere große Peptide im oberen Bereich auf eine unvollständige Spaltung hindeuteten. Des Weiteren wurden die charakteristischen Bromcyanpeptide des Typ I-Kollagens dargestellt. Das Bromcyanpeptid CB 5 ließ darauf schließen, dass das Typ III-Kollagen zusammen mit dem Kollagentyp I innerhalb der ersten Fraktion ausgefallen war. Jedoch ließen sich diese zwei Typen nicht voneinander trennen. Die rechte Spur stellte die Bromcyanpeptide der  $\alpha_2$ -Bande dar. Hierbei entsprach wiederum die oberste Bande der  $\alpha_2$ -Bande. Danach erscheinen die für die  $\alpha_2$ -Bande spezifischen Peptide CB 3-5 und CB 4. Die Trennung der beiden  $\alpha$ -Banden erfolgte leider nicht vollständig, sodass die charakteristischen Banden der jeweils anderen Spur leicht zu deuten waren.

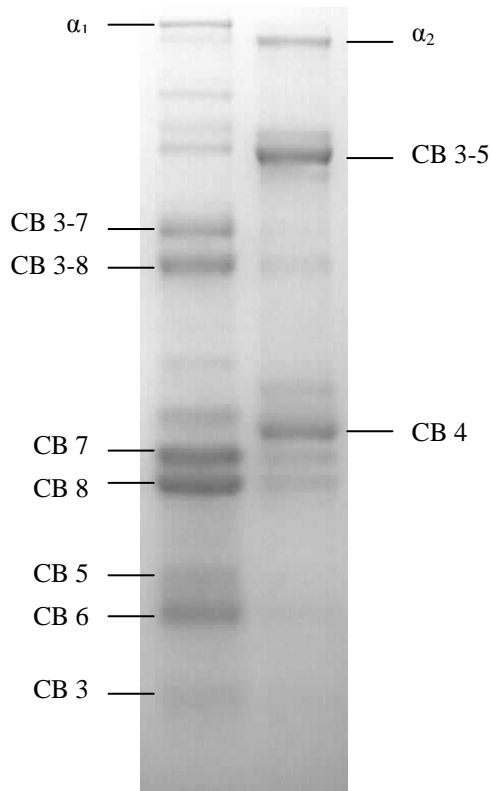


Abbildung 30: Darstellung der Bromcyanpeptide der ersten Fraktion aus dem sauren Extrakt von Schweinehaut (12 %iges Gel)

Die densitometrische Auswertung der elektrophoretischen Spuren aus Abbildung 30 mit Hilfe der Integrationsmethode Rolling Disk bestätigte ebenfalls das Vorhandensein der charakteristischen Peptide des Typ I-Kollagens und des CB 5, welches dem Kollagentyp III zugeordnet wurde (Abbildung 31).

Somit konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass in der ersten ausgefällten Fraktion nach der sauren Extraktion das Kollagen vom Typ I und III vorhanden war. Dennoch ließen sich die beiden Typen mit dieser Methode nicht trennen. Die Reduktion der gewonnenen Niederschläge hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis. Jedoch könnte bei eventuell neu geplanten Versuchen eine Reduktion noch vor der Extraktion der Haut vorgenommen werden. Dabei wäre darauf zu achten, dass die Hautprobe nicht durch zu hohe Temperaturen völlig denaturiert wird.

Da die kleineren Peptide im unteren Bereich des Gels (Abbildung 30) sehr schwach dargestellt waren, könnte ein Polyacrylamidgel mit einer höheren Acrylamidkonzentration, wie z. B. 16 %, zu schärferen Banden führen. Für eine eindeutige Identifikation der Bromcyanpeptide des Typ III- und Typ V-Kollagens wäre eine deutliche Darstellung der

Peptide aus den jeweiligen Standards von Vorteil. Bisher war dies noch nicht komplett gelungen, aber die Verwendung einer höheren Konzentration von  $\alpha_1$ (III)-Banden für die eventuell folgenden Versuche wäre als sinnvoll zu erachten.

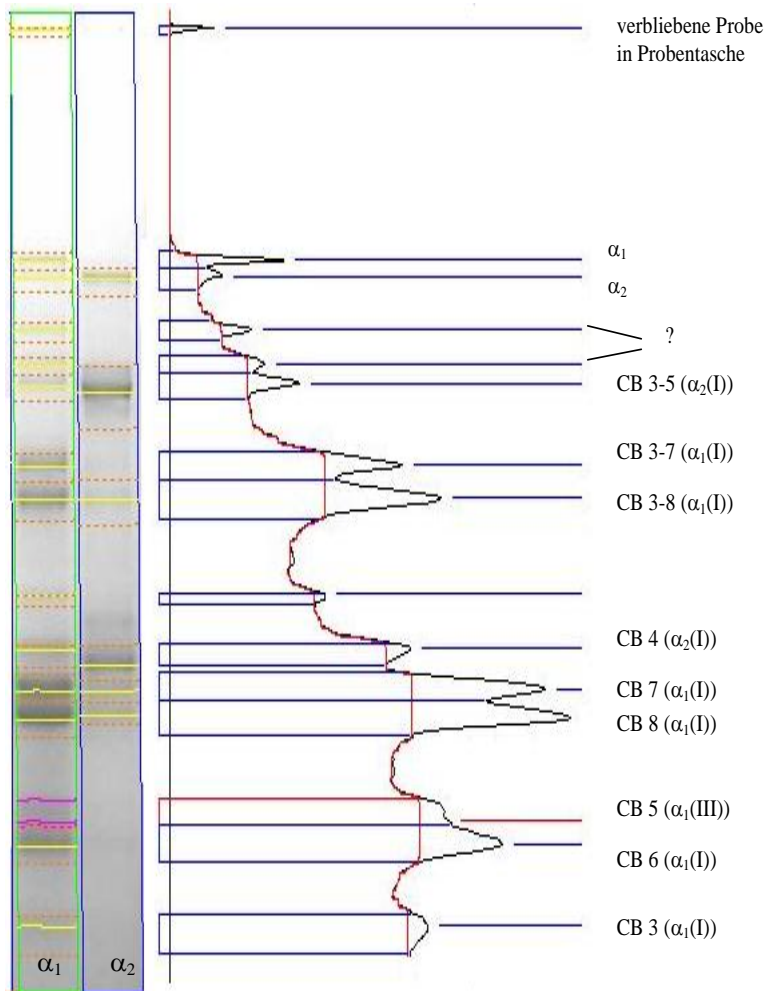


Abbildung 31: Densitometrische Auswertung der Bromcyanpeptide der ersten Fraktion aus dem sauren Extrakt von Schweinehaut

#### 4.2.4 NaCl-Fällung nach saurer Extraktion mit Pepsin

Mittels fraktionierter Salzfällung nach saurer Extraktion mit Pepsin wurde die größte Ausbeute an Niederschlag erzielt. Bei dieser Methode wurden laut *Bornstein und Sage* (1980) die drei gleichen Fraktionen wie bei der NaCl-Fällung nach saurer Extraktion ohne Pepsinzugabe ausgefällt. In Abbildung 32 werden die drei unterschiedlichen Fraktionen zusammen mit einem Fisch-SLK-Marker in einem 12 %igen Polyacrylamidgel dargestellt.



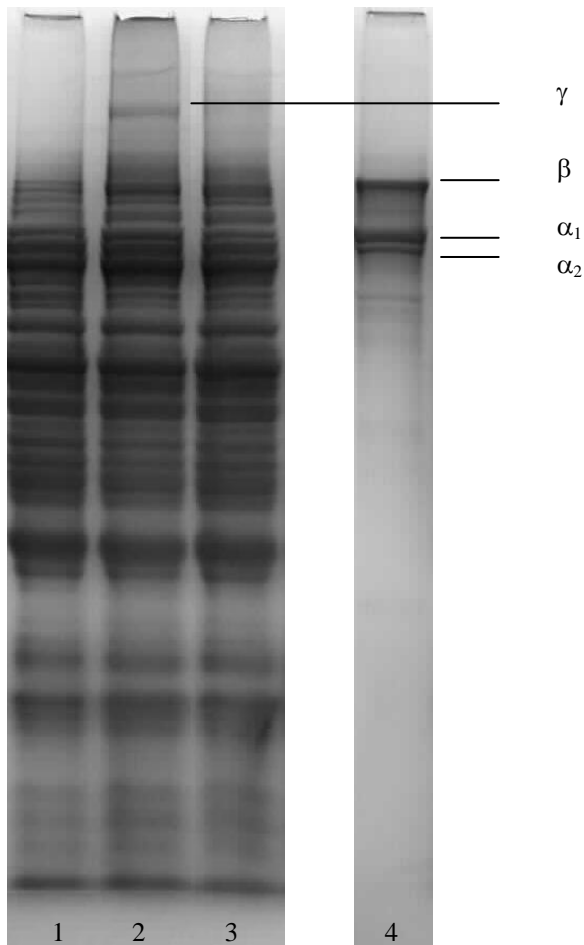


Abbildung 32: Darstellung der ersten (Spur 1), zweiten (Spur 2) und dritten (Spur 3) Fraktion nach saurer Extraktion mit Pepsin von Schweinehaut sowie des Fisch-SLK-Markers (Spur 4) (12 %iges Gel)

Bei den dargestellten Fraktionen aus dem sauren Extrakt mit Pepsin war die große Anzahl an kleineren Molekülen unterhalb der  $\alpha$ -Banden sehr auffällig. Dies ließ auf eine Denaturierung der Haut und einen darauf folgenden Abbau des Kollagens durch Pepsin schließen. Die verwendete Haut wurde vor der Extraktion mit Hilfe eines Fleischwolfes zerkleinert. Die dabei wirkenden Scherkräfte könnten auch für eine erhöhte Temperatur gesorgt haben. Bei der Extraktion und anschließenden Fällung musste stets darauf geachtet werden, dass die Haut gut gekühlt blieb. Da eine erhöhte Temperatur zur Denaturierung des in der Haut enthaltenen Kollagens führen konnte. Deshalb sollte bei folgenden Versuchen eine ungewolfte Haut oder eine Zerkleinerung von Hand gewählt werden, um eine eventuell vorliegende Denaturierung durch die Verwendung des Fleischwolfes ausschließen zu können. Die starke Bande unterhalb der  $\alpha_2$ -Bande konnte auf eine  $\alpha$ -Bande mit abgespaltenen Telopeptiden hindeuten, denn Pepsin spaltet bei nativem

Kollagen nur innerhalb der nicht-helikalen Anteile (Telopeptide) (Struck und Pillukat, 1989). Laut *Abraham et al.* (2008) könnten die kleineren Kollagenmoleküle auch auf den Abbau des Kollagens durch Kollagenase zurückzuführen sein. Kollagenase kommt in der Haut vor und spaltet natives Kollagen bei einem pH-Wert um 7 und einer Temperatur bis maximal 37 °C (Reich, 1966). Dies war jedoch eher unwahrscheinlich, da die Extraktion mit einem geringen pH-Wert durchgeführt wurde. Ein zu niedriger pH-Wert konnte jedoch auch zu einer Hydrolyse und damit verbundenen Spaltung des Kollagens führen. Durch die Denaturierung konnte das Pepsin vermutlich auch die helikalen Bereiche des Kollagens angreifen. Dementsprechend wurden viele kleinere Kollagenmoleküle, also Spaltprodukte, im Gel dargestellt. Um diese Reaktion zu vermeiden, könnte der pH-Wert des sauren Extraktes etwas erhöht und die Konzentration des Pepsins verringert werden.

Weiterhin war auch bei dieser Methode kein Unterschied zwischen den einzelnen Fraktionen zu erkennen. Die zweite Fraktion spielte bei der Untersuchung von Hautproben keine Rolle. Bei der ersten und dritten Fraktion waren jeweils beide  $\alpha$ -Banden vorhanden, sodass davon ausgegangen werden musste, dass das Typ I-Kollagen in den Fraktionen vorkam.

Neben der Schweinehaut wurde auch Rindshaut mit Hilfe dieser Methode untersucht. Dazu sind in Abbildung 33 die erste und dritte Fraktion nach der sauren Extraktion mit Pepsin von Rindshaut dargestellt. Die weitere Untersuchung der zweiten Fraktion war nicht von Bedeutung.

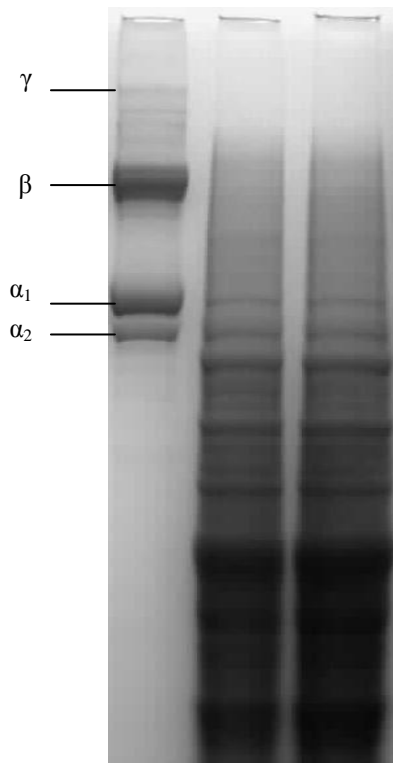


Abbildung 33: Darstellung der ersten (mittlere Spur) und dritten (rechte Spur) Fraktion nach der sauren Extraktion mit Pepsin von Rindshaut im Vergleich zum Rinder-SLK (linke Spur) (8 %iges Gel)

Bei der fraktionierten Fällung des sauren Extraktes mit Pepsin von Rindshaut wurde die Salzzugabe in 0,2 molaren Schritten erhöht um nach dem ersten Fällungsschritt noch eventuell vorhandenes Typ I-Kollagen vollständig herauszulösen. Jedoch konnte auch durch die langsamere Salzfällung erneut kein Unterschied zwischen der ersten und dritten Fraktion erzielt werden.

Im Vergleich zum Rinder-SLK war ein deutlicher Intensitätsverlust der  $\alpha$ -Banden zu beobachten. Die schwachen  $\alpha$ -Banden sowie die vielen Banden unterhalb dieser bestätigten die Annahme, dass die Zugabe von Pepsin nach einer eventuell stattgefundenen Denaturierung zu einem erhöhten Abbau von Kollagen führte. Um eine eventuelle Denaturierung der Rindshaut festzustellen, wurde eine Messung mit dem Verfahren der Dynamischen Differenzkalorimetrie (DDK) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurden die physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften einer Probe durch die Analyse der aufgenommenen bzw. abgegebenen Wärmemenge entlang eines Temperaturgradienten bestimmt. Die Schrumpfungstemperatur des in der Rindshaut enthaltenen Kollagens betrug ca. 60 °C. Dieser Wert befand sich im Bereich von nativem

Kollagen und damit konnte eine Denaturierung der Haut noch vor der Extraktion ausgeschlossen werden. Demzufolge wurde eine Denaturierung während der sauren Extraktion angenommen. Deshalb muss bei folgenden Versuchen auf eine geringere Säurestärke sowie auf einen höheren pH-Wert des Extraktes geachtet werden.

Die anschließende Bromcyanspaltung der  $\alpha$ -Banden aus dem Gel zeigte sowohl bei Schweinehaut als auch bei Rindshaut ein negatives Ergebnis. Dies ließ vermuten, dass das Kollagen durch die Zugabe von Pepsin nach einer eventuell stattgefundenen Denaturierung sehr stark abgebaut wurde und die Bromcyanpeptide somit nicht mehr dargestellt werden konnten. Die fraktionierte Salzfällung nach dem sauren Extrakt mit Pepsin wurde aufgrund der Ergebnisse nicht mehr mit in die weiteren Betrachtungen einbezogen.

Da aus den elektrophoretischen Untersuchungen der einzelnen Fraktionen keine eindeutigen Ergebnisse hervorgegangen waren, wurden diese nochmals über die Größenausschluss- und Ionenaustauschchromatographie untersucht.

## **4.3 Größenausschlusschromatographie**

### **4.3.1 Kollagenstandards**

Mit Hilfe einer Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie-Anlage wurden die Proben über eine Säule Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) getrennt. Die Trennung der einzelnen Kollagenmoleküle erfolgte nach dem Prinzip des Größenausschlusses (siehe Abschnitt 2.3.4). Die größten Moleküle ( $\gamma$ -Trimere) konnten nicht so tief in die Poren der stationären Matrix eindringen und wurden am schnellsten mit Hilfe der mobilen Phase aus dem System gespült. Demzufolge erschienen sie als erster Peak im Chromatogramm. Danach folgten die  $\beta$ -Dimere und zum Schluss erschienen die kleinsten Kollagenmoleküle, die  $\alpha$ -Monomere.

Für die Identifikation der einzelnen Kollagentypen wurden die Proben wieder mit den jeweiligen Kollagenstandards verglichen. Hierfür wurden im Diagramm 1 die verschiedenen Kollagentyp-Standards miteinander verglichen.

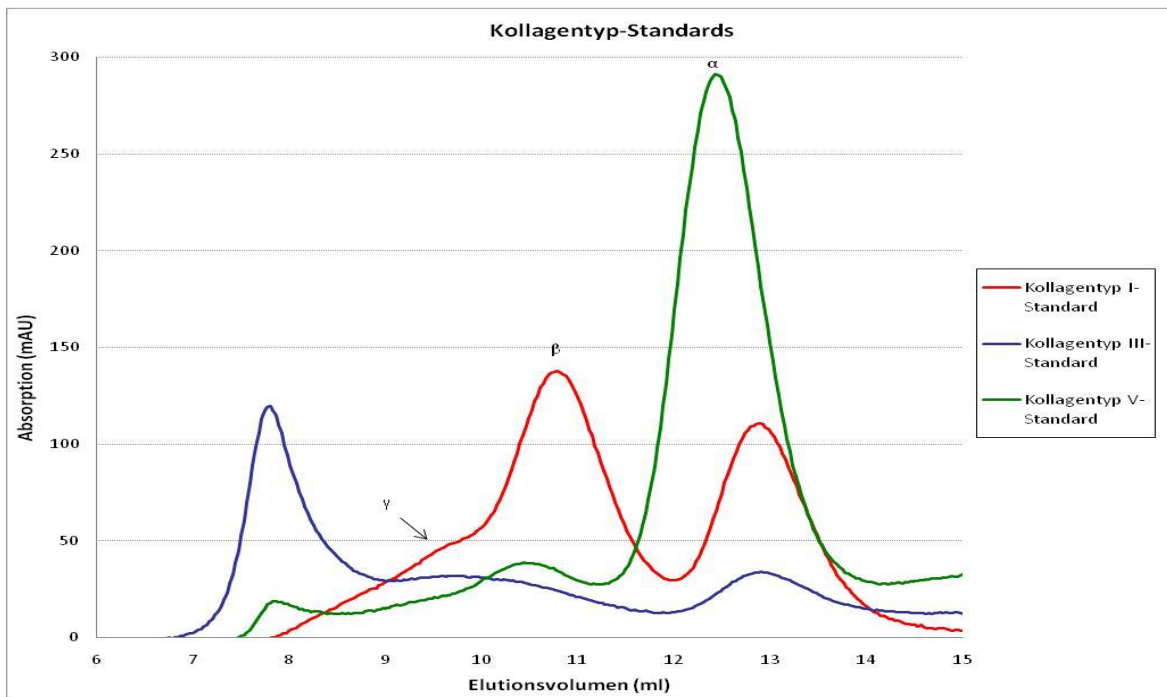


Diagramm 1: Vergleich der Kollagentypen I, III und V

Der Typ I-Standard zeigte ab einem Elutionsvolumen von ca. 7,5 ml den ersten Anstieg, mit diesem wurden hochmolekulare Anteile vermutet. Die leichte Schulter in einem Bereich von ca. 9,5-10 ml war auf  $\gamma$ -Trimere des Kollagens zurückzuführen. Im Anschluss waren zwei deutliche Peaks zu beobachten. Dabei lag das Maximum des ersten Peaks ( $\beta$ -Dimere) bei einem Elutionsvolumen von 11 ml und der Höchstpunkt des zweiten Peaks ( $\alpha$ -Monomere) befand sich bei einem Elutionsvolumen von 13 ml. Des Weiteren war die Absorption des  $\beta$ -Peaks mit 138 mAU höher als die des  $\alpha$ -Peaks mit ca. 112 mAU. Mit dem Vergleich der beiden Flächen zeigte sich, dass sich in diesem Standard mehr  $\beta$ -Dimere befanden als  $\alpha$ -Monomere. Der erste Peak des Typ V-Kollagens befand sich bei einem Elutionsvolumen von 8 ml, danach folgten der zweite Peak nach 10,5 ml und der dritte nach 12,5 ml. Der dritte Peak, der den  $\alpha$ -Monomeren entsprach, hatte sich deutlich von den anderen abgehoben mit einer gemessenen Absorption von 295 mAU. Im Vergleich zum Typ I-Standard erschien das Maximum der  $\alpha$ -Banden beim Kollagentyp V etwas früher und der Peak war deutlich breiter. Dies bestätigte die Untersuchungen mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, wobei der Typ V drei  $\alpha$ -Banden oberhalb der  $\alpha_1$ -Bande des Typ I-Kollagens aufwies (Abbildung 20). Der  $\beta$ -Peak des Typ III-Kollagens erschien nach einem Elutionsvolumen von 9-12 ml. Der  $\alpha$ -Peak besaß sein Maximum bei einem Elutionsvolumen von 13 ml, welches genau mit dem Höchstpunkt

vom Typ I-Kollagen übereinstimmte. Auch im Polyacrylamidgel war dies zu beobachten, da sich die  $\alpha_1$ -Banden der beiden Kollagentypen I und III auf gleicher Höhe befanden. Demzufolge hatten diese Banden eine identische Molmasse (siehe Abschnitt 4.1.1). Der erste große Peak des Kollagentyps III nach einem Elutionsvolumen von 7,7 ml entsprach hochmolekularen Anteilen und ließ vermuten, dass in dem Probenmaterial noch viele ungespaltene Disulfidbrückenbindungen vorhanden waren. Deshalb wurde im Anschluss die Auswirkung einer Reduzierung auf das Typ III-Kollagen untersucht (siehe Abschnitt 4.3.2).

Mit diesen Kollagentyp-Standards wurden bereits selbst hergestellten Proben untersucht und verglichen. Im Diagramm 2 ist der Vergleich des Rinder-SLK mit den drei Kollagentypen I, III und V dargestellt. Dabei fiel auf den ersten Blick auf, dass der Verlauf, das Verhältnis von  $\beta$ - zu  $\alpha$ -Peak sowie die Position der Maxima beim Rinder-SLK und beim Typ I-Kollagen identisch waren. Sie unterschieden sich nur in der Intensität der Absorption, was auf verschiedene Ausgangskonzentrationen zurückzuführen war. Das Maximum des  $\alpha$ -Peaks erschien beim Kollagentyp V wieder früher als beim Rinder-SLK, dies bestätigte unter anderem auch die Abbildung 20. Die Gelelektrophorese zeigte, dass sich die  $\alpha$ -Banden des Typ V oberhalb der  $\alpha$ -Banden der Kollagentypen I und III sowie des Rinder-SLK befanden (siehe Abschnitt 4.1.1). Aufgrund dieser Tatsache ließ sich vermuten, dass das Typ V-Kollagen in so geringen Mengen bzw. nicht im Rinder-SLK vorhanden war, so dass es nicht nachgewiesen werden konnte. Da die Maxima der Kollagentypen I und III genau übereinander verliefen, konnte keine Aussage über das Vorhandensein des Typ III-Kollagens im Rinder-SLK getroffen werden.

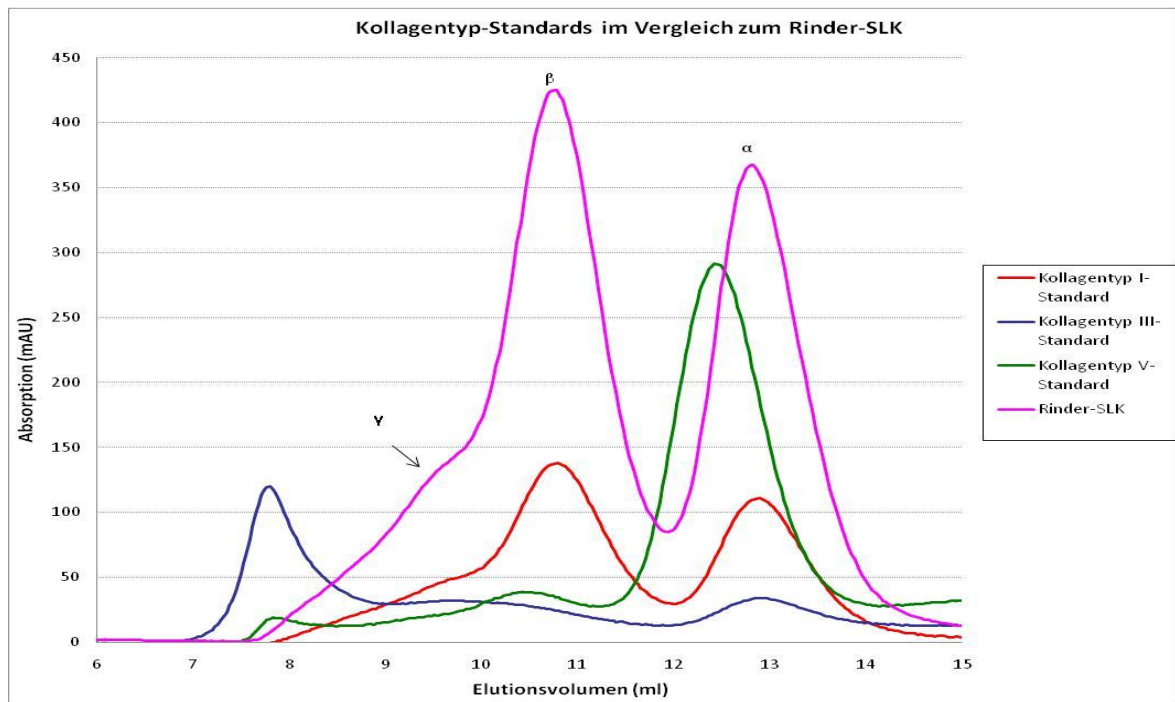


Diagramm 2: Vergleich von Rinder-SLK mit den Kollagentyp-Standards

Im Diagramm 3 ist Fisch-SLK im Vergleich zum Kollagentyp I-Standard dargestellt. Die Kurvenverläufe von der Probe und dem Typ I-Standard waren sich sehr ähnlich, jedoch war die Position der Maxima leicht verschoben. Demnach wurden die Maxima der  $\beta$ - und  $\alpha$ -Bande des Fisch-SLK im Vergleich zu denen des Typ I-Standards geringfügig später detektiert. Dies zeigte auch das Ergebnis der elektrophoretischen Untersuchung, wobei die  $\alpha$ -Banden des Fisch-SLK leicht unterhalb vom Rinder-SLK verliefen (Abbildung 20). Folglich konnte davon ausgegangen werden, dass die Moleküle der  $\alpha$ -Banden in Fischhaut etwas kleiner waren als die in Rinderhaut. Jedoch konnten in Bezug auf das Bandenmuster und das Chromatogramm des Fisch-SLK ausschließlich Vermutungen geäußert werden, da die Struktur dieses marinen Kollagens noch nicht vollständig charakterisiert wurde.

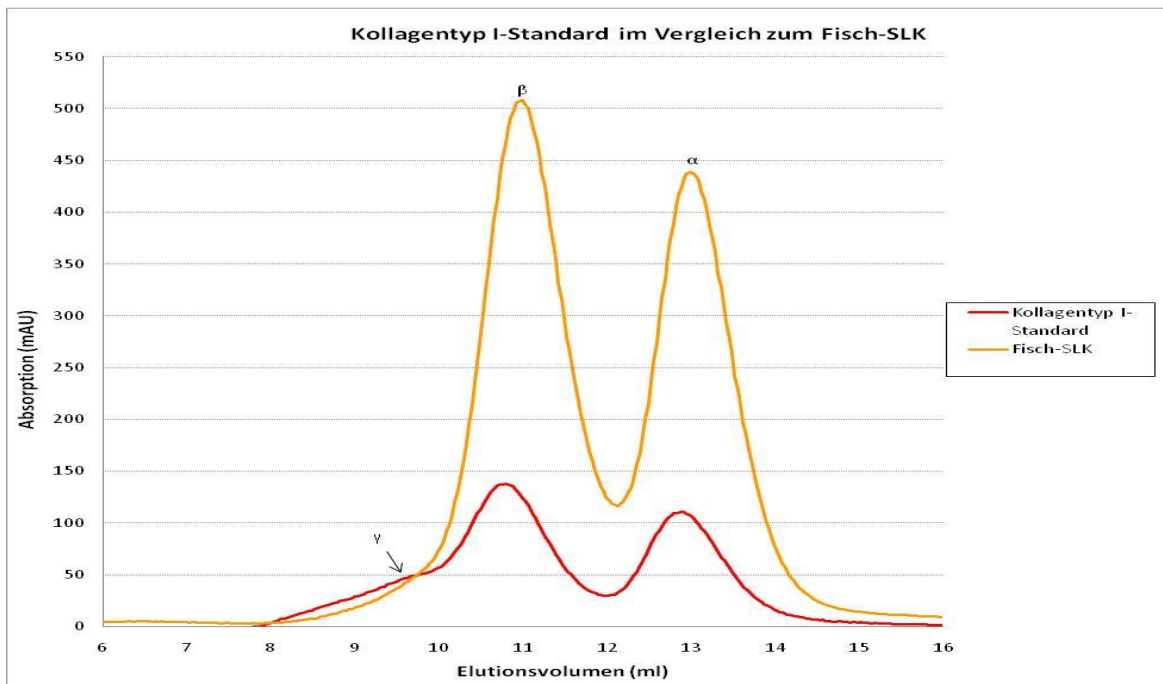


Diagramm 3: Vergleich von Fisch-SLK mit dem Kollagentyp I-Standard

### 4.3.2 Reduktion

Die Reduktion des Typ III-Kollagens wurde mit 2-Mercaptoethanol und anschließender Erhitzung auf 80 °C durchgeführt (Borel und Randoux, 1985). Im Diagramm 4 ist der Unterschied zwischen dem reduzierten und unreduzierten Typ III-Kollagen dargestellt.

Beim Vergleich der beiden Kurven war die Abnahme der hochmolekularen Anteile und die Zunahme des  $\alpha$ -Peaks mit der Reduktion deutlich zu erkennen. Demzufolge hatte die Reduktion einen großen Einfluss auf den Anteil von  $\alpha$ -Monomeren, da durch die Spaltung der Disulfidbrücken mehr hochmolekulare Anteile zu kleineren Molekülen, wie  $\alpha$ -Monomere abgebaut wurden. Dies bestätigte auch das Ergebnis der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe Abschnitt 4.1.1).



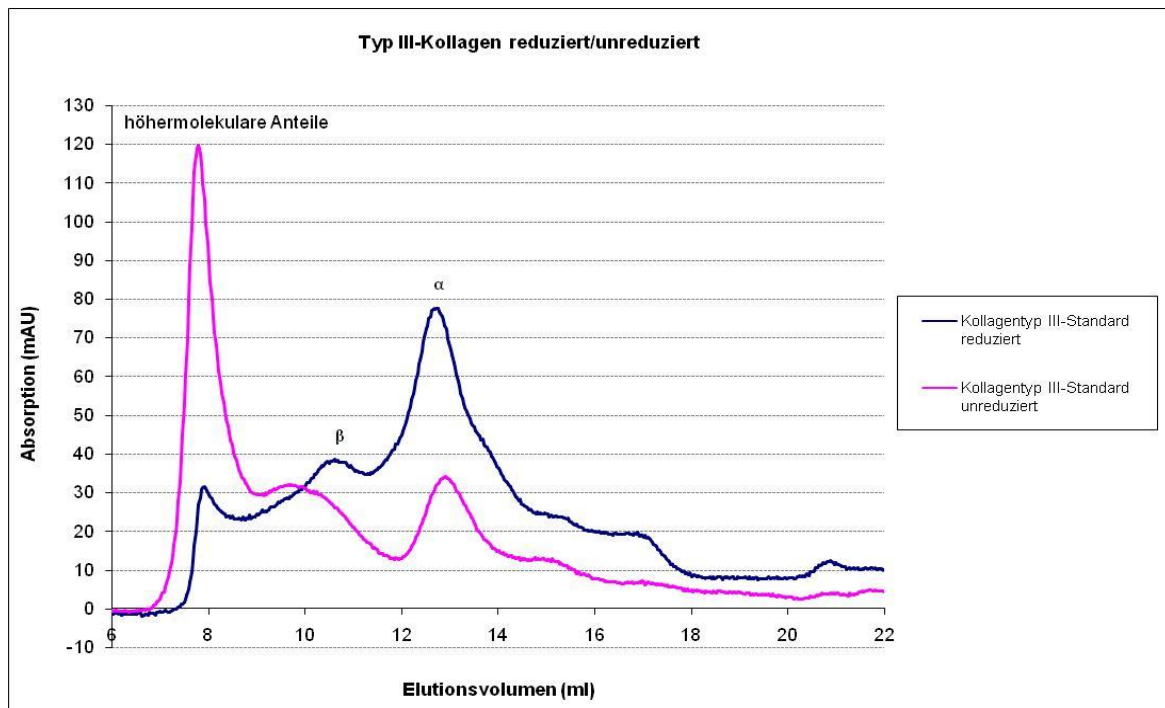


Diagramm 4: Vergleich von unreduziertem mit reduziertem Typ III-Kollagen

### 4.3.3 Analyse der einzelnen Fraktionen nach verschiedenen Extraktionsmethoden von Rinderhaut

#### NaCl-Fällung nach Neutralsalz-Extraktion

Nach der Neutralsalz-Extraktion war die Menge des abgenommenen Niederschlags sehr gering, dadurch gestaltete sich die Untersuchung der Fraktionen sehr schwierig. Die Analyse der ersten (nach *Bornstein und Sage* (1980) dem Typ III-Kollagen entsprechend), zweiten (nach *Bornstein und Sage* (1980) dem Typ I-Kollagen entsprechend) und dritten Fraktion (nach *Bornstein und Sage* (1980) dem Typ V-Kollagen entsprechend) zeigte bei der Größenausschlusschromatographie ein negatives Ergebnis. Die zweite Fraktion ist im Diagramm 5 dargestellt. Der Vergleich dieser Fraktion mit dem Kollagentyp I-Standard zeigte keine Gemeinsamkeiten, da die Maxima beider Kurven verschoben und nicht übereinander lagen. Außerdem zeigte diese zweite Fraktion keinen typischen Kurvenverlauf entsprechend dem Typ I-Kollagen. Zudem war das gemessene Signal so gering, dass eine qualitative und besonders eine quantitative Auswertung nicht möglich waren. Folglich wurde die fraktionierte Salzfällung dieses Extrakts in die weiteren Betrachtungen nicht mit einbezogen.

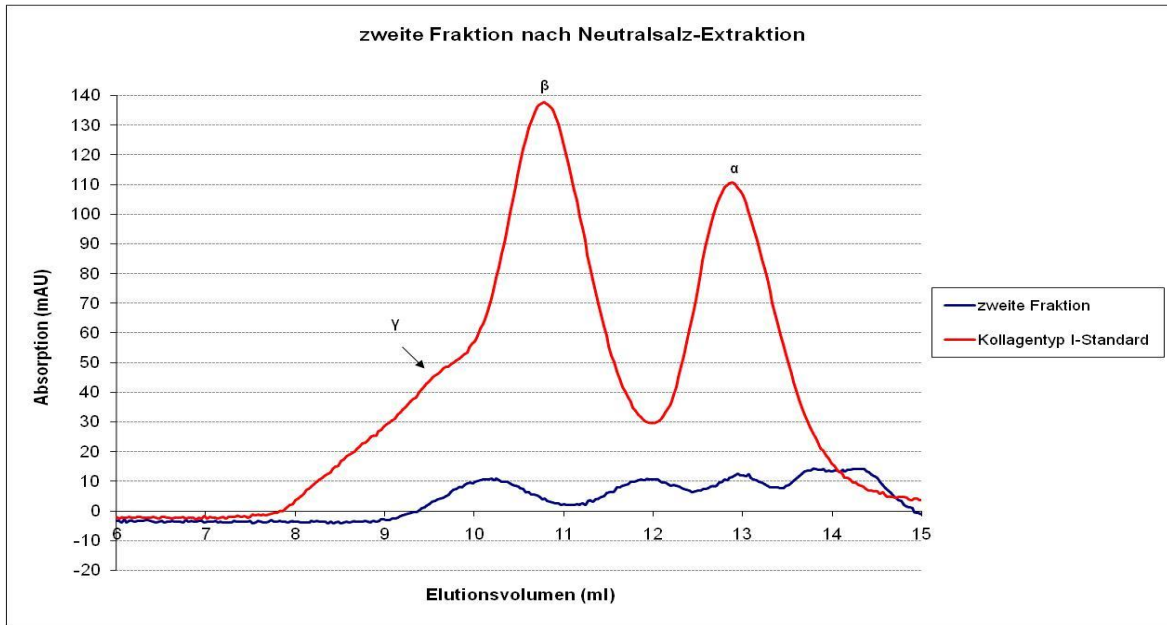


Diagramm 5: Vergleich der zweiten Fraktion nach Neutralsalz-Extraktion mit Kollagentyp I-Standard

### NaCl-Fällung nach saurer Extraktion

Bei der fraktionierten Salzfällung nach der sauren Extraktion konnten drei verschiedene Fraktionen von der Lösung abgetrennt werden. Dabei entsprachen nach *Bornstein und Sage* (1980) die erste Fraktion den Kollagentypen I und III, die zweite Fraktion dem Typ II-Kollagen und die dritte Fraktion dem Kollagentyp V. Aufgrund der Ergebnisse der elektrophoretischen Untersuchung konnte angenommen werden, dass die zweite Fraktion bei der Analyse von Hautproben unbedeutend war. Deshalb wurde diese Fraktion nicht mit in die weiteren Betrachtungen der Größenausschlusschromatographie einbezogen.

Die erste Fraktion (reduziert und unreduziert) ist im Vergleich zu den beiden Kollagentypen I und III im Diagramm 6 dargestellt. Dabei war der fast identische Verlauf der ersten Fraktion und des Kollagentyps I sehr auffällig. Demzufolge konnte davon ausgegangen werden, dass Typ I-Kollagen mit der ersten Fraktion ausgefällt wurde. Aufgrund der relativ breit verlaufenden Peaks konnte das Vorhandensein des Typ III innerhalb der ersten Fraktion nicht ausgeschlossen werden. Durch die Reduktion der ersten Fraktion stiegen die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peaks leicht an, jedoch konnte keine Abnahme der hochmolekularen Anteile registriert werden. Deshalb konnte der Einfluss der Reduktion in diesem Fall vernachlässigt werden.

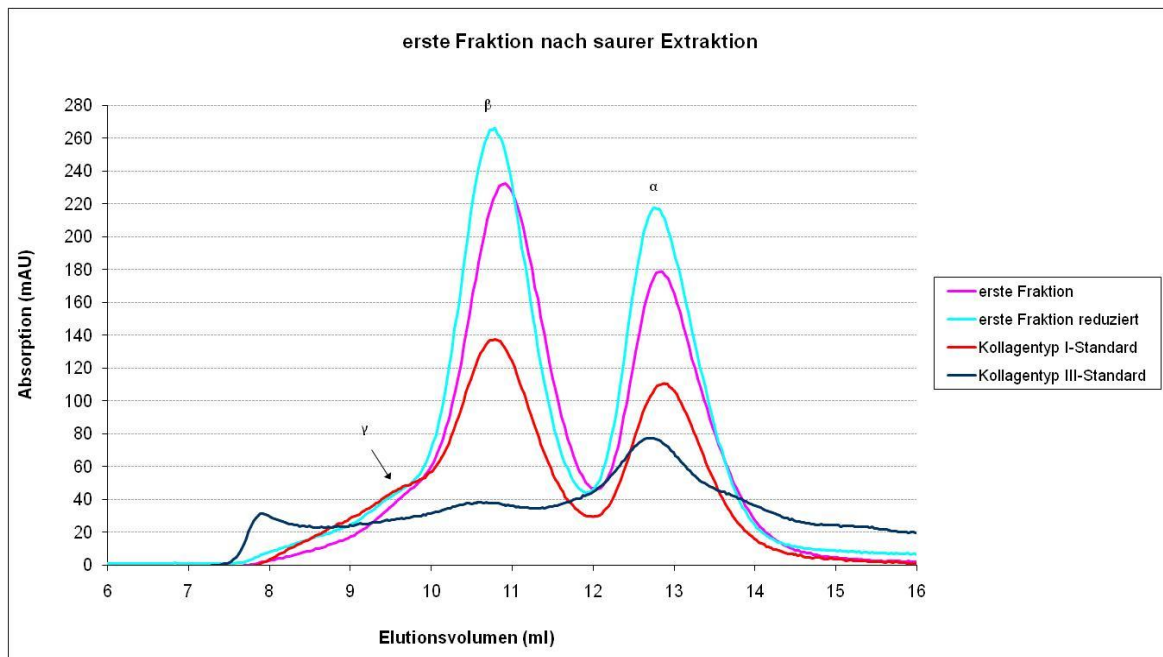


Diagramm 6: Vergleich der ersten Fraktion (reduziert/unreduziert) mit den Kollagentypen I und III

Diagramm 7 zeigt den Unterschied zwischen der ersten und der dritten Fraktion im Vergleich zum Kollagentyp V. Bei der dritten abgenommenen Fraktion war im Vergleich zur ersten Fraktion eine deutliche Abnahme der Peaks zu verzeichnen, was eine geringere Konzentration an Kollagen bedeutete. Da der Kurvenverlauf der dritten Fraktion vollkommen identisch zur ersten Fraktion war, konnte dabei wieder von Typ I-Kollagen ausgegangen werden (siehe auch Diagramm 6). Nach *Bornstein und Sage* (1980) sollte die dritte Fraktion das Typ V-Kollagen darstellen, aber in diesem Fall erschien das Maximum des Kollagentyps V etwas früher als das Maximum der dritten Fraktion. Auch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Peaks der dritten Fraktion waren im Vergleich zum dargestellten Typ V zu stark ausgeprägt. Demzufolge konnte davon ausgegangen werden, dass mit dieser dritten Fraktion ausschließlich das restliche Typ I-Kollagen aus dem Extrakt ausgefallen war. Dies bedeutet wiederum für nachfolgende Versuche, dass die Fällungszeiten eventuell verlängert und die Salzkonzentration für die jeweilige Fraktion nach der Abnahme des Niederschlags noch einmal eingestellt werden muss, das heißt, es sollte für jede Fraktion eine doppelte Fällung durchgeführt werden.

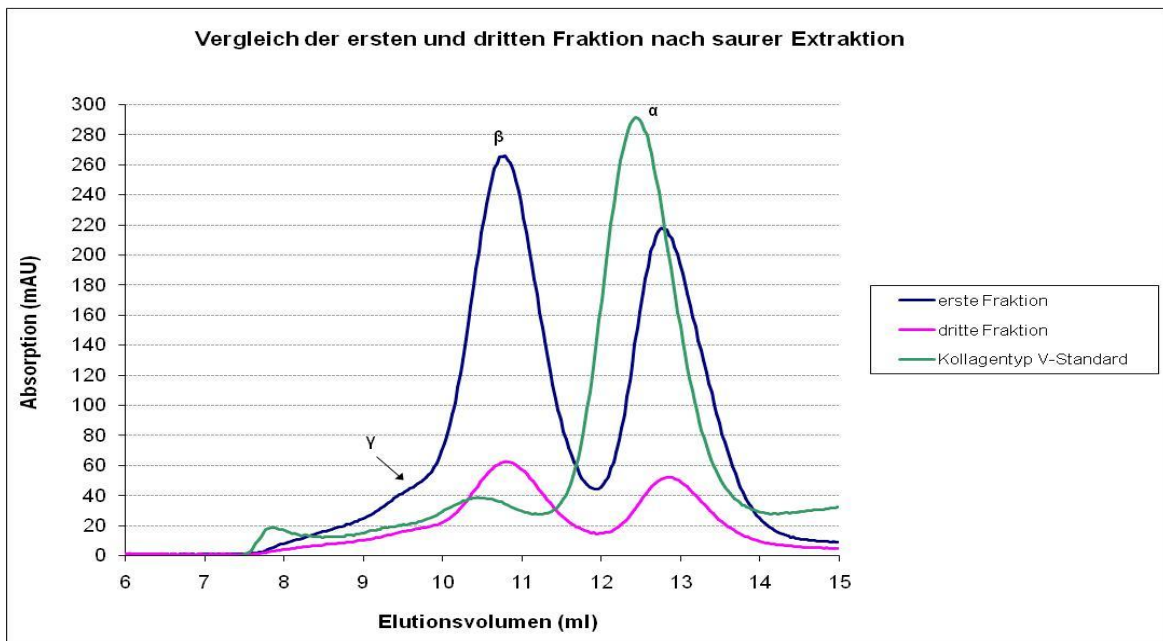


Diagramm 7: Darstellung der ersten und dritten abgenommenen Fraktion im Vergleich zum Kollagentyp V-Standard

### NaCl-Fällung nach saurer Extraktion mit Pepsin

Mit Hilfe der sauren Extraktion mit Pepsin-Verdau konnte die Ausbeute an Kollagen gegenüber der sauren Extraktion allein gesteigert werden. Die Trennung der einzelnen Kollagentypen wurde dabei analog der fraktionierten Salzfällung nach saurer Extraktion durchgeführt. Demzufolge wurden die einzelnen Fraktionen mit den gleichen vorgeschriebenen Salzkonzentrationen ausgefällt. Jedoch war auch in diesem Fall die zweite Fraktion für die Auswertung nicht von Bedeutung.

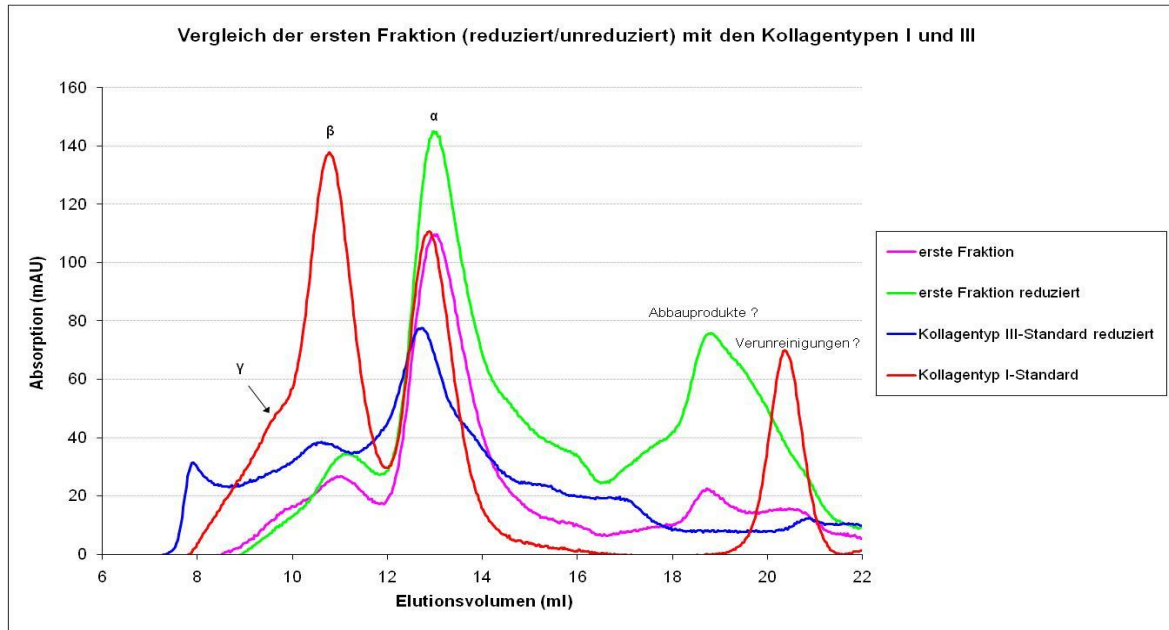


Diagramm 8: Vergleich der ersten Fraktion nach saurer Extraktion und Zugabe von Pepsin mit Kollagentypen I und III

Im Diagramm 8 ist die erste Fraktion (reduziert und unreduziert) im Vergleich zu den beiden Kollagentypen I und III dargestellt. Infolge der reduzierten Behandlung der Fraktion konnte eine Abnahme der hochmolekularen Anteile und eine deutliche Zunahme der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peaks beobachtet werden. Dadurch konnte das Vorhandensein des Typ III-Kollagens vermutet werden, da die Erhöhung der Peaks auf eine Spaltung der Disulfidbrücken zurückzuführen sein konnte. Weiterhin war bei beiden Kurven (reduziert und unreduziert) ein Peak beginnend nach einem Elutionsvolumen von ca. 17 ml zu verzeichnen. Dabei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Abbauprodukte des Kollagens. Der geringe pH-Wert der Essigsäure führte vermutlich zu einer sehr starken Quellung des Kollagens, da das Maximum der Quellung nach den Untersuchungen von Reich (1966) bei einem pH-Wert von 2-4 erreicht wurde. Durch diese konnte ein Angriff des vorhandenen Pepsins auf die helikalen Bereiche des Kollagens stattfinden. Zudem erreicht Pepsin bei einem pH-Wert von 2 sein Wirkungsoptimum (Reich, 1966). Für zukünftige Versuche wäre demzufolge eine geringere Konzentration des Extraktionsmittels oder ein höherer pH-Wert des gesamten Extraktionsansatzes zu wählen.

Im Vergleich zum Kollagentyp I-Standard waren deutlich schwächere Peaks für die hochmolekularen Anteile sowie für  $\gamma$  und  $\beta$  zu beobachten, dies konnte wiederum auf die Denaturierung des Kollagens zurückgeführt werden. Bei beiden Kurven lagen die Maxima

der  $\alpha$ -Peaks beim gleichen Elutionsvolumen. Infolgedessen wurde mit der ersten Fraktion Typ I-Kollagen ausgefällt. Jedoch war im Vergleich zum Kollagentyp III-Standard eine Verschiebung der Maxima zu erkennen, sodass in der ersten Fraktion kein Typ III-Kollagen angenommen werden konnte. Es wurde davon ausgegangen, dass das Typ III-Kollagen nicht mit ausgefällt wurde. Für weitere Versuche könnte eine Reduzierung der Haut noch vor der Extraktion vorgenommen werden, damit der Kollagentyp III aus dem festen Verbund der Haut herausgelöst wird.

Mit Hilfe des Diagramms 9 werden die Unterschiede zwischen der ersten und dritten Fraktion im Vergleich zum Kollagentyp V-Standard dargestellt. Die Kurvenverläufe beider Fraktionen waren sehr ähnlich, jedoch konnte eine leichte Verschiebung der jeweiligen Maxima und eine Konzentrationsabnahme aufgrund des geringeren  $\alpha$ -Peaks beobachtet werden. Im Gegensatz zur ersten Fraktion erschienen bei der dritten Fraktion ausgeprägtere hochmolekulare Anteile bei einem Elutionsvolumen von 7,5-10 ml. Der Vergleich mit dem Kollagentyp V-Standard zeigte, dass die Maxima der  $\alpha$ -Peaks von Typ V-Kollagen und der ersten Fraktion deutlich verschoben waren. Deshalb konnte das Typ V-Kollagen innerhalb der ersten Fraktion ausgeschlossen werden. Der Verlauf der Kurven der dritten Fraktion und des Typ V-Kollagens stimmen gut überein, sodass der Kollagentyp V innerhalb der dritten Fraktion erwartet werden konnte.

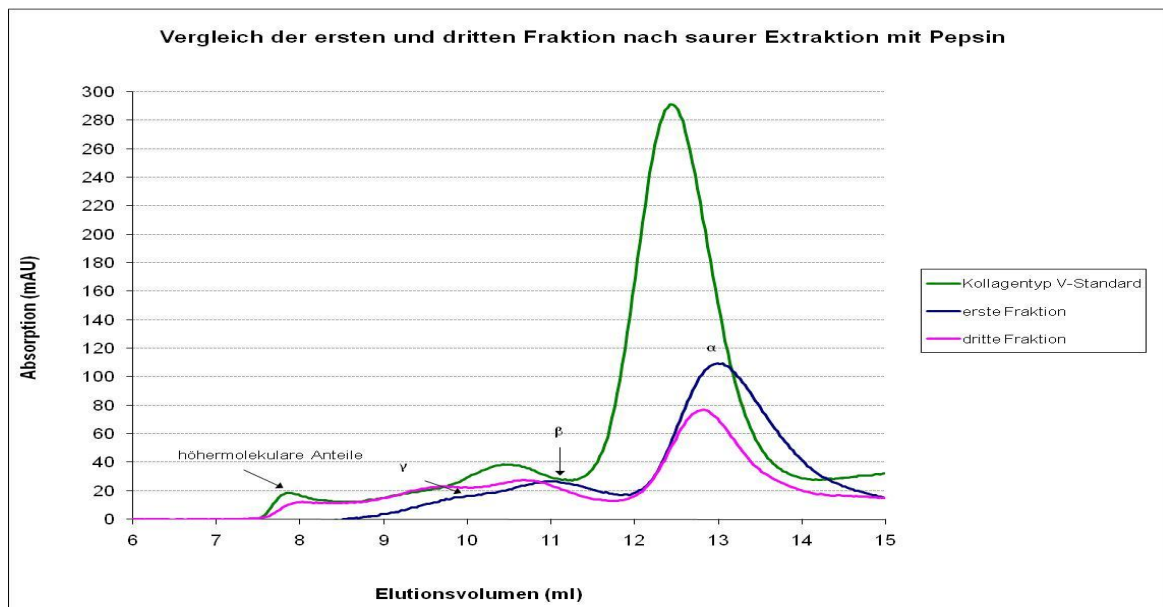


Diagramm 9: Darstellung der ersten und dritten Fraktion nach saurer Extraktion mit Pepsin sowie des Kollagentyp V-Standards

Weiterhin sind im Diagramm 10 die Elutionsprofile der dritten Fraktion nach saurer Extraktion mit und ohne Zusatz von Pepsin dargestellt. Ohne Pepsinzugabe (blaue Kurve) zeigte die Kurve einen charakteristischen Verlauf entsprechend dem Typ I-Kollagen bzw. Rinder-SLK (siehe auch Diagramm 2). Mit der Zugabe des Pepsins zum Extraktionsansatz verringerte sich der  $\beta$ -Peak und gleichzeitig erhöhte sich der  $\alpha$ -Peak. Die kleinen Peaks bei größeren Elutionsvolumina deuten auf Abbauprodukte des Kollagens hin. In diesem Fall wurde die Denaturierung des Kollagens bereits während der sauren Extraktion durch die Zugabe von Pepsin und der damit verbundenen Spaltung in kleinere Peptide erst sichtbar gemacht. Die Maxima beider Kurven lagen genau übereinander, deshalb konnte von den gleichen Kollagentypen innerhalb beider Fraktionen ausgegangen werden. Der leichte Peak der blauen Kurve am Säulenbeginn war vermutlich auf Verunreinigungen der Säule durch eine vorherige Probe zurückzuführen.

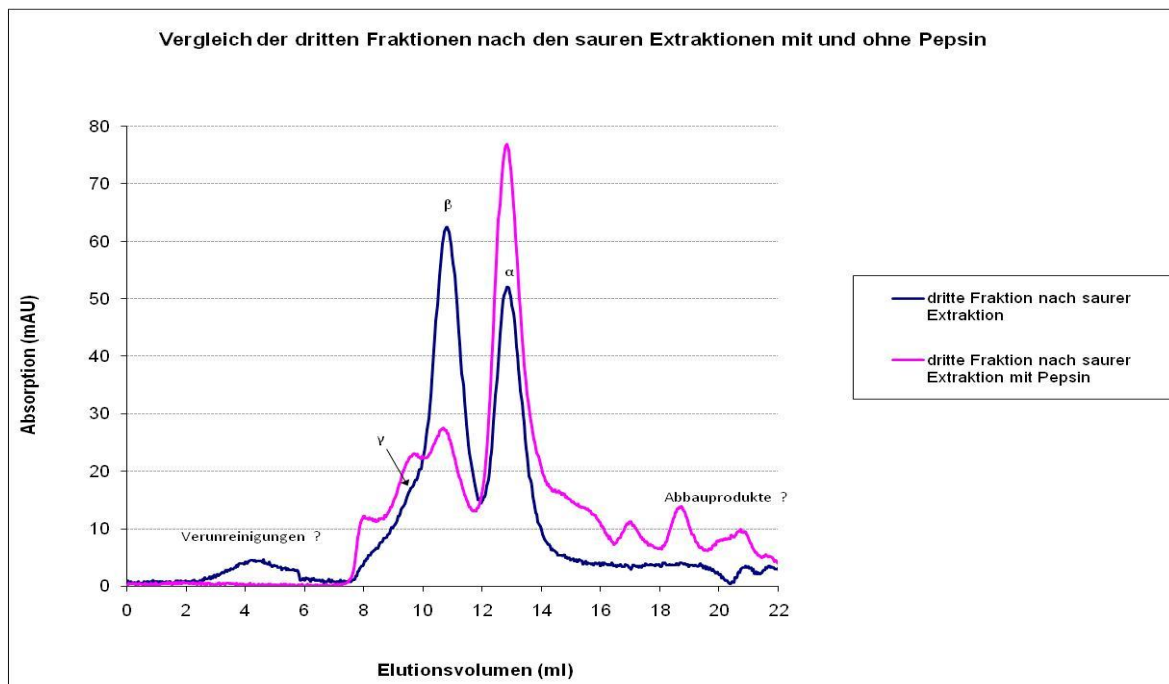


Diagramm 10: Darstellung der dritten Fraktionen nach saurer Extraktion mit und ohne Pepsin

Die Trennung der einzelnen Kollagentypen wurde zusätzlich auch ohne fraktionierte Salzfallung über die Größenausschlusschromatographie mit anschließender Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Dementsprechend wurde der saure Extrakt des Kollagens mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie aufgetrennt und die  $\alpha$ -Fraktion in einem Bereich von 12,25-14,14 ml des Elutionsvolumens aufgefangen (Diagramm 11).

Der saure Extrakt zeigte im Vergleich zum Rinder-SLK einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf. Jedoch war ein anderes Verhältnis von  $\alpha$ - zu  $\beta$ -Peak sowie zusätzliche Peaks bei großem Elutionsvolumina zu verzeichnen. Dies konnte wiederum auf eine Denaturierung des Kollagens während der sauren Extraktion zurückzuführen sein, da eine Schädigung der Hautstruktur vor der Extraktion nach den Ergebnissen der Dynamischen Differenzkalorimetrie ausgeschlossen werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.3). Dementsprechend sollte der pH-Wert des Extraktionsansatzes in Zukunft eingestellt und eine niedrigere Essigsäurekonzentration gewählt werden, damit eine zu starke Quellung des Kollagens verhindert wird.

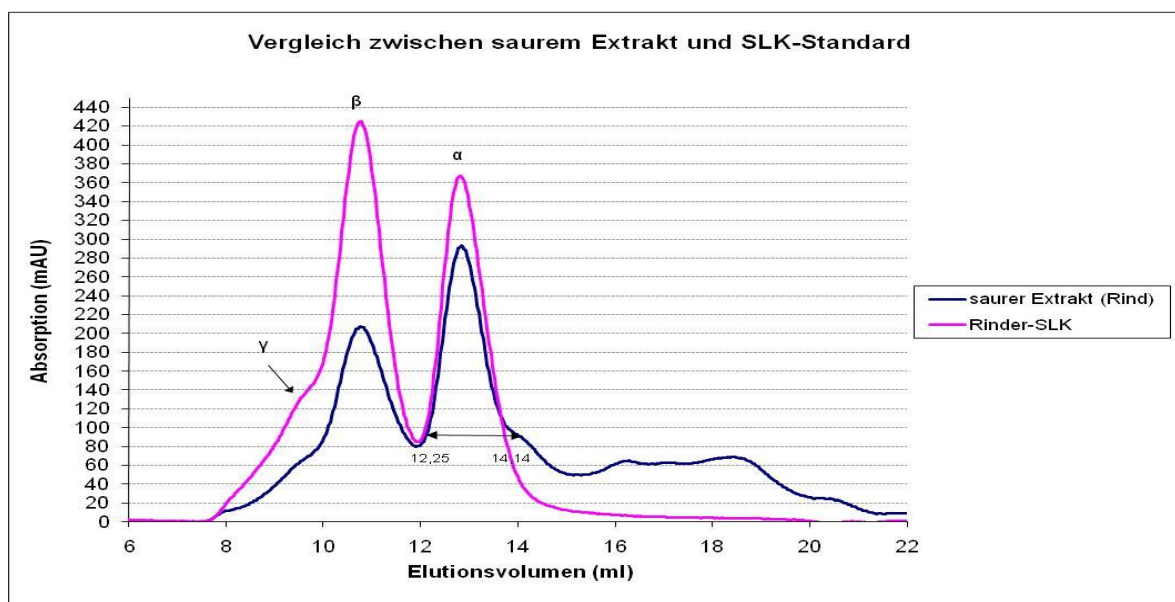


Diagramm 11: Darstellung des sauren Extraktes im Vergleich zum Rinder-SLK

#### 4.4 Ionenaustauschchromatographie

Im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie wurde die gesammelte  $\alpha$ -Fraktion mittels Ionenaustauschchromatographie aufgetrennt, damit die  $\alpha$ -Banden der verschiedenen Kollagentypen besser identifiziert werden konnten. Das Diagramm 12 stellt die Unterschiede zwischen den einzelnen Kollagentypen, dem Rinder-SLK und der  $\alpha$ -Fraktion dar.

Zum Vergleich wurde unter anderem Rinder-SLK genommen. Dieses zeigte nach ca. 13 ml den ersten und nach 14 ml des Elutionsvolumens den zweiten Peak. Aufgrund der Ergebnisse von *Tuan und Lynch* (1983) wurden bei dem ersten Peak die  $\alpha_1$ -Banden und beim zweiten Peak die  $\alpha_2$ -Banden des Typ I-Kollagens angenommen. Der dritte Peak im



Bereich von 15-18 ml des Elutionsvolumens konnte noch nicht definiert werden. Der Kollagentyp II-Standard wies einen breiteren Peak nach einem Elutionsvolumen von ca. 13 ml auf, jedoch war dessen Maximum leicht verschoben im Vergleich zum Peak im Chromatogramm des Rinder-SLK. Die Konzentration des Kollagentyp V-Standards wurde um das fünffache erhöht, um die sehr schwachen Peaks nach 12 und 14 ml des Elutionsvolumens sichtbar zu machen. Der Peak bei ca. 18 ml des Elutionsvolumens zählte als dritte  $\alpha$ -Bande zum Typ V-Kollagen. Nach ca. 10,5 ml des Säulenvolumens erschien ein Peak für das Typ III-Kollagen, dabei handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die  $\alpha_1$ -Bande dieses Typs. Allgemein betrachtet waren die Konzentrationen der Typen III und V zu gering, sodass weitere Versuche notwendig sind. Die isolierte  $\alpha$ -Fraktion zeigte im Bereich von 10-11,5 ml des Elutionsvolumens einen deutlichen Peak, dessen Maximum genau oberhalb des Kollagentyp III-Standards lag. Jedoch wäre zu vermuten gewesen, dass die  $\alpha$ -Fraktion zusätzliche Peaks entsprechend dem Rinder-SLK aufweist. Für den eindeutigen Vergleich sollte jedoch der Kollagentyp I-Standard mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie analysiert werden. Nach ca. 16,5 ml des Elutionsvolumens war ein ganz schwacher Peak zu erahnen. Um diesen leichten Peak besser deuten zu können, wird im Diagramm 13 der Unterschied zwischen der  $\alpha$ -Fraktion und dem verwendeten Laufpuffer dargestellt.

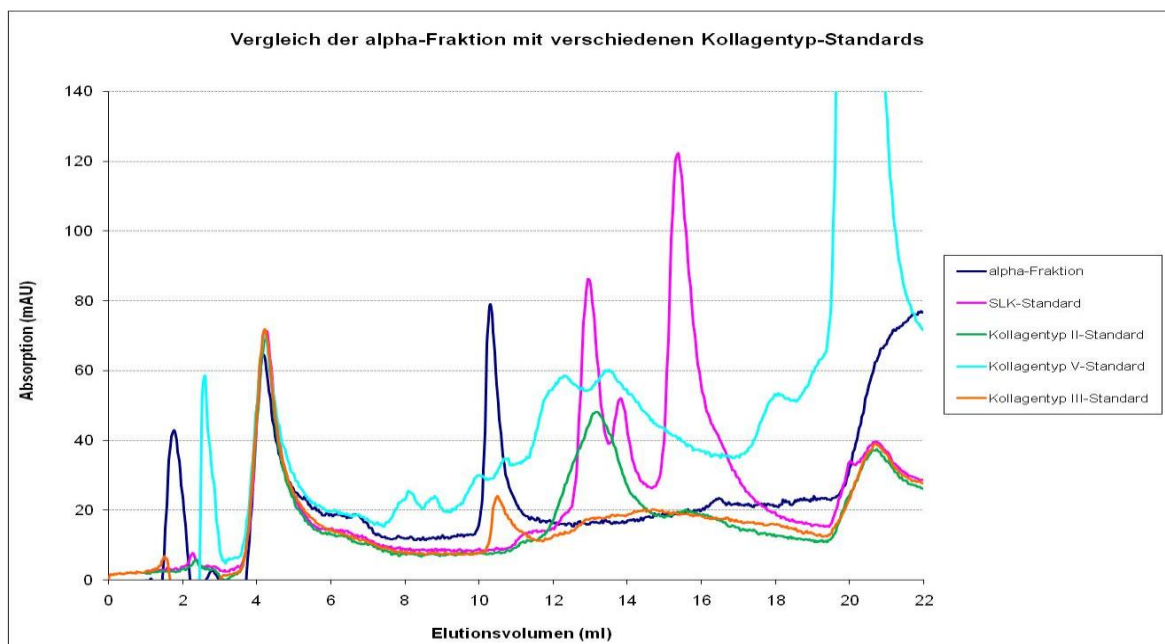


Diagramm 12: Vergleich der unterschiedlichen Kollagentyp-Standards mit der isolierten  $\alpha$ -Fraktion

Durch den Vergleich der Probe mit dem Laufpuffer wurde bestätigt, dass die Peaks am Säulenanfang und am Säulenende auf den Laufpuffer zurückgeführt werden konnten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass im Chromatogramm der Probe in dem Bereich von ca. 11-19,5 ml des Elutionsvolumens eine höhere Absorption messbar war. Dementsprechend müssen weitere Versuche durchgeführt werden, um genauere Informationen zu diesem Bereich zu erhalten. Da die gemessenen Absorptionen aller Proben sehr gering sind, sollten die verwendeten Konzentrationen erhöht werden.

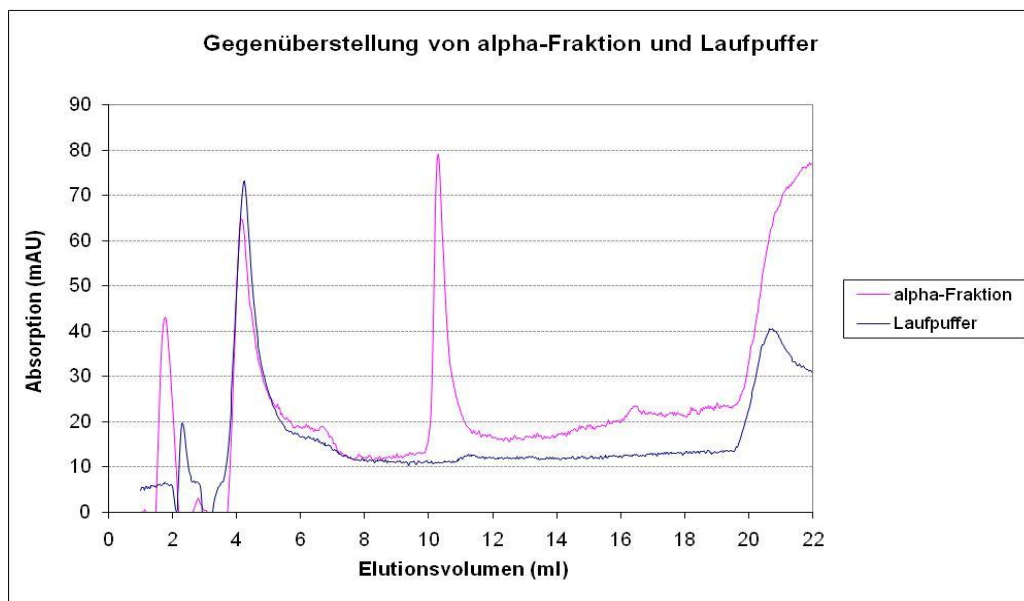


Diagramm 13: Vergleich der  $\alpha$ -Fraktion mit dem verwendeten Laufpuffer

## 4.5 Western Blot

Bei einem ersten Versuchsansatz erfolgte der Transfer der Banden des Kollagens vom Gel (8 %) auf die Membran über zwei Stunden. Die aufgetragenen Proben wurden jeweils mit den Primärantikörpern Anti-Kollagentyp I und Anti-Kollagentyp III über Nacht bei 4 °C behandelt. Dabei wurde für die Primärantikörper die Verdünnung von 1:5000 gewählt. Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper (mit alkalischer Phosphatase markiert) mit der Verdünnung von 1:1000 zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Das Enzym alkalische Phosphatase katalysierte die Reaktion an den Farbstoffen BCIP und NBT, was mit einem Farbumschlag verbunden war (siehe Abschnitt 2.3.3). Die Bandenmuster auf den Membranen wurden mit Hilfe der Geldokumentationsanlage festgehalten.

Abbildung 34 zeigt verschiedene Proben, die mit dem Primärantikörper Anti-Kollagentyp I behandelt wurden.

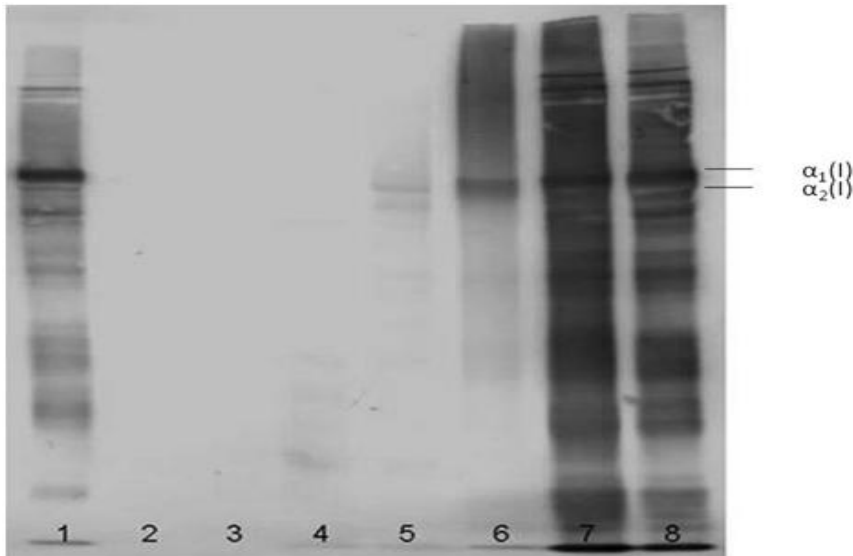


Abbildung 34: Darstellung des ersten Versuchsansatzes von mit Anti-Kollagentyp I behandelten Proben (Spur 1: Rinder-SLK reduziert; Spur 2: Kollagentyp V-Standard; Spur 3: Kollagentyp III-Standard, reduziert; Spur 4: saurer Extrakt mit Pepsin aus Rinderhaut, reduziert; Spur 5: saurer Extrakt mit Pepsin aus Rinderhaut; Spur 6: saurer Extrakt aus Rinderhaut; Spur 7 und 8: saurer Extrakt aus Rinderhaut, reduziert) (8 % Gel)

Der Primärantikörper Anti-Kollagentyp I bindet normalerweise nur an den Banden, die dem Kollagentyp I zugeordnet werden konnten. Nach diesem Immunoblot konnte das Typ I-Kollagen beim Rinder-SLK und dem sauren Extrakt aus Rindshaut nachgewiesen werden. Die Reduktion der sauren Extrakte der Spuren 7 und 8 zeigte im Vergleich zur unreduzierten Probe der Spur 6 eine deutliche Intensitätserhöhung der Banden. Da das Typ I-Kollagen jedoch keine Disulfidbrücken enthielt, war der Einfluss der Reduktion auf die Proben unbedeutend. Die beobachtete Intensitätserhöhung konnte vermutlich auf Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Proben zurückgeführt werden. Die Proben, in denen das Typ I-Kollagen vorhanden war, wiesen zudem eine besonders deutliche und stark gefärbte Bande, die  $\alpha_1$ -Bande, auf. Dementsprechend war eine Bindung des Primärantikörpers an die  $\alpha_1$ -Bande des Typ I-Kollagens denkbar. Weiterhin wurden aber auch viele kleinere Moleküle angefärbt, jedoch konnte der Grund für diese Färbung noch nicht eindeutig geklärt werden. Die Denaturierung führte vermutlich zu einer besonders durch das zugegebene Pepsin verstärkten Spaltung der Kollagenmoleküle und der Bindungsstellen für den Primärantikörper. Die Kollagentypen III und V reagierten nicht mit dem Primärantikörper Anti-Kollagentyp I, damit konnte die hohe Spezifität des verwendeten Antikörpers bestätigt werden.

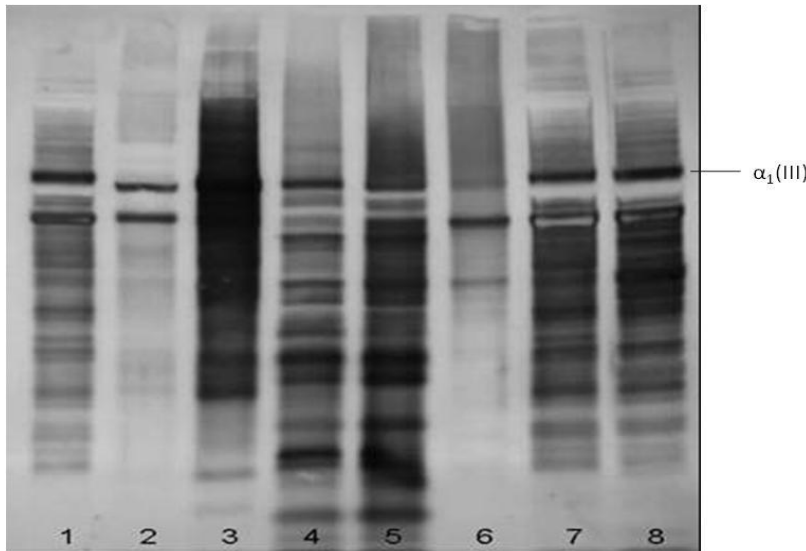


Abbildung 35: Darstellung des ersten Versuchsansatzes von mit Anti-Kollagentyp III behandelten Proben (Spur 1: Rinder-SLK reduziert; Spur 2: Kollagentyp V-Standard; Spur 3: Kollagentyp III-Standard, reduziert; Spur 4: saurer Extrakt mit Pepsin aus Rinderhaut, reduziert; Spur 5: saurer Extrakt mit Pepsin aus Rinderhaut; Spur 6: saurer Extrakt aus Rinderhaut; Spur 7 und 8: saurer Extrakt aus Rinderhaut, reduziert) (8 % Gel)

In Abbildung 35 sind die verschiedenen Proben, die mit dem Primärantikörper Anti-Kollagentyp III behandelt wurden, dargestellt. Der verwendete Primärantikörper sollte an spezifischen Erkennungsregionen binden, die für das Typ III-Kollagen charakteristisch waren. Beim größten Teil der Proben war die  $\alpha_1$ -Bande sehr stark gefärbt, unterhalb dieser war eine deutliche Aussparung zu beobachten. Diese Leerstelle konnte vermutlich der  $\alpha_2$ -Bande des Typ I-Kollagens zugeordnet werden. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass der Primärantikörper an einem bestimmten Erkennungsmuster der  $\alpha_1$ -Bande gebunden hat. Jedoch konnten weitere Färbungen von kleineren Molekülen, wie bereits beim Typ I-Kollagen festgestellt wurde, beobachtet werden. Es ließ sich vermuten, dass diese sichtbaren Banden im unteren Bereich der Membran auf eine Denaturierung zurückzuführen waren. Dabei war die Intensität der Banden am stärksten bei dem mit Pepsin behandelten sauren Extrakt. Letztendlich wurde damit die Vermutung bestätigt, dass Pepsin die Spaltung des Kollagens in kleinere Moleküle noch verstärkt. Weiterhin konnte der Einfluss einer Reduktion der Proben durch eine höhere Intensität und Anzahl der jeweiligen Banden wahrgenommen werden. Dabei war der Unterschied zwischen einer reduzierten und einer unreduzierten Probe besonders bei den Spuren 6 (keine  $\alpha_1$ -Bande) und 7 bzw. 8 (sehr deutliche  $\alpha_1$ -Bande) zu beobachten. Der reduzierte Kollagentyp III-

Standard war wie zu erwarten am stärksten gefärbt, allerdings wurden die Banden aufgrund der zu hohen Konzentration nur verschmiert dargestellt. Aus diesem Grund sollte bei folgenden Untersuchungen eine geringere Konzentration des Standards verwendet werden. Die starke Färbung des Typ III-Kollagens zeigte aber auch, dass der Primärantikörper eine hohe Empfindlichkeit aufwies. Im Gegensatz dazu konnten beim Kollagentyp V-Standard zwei markante Banden festgestellt werden, die wahrscheinlich aus Kreuzreaktionen des Primärantikörpers mit dem Typ V-Kollagen hervorgegangen waren.

Für den zweiten Versuchsansatz wurde die Transferzeit auf ca. 14 Stunden über Nacht verlängert. Die jeweiligen Proben wurden wiederum mit den zwei Primärantikörpern für zwei Stunden bei Raumtemperatur und anschließend mit dem Sekundärantikörper, wie beim ersten Versuchsansatz, behandelt. Jedoch wurde für die Primärantikörper eine Verdünnung von 1:8000 und für den Sekundärantikörper eine Verdünnung von 1:2000 gewählt. Ansonsten erfolgte der Western Blot wie beim ersten Versuchsansatz.

Abbildung 36 zeigt die verschiedenen Proben, die mit dem Primärantikörper Anti-Kollagentyp I versetzt wurden.

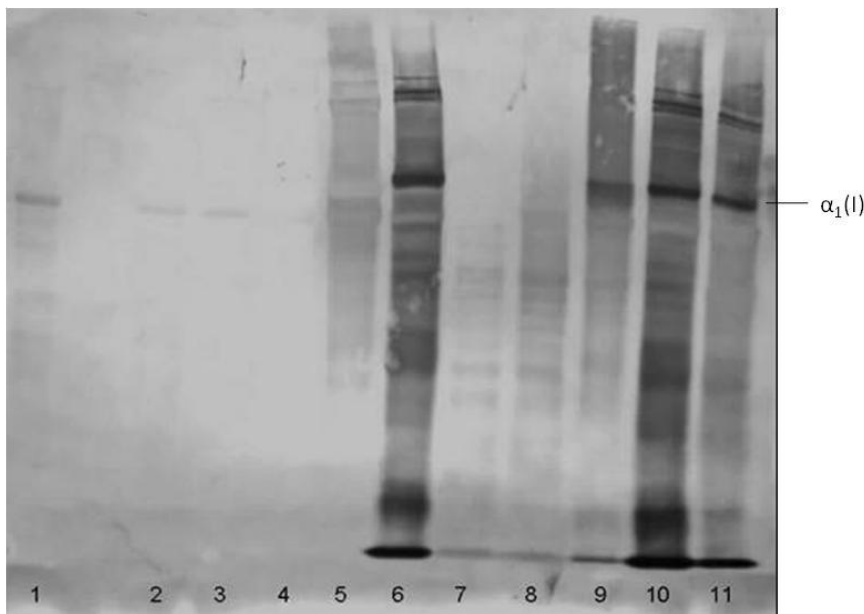


Abbildung 36: Darstellung des zweiten Versuchsansatzes von mit Anti-Kollagentyp I behandelten Proben (Spur 1: Kollagentyp III-Standard; Spur 2: Kollagentyp III-Standard, reduziert; Spur 3: Kollagentyp V-Standard; Spur 4: Fisch-SLK, reduziert; Spur 5: Kollagenlösung, reduziert; Spur 6: Rinder-SLK, reduziert; Spur 7: saurer Extrakt mit Pepsin aus Rinderhaut, reduziert; Spur 8: saurer Extrakt mit Pepsin aus Rinderhaut; Spur 9: saurer Extrakt aus Rinderhaut; Spur 10 und 11: saurer Extrakt aus Rinderhaut, reduziert) (8 % Gel)

Im Vergleich zum ersten Ansatz ergaben sich keine großen Unterschiede, sodass die Transferzeit auch für weitere Versuche bei zwei Stunden belassen und eine höhere Verdünnung der Antikörper von 1:8000 bzw. 1:2000 verwendet sowie eine Inkubationszeit für die Primärantikörper über Nacht bei 4 °C eingestellt wurde. Ausschließlich bei den beiden Kollagentypen-Standards zeigten sich jeweils schwache Banden, die aber aufgrund der geringen Intensität vernachlässigt wurden. Insofern konnte beim Rinder-SLK und den sauren Extrakten aus Rinderhaut das Typ I-Kollagen nachgewiesen werden. Beim Fisch-SLK konnten keine Banden festgestellt werden, da der verwendete Primärantikörper ausschließlich mit Typ I-Kollagen von Rind und Mensch reagierte. Die Kollagenlösung wurde nicht beachtet, da die Banden zu schwach und verschmiert dargestellt wurden. Aus dem Grund, dass der saure Extrakt mit Pepsin wahrscheinlich geschädigt und die für den Primärantikörper charakteristischen Bindungsstellen vermutlich gespalten wurden, konnte das Vorkommen des Typ I-Kollagens nicht bewiesen werden.

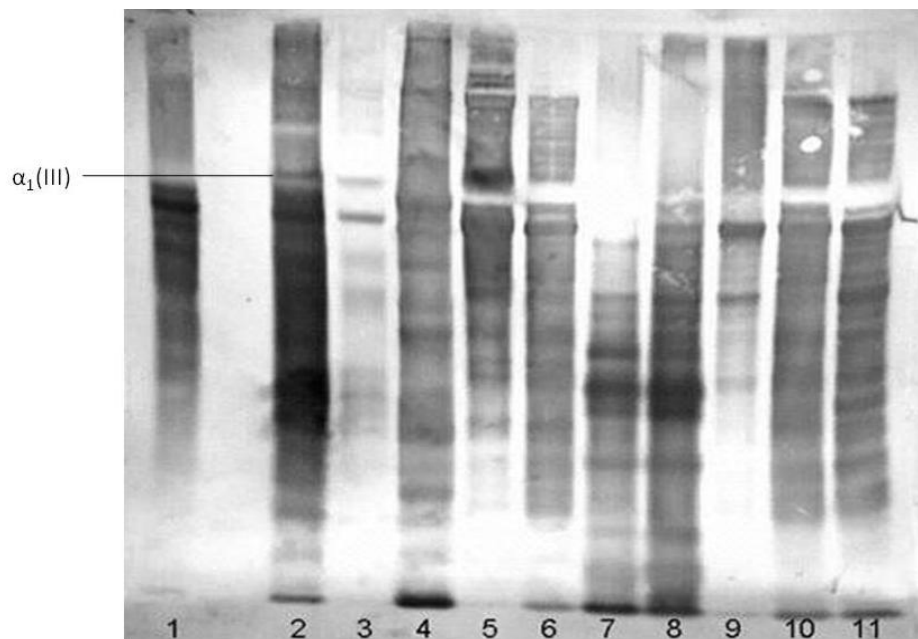


Abbildung 37: Darstellung des zweiten Versuchsansatzes von mit Anti-Kollagentyp III behandelten Proben

(Spur 1: Kollagentyp III-Standard; Spur 2: Kollagentyp III-Standard, reduziert; Spur 3: Kollagentyp V-Standard; Spur 4: Fisch-SLK, reduziert; Spur 5: Kollagenlösung, reduziert; Spur 6: Rinder-SLK, reduziert; Spur 7: saurer Extrakt mit Pepsin aus Rinderhaut, reduziert; Spur 8: saurer Extrakt mit Pepsin aus Rinderhaut; Spur 9: saurer Extrakt aus Rinderhaut; Spur 10 und 11: saurer Extrakt aus Rinderhaut, reduziert) (8 % Gel)

Abbildung 37 stellt die verschiedenen Proben des zweiten Versuchsansatzes dar, die mit dem Primärantikörper Anti-Kollagentyp III behandelt wurden. Der zweite Versuchsansatz war im Vergleich zum ersten etwas undeutlicher und die  $\alpha_1$ -Banden des Typ III-Kollagens konnten nicht eindeutig definiert werden. Deshalb wurde die Reaktion mit dem Primärantikörper bei den nachfolgenden Versuchen bei 4 °C und über Nacht durchgeführt. Jedoch wurden trotz dieser geringfügigen Abweichungen die gleichen Ergebnisse erzielt. Durch die Intensitätszunahme nach der Reduktion des Typ III-Kollagens konnte bestätigt werden, dass die Disulfidbrücken gespalten wurden und demzufolge mehr Kollagentyp III nachweisbar war. Dieser Unterschied konnte von Spur 9 zu Spur 10 bzw. 11 beobachtet werden. Dabei fiel auf, dass die hochmolekularen Anteile weiter zu  $\gamma$ -Trimeren,  $\beta$ -Dimeren und  $\alpha$ -Monomeren abgebaut wurden.

Im Anschluss wurde eine Bromcyanspaltung der Proben durchgeführt. Die Bromcyanpeptide, die vom Primärantikörper Anti-Kollagentyp I gebunden wurden, sind in Abbildung 38 dargestellt.

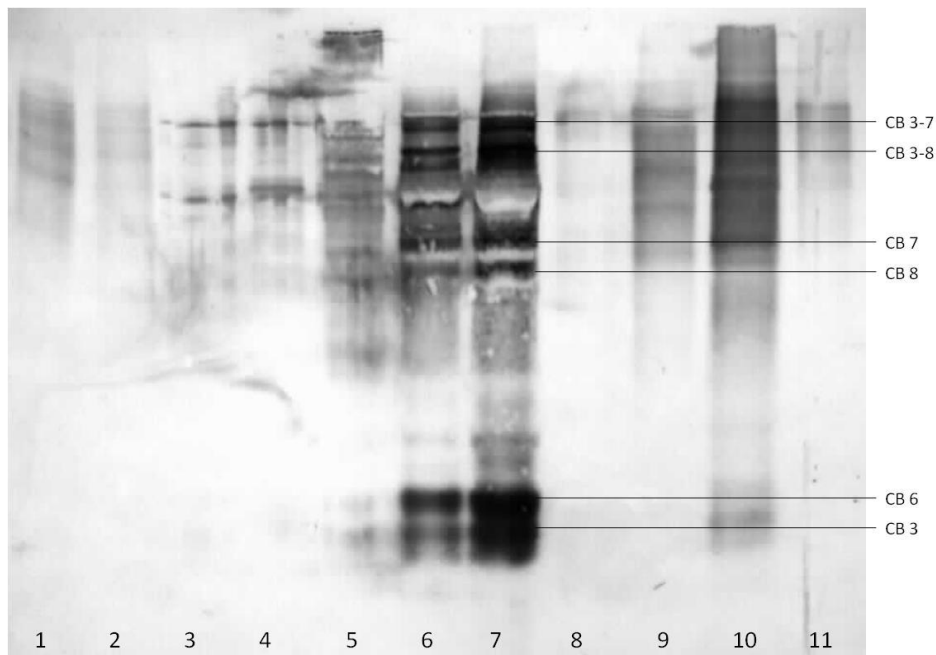


Abbildung 38: Darstellung der mit dem Primärantikörper Anti-Kollagentyp I behandelten Bromcyanpeptide

(Spur 1: Kollagentyp III-Standard; Spur 2: Kollagentyp V-Standard; Spur 3 und 4: Auftragspuffer; Spur 5: Kollagenlösung; Spur 6 und 7: Rinder-SLK; Spur 8: Auftragspuffer; Spur 9: Kollagenlösung; Spur 10: saurer Extrakt aus Rinderhaut, reduziert; Spur 11: Fisch-SLK) (12 % Gel)

Die leichten Färbungen der Spuren mit Auftragspuffer zeigten, dass auch die anderen Proben mit angedeuteten Banden, wie z.B. Kollagentyp III und V-Standard, nicht beachtet werden mussten. Die zusätzlichen Färbungen konnten auf eine unsaubere Versuchsdurchführung zurückgeführt werden, da kleine Luftblasen zwischen Membran und Gel vorhanden waren. Ausschließlich beim Rinder-SLK und dem sauren Extrakt konnten die Bromcyanpeptide des Typ I-Kollagens festgestellt werden. Die charakteristischen Bromcyanpeptide der  $\alpha_1$ -Bande des Typ I-Kollagens CB 3-7, CB 3-8, CB 7, CB 8, CB 6 und CB 3 konnten alle nachgewiesen werden (nach Bornstein und Sage, 1980). Dies bestätigte, dass der Primärantikörper nur an der  $\alpha_1$ -Bande des Kollagentyp I gebunden hat. Da der verwendete Primärantikörper nur mit Typ I-Kollagen von Mensch und Rind reagierte, konnten keine sichtbaren Banden beim Fisch-SLK erwartet werden. Wie bereits bei den elektrophoretischen Untersuchungen festgestellt wurde, erfolgte bei der Kollagenlösung keine Bromcyanspaltung. Der Grund dafür war vermutlich eine unbekannte Probenvorbehandlung vom Hersteller, wie z. B. die Verwendung von Konservierungsmitteln.

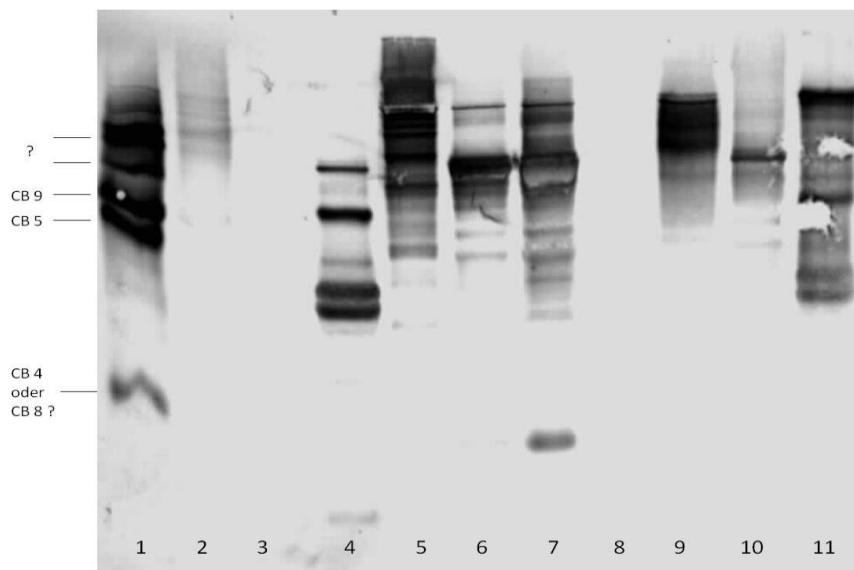


Abbildung 39: Darstellung der mit dem Primärantikörper Anti-Kollagentyp III behandelten Bromcyanpeptide

(Spur 1: Kollagentyp III-Standard; Spur 2: Kollagentyp V-Standard; Spur 3: Auftragspuffer; Spur 4: Fisch-SLK; Spur 5: Kollagenlösung; Spur 6 und 7: Rinder-SLK; Spur 8: Auftragspuffer; Spur 9: Kollagenlösung; Spur 10: saurer Extrakt aus Rinderhaut, reduziert; Spur 11: Fisch-SLK) (12 % Gel)



Die Bromcyanpeptide, die vom Primärantikörper Anti-Kollagentyp III gebunden wurden, sind in der Abbildung 39 dargestellt. Hierbei konnten die dargestellten Peptide den charakteristischen Bromcyanpeptiden nach *Bornstein und Sage* (1980) CB 9, CB 5 und CB 4 bzw. CB 8 zugeordnet werden. Die Banden oberhalb von CB 9 deuteten entweder auf eine unvollständige Bromcyanspaltung hin oder es erfolgte eine Querreaktion mit dem Kollagentyp I. Die charakteristische Bande, die beim Kollagentyp III-Standard dem CB 4 bzw. CB 8 entsprach, war sehr deutlich bei Rinder-SLK (Spur 7) dargestellt. Dies deutete auf das Vorhandensein von Typ III-Kollagen hin. Besonders auffällig war der Verlauf der Banden beim Fisch-SLK, da die charakteristischen Bromcyanpeptide des Typ III-Kollagens bei dieser Probe insgesamt weiter unten liefen. Dabei konnte vermutet werden, dass die Bromcyanpeptide des Fisch-SLK kleiner als die des Rinder-SLK waren. Der Kollagentyp V-Standard wurde nicht beachtet, da keine deutlichen Banden zu entdecken waren. Jedoch zeigte die leichte Färbung des Kollagentyps V die unspezifische Reaktion des Primärantikörpers mit der jeweiligen Probe. Dementsprechend sollte in Zukunft ein spezifischerer Primärantikörper verwendet werden. In diesem Zusammenhang sollten auch in einer zweiten Versuchsreihe die polyklonalen Antikörper durch monoklonale Antikörper ausgetauscht werden. Da die polyklonalen Antikörper ein sehr breites Reaktionsspektrum aufzeigten, konnten Kreuzreaktionen bzw. die Bindung des Antikörpers an verschiedenen Antigenen, die das gleiche oder ähnliche Epitope besaßen, nicht ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu sollte durch monoklonale Antikörper eine höhere Spezifität erreicht werden können (Ferencik et al., 2005). Schließlich konnte bei den Proben Fisch-SLK, Rinder-SLK, Kollagenlösung, saurer Extrakt aus Rinderhaut und vor allem Kollagentyp III-Standard das Typ III-Kollagen nachgewiesen werden. Da der Kollagentyp III-Standard etwas verzerrt dargestellt wurde, muss der Western Blot der Bromcyanpeptide wiederholt werden.

## 5 Zusammenfassung

Im Hinblick auf die medizinische Anwendung von kollagenen Geweben ist die Charakterisierung von verschiedenen Kollagentypen zum Beispiel für die Züchtung bestimmter Zellen unumgänglich.

Ziel dieser Arbeit war es daher verschiedene Kollagentypen in unterschiedlichen Gewebeproben mit Hilfe von elektrophoretischen sowie chromatographischen Methoden zu identifizieren und zu quantifizieren. Folglich sollte eine sehr empfindliche und zugleich spezifische sowie sparsame Methode zur Charakterisierung der verschiedenen Kollagentypen entwickelt werden.

Um verschiedene Hautproben mit Hilfe der unterschiedlichen Methoden untersuchen zu können, musste das Kollagen zuerst durch eine Extraktion aus dem Hautgewebe herausgelöst werden. Im Anschluss an die Extraktion wurde eine fraktionierte Salzfällung des gewonnenen Extraktes durchgeführt um die einzelnen Kollagentypen voneinander zu trennen.

Mit Hilfe der Elektrophorese wurden die jeweiligen Proben in  $\gamma$ -Trimere,  $\beta$ -Dimere und  $\alpha$ -Monomere aufgetrennt. Für die Identifikation der verschiedenen Kollagentypen waren ausschließlich die  $\alpha$ -Banden von Bedeutung. Hierbei zeigte sich, dass der in der Arbeit verwendete Kollagentyp III-Standard als Homotrimer nur aus  $\alpha_1$ -Ketten, der Kollagentyp I als Heterotrimer aus  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Ketten und der Kollagentyp V-Standard aus drei verschiedenen  $\alpha$ -Ketten aufgebaut sind. Durch die anschließende Spaltung mit Bromcyan konnte das Typ I-Kollagen bei allen Proben eindeutig nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Anteile von Typ III- und V-Kollagen in den Proben gestaltete sich die Identifikation dieser Typen über die Bromcyanpetide jedoch schwierig. Dennoch konnte der Kollagentyp III über eine densitometrische Auswertung des Polyacrylamidgels bestimmt werden. Zudem konnten auch die Ergebnisse nach Reduktion der Proben, die Spaltung der Disulfidbrücken, im Zusammenhang mit dem Vorhandensein des Typ III-Kollagens gesehen werden. Der Kollagentyp V konnte wahrscheinlich aufgrund seines geringen Gehaltes in den Hautproben nicht nachgewiesen werden.

Für den Vergleich der Ergebnisse aus der Doppel-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proben zusätzlich mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie und Ionenaustauschchromatographie analysiert. Hierbei wurden im Vergleich zu den elektrophoretischen Untersuchungen ähnliche Ergebnisse erzielt. Jedoch war diese

Methode für den Nachweis von Typ III-Kollagen weniger geeignet, da ausschließlich über die Veränderungen durch die Reduktion der Proben auf den Kollagentyp III geschlossen werden konnte. Da die Peaks der einzelnen Kollagentypen sehr breit und dicht beieinander eluierten, war eine eindeutige Bestimmung der Typen kaum möglich.

Weiterhin wurden alle  $\alpha$ -Banden aus dem sauren Extrakt fraktioniert und über Ionenaustauschchromatographie getrennt. Der Vergleich der  $\alpha$ -Banden der unterschiedlichen Kollagentypen zeigte eine deutlichere Abtrennung der einzelnen Peaks, durch die eine bessere Charakterisierung der verschiedenen Typen möglich war. Die Analyse der  $\alpha$ -Fraktion zeigte jedoch nur einen Peak entsprechend dem Typ III-Kollagen und keinen Peak entsprechend dem Typ I-Kollagen.

Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung wurde ein Western Blot durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode konnte das Typ I-Kollagen beim Rinder-SLK sowie dem sauren Extrakt und das Typ III-Kollagen beim Rinder-SLK, dem sauren Extrakt, Fisch-SLK und Kollagenlösung nachgewiesen werden.

Letztlich konnte innerhalb dieser Arbeit eine neue elektrophoretische Methode, bei der die Bromcyanspaltung am ersten Polyacrylamidgel vorgenommen wurde, etabliert werden. Mit Hilfe von diesem Verfahren konnte neben Typ I-Kollagen auch Typ III-Kollagen nachgewiesen werden. Jedoch war der Nachweis von Typ V-Kollagen nicht möglich.

## 6 Ausblick

Mit Hilfe der neu entwickelten Methode der Doppel-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sowie dem im Anschluss durchgeführten Western Blot können das Typ I- und III-Kollagen in den Hautproben nachgewiesen werden.

In Zukunft könnte die Analyse der Kollagentypen auch auf andere Gewebearten, wie z. B. Knorpel und Knochen ausgedehnt werden. Eine Quantifizierung der einzelnen Kollagentypen wäre zukünftig über eine densitometrische Analyse möglich. Jedoch sollte die Darstellung der Bromcyanpeptide von den Kollagentyp III- und V-Standards auf dem Polyacrylamidgel z. B. durch das Auftragen höherer Konzentrationen verbessert werden.

Zusätzlich sollte an der Weiterentwicklung einer immunhistochemischen Methode zur Analyse der verschiedenen Kollagentypen auch bei unlöslichen Proben gearbeitet werden.

Mit Hilfe des Western Blots können bereits gute Ergebnisse erzielt werden, jedoch ist eine weitere Verbesserung, z. B. durch eine höhere Spezifität der Primärantikörper möglich. Des Weiteren wäre eine Analyse der Hautproben mit dem Primärantikörper Anti-Kollagentyp V von großem Interesse.

## 7 Anlagen

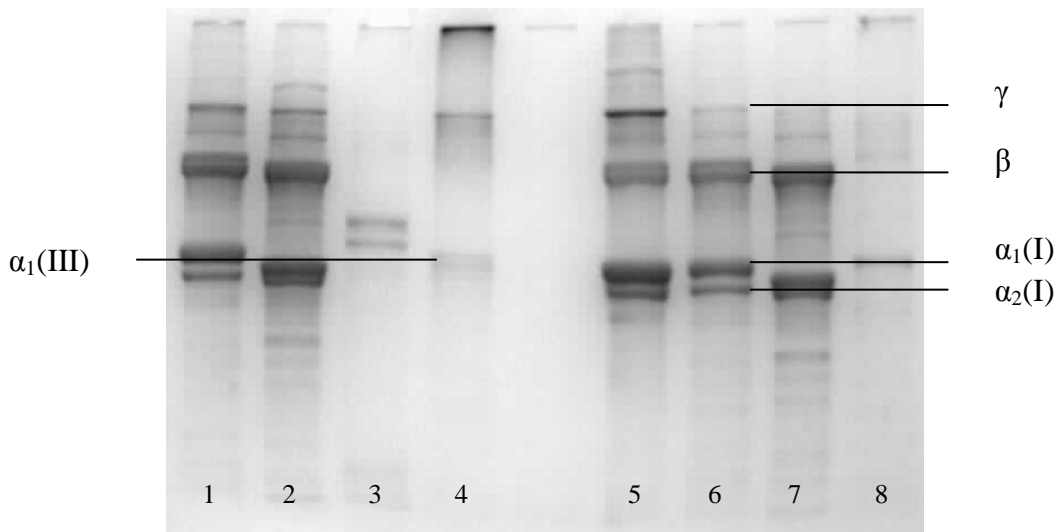


Abbildung 40: Vergleich von verschiedenen reduzierten und unreduzierten Kollagen-Proben und Standards (Spur 1: Rinder-SLK; Spur 2: Fisch-SLK; Spur 3: Typ V-Standard; Spur 4: Typ III-Standard; Spur 5: Kollagenlösung (Collaplex, 1%); Spur 6: reduziertes Rinder-SLK; Spur 7: reduziertes Fisch-SLK; Spur 8: reduzierter Typ III-Standard) (12 % Gel)

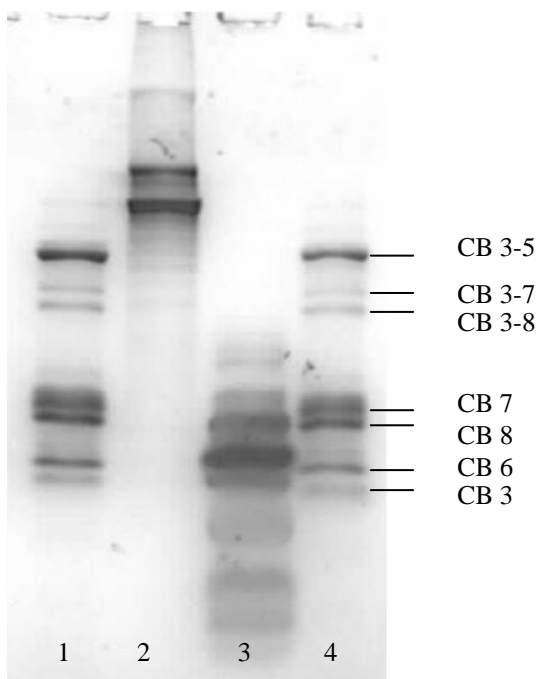


Abbildung 41: Darstellung der entsalzten Bromcyanpeptide von verschiedenen Proben (Spur 1: Rinder-SLK; Spur 2: Kollagenlösung (Collaplex, 1%); Spur 3: Fisch-SLK; Spur 4: Rinder-SLK) (12 % Gel)

## **Literaturverzeichnis**

**Abraham, Leah C.; Zuena, Erin; Perez-Ramirez, Bernardo; Kaplan, David L.:**

**Review:** Guide to Collagen Characterisation for Biomaterial Studies.

In: Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. - Wiley Periodicals – 87B(2008), S. 264-285

**Aidos, Isabel; Lie, Øyvind; Espe, Marit:** Collagen Content in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.).

In: Journal of Agriculture Food Chemistry. – Washington: American Chemical Society – 47(1999), S. 1440-1444

**Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter:** Molekularbiologie der Zelle. – 4. Auflage – Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2004

**Anesey, Joan; Scott, Paul G.; Veis, Arthur; Chyatte, Douglas:** The isolation of a soluble type III collagen precursor from rat skin.

In: Biochemical and biophysical Research Communications. - London: Academic Press – 62(1975)4, S. 946-952

**Ayad, Shirley; Boot-Handford, Ray; Humphries, Martin J.; Kadler, Karl E.;**

**Shuttleworth, Adrian:** The Extracellular Matrix Facts Book. – 2. Auflage – San Diego: Academic Press, 1998

**Baldock, Clair; Sherratt, Michael J.; Shuttleworth, C. Adrian; Kielty, Cay M.:** The supramolecular organization of collagen VI microfibrils.

In: Journal of Molecular Biology. - Elsevier Science - 330(2003)2, S. 297-307

**Belitz, Hans-Dieter; Grosch, Werner; Schieberle, Peter:** Lehrbuch der Lebensmittelchemie. – 6. Auflage – Berlin: Springer-Verlag, 2007

**Benninghoff, Alfred; Drenkhahn, Detlev:** Anatomie 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. – 17. Auflage - München: Urban & Fischer Verlag, 2008

**Brinckmann, Jürgen:** Collagens at a Glance (Topics in Current Chemistry). – Berlin: Springer-Verlag, 2005

**Bogduk, Nikolai:** Klinische Anatomie von Lendenwirbelsäule und Sakrum. – Berlin: Springer-Verlag, 2000

**Borel, J.P.; Randoux, A.:** Methodological Approach to the Primary Structure of Collagen. In: Front Matrix Biology. – Basel: Karger AG – 10(1985), S. 1-58

**Bornstein, Paul; Piez, Karl A.:** A biochemical study of human skin collagen and the relation between intra- and intermolecular cross-linking. In: Journal of Clinical Investigation. - Danvers: The American Society for Clinical Investigation - 43(1964)9, S. 1813-1823

**Bornstein, Paul; Piez, Karl A.:** The nature of the intramolecular cross-links in collagen. The separation and characterization of peptides from the cross-link region of rat skin collagen. In: Biochemistry. – Washington: American Chemical Society – 5(1966)11, S. 3460-3473

**Bornstein, Paul; Sage, Helene:** Structurally distinct collagen types. In: Annual Review of Biochemistry. – Washington: Annual Reviews – 49(1980), S. 957-1003

**Buddecke, Eckhart:** Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin. – Berlin: de Gruyter, 1981

**Byers, Peter H.; McKenney, Keith H.; Lichtenstein, Jack R.; Martin, George R.:** Preparation of type III procollagen and collagen from rat skin.  
In: Biochemistry - Washington: American Chemical Society - 13(1974), S. 5243-5248

**Cao, Hui; Xu, Shi-Ying:** Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage.  
In: Food Chemistry. - Elsevier Ltd. – 108(2008), S. 439-445

**Chandrakasan, Gowri; Torchia, Dennis A.; Piez, Karl A.:** Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution.  
In: The Journal of Biological Chemistry. - : The American Society for Biochemistry and Molecular Biology – 251(1976)19, S. 6062-6067

**Chung, Endy; Keele, Elizabeth M.; Miller, Edward J.:** Isolation and Characterization of the Cyanogen Bromide Peptides from the  $\alpha 1$ (III) Chain of Human Collagen.  
In: Biochemistry – Washington: American Chemical Society – 13(1974)17, S. 3459-3464

**Dublet, Bernard; van der Rest, Michel:** Type XIV collagen, a new homotrimeric molecule extracted from fetal bovine skin and tendon, with a triple helical disulfide-bonded domain homologous to type IX and type XII collagens.  
In: The Journal of Biological Chemistry. – Washington: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. – 266(1991), S. 6853-6858



**Epstein, Ervin H., Jr.; Munderloh, Neil H.:** Isolation and Characterization of CNBr Peptides of Human  $[\alpha 1(\text{III})]_3$  Collagen and Tissue Distribution of  $[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2$  and  $[\alpha 1(\text{III})]_3$  Collagens.

In: The Journal of Biological Chemistry. – Washington: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. – 250(1975)24, S. 9304-9312

**Ferencik, Miroslav; Rovensky, Jozef; Matha, Vladimir; Jensen-Jarolim, Erika:** Wörterbuch Allergologie und Immunologie: Fachbegriffe, Personen und klinische Daten von A-Z. – Wien: Springer-Verlag, 2005

**Fratzl, P.:** Collagen: Structure and Mechanics. – Berlin: Springer Science+Business Media, 2008

**Friess, Wolfgang:** Collagen – biomaterial for drug delivery.

In: European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – Elsevier Science B.V. – 45(1998), S. 113-136

**Geckeler, Kurt E.; Eckstein, E.:** Bioanalytische und biochemische Labormethoden. – Braunschweig: Vieweg, 1998

**Gelse, K.; Pöschl, E.; Aigner, T.:** Collagens-structure, function, and biosynthesis.

In: Advanced Drug Delivery Reviews. – Elsevier B.V. – 55(2003), S. 1531-1546

**Gerok, Wolfgang; Huber, Christoph; Meinertz, Thomas; Zeidler, Henning:** Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt. – 11., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage – Stuttgart: Schattauer, 2007

**Gey, Manfred H.:** Instrumentelle Bioanalytik. – Braunschweig: Vieweg, 1998

**Grassmann, W.; Engel, J.; Hannig, K.; Hörmann, H; Kühn, K.; Nordwig, A.:**

Collagen.

In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. – Berlin: Springer Verlag. – 13(1965),  
S. 195-314

**Gossauer, Albert:** Struktur und Reaktivität der Biomoleküle: eine Einführung in die organische Chemie. – Zürich: Helvetica Chimica Acta AG, 2006

**Häfner, K. A.; Pufahl, L.; Rödl, C.; Wisniewska, J.:** Biochemische Untersuchungsmethoden und klinische Chemie. – 122 S.

Frankfurt am Main, Goethe-Universität, Institut für Pharmazeutische Chemie, Praktikumsunterlagen, 2009

**Helm, Mark; Wöfl, Stefan:** Instrumentelle Bioanalytik. – Weinheim: Wiley-VCH, 2007

**Horton, H. Robert; Scrimgeour, K. Gray; Moran, Laurence A.; Biele, Carsten; Perry, Marc D.; Rawn, J. David:** Biochemie. – 4., aktualisierte Auflage - München: Pearson Studium, 2008

**Huttenlocher, Sonja:** Untersuchung altersbedingter Veränderungen von Kollagen XVII. – 2007 – 82 S.

Gießen, Justus-Liebig-Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, Inaugural-Dissertation, 2007

**Jackson, D. S.:** Connective tissue growth stimulated by carrageenin.

In: Biochemical Journal - London: Portland Press - 65(1956), S. 277-284

**Jimenez, Sergio A.; Bashey, Reza I.; Benditt, Milton; Yankowski, Ronald:**

Identification of Collagen  $\alpha 1(I)$  Trimer in Embryonic Chick Tendons and Calvaria.

In: Biochemical and Biophysical Research Communications. – San Diego: Academic Press – 78(1977)4, S. 1354-1361

**Kadler, Karl E.; Baldock, Clair; Bella, Jordi; Boot-Handford, Raymond P.:** Collagens at a glance.

In: Journal of Cell Science. – Manchester: The Company of Biologists – 120(2007), S. 1955-1958

**Kessler, Alexander; Rosen, Hyman; Levenson, Stanley M.:** Chromatographic fractionation of acetic acid solubilized rat tail tendon collagen.

In: The Journal of Biological Chemistry. - The American Society for Biochemistry and Molecular Biology – 235(1960)4, S. 989-994

**Kimura, Shigeru; Takema, Yoshinori; Kubota, Minoru:** Octopus skin collagen.

Isolation and characterization of collagen comprising two distinct  $\alpha$ -chains.

In: The Journal of Biological Chemistry. – The American Society for Biochemistry and Molecular Biology – 256(1981)24, S. 13230-13234

**Koolman, Jan; Röhm, Klaus-Heinrich:** Taschenatlas der Biochemie. – 3. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage - Stuttgart: Thieme, 2002

**Kucharz, E. J.:** The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology. – Berlin: Springer-Verlag, 1992

**Kühn, Klaus:** The Classical Collagens: Types I, II, and III. – New York: Academic Press, Inc., 1987

**Lillie, John H.; Wootton, Joyce A. M.; Maccallum, Donald K.; Mckelvey, Steven W.; Minor, Ronald R.:** Electrophoretic Isolation and Peptide Mapping of Collagen Types from Microsamples of Tissue.

In: Methods in Enzymology. – London: Academic Press, Inc. – 145(1987), S. 171-183

**Lindsay, Sandie:** Einführung in die HPLC. – Braunschweig: Vieweg, 1996

**Linnemann, Markus; Kühl, Michael:** Biochemie für Mediziner. – 7., neu bearbeitete und erweiterte Auflage – Berlin: Springer Verlag, 2004

**Lottspeich, Friedrich; Engels, Joachim W.:** Bioanalytik. – 2. Auflage – München: Spektrum Akademischer Verlag, 2006

**Lotz, Anne Stephanie:** Modulation des Einwachsverhaltens kortikal reinsertierter Sehnen und Ligamente durch Wachstumsfaktoren. – 2003 – 82 S.

Jena, Friedrich-Schiller-Universität, Medizinische Fakultät, Dissertation, 2003

**Matthijs, Omer; van Paridon-Edauw, Didi; Winkel, Dos:** Manuelle Therapie der peripheren Gelenke. - Bd. 1 – München: Urban & Fischer Verlag, 2003

**Mayne, Richard; Burgeson, Robert E.:** Structure and Function of Collagen Types. – New York: Academic Press, Inc., 1987

**Meyer, Michael:** Thermisch-mechanischer Aufschluß von Rindshautkollagen. – 2002 – 111 S.

Dresden, Technische Universität, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Dissertation, 2002

**Michov, Budin:** Elektrophorese: Theorie und Praxis. – Berlin: de Gruyter, 1995

**Miller, Edward Joseph:** Biochemical characteristics and biological significance of the genetically-distinct collagens.

In: Molecular & Cellular Biochemistry. – Den Haag: Dr. W. Junk b.v. Publishers – 13(1976)3, S. 165-192

**Miller, Edward Joseph:** Isolation and Characterization of Collagen from Chick Cartilage Containing Three Identical  $\alpha$  Chains.

In: Biochemistry. – Washington: American Chemical Society – 10(1971)9, S. 1652-1659

**Miller, Edward Joseph; Finch, J. Edward, Jr.; Chung, Endy; Butler, William T.; Robertson, Paul B.:** Specific cleavage of the native Type III collagen molecule with trypsin: Similarity of the cleavage products to collagenase-produced fragments and primary structure at the cleavage-site.

In: Archives of Biochemistry and Biophysics. – Elsevier – 173(1976)2, S. 631-637

**Minuth, Will W.; Strehl, Raimund; Schumacher, Karl:** Zukunftstechnologie Tissue Engineering. Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. – Weinheim: Wiley-VCH, 2003

**Moll, Karl Josef; Moll, Michaela:** Anatomie. – 18. Auflage – München: Urban & Fischer Verlag, 2005

**Moro, Luigi; Smith, Barbara D.:** Identification of Collagen  $\alpha 1(I)$  Trimer and Normal Type I Collagen in a Polyoma Virus-Induced Mouse Tumor.

In: Archives of Biochemistry and Biophysics. – San Diego: Academic Press – 182(1977), S. 33-41

**Myers, Jeanne C.; Li, Deqin; Amenta, Peter S.; Clark, Charles C.; Nagaswami, Chandrasekaran; Weisel, John W.:** Type XIX collagen purified from human umbilical cord is characterized by multiple sharp kinks delineating collagenous subdomains and by intermolecular aggregates via globular, disulfide-linked, and heparin-binding amino termini.

In: The Journal of Biological Chemistry. – Washington: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. – 278(2003)34, S. 32047-32057

**Nimni, Marcel E.:** Collagen: Its Structure and Function in Normal and Pathological Connective Tissues.

In: Seminars in Arthritis and Rheumatism. – New York: Grune & Stratton, Inc. – 4(1974)2, S. 95-127

**Nokelainen, Minna:** Recombinant human collagens. Characterization of type II collagen expressed in insect cells and production of types I-III collagen in the yeast *Pichia pastoris*. – 2000. – S. 72

Oulu, Universität, Department of Medical Biochemistry, Dissertation, 2000

**Peri, Thomas** <perit@notredameprep.com>: Peri Home Page. URL:<

<http://www.ndpteachers.org/perit/Pepsin%20&%20Trypsin.jpg>>, verfügbar am 11.06.2009

**Piez, Karl A.; Eigner, Elizabeth A.; Lewis, Marc S.:** The Chromatographic Separation and Amino Acid Composition of the Subunits of Several Collagens.

In: Biochemistry. – Washington: American Chemical Society - 2(1963), S. 58-66

**Pingoud, Alfred; Urbanke, Claus:** Arbeitsmethoden der Biochemie. – Berlin: de Gruyter, 1997

**Prockop, Darwin J.; Kivirikko, Kari I.:** Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy.

In: Annual Review of Biochemistry. – Annual Reviews Inc. – 64(1995), S. 403-434

**Rehm, Hubert:** Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. – 3., überarbeitete Auflage – Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2000

**Reich, Günther:** Kollagen: Eine Einführung in Methoden, Ergebnisse und Probleme der Kollagenforschung. – Dresden: Theodor Steinkopff Verlag, 1966

**Reich, Günter:** Vom Kollagen zum Leder. – Freiberg: Medienzentrum der TU Bergakademie Freiberg, 2003

**Ricard-Blum, Sylvie; Ruggiero, Florence; van der Rest, Michel:** The Collagen Superfamily (Topics in Current Chemistry). – Berlin: Springer-Verlag, 2005

**Richter, Gerhard:** Praktische Biochemie. – Stuttgart: Thieme, 2003

**Robins, Simon P.:** Functional properties of collagen and elastin.

In: Baillière's Clinical Rheumatology. – Elsevier Science – 2(1988)1, S. 1-36

**Rosen, Hyman; Kessler, Alexander; Levenson, Stanley M.:** Metabolic inhomogeneity of rat tail tendon collagen: the distribution of  $^{14}\text{C}$  in the chromatographic components.

In: Archives of Biochemistry and Biophysics. - London: Academic Press - 90(1960)2, S. 197-169

**Salter, D. M.:** The tissues we deal with: (II) Cartilage.

In: Current Orthopaedics. – Harcourt Brace & Co. Ltd – 12(1998)4, S. 251-257

**Schäfer, J.:** Biochemisches Praktikum für Fortgeschrittene. – 2007. – 136 S.

Mainz, Universität, Institut für Biochemie, Praktikumsanleitung, 2007

**Schroeder, W. A.; Honnen, Lewis; Green, F. Charlotte:** Chromatographic separation and identification of some peptides in partial hydrolysates of gelatin.

In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – Washington: National Academy of Sciences – 39(1953), S. 23-30

**Schulze, Jörg:** Kollagen XXII – Charakterisierung eines neuen Markers an Gewebegrenzen. – 2005. – 123 S.

Köln, Universität, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Inaugural-Dissertation, 2006

**Schwaller, B.:** Das Bindegewebe.

URL:<<http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/bindegewebe/sfa/images/kollagen.gif>>, verfügbar am 16.06.2009

**Srinivas, G. R.; Barrach, H. J.; Chichester, C. O.:** Quantitative immunoassays for type II collagen and its cyanogen bromide peptides.

In: Journal of Immunological Methods. – Elsevier Science Publishers B.V. – 159(1993), S. 53-62

**Stather, Fritz:** Gerbereichemie und Gerbereitechnologie. – Berlin: Akademie-Verlag, 1957

**Struck, H.; Pillukat, Th.:** Kollagen-Antikörper und ihr Einfluß auf die Wundheilung.

In: Langenbecks Archiv für Chirurgie. - Berlin: Springer-Verlag – 374(1989), S. 12-19



**Tanaka, Shizuko; Hata, Ryu-Ichiro; Nagai, Yutaka:** Two-dimensional Electrophoresis Patterns of the CNBr Peptides of Collagen Types I, II, III and V.

In: Collagen Rel. Res. – 5(1981), S. 445-452

**Töpel, Alfred:** Chemie und Physik der Milch: Naturstoff – Rohstoff – Lebensmittel. – 3., überarbeitete Auflage – Hamburg: Behr's Verlag, 2004

**Towbin, J.; Staehlin, T.; Gordon, J.:** Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications.

In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – National Academy of Sciences – 76(1979), S. 4350-4354

**Tuan, Rocky S.; Lynch, Marion H.:** Effect of Experimentally Induced Calcium Deficiency on the Developmental Expression of Collagen Types in Chick Embryonic Skeleton.

In: Developmental Biology. – Academic Press, Inc. – 100(1983), S. 374-386

**van den Berg, Franz; Cabri, Jan:** Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen. - 2., korrigierte Auflage – Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003

**van der Rest, Michel; Garrone, Robert:** Collagen family of proteins.

In: The FASEB Journal. – The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology – 5(1991), S. 2814-2823

**van der Rest, Michel; Garonne, Robert; Herbage, Daniel:** Collagen: a family of proteins with many facets.

In: Advances in Molecular and Cell Biology. – JAI Press Inc. – 6(1993), S. 1-52

**Westermeier, Reiner:** Elektrophorese-Praktikum. – Weinheim: VCH, 1990

**Wu, Jiann-Jiu; Woods, Patricia E.; Eyre, David R.:** Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding.

In: The Journal of Biological Chemistry. – Washington: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. – 267(1992)32, S. 23007-23014

**Xiong, Xin:** New Insights into Structure and Function of Type I Collagen. -2008, -S. 100  
Stuttgart, Universität, Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik, Dissertation, 2008

## **Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Freiberg, den 18.09.2009

Caroline Vogler