

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln
(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h. c. E. KLENK)
und dem Pathologischen Institut der Universität Köln
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. H. HEINLEIN)

Biochemische und histochemische Untersuchungen am Amyloid*

Von

PAUL SCHMITZ-MOORMANN

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 22. November 1960)

Für den histologischen Nachweis des Amyloids stehen relativ spezifische Färbemethoden, wie die Metachromasie mit Methylviolett und die Kongorotfärbung, zur Verfügung, jedoch ist nur wenig über den Mechanismus dieser Färbungen und über die chemische Bindung dieser Farbstoffe am Amyloid bekannt.

Während man ursprünglich annahm (KRAWKOW), daß Chondroitinschwefelsäure der Träger der Metachromasie mit Methylviolett sei, konnte bald gezeigt werden, daß beim Amyloid nur im erhaltenen Parenchym die Schwefelsäure vermehrt ist (HEINLEIN 1930), während das Amyloid selbst keine Schwefelsäure enthält (HANSEN 1908). LEUPOLD (1918, 1926) fand, daß nur bei Behandlung mit Laugen, nicht aber mit Säuren die Methylviolettmetachromasie verschwindet. Auf Grund seiner Befunde kam er zu dem Schluß, daß die Methylviolettmetachromasie des Amyloids am Eiweiß gebunden ist und, in Übereinstimmung mit SCHMIEDEBERG (1891, 1920), daß das Amyloid ein hochmolekulares Eiweiß von Globulincharakter ist. Auch LETTERER (1958, 1959) hält das Amyloid für ein globulinartiges Eiweiß. Er ordnet die Metachromasie mit Methylviolett der Grundsubstanz zu, der sich das Amyloid angelagert habe. Jedoch sieht auch er keinen Zusammenhang zwischen Färbung und chemischer Natur. „Die als typisch bekannten Farbreaktionen des Amyloids lassen keinen Schluß auf seine chemische Natur oder auch nur das Vorhandensein bestimmter chemischer Gruppen zu.“ Demgegenüber stehen die Befunde von BANK und BUNGENBERG DE JONG (1939), die feststellten, daß die Metachromasie basischer Farbstoffe an das Vorhandensein saurer Gruppen gebunden ist, wobei die Stärke der Metachromasie der Ladungsdichte des Kolloids parallel geht. Auch die positive Farbreaktion des Amyloids mit Alcianblau (LETTERER 1958) weist auf das Vorhandensein eines sauren Polysaccharids hin. Schließlich konnte HASS schon 1942 aus Amyloid ein uronsäurehaltiges Polysaccharid gewinnen.

Von KLENK und FAILLARD wurde 1955 festgestellt, daß das Amyloid Neuraminsäure (NS) enthält. Von diesen Ergebnissen ausgehend, wurden Versuche unternommen, die neuraminsäurehaltige Substanz anzureichern; dabei fand sich in der kalten Phenolextraktion nach WESTPHAL u. Mitarb. (1952) eine Methode, aus dem Amyloid eine einheitliche neuraminsäurehaltige Fraktion darzustellen. Im ersten Teil dieser Arbeit wird diese Fraktion näher untersucht. Im zweiten Teil soll dann der Einfluß der gleichen Reagentien, die zur Extraktion der neuraminsäurehaltigen Fraktion benutzt wurden, auf die Färbbarkeit von Amyloid in histologischen Präparaten untersucht werden.

* Diese Untersuchung wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Biochemischer Teil

Methodik

Als Ausgangsmaterial standen Teile einer menschlichen Amyloidleber zur Verfügung, bei der, nach dem histologischen Befund, das normale Leberparenchym fast vollständig durch Amyloid ersetzt war.

Darstellung des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids. Das Gewebe wurde zerkleinert, nach Einfrieren getrocknet und pulverisiert. Das Pulver wurde im Soxhlet bis zur Erschöpfung mit Aceton extrahiert und getrocknet (Fraktion I). Das mit Aceton extrahierte getrocknete Pulver wurde mit Harnstoff in Anlehnung an die Methode von HEIMER und MEYER (1956) aufgeschlossen.

100 g Gewebepulver wurden in 1300 ml einer 6 n-wäßrigen Harnstofflösung aufgeschwemmt, die mit 1 n NaOH auf pH 9,0 eingestellt wurde. Die Suspension blieb 3 Tage bei + 4° stehen, wobei sie täglich mehrmals umgerührt und mit 1 n NaOH wieder auf pH 9,0 eingestellt wurde. Anschließend Zentrifugation. Überstand (Fraktion IIa) und Rückstand (Fraktion IIb) wurden getrennt gegen Leitungswasser und destilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert.

Ausbeute. Überstand: 68,3 g mit 1,1% Neuraminsäure (Fraktion IIa). Rückstand: 29,8 g mit 0,3% Neuraminsäure (Fraktion IIb).

Der Überstand wurde nach WESTPHAL mit kaltem Phenol extrahiert.

10 g des lyophilisierten Überstandes wurden in 160 ml destillierten Wassers suspendiert und auf + 20° C gekühlt. Hierzu wurden unter kräftigem Umschwenken 265 ml einer auf + 4° C gekühlten, 75%igen Phenol-Wassermischung hinzugefügt. Die Emulsion wurde kräftig geschüttelt und für eine halbe Stunde bei + 4° C belassen. Nach Zentrifugation wurde die wäßrige Phase abgehebert. Die phenolische Phase wurde mit 50 ml destillierten Wassers versetzt, geschüttelt und nochmals für eine halbe Stunde bei 4° C belassen. Nach Zentrifugation wurde wiederum die wäßrige Phase abgehebert und mit der ersten vereinigt. Sie wurden dann gegen Leitungswasser und destilliertes Wasser dialysiert, elektrodialysiert, filtriert und nach Einfrieren getrocknet (Fraktion IIIa). Die phenolische Phase wurde in die 6fache Menge kalten Äthanol eingegossen und über Nacht bei + 4° C belassen. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen und dialysiert. Dabei ging ein Teil in Lösung. Nach Zentrifugation wurden Überstand (Fraktion IIIb) und Niederschlag (Fraktion IIIc) getrennt nach Einfrieren getrocknet. Das Phenol-Alkoholgemisch wurde gegen Fließwasser und destilliertes Wasser dialysiert und getrocknet (Fraktion IIId).

Ausbeute. Fraktion IIIa: 0,58 g mit 3,7% Neuraminsäure (Rohmucoprotein); Fraktion IIIb: 1,19 g mit 1,2% Neuraminsäure; Fraktion IIIc: 3,8 g mit 0,8% Neuraminsäure; Fraktion IIId: 3,9 g ohne nachweisbare Neuraminsäure.

Das Rohmucoprotein der wäßrigen Phase wurde durch fraktionierte Alkoholfällung weiter gereinigt.

Das Rohmucoprotein wurde in 20 ml destillierten Wassers gelöst. Unter Umrühren wurden langsam 13,3 ml abs. Äthanol zugegeben, so daß 40%iges Äthanol erhalten wurde. Über Nacht bei + 4° C stehengelassen. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen und getrocknet (Fraktion IVa). Der Überstand wurde mit 6,7 ml abs. Äthanol versetzt, so daß 50%iges Äthanol erhalten wurde. Wieder über Nacht bei 4° C belassen, Niederschlag abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen und nach Einfrieren getrocknet (Fraktion IVb). Zum Überstand wurden 60 ml abs. Äthanol gegeben, so daß 80%iges Äthanol erhalten wurde. Über Nacht bei 4° C stehengelassen. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen und getrocknet (Fraktion IVc). Überstand im Vakuum zur Trockne eingeengt, in wenig Wasser aufgenommen und getrocknet (Fraktion IVd).

Ausbeute. Fraktion IVa: 0,170 g mit 1,5% Neuraminsäure; Fraktion IVb: 0,141 g mit 2,2% Neuraminsäure; Fraktion IVc: 0,210 g mit 5,3% Neuraminsäure; Fraktion IVd: 0,003 g ohne nachweisbare Neuraminsäure.

Durch engere Fraktionierung oder durch wiederholte Fällungen konnte keine höhere Anreicherung der Neuraminsäure erreicht werden.

Aus amyloidfreien, normalen menschlichen Lebern konnte mit der gleichen Methode keine neuraminsäurehaltige Substanz gewonnen werden.

Papierelektrophoretische Untersuchung. Die Elektrophorese wurde im Grassmann-Elektrophoresegerät durchgeführt. Als Puffer wurde der Michaelis-Puffer in der Modifikation von WIEDEMANN verwandt. Papier Schleicher & Schüll 2043 b. pH 6,1. Laufzeit 16 Std bei 220 V und 4 mA, Auftragsmenge 5—10 mg, in Puffer gelöst. Trocknen der Streifen bei 105° C. Anfärben der Streifen mit Ninhydrin, Bials Reagens, Amidoschwarz und Perjodat-Benzidin nach VISCONTINI (1955) zum Nachweis von Polyalkoholen mit vicinalen Hydroxylgruppen.

Papierchromatographische Bestimmung der Zucker. 20 mg der zu untersuchenden Substanz wurde in einem Reagensglas in 5 ml 5%iger Salzsäure gelöst und eingeschmolzen. Hydrolyse 4 Std bei 105° C. Nach Abschluß der Spaltung Fällung der Cl-Ionen mit Blei- und Silberacetat. Aus dem Filtrat wurden die Schwermetallionen mit Schwefelwasserstoff entfernt. Das Filtrat wurde im Vakuum bei 40° zur Trockne eingedampft und in wenig 0,6 n Ameisensäure aufgenommen. Eine Säule 2×25 cm wurde mit dem Kationenaustauscher Dowex 50×8,50 mesh in der H-Form gefüllt und mit 0,6 n Ameisensäure durchspült. Das angesäuerte Hydrolysat wurde auf die Säule gegeben und die Säule mit 250 ml 0,6 n Ameisensäure entwickelt. Das Eluat wurde gesammelt (1. Fraktion). Die Säule wurde dann mit 500—1000 ml Wasser neutral gewaschen. Bei den ersten Ansätzen wurde auch diese Fraktion gesammelt und papierchromatographisch untersucht. Da sich aber weder Zucker noch Aminosäuren nachweisen ließen, wurde sie bei weiteren Ansätzen verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 250 ml 5%igen Ammoniaks entwickelt. Das Eluat wurde wiederum gesammelt (2. Fraktion). Beide Fraktionen wurden getrennt im Rotationsverdampfer (Wasserstrahlvakuum, 40° C) eingedampft, in wenig Wasser aufgenommen und papierchromatographisch untersucht.

Als Papier wurde Schleicher & Schüll 2043 b verwandt, als mobile Phase Pyridin:Essigester:Wasser = 7:10:4 (v/v). Die zu untersuchenden Substanzen wurden neben Testzucker gemischen aufgetragen und das Chromatogramm 18 Std bei 20° C aufsteigend entwickelt. Anschließend wurden die Chromatogramme bei 80° C getrocknet und mit dem Reagens nach VISCONTINI (1955) bzw. Ninhydrinlösung eingesprüht. Die Zucker stellten sich als weiße Flecken auf blauem Hintergrund dar. Die Aminosäuren und Hexosamin ergaben nach Ninhydrinbehandlung blaurote Flecken.

Papierchromatographische Bestimmung der Aminosäuren. 5 mg der Substanz wurden in einem Reagensglas in 5 ml 20%iger HCl gelöst, eingeschmolzen und 24 Std bei 105° C gespalten. Nach Abschluß der Spaltung wurden die ausgefallenen Huminsubstanzen abfiltriert und 3mal mit Wasser gewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer (Wasserstrahlvakuum, 40° C) zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit wenig Wasser in ein Reagensglas überführt und getrocknet, die trockne Substanz in 0,1 ml Wasser gelöst. Auftragsmenge: 10—20 mm³.

Das Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll 2043 b) wurde in Viertelbogen zerlegt. Der Auftragungspunkt lag 5 cm von beiden Kanten entfernt. Das Chromatogramm wurde zweidimensional entwickelt. Als erster Entwickler wurde sekundäres Butanol:Ameisensäure:Wasser = 75:13:12 (v/v) verwandt. Ein Papierstreifen, auf den Glutaminsäure aufgetragen war, wurde mitentwickelt. Nach dem Trocknen wurden das Chromatogramm und der Teststreifen nochmals in der gleichen Richtung entwickelt. Nach diesem zweiten Lauf wurde der Teststreifen mit Ninhydrin angefärbt, die Laufstrecke der Glutaminsäure auf das Chromatogramm übertragen und das Chromatogramm oberhalb der Glutaminsäure durchtrennt. Die untere Hälfte wurde 2mal in 80%igem Phenol entwickelt, die obere Hälfte 2mal in folgendem Gemisch: Methyläthylketon:Pyridin:Wasser = 70:15:15 (v/v).

Nach dem Trocknen wurden beide Chromatogrammhälften mit Ninhydrin angefärbt.

Quantitative Bestimmung der Glucuronsäure. Die Bestimmung erfolgte nach KELCH und HEYNS. Als Test wurde jedoch nicht reine Glucuronsäure verwandt, sondern ein Gemisch von Glucuronsäure, Hexosamin und Casein, das in seinem Eiweiß- und Hexosamingehalt dem untersuchten Mucoprotein entsprach. Einzelheiten der Methode: HOPPE-SEYLER und THIERFELDER: Handbuch der physiologischen und pathologischen Analyse, 10. Aufl., Bd. III/1, S. 869.

Darstellung der N-Acetyl-Neuraminsäure aus Amyloidleber. Die Darstellung der Neuraminsäure erfolgte nach KLENK und FAILLARD (1957).

10 g der pulverisierten und acetonextrahierten Amyloidleber wurden in der 5fachen Menge 0,03 n Schwefelsäure aufgeschwemmt und unter starkem Rühren 1 Std auf 75–80° C erwärmt. Anschließend wurde zur Neutralisierung eine der Schwefelsäure entsprechende Menge an Bariumacetat, in wenig Wasser gelöst, zugegeben, der unlösliche Anteil abzentrifugiert und 2mal mit Wasser gewaschen. Überstand und Waschwasser wurden vereinigt und unter häufigem Wechsel des Außendialysates so lange gegen Wasser dialysiert, bis sich im Außendialysat keine Neuraminsäure mehr nachweisen ließ. Die vereinigten Außendialysate wurden im Rotationsverdampfer (Wasserstrahlvakuum, 40° C) eingengt und über eine Dowex 50×8-Säule (H-Form) gegeben, um sie von Kationen zu befreien. Aus dem Eluat wurde mit einer Anionenaustauschersäule (Lewatit MIH, Acetatform) mit 2 n Ameisensäure als Eluens die reine N-Acetyl-Neuraminsäure gewonnen.

Ausbeute. 68 mg, davon kristallisiert aus Eisessig-Wasser 48 mg.

Identifizierung der N-Acetyl-Neuraminsäure. Die Identifizierung geschah 1. durch Papierchromatographie nach SVENNERHOLM (1956). Das Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043 b wurde in Laufrichtung in 40 cm lange und 14,5 cm breite Streifen zerlegt. Aufgetragen wurden 100 γ der kristallisierten Substanz, in Wasser gelöst. Als Testsubstanz wurde N-Acetyl-Neuraminsäure verwandt. Entwicklung in n-Propanol:n-Butanol:0,1 n HCl = 2:1:1 (v/v). Durchlaufchromatogramm, 24 Std bei 20° C. Anfärbung mit BIALs-Reagens. 2. Durch Glykolybestimmung nach KLENK und UHLENBRUCK (1957). 3. Durch Infrarotspektrographie.

Hämagglutinationshemmtest. Dieser Test wurde nach KLENK, FAILLARD und LEMPRIED (1955) durchgeführt. 2 mg der zu untersuchenden Substanzen wurden in 1 ml phys. Kochsalzlösung gelöst. Ausgehend von 0,2 ml dieser Lösung wurde mit phys. Kochsalzlösung eine Verdünnungsreihe in der Zweierpotenz angelegt. Zu jedem Röhrchen wurden 0,2 ml Indicatorviruslösung, 4 Agglutinationsdosen enthaltend, sowie 0,2 ml einer 1%igen Aufschwemmung von Hühnererythrocyten gegeben. Als Kontrollen dienten ein Röhrchen ohne Indicatorvirus und ein Röhrchen ohne Indicatorvirus und Untersuchungssubstanz. Die Ablesung erfolgte nach 2 Std bei 4° C und nach 12 Std bei Zimmertemperatur.

Ergebnisse

Mit Hilfe der kalten Phenolextraktion nach WESTPHAL (1952) ließ sich aus einer menschlichen Amyloidleber eine zuckerhaltige Substanz gewinnen, die 3,7% Neuraminsäure enthielt (Fraktionen IIIa). Diese Substanz war aber, wie die papierelektrophoretische Untersuchung ergab, nicht einheitlich und wurde daher mit 40-, 50- und 80%igem Äthanol fraktioniert. Die mit 80%igem Äthanol gefällte Fraktion (Fraktion IVc) zeigte bei der papierelektrophoretischen Untersuchung eine breite Bande, die sich mit Ninhydrin, Bials Reagens, Amidoschwarz und Perjodat-Benzidin anfärbte. Daneben fand sich als Verunreinigung eine schmale Bande, die sich nur mit Ninhydrin und Perjodat-Benzidin anfärbte (Abb. 1). Diese Verunreinigung konnte weder durch engere Fraktionierung noch durch wiederholte Alkoholfällungen abgetrennt werden. Die Fraktion, die mit 50%igem Äthanol gefällt wurde (Fraktion IVb), enthielt neben einer schwachen Bande, die in ihrer Lage und Anfärbbarkeit der Hauptbande der Fraktion IVc entsprach, eine breite verwaschene Bande, die bis zur Startlinie reichte und sich mit Ninhydrin, Amidoschwarz und Perjodat-Benzidin, nicht dagegen mit BIALs Reagens anfärbte. Ein Teil der aufgetragenen Substanz war an der Startstelle liegengeblieben (Abb. 1). Bei der mit 40%igem Äthanol gefällten Fraktion (Fraktion IVa) blieb der Großteil der aufgetragenen Substanz an der Startlinie liegen, im übrigen entsprach sie in ihrem Verhalten der Fraktion IVb (Abb. 1). Bei der papierchromatographischen Zuckerbestimmung wurde in allen 3 Fraktionen der Alkoholfällung (Fraktion IVa—c) Galactose, Mannose, Galactosamin und Glucuronsäure gefunden. Als weiteres Spaltprodukt wurde N-Acetyl-Neuraminsäure

isoliert, die man papierchromatographisch und mit Hilfe der Infrarotspektrographie identifizierte. Ein Glykolyrest ließ sich in der Substanz nicht nachweisen.

Es werden also durch die kalte Phenolextraktion zwei zuckerhaltige Substanzen freigesetzt, von denen eine Neuraminsäure enthält. Durch die fraktionierte Alkoholfällung gelingt es, diese neuraminsäurehaltige Substanz weitgehend gereinigt darzustellen (Fraktion IVc). Die zweite nur Zucker enthaltende

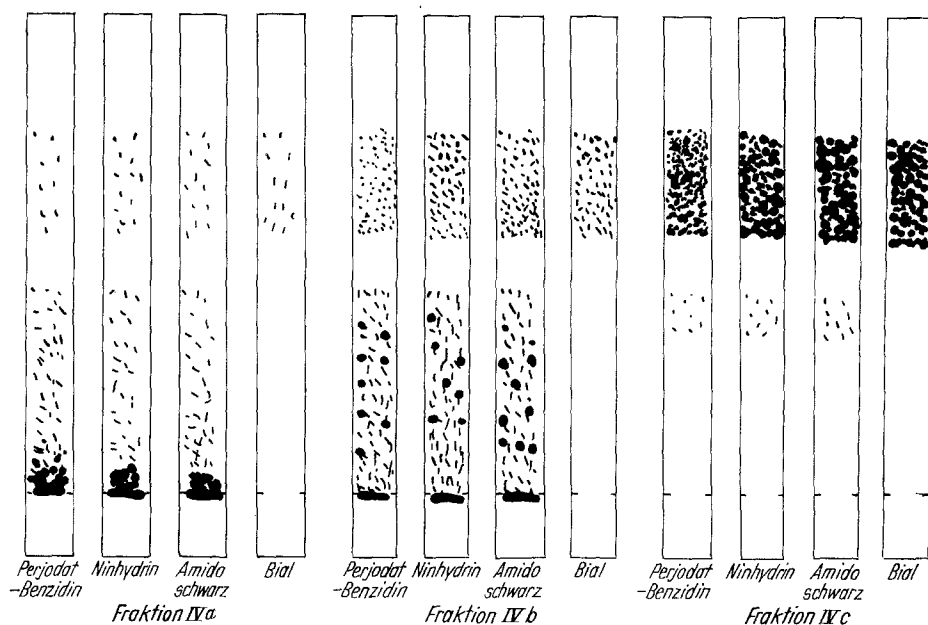


Abb. 1. Papierelektrophoretische Untersuchung der Fraktionen IVc, IVb und IVa. Fraktion IVa: Mit 40 %igem Alkohol gefällter Niederschlag aus dem Phenolextrakt der Fraktion IIa. Fraktion IVb: Mit 50 %igem Alkohol gefällter Niederschlag aus dem Überstand der Fraktion IVa. Fraktion IVc: Mit 80 %igem Alkohol gefällter Niederschlag aus dem Überstand der Fraktion IVb. Die Elektrophoresestreifen jeder Fraktion wurden angefärbt mit (von links nach rechts) Perjodat-Benzidin zum Nachweis von Kohlenhydraten. Ninhydrin zum Nachweis von Aminosäuren. Amidoschwarz zum Nachweis von Eiweiß. BIALs Reagens zum Nachweis von Neuraminsäure

neuraminsäurefreie Substanz findet sich in den Fraktionen IVa und IVb, zusammen mit einem Teil des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids. In Tabelle 1 sind die Analysendaten der Ausgangssubstanzen und der verschiedenen Fraktionen der Alkoholfällung zusammengestellt. Auch hier ergibt der Vergleich der molaren Zahlen, daß sich in den Fraktionen IVa und IVb außer dem neuraminsäurehaltigen Mucoprotein noch eine weitere zuckerhaltige Substanz befindet.

Das neuraminsäurehaltige Mucoprotein, das weitgehend gereinigt vorlag, wurde im weiteren näher untersucht.

Als Zucker bzw. Zuckerabkömmlinge fanden sich N-Acetylneuraminsäure, Galaktosamin, Glucuronsäure, Galaktose und Mannose. Der Glucuronsäuregehalt betrug 6,3%. Der Gehalt an Neutralzuckern ließ sich nicht direkt bestimmen. Jedoch konnte er aus dem Reduktionswert errechnet werden, da ja der Galaktosamin- und Glucuronsäuregehalt bekannt war. Danach ergaben

sich für die Zusammensetzung des säurehaltigen Mucoproteids die Werte der Tabelle 2.

Bei der qualitativen Bestimmung der Aminosäuren des säurehaltigen Mucoproteids fanden sich Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin,

Tabelle 1. *Analysendaten verschiedener Fraktionen der Amyloidleber*

	Fraktion				
	I	IIa	IVa	IVb	IVc
Neuraminsäure	0,8 1	1,1 1	1,5 1	2,2 1	5,3 1
Reduktionswert	4,0 7,7	5,4 7,7	11,0 11,3	15,5 10,9	23,0 6,8
Hexosamin	1,17 2,3	1,85 2,7	3,94 4,1	7,01 5,0	7,54 2,2
Stickstoff	12,20 345	12,71 233	6,95 92	10,08 92	9,5 36
Aschewert	—	—	unter 0,3%		

Die erste Zeile enthält jeweils die relativen Werte, ausgedrückt in Prozent, die zweite Zeile die molaren Werte, bezogen auf Sialinsäure = 1.

Fraktion I: Acetonextrahierte Amyloidleber. Fraktion IIa: Harnstoffextrakt aus Fraktion I. Fraktion IVa: Mit 40%igem Äthanol gefällter Niederschlag aus dem Phenolextrakt der Fraktion IIa. Fraktion IVb: Mit 50%igem Äthanol gefällter Niederschlag aus dem Überstand der Fraktion IVa. Fraktion IVc: Mit 80%igem Äthanol gefällter Niederschlag aus dem Überstand der Fraktion IVb.

Tabelle 2. *Zusammensetzung des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids*

N-Acetylneuraminsäure	5,8%
Galaktosamin	7,5%
Glucuronsäure	6,3%
Neutralsucker (Mannose und Galaktose)	8,2%
Aminosäurenstickstoff	8,9%

der Neuraminsäure auf die Anfärbarkeit zu klären, wurde diese mit stark verdünnter Salzsäure abgespalten und dann die Färbung durchgeführt. Schließlich wurde auch noch der Einfluß verschiedener Fermente auf die Anfärbarkeit der Amyloidsubstanz untersucht.

Methodik

Als Material standen Teile von alkoholfixierten, in Paraffin eingebetteten Amyloidnieren zur Verfügung.

Phenolbehandlung. Da sich 40–60%ige Phenol-Wassermischungen sehr rasch entmischen, konnte für die histochemischen Untersuchungen nicht die gleiche Phenol-Wassermischung (54%) wie für die biochemischen Untersuchungen verwandt werden. Es wurde daher bei 20° C mit Wasser gesättigtes Phenol (etwa 75% Phenol) und mit Phenol gesättigtes Wasser (etwa 6% Phenol) verwandt. Die Lösungen wurden auf + 4° C vorgekühlt. In diese

Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin und Valin.

Im Hämagglutinationshemmtest ergab sich eine Hemmung der Agglutination bis ins 7. Röhrchen, d. h. 1 mg des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids hemmt die Agglutinationskraft von 1280 Agglutinationsdosen des Grippevirus. Gegenüber Grippevirus wirkt das Mucoprotein also als Antikörper.

Histochemischer Teil

Um die Rolle des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids, das sich durch kalte Phenol-extraktion aus der Amyloidsubstanz gewinnen läßt, bei den verschiedenen Amyloidfärbungen zu untersuchen, wurden histologische Präparate von amyloidotisch veränderten Organen mit Phenol behandelt und dann den verschiedenen Färbungen zugeführt. Um speziell den Einfluß

Lösungen wurden die entparaffinierten Schnitte eingestellt und für eine halbe Stunde bei 4°C belassen. Anschließend wurden die Schnitte gründlich unter mehrmaligem Wechsel des Waschwassers gewaschen und dann gefärbt. Kontrollschnitte wurden für eine halbe Stunde in auf $+4^{\circ}\text{C}$ gekühltes Wasser eingestellt und dann zusammen mit den phenolbehandelten Schnitten gefärbt.

Abspaltung der Neuraminsäure. Die entparaffinierten Schnitte wurden in auf 75°C vorgewärmte 0,01, 0,03, 0,06 bzw. 0,1 n Salzsäure eingestellt und für eine Stunde bei dieser Temperatur belassen. Anschließend sorgfältiges Auswaschen der Salzsäure und Färbung. Kontrollschnitte wurden für eine Stunde in 75°C warmes Wasser eingestellt und dann zusammen mit den salzsäurebehandelten Schnitten gefärbt.

Behandlung mit Hyaluronidase. 25 mg Stierhodenhyaluronidase (Kinetin Schering 125 000 IE) wurden in 100 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 5,5 gelöst, die Lösung auf 37°C vorgewärmt und in diese Lösung die entparaffinierten Schnitte eingestellt und für 3 Std bei 37°C belassen. Anschließend sorgfältiges Waschen und Färben. Kontrollschnitte wurden 3 Std in 37°C warmen 0,2 m Acetatpuffer pH 5,5 eingestellt und zusammen mit den fermentbehandelten Schnitten gefärbt.

Behandlung mit Amylase. 1 g Amylase (Diastase Merck) wurde in 100 ml 0,2 m Acetatpuffer pH 6,0 gelöst. In die auf 37°C vorgewärmte Lösung wurden die entparaffinierten Schnitte eingestellt und für 3 Std bei 37°C belassen. Anschließend Waschen und Färben. Kontrollschnitte wurden in 37°C warmen 0,2 m Acetatpuffer pH 6,0 für 3 Std eingestellt und zusammen mit den fermentbehandelten Schnitten gefärbt.

Behandlung mit Papain. 1,0 g Papain (Merck) und 0,2 g Cysteinhydrochlorid wurden im Starmix mit 150 ml phys. Kochsalzlösung und 50 ml 3,6%igem $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ gemischt, der ungelöste Teil durch Zentrifugation entfernt. In die auf 37°C vorgewärmte Lösung wurden die entparaffinierten Schnitte eingestellt und für eine halbe Stunde bei 37°C belassen. Für die Kontrollschnitte wurde eine entsprechende papainfreie Lösung verwandt.

Färbungen. Astrablau nach PROCH (1957), Alcianblau-PAS nach DIEZEL (1957), PAS, Kresylviolett in Citratpuffer pH 2,8; 3,0; 3,2 ... bis 4,0 und Acetatpuffer pH 4,2 und 4,4; Methylviolett, Kongorot, Bialsche Reaktion auf Neuraminsäure nach DIEZEL (1951).

Darstellung des Stromas menschlicher Erythrocyten. Aus menschlichem Citratblut wurden durch Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes die Erythrocyten gewonnen, die dann durch mehrmaliges Waschen mit phys. Kochsalzlösung völlig vom Plasma befreit wurden. Die gewaschenen Erythrocyten wurden mit der 10fachen Menge etwa 0,01 n Essigsäure hämolyisiert und über Nacht bei $+4^{\circ}\text{C}$ belassen. Das ausgefallene Stroma wurde solange mit 0,01 n Essigsäure gewaschen, bis der Überstand farblos war. Das so dargestellte Stroma wurde gefriergetrocknet, im Soxhlet bis zur Erschöpfung mit Aceton extrahiert und getrocknet.

Ergebnisse

Sowohl in den nichtvorbehandelten wie in den Kontrollschnitten zeigte die Amyloidsubstanz bei allen Färbungen ein gleiches Verhalten: Astrablau negativ, Alcianblau positiv, PAS positiv, Metachromasie mit Methylviolett, Metachromasie mit Kresylviolett ab pH 3,2, Dichroitismus mit Kongorot, positive Bialreaktion (Tabelle 3). Bei den verschiedenen Fermentbehandlungen kam es nicht zu einer Änderung des färberischen Verhaltens der Amyloidsubstanz (Tabelle 3). Bei der Hydrolyse mit 0,01 n HCl trat mit Kresylviolett erst bei pH 3,4 eine Metachromasie auf, die Metachromasie mit Methylviolett war abgeschwächt, die Bialreaktion verlief negativ, im übrigen war das färberische Verhalten nicht verändert. Bei der Hydrolyse mit 0,03; 0,06 und 0,1 n HCl ergab sich mit Kresylviolett erst bei pH 4,0 eine Metachromasie. Die Metachromasie mit Methylviolett war nur bei starker Überfärbung schwach positiv, die PAS-Reaktion war unverändert positiv, die Färbungen mit Astrablau, Alcianblau, Kongorot und die Bialreaktion verliefen negativ. Sowohl die mit wassergesättigtem Phenol wie die mit

phenolgesättigtem Wasser behandelten Schnitte zeigten das gleiche färberische Verhalten wie die mit 0,03 bis 0,1 n HCl hydrolysierten Schnitte, bis auf den Unterschied, daß die Bialreaktion positiv verlief (Tabelle 3).

Träger der Metachromasie mit basischen Farbstoffen sind, wie BANK und BUNGENBER DE JONG (1939) zeigen konnten, an Koloide gebundene Anionen, wobei die Intensität der Metachromasie der Ladungsdichte entspricht. Der negative Ausfall bei der Färbung mit Astrablau spricht dafür, daß es sich beim Amyloid

Tabelle 3. *Das Verhalten der normalen und vorbehandelten Amyloidnierenschnitte bei den verschiedenen Färbungen*

Beim Kresylviolett wurde der pH-Wert angegeben, bei dem sich das Amyloid metachromatisch anfärbte.

Amyloidnierenschnitte	Astra- blau	Methyl- violett	Kresyl- violett	Kongo- rot	Alcian- blau	PAS	Bial
Normal	neg.	+++	3,2	pos.	pos.	pos.	pos.
Spaltung mit:							
0,01 n HCl	neg.	++	3,4	pos.	pos.	pos.	neg.
0,03 n HCl	neg.	(+)	4,0	neg.	neg.	pos.	neg.
0,06 n HCl	neg.	(+)	4,0	neg.	neg.	pos.	neg.
0,1 n HCl	neg.	(+)	4,0	neg.	neg.	pos.	neg.
Kontrolle	neg.	+++	3,2	pos.	pos.	pos.	pos.
Phenol 6%	neg.	(+)	4,0	neg.	neg.	pos.	pos.
Phenol 75%	neg.	(+)	4,0	neg.	neg.	pos.	pos.
Kontrolle	neg.	+++	3,2	pos.	pos.	pos.	pos.
Papain	neg.	+++	3,2	pos.	pos.	pos.	pos.
Papainkontrolle	neg.	+++	3,2	pos.	pos.	pos.	pos.
Hyaluronidase	neg.	+++	3,2	pos.	pos.	pos.	pos.
Hyal.-Kontrolle	neg.	+++	3,2	pos.	pos.	pos.	pos.
Amylase	neg.	+++	3,2	pos.	pos.	pos.	pos.
Amylasenkontrolle	neg.	+++	3,2	pos.	pos.	pos.	pos.

um eine organische Säure handelt. Der negative Ausfall der Färbungen mit Alcianblau, Kongorot und Methylviolett sowie die pH-Verschiebung der Anfärbbarkeit mit Kresylviolett nach Abspaltung der Neuraminsäure mit 0,03; 0,06 bzw. 0,1 n HCl zeigen, daß die Säure Träger der Fähigkeit zur Metachromasie ist. Dem entsprechen die Befunde bei der Phenolbehandlung der Amyloidsubstanz. Da durch die Phenolextraktion das neuraminsäurehaltige Mucoprotein freigesetzt wird, zeigen hier die verschiedenen Färbungen das gleiche Verhalten wie nach Abspaltung der Neuraminsäure allein. Nach der Phenolextraktion ist an den Amyloidschnitten die PAS-Reaktion noch positiv, demnach enthält die Amyloidsubstanz außer den durch Phenol abspaltbaren Mucoproteiden noch ein weiteres Polysaccharid, das nicht durch Phenol freigesetzt wird. Auffallend ist, daß die Bialreaktion nach der Phenolextraktion noch positiv ist; denn sowohl nach den Ergebnissen der biochemischen Untersuchungen wie nach dem Ausfall der übrigen Färbungen ist es unwahrscheinlich, daß in den Schnitten noch Neuraminsäure vorhanden ist. Die Bialreaktion wurde daher an einem anderen neuraminsäurehaltigen Material überprüft.

Als Untersuchungsmaterial diente mit Aceton extrahiertes Stroma menschlicher Erythrocyten mit einem Neuraminsäuregehalt von 1,1%. Das Stroma wurde über Chloroform in Paraffin eingebettet und wie üblich zu histologischen Schnitten verarbeitet. An diesen Präparaten wurde die Bialsche Reaktion durchgeführt, wobei Amyloidnierenschnitte zur Kontrolle mitgefärbt wurden. Während sich die Amyloidsubstanz stets anfärbte, verlief die Reaktion am

Stroma bei wiederholten Färbungen immer negativ. Um einen Verlust der Neuraminsäure durch die verschiedenen Passagen der Paraffineinbettung und Entparaffinierung auszuschließen, wurde Stroma durch diese Passagen hindurchgeführt und dann gefriergetrocknet. Eine Neuraminsäurebestimmung an diesem Material ergab jedoch den gleichen Wert wie bei der Ausgangssubstanz, nämlich 1,1%.

Da nach diesen Befunden die Bialsche Reaktion nicht als Nachweis für Neuraminsäure im histologischen Schnitt angesehen werden kann, muß die positive Reaktion im Amyloid durch andere Faktoren ausgelöst werden.

Diskussion

Nach ARVY und SORS (1959) besteht die Amyloidsubstanz aus mehreren Eiweiß- und Polysaccharidfraktionen. Unsere Untersuchung bestätigt, daß sich im Amyloid mehrere zuckerhaltige Substanzen befinden. Durch die Phenol-extraktion konnte ein neuraminsäurehaltiges Mucoprotein und eine neuraminsäurefreie, zuckerhaltige Substanz freigesetzt werden. Wie die histochemischen Untersuchungen ergaben, bleiben aber nach der Phenol-extraktion noch PAS-positive Substanzen im Amyloid gebunden. Nach diesen Befunden enthält das Amyloid also mindestens drei zuckerhaltige Fraktionen, von denen eine ein neuraminsäurehaltiges Mucoprotein ist. HASS (1942) konnte aus amyloidotisch veränderten Organen ein Polysaccharid isolieren, das Uronsäuren, Hexosamin und andere reduzierenden Substanzen enthielt. Dabei entsprach die Ausbeute dem Ausmaß der amyloidotischen Veränderung. Nach ARVY und SORS (1959) enthalten die Polysaccharide des Amyloids Glucose, Galaktose, Hexosamin und Uronsäure. Wir fanden in dem neuraminsäurehaltigen Mucoprotein Galaktose, Mannose, Galaktosamin und Glucuronsäure, aber keine Glucose. Die Neuraminsäure wurde im Amyloid erstmals von KLENK und FAILLARD (1955) nachgewiesen, sie liegt, wie wir zeigen konnten, in Form der N-Acetylneuraminsäure vor. Auch in der normalen Leber findet sich N-Acetylneuraminsäure (SVENNERHOLM 1957), jedoch enthält die von uns untersuchte Amyloidleber etwa die 10fache Menge an N-Acetylneuraminsäure. Auch läßt sich aus normalen menschlichen Lebern mit Hilfe der kalten Phenol-extraktion keine neuraminsäurehaltige Substanz isolieren. LARSEN (1958) konnte aus Amyloid durch fraktionierte Alkoholfällung 2 PAS-positive Substanzen isolieren, von denen eine sich mit Kresylviolett stark metachromatisch anfärbte. Eine chemische Untersuchung der beiden Fraktionen wurde nicht durchgeführt. Immerhin scheint die metachromatische Fraktion mit dem von uns isolierten neuraminsäurehaltigen Mucoprotein identisch zu sein, da ja, wie gezeigt werden konnte, die Neuraminsäure innerhalb des Kolloids Träger der metachromatischen Eigenschaften des Amyloids ist.

Daß sich neben diesen Polysacchariden im Amyloid noch ein hochmolekularer Eiweißkörper befindet, der Globulincharakter hat, konnte LETTERER (1958, 1959) zeigen. Jedoch muß betont werden, daß kein Anhalt dafür besteht, daß die im Amyloid nachweisbare Neuraminsäure aus dem Blute stammt. Zwar finden sich im Serum neuraminsäurehaltige Mucoproteide; jedoch enthalten alle diese Substanzen Fucose (SCHULTZE 1960), die wir bei unserer Substanz nicht finden konnten. Ferner macht der Hexuronsäuregehalt der Serum-mucoproteide nur 5—10% des Neuraminsäuregehaltes aus (SCHULTZE 1960), während bei dem von uns aus Amyloid isolierten Mucoprotein Hexuronsäure- und Neuraminsäuregehalt fast gleich sind.

Unsere histologischen Befunde bei Fermentbehandlung von amyloidotisch veränderten Organen entsprechen denen anderer Beobachter (PEARSE 1960, ARVY und SORS 1959, DIEZEL und PFLEIDERER 1959, WINDRUM und KRAMER 1957). Allerdings konnten wir im Unterschied zu DIEZEL am papainbehandelten Amyloid keine negative Bial-Reaktion feststellen. Da ja, wie unsere Untersuchung ergab, beim Amyloid die Neuraminsäure Träger der Fähigkeit zur Metachromasie ist, müßten dann auch die Färbungen mit Kresyl- und Methylviolett negativ ausfallen, was aber nicht der Fall ist. Auch halten wir die von DIEZEL entwickelte Methode zum Nachweis der Neuraminsäure im histologischen Schnitt nicht für spezifisch, da sich neuraminsäurehaltiges Stroma von menschlichen Erythrocyten nicht mit BIALS Reagens anfärben läßt.

Schließlich soll nach DIEZEL bei der Kongorotfärbung des Amyloids die Doppelbrechung am Eiweiß gebunden sein, da sie nach Benzoylierung verschwindet. Demgegenüber ergeben unsere Untersuchungen, daß diese Eigenschaft an den Kohlenhydratanteil gebunden ist, wobei die Neuraminsäure ein wesentlicher Träger dieser Eigenschaft ist; denn sowohl nach Abspaltung der Neuraminsäure mit verdünnter Salzsäure wie nach Extraktion des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids mit Phenol zeigte die Amyloidsubstanz mit Kongorot keine Anfärbung und keinen Dichroitismus mehr. LEUPOLD (1918) fand in seinen Untersuchungen, daß durch Säurebehandlung von Amyloid die Methylviolettreaktion nicht ausgelöscht werden kann. Das entspricht unseren Befunden, da auch wir nach Säurebehandlung noch eine Restmetachromasie feststellen können. Jedoch ergibt sich aus dem Vergleich mit den durchgeführten Kontrollen einwandfrei, daß die Intensität der Metachromasie stark nachgelassen hat. Besonders deutlich wird dies an der Färbung mit Kresylviolett bei abgestuften pH-Werten. Hier findet sich ein Rückgang der metachromatischen Anfärbbarkeit von pH 3,2 auf pH 4,0.

Zusammenfassung

Aus einer menschlichen Amyloidleber wurde durch Extraktion mit kaltem Phenol ein Mucoprotein isoliert, das 6,3% N-Acetylneuraminsäure, 7,5% Galaktosamin, 6,3% Glucuronsäure, 8,2% Hexosen (Mannose und Galaktose) und 8,9% Aminosäurenstickstoff enthielt. Als Aminosäuren ließen sich Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin und Valin nachweisen. Gegenüber dem Grippevirus verhielt sich das Mucoprotein als Antikörper.

Daneben wurde durch die Phenolextraktion eine zweite neuraminsäurefreie, zuckerhaltige Substanz freigesetzt, während ein drittes Polysaccharid nicht aus dem Amyloidkomplex abgespalten werden konnte.

Durch Hyaluronidase, Amylase und Papain wird die Amyloidsubstanz im histologischen Präparat nicht angegriffen.

Bei Freisetzung der Neuraminsäure im histologischen Präparat sowie bei Extraktion des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids mit kaltem Phenol verliert die Amyloidsubstanz die Fähigkeit zur Metachromasie mit Kresylviolett und Methylviolett und die zum Dichroitismus mit Kongorot. Das neuraminsäurehaltige Mucoprotein im Amyloid ist also Träger der Fähigkeit zur metachromatischen Färbbarkeit und zum Dichroitismus mit Kongorot.

Summary

A mucoprotein was isolated from a human liver with amyloid by extraction with cold phenol. The following chemical constituents were elicited: 6,3 % N-acetyl neuraminic acid, 7,5% galactosamine, 6,3% glucuronic acid, 8,2% hexoses (mannose and galactose) and 8,9% amino acid nitrogen. Amino acids present were alanine, arginine, asparagine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine and valine. The mucoprotein behaved as an antibody against the influenza virus.

In addition, a second substance containing sugar and free of neuraminic acid was isolated with the phenol extraction; a third polysaccharid could not be extracted from the amyloid complex.

The amyloid substance is not attacked in histological preparations by hyaluronidase, amylase or papain.

With the freeing of neuraminic acid in histological preparations as well as with the extraction of the mucoprotein containing neuraminic acid by cold phenol, the amyloid substance loses its possibility of metachromatic staining by cresyl-violet and methylviolet and its dichroism with congo red. The mucoprotein containing neuraminic acid is responsible for the ability to take the metachromatic stain and for the dichroism with congo red.

Literatur

- ARVY, L., et CH. SORS: Etude histochimique de la substance amyloide. *Acta histochem. (Jena)* **6**, 77 (1959).
- BANK, O., u. H. G. BUNGENBERG DE JONG: Mechanismen der Farbstoffaufnahme. I. Mitt. *Protoplasma* **32**, 489 (1939).
- DIEZEL, P. B.: Die Stoffwechselstörungen der Sphingolipide. Monogr. Ges.-Geb. Neurol. Psych. H. 80 (1957).
- u. A. PELEIDERER jr.: Histochemische und polarisationsoptische Untersuchungen am Amyloid. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 552 (1957).
- HANSSSEN, C.: Ein Beitrag zur Chemie der amyloiden Entartung. *Biochem. Z.* **13**, 108 (1908).
- HASS, G.: Studies of amyloid. *Arch. Path. (Chicago)* **34**, 92 (1942).
- HEIMER, R., and K. MEYER: Studies on sialic acid of submaxillary mucoid. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **42**, 728 (1956).
- HEINLEIN, H.: Der Sulfatschwefelgehalt amyloider Organe. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **149**, 119 (1930).
- HOPPE-SEYLER, u. THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Herausgeb. K. LANG u. E. LEHNARTZ, 10. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- KELCH, C., u. K. HEYNS: Zit. nach HOPPE-SEYLER und THIERFELDER.
- KLENK, E., u. H. FAILLARD: Über das Vorkommen von Neuraminsäure in Lebereiweiß bei amyloider Degeneration. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **299**, 191 (1955).
- — Isolierung von N-Acetylneuraminsäure aus Fetuin. *Dtsch. Z. Verdau.- u. Stoffwechsel-Kr.* **17** (II), 51 (1957).
- — u. H. LEMPFRIED: Über die enzymatische Wirkung des Influenzavirus. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **301**, 235 (1955).
- u. G. UHLENBRUCK: Über die Abspaltung von N-Glykolylnuraminsäure (p-Sialinsäure) aus dem Schweinesubmaxillarmucin durch „Receptor-Destroying-Enzyme“. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **307**, 266 (1957).
- KRAWKOW, P. N.: Beiträge zur Chemie der Amyloidentartung. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **40**, 195 (1898).
- LETTERER, E.: Über die geweblichen und humoralen Störungen des Eiweißstoffwechsels. *Medizinische* **1958**, Nr. 1.
- Allgemeine Pathologie. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

- LEUPOLD, E.: Untersuchungen über die Mikrochemie und Genese des Amyloids. Beitr. path. Anat. **64**, 347 (1918).
— Amyloid und Hyalin. Ergebn. allg. Path. path. Anat. **21**, 121 (1925/26).
MERCK, E.: Chromatographie, 2. Aufl. Darmstadt 1959.
PEARSE, A. G. E.: Histochemistry, 2nd edit. London: Little and Comp. 1960.
PIOCH, W.: Über die Darstellung saurer Mucopolysaccharide mit dem Kupferphthalocyanin-farbstoff Astrablau. Virchows Arch. path. Anat. **330**, 337 (1957).
RAUEN, H. M.: Biochemisches Taschenbuch, 1. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
SCHMIEDEBERG, O.: Zit. nach E. LEUPOLD.
SCHULTZE, H. E.: Immunitätslehre in Klinik der Gegenwart, Herausgeb. R. COBERT, K. GUTZEIT u. H. E. BOCK. München: Urban & Schwarzenberg 1960.
SVENNERHOLM, L.: Isolating of N-Acetyl-Sialic-Acid from normal liver. Biochim. biophys. Acta **23**, 652 (1957).
VISCONTINI, M., D. HOCH u. P. KARRER: Mikromethode zur Bestimmung der Ringstruktur des Zuckerrestes bei Nukleosiden. Helv. chim. Acta **38**, 642 (1955).
WESTPHAL, O., O. LÜDERITZ u. F. BISTER: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforsch. **7b**, 148 (1952).
WIEDEMANN, E.: Zit. nach H. M. RAUEN.

Dr. P. SCHMITZ-MOORMANN
Pathologisches Institut der Universität Köln, Josef Stelzmann-Straße 9