

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Köln
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. H. HEINLEIN)

Biochemische und histochemische Untersuchungen am retikulären Bindegewebe der Milz*

Von

PAUL SCHMITZ-MOORMANN

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 23. Mai 1961)

Unter retikulärem Bindegewebe verstehen wir „feinste Fäserchen, an den Grenzflächen von Epithel und Bindegewebe gelegen, die im Gegensatz zu den unverzweigten kollagenen Fasern ein sehr feines dichtes Netz als umhüllende oder raumgitterartige Struktur bilden“ (LETTERER 1959 a). Diese Fasern zeichnen sich dadurch aus, daß sie sich nach BIELSCHOWSKY mit Silber schwärzen. Jedoch ist dies kein spezifisches Merkmal; einmal lassen sich auch Nerven und Glia mit Silber schwärzen, zum anderen finden sich im embryonalen Gewebe und in heilenden Hautwunden feinste, allerdings unverzweigte Fasern, die sich versilbern lassen und als unreifes Kollagen angesprochen werden (ROBB-SMITH 1957). WINDRUM u. Mitarb. (1955) nennen als wichtigste histochemische Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen kollagenen und retikulären Fasern folgende Farbreaktionen: 1. die Versilberung: Kollagen gelbbraun, Retikulin schwarz; 2. die PAS-Reaktion: Kollagen schwach rot, Retikulin leuchtend rot; 3. die Säurefuchsinfärbung: Kollagen leuchtend rot, Retikulin schwach rot und 4. die metachromatische Färbung nach Sulfatierung: Kollagen orthochromatisch, Retikulin metachromatisch.

In seinem elektronenoptischen und röntgenspektrographischen Verhalten zeigt jedoch das Retikulin weitgehende Übereinstimmung mit dem Kollagen, so daß es von manchen Seiten als Vorstufe des Kollagens angesprochen (WASSERMANN 1959, LETTERER 1959 b) oder mit dem säurelöslichen Prokollagen identifiziert wird (HARTMANN 1959, 1960), eine Ansicht, die auch schon von ROULET (1937) auf Grund seiner morphologischen und histogenetischen Befunde vertreten wurde. Auch biochemische Untersuchungen führen zu diesem Ergebnis (BUDDECKE 1960 a), da Kollagen und Retikulin in ihrer Aminosäurezusammensetzung weitgehend übereinstimmen (WINDRUM u. Mitarb. 1955). Demgegenüber konnte bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit markierten Retikulinantikörpern festgestellt werden, daß diese nur Retikulin, Sarkolemm, Neurilemm und epitheliale Basalmembran anfärben, nicht aber Kollagen, Knorpel und elastisches Gewebe (CRUICKSHANK u. Mitarb. 1953). Auch ergibt die Totalanalyse des Retikulins (WINDRUM u. Mitarb. 1955) sowohl qualitativ wie quantitativ eine ganz andere Zusammensetzung wie die des Kollagens.

Der wichtigste Unterschied zwischen Kollagen und Retikulin liegt darin, daß sie verschiedene Kittsubstanzen haben (WASSERMANN 1959). Während aber die

* Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Kittsubstanzen des kollagenen Bindegewebes vielfach untersucht und auch schon weitgehend isoliert und analysiert wurden (GIBIAN 1959, BUDECKE 1960a), sind nur wenige Untersuchungen an der Kittsubstanz des retikulären Bindegewebes durchgeführt worden. Während es nämlich relativ einfach ist, die Kittsubstanz des Kollagens freizusetzen (GIBIAN 1959), war dies beim retikulären Bindegewebe bisher nicht möglich. So konnte der Kohlenhydratanteil des Retikulins, der ja die Kittsubstanz ausmacht, nur durch Totalanalyse des Retikulins bestimmt werden, was natürlich keine näheren Aussagen über Zusammensetzung und Aufbau ermöglicht (WINDRUM u. Mitarb. 1955, GLEGG u. Mitarb. 1953).

Bei Voruntersuchungen über Möglichkeiten, diesen Kohlenhydratanteil freizusetzen, ergab sich nun, daß es nach Papainbehandlung von alkoholfixierten Schnitten zu einer deutlich verminderten Anfärbung des Retikulins bei der PAS-Reaktion kam. Der Kohlenhydratanteil wurde also durch Papain freigesetzt. Als Methode zur Darstellung dieses Kohlenhydratanteils bot sich die von BUDECKE (1960a) an Aorten angewandte Aufarbeitung an, die zudem eine einfache Möglichkeit bot, saure und neutrale Mucopolysaccharide zu trennen. Allerdings war vorher eine partielle Reinigung des im Handel erhältlichen Papains notwendig, da es je nach Charge 4—8% eines neutralen Polysaccharides enthält, das mit in die zu isolierende Substanz eingehen und die Ergebnisse verfälschen würde.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll nun dieses isolierte Mucopolysaccharid näher untersucht werden. Im zweiten Teil soll dann der Einfluß der gleichen Reagentien, mit denen das Mucopolysaccharid freigesetzt wurde, auf die histochemischen Reaktionen des Retikulins bestimmt werden.

Biochemischer Teil

Methodik

Material. Als Ausgangsmaterial wurden normale menschliche Milzen verwandt, die im laufenden Sektionsbetrieb anfielen. Die Organe wurden mit langem Gefäßstiel herauspräpariert, wobei eine Lädierung der Kapsel peinlich vermieden wurde.

Isolierung des reticulären Bindegewebes. Die Organe wurden von den Arterien aus unter leicht erhöhtem Druck mit Leitungswasser durchspült. Diese Methode erwies sich günstiger als eine Durchspülung mit physiologischer Kochsalzlösung, weil so die Erythrocyten hämolytisch und auch kleinere Blutgerinnsel aufgelöst wurden. Die Durchspülung wurde beendet, wenn das Spülwasser klar abließ und die Milz makroskopisch blutleer war. An einem kleinen Organstück wurde dann sichergestellt, daß die Milz auch feingeweblich nicht pathologisch verändert war. Von den blutleeren Organen wurde die Kapsel abgezogen und die Gefäße am Hilus abgeschnitten. Sodann wurden die Organe zerkleinert und eine Minute im Starmix mit dem zehnfachen Volumen Aceton verrieben. Die Gewebsaufschwemmung wurde durch ein Sieb (0,8 mm Maschengröße) gegeben, wobei das Gerüstgewebe und die Gefäße zurückblieben. Dieser Rückstand wurde nochmals mit dem 10fachen Volumen Aceton $\frac{1}{2}$ min verrieben und durch das Sieb gegeben. Der im Sieb bleibende Rückstand wurde getrocknet und gewogen. Die durchgelaufene Gewebsaufschwemmung blieb über Nacht im Kühlschrank stehen. Am nächsten Morgen wurde das Aceton abgesaugt und erneuert, die Aufschwemmung über Nacht bei $+4^{\circ}\text{C}$ belassen, das Aceton wiederum abgesaugt und der Rückstand bei 40°C getrocknet. Der trockne Rückstand wurde im Soxhlet solange mit Aceton extrahiert, bis das ablaufende Aceton farblos blieb (4—6 Std). Der entfettete Gewebsbrei wurde getrocknet und trocken aufbewahrt. Bei einer histologischen Untersuchung dieses Gewebspulvers, die nach Paraffineinbettung durchgeführt wurde, fanden sich zwar noch einige Trabekel, überwiegend bestand das Pulver aber aus reticulärem Bindegewebe mit feinen Gitterfasern und kernhaltigen Zellen.

Ausbeute. Trockengewicht (ohne Kapsel): 8% des Frischgewichtes (= entblutete Milz). 75% des Trockengewichtes = reticuläres Bindegewebe, 25% des Trockengewichtes = kollagenes Bindegewebe und Gefäße.

Darstellung des Mucoproteids aus Retikulin. Die Darstellung erfolgte nach der von BUDDECKE (1960a) entwickelten Methode mit Papain. Das Papain wurde zuvor in Anlehnung an die Methode von KIMMEL und SMITH (1954) gereinigt.

100 g Papain (Merck 1:300) wurden im Starmix mit 300 ml 0,4 m Cysteinlösung verrieben, die Aufschwemmung 30 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der Niederschlag wiederum mit 300 ml 0,4 m Cysteinlösung verrieben. Erneute Zentrifugation und Aufschwemmung des Rückstands in 400 ml 0,4 m Cysteinlösung. Nach Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt (trübe grauweiße Suspension) und in einer hochtourigen Zentrifuge mit 18000 g $\frac{1}{2}$ Std zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit Ammonsulfat 0,4fach gesättigt, der Niederschlag abzentrifugiert und in 200 ml 0,2 m Cysteinlösung aufgenommen. Die Lösung wurde wiederum mit Ammonsulfat 0,4fach gesättigt, der Niederschlag abzentrifugiert und mit 0,4fach gesättigtem Ammonsulfat gewaschen. Sodann wurde der Niederschlag in 100 ml 0,2 m Cysteinlösung aufgenommen, gegen Fließ- und destilliertes Wasser dialysiert, elektrodialysiert und lyophilisiert.

Ausbeute. 3,0 g. Bei einer papierchromatographischen Zuckerbestimmung (Methodik s. später) war diese Substanz praktisch zuckerfrei (maximale Verunreinigung durch Zucker 0,5⁰/₁₀₀).

25 g des trocknen Milzretikulins wurden in 250 ml folgender Lösung aufgeschwemmt: 1,25 g gereinigtes Papain wurden in 62,5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst; hierzu wurden 62,5 ml einer 3,6%igen $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung sowie 125 ml einer 0,2%igen Cysteinlösung in physiologischer Kochsalzlösung gegeben. Die Aufschwemmung wurde unter Rühren 12 Std auf 56° C erwärmt, der Überstand dekantiert und der Rückstand nochmals 6 Std mit 200 ml einer frischen Papainlösung behandelt. Der Rückstand wurde abzentrifugiert, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, dialysiert und gefriergetrocknet. Die Überstände und das Waschwasser wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer (40° C, Wasserstrahlvakuum) eingeengt und dialysiert. Das Innendialysat wurde sodann mit der 10fachen Menge Äthanol (unter Zusatz von Na-Acetat) versetzt und blieb über Nacht bei +4° C stehen. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, in destilliertem Wasser aufgenommen und mit 1 n-NaOH auf p_H 10 eingestellt. Dabei bildete sich eine hauchartige Trübung, die abzentrifugiert wurde. Sodann wurde wiederum mit der 10fachen Menge Äthanol gefällt. Der abzentrifugierte Niederschlag wurde in destilliertem Wasser aufgenommen und mit 1 n-HCl auf p_H 2,5 eingestellt. Dabei bildete sich ein voluminöser Niederschlag, der abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen und nach Einfrieren getrocknet wurde (Fraktion 1a). Der Überstand wurde mit dem 10fachen Volumen Äthanol versetzt und der entstandene Niederschlag in destilliertem Wasser aufgenommen. Da er sich nicht völlig löste, wurde die Lösung leicht alkalisch gemacht, worauf er komplett in Lösung ging. Diese Lösung wurde dialysiert und elektrodialysiert. Dabei bildete sich ein Niederschlag, der nach Abschluß der Elektrodialyse abzentrifugiert und nach Einfrieren getrocknet wurde (Fraktion 1b). Der Überstand wurde ebenfalls eingefroren und getrocknet (Fraktion 1).

Ausbeute. Fraktion 1: 0,444 g (Rohmucoproteid), Fraktion 1a: 0,890 g, Fraktion 1b: 0,088 g. Rückstand nach Papainspaltung des Retikulins: 13,6 g.

0,347 g des trocknen Rohmucoproteids (Fraktion 1) wurden in 10 ml 90%igen Phenols aufgeschwemmt. Dabei ging die Substanz sofort fast völlig in Lösung. Der ungelöste Anteil, der die sauren Mucopolysaccharide enthielt, wurde abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen, der ungelöste Anteil abzentrifugiert und verworfen. Nach Einstellen des Überstandes auf p_H 2 bildete sich ein geringer Niederschlag, der abzentrifugiert und verworfen wurde. Sodann wurde mit dem 10fachen Volumen Äthanol gefällt und über Nacht bei +4° C belassen. Es entstand ein hauchartiger Niederschlag, der abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen, neutralisiert, dialysiert und nach Einfrieren getrocknet wurde (Fraktion 2a). Der Überstand aus der Phenolextraktion wurde mit der 10fachen Menge Äthanol versetzt und blieb über Nacht bei +4° C stehen. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, gegen Fließ- und destilliertes Wasser dialysiert und elektrodialysiert. Bei der Elektrodialyse bildete sich ein Niederschlag, der der Kammerwand so fest anhaftete, daß er nur teilweise zurückgewonnen

werden konnte. Niederschlag (Fraktion 2b) und Überstand (Fraktion 2) der Elektrodialyse wurden getrennt eingefroren und getrocknet.

Ausbeute. Fraktion 2: 0,134 g (gereinigtes Mucoprotein), Fraktion 2a: 0,006 g, Fraktion 2b: 0,028 g (nur teilweise zurückgewonnen).

Papierelektrophoretische Untersuchung. Diese Methode wurde bereits ausführlich dargestellt (SCHMITZ-MOORMANN 1961), so daß hier nur darauf verwiesen zu werden braucht.

Papierchromatographische Bestimmung der Zucker. 1. *Neutralzucker.* Von der zu untersuchenden Substanz wurde eine etwa 2 mg Neutralzucker enthaltende Menge (bestimmt aus der Differenz des Reduktionswertes und des Hexosamingehaltes) mit der 50fachen Menge 10%iger HCl 1 Std auf 100° C erhitzt. Das Hydrolysat wurde filtriert, der Rückstand ausgewaschen, Filtrat und Waschwasser vereinigt und mit Bleiacetat, Silberacetat und Schwefelwasserstoff von Chlor- und Schwermetallionen befreit. Das klare Filtrat wurde über eine kombinierte Kationen- (Dowex 50 × 8, H-Form) und Anionen- (Lewatit MIH, Acetatform)-Austauschersäule gegeben und mit 250 ml destilliertem Wasser nachgewaschen. Das Eluat, das die Neutralzucker enthielt, wurde im Rotationsverdampfer (Wasserstrahlvakuum, 40° C) zur Trockne eingedampft, mit wenig destilliertem Wasser über ein Filter in ein Reagensglas überführt, eingefroren und getrocknet. Die Anionenaustauschersäule, die eventuell vorhandene saure Zucker enthielt, wurde mit 250 ml 2 n-Ameisensäure eluiert und das Eluat wie oben aufgearbeitet. Jedoch konnten saure Zucker weder hier noch im ungereinigten Hydrolysat nachgewiesen werden, so daß bei späteren Ansätzen auf diesen Arbeitsschritt verzichtet wurde. Die getrockneten Substanzen wurden in 0,2 ml Wasser gelöst, so daß sich im mm³ etwa 10 µ Neutralzucker befanden. Aufgetragen wurden 0,02 ml.

Als Papier wurde Schleicher & Schüll 2043b verwandt, das nach JAYME und KNOLLE (1956) mit 0,2 m Phosphatpuffer pH 5,0 imprägniert wurde. Die Chromatogramme wurden 18 Std absteigend in Pyridin-Essigester-Wasser = 7:10:3 (v/v), das zusätzlich 2,5% Phthalsäure enthielt (GUSTAFSON u. Mitarb. 1951), entwickelt und an der Luft und 20 min bei 80° C getrocknet. Die trocknen Chromatogramme wurden durch eine 2%ige Anilinlösung in 100%igem peroxydfreiem Äther gezogen und etwa 5 min auf 105° erhitzt. Die Zucker stellten sich als braune (Hexosen) oder braunrote (Pentosen) Flecke dar.

2. *Basische Zucker.* Von der zu untersuchenden Substanz wurde eine etwa 1 mg Hexosamin enthaltende Menge (bestimmt aus dem Hexosaminwert nach MORGAN-ELSON) in ein Reagensglas eingewogen, in der 50fachen Menge 6 n-HCl gelöst, eingeschmolzen und 6 Std bei 105° C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde filtriert und zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit einer Anionenaustauschersäule (Lewatit MIH, Acetatform) von den sauren Aminosäuren befreit, das Eluat im Rotationsverdampfer eingengt, in ein Reagensglas überführt, lyophilisiert und in 0,2 ml Wasser gelöst. Aufgetragen wurden 0,02—0,04 ml.

Als Papier wurde nicht imprägniertes Papier Schleicher & Schüll 2043b, als Entwickler der gleiche wie oben, aber ohne Phthalsäurezusatz, verwandt. Die Chromatogramme wurden 18 Std absteigend entwickelt. Die Zucker wurden mit Perjodat-Benzidin, Ninhydrin und dem Patridge-Gemisch zum Nachweis von Hexosaminen sichtbar gemacht (Merck 1958).

Quantitative papierchromatographische Bestimmung von Galaktose und Mannose. Diese Bestimmung wurde nach SPIRO (1960) durchgeführt. Die Neutralzucker wurden wie oben beschrieben isoliert, wobei quantitativ gearbeitet wurde. Eine definierte Menge (100—150) wurde auf das Chromatogramm aufgetragen und das Chromatogramm in n-Butanol-Äthanol-Wasser = 10:1:2 (v/v) 92—96 Std absteigend entwickelt. Aus mitaufgetragenen Testen wurden die Zucker dann lokalisiert und nach einer Schablone zusammen mit einem Leerwert herausgeschnitten. Die Papierstreifen wurden zerschnitzelt, 3 Std mit 5 ml Wasser eluiert und von dem Eluat 2—3 ml zur colorimetrischen Zuckerbestimmung nach SOMOGYI (1945) und NELSON (1944) verwandt. Abgelesen wurde in 2 cm-Cuvetten bei 530 mµ. Die Bestimmung des Zuckergehaltes erfolgte anhand einer Eichkurve, die für Galaktose und für Mannose für Werte zwischen 6 und 60 µ aufgestellt wurde.

Papierchromatographische Bestimmung der Aminosäuren. Diese Methodik wurde bereits ausführlich dargestellt (SCHMITZ-MOORMANN 1961), so daß hier nur darauf verwiesen zu werden braucht.

Darstellung der Neuraminsäure aus dem Milzreticulum. Die Darstellung der Neuraminsäure erfolgte nach SVENNERHOLM (1957).

31,8 g Retikulin (= 546 g Frischmilz) wurden mehrmals bei $+4^{\circ}\text{C}$ mit 0,01 n H_2SO_4 aufgeschwemmt, bis die Lösung nach 12stündigem Stehen ein pH von 3 behielt. Dabei ging allerdings ein Teil der Substanz in die überstehende Flüssigkeit, die sich braun färbte und leicht trübe wurde. Diese Trübung verschwand auch nicht nach Zentrifugation. Nachdem die Substanz kein weiteres Säurebindungsvermögen mehr zeigte, wurde sie in der 10fachen Menge 0,03 n H_2SO_4 aufgeschwemmt und 1 Std unter kräftigem Rühren auf $75-80^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Der Überstand wurde abzentrifugiert, der Rückstand gewaschen; Überstand und Waschwasser vereinigt und mit gesättigter $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung neutralisiert (pH 5–6). Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert. Der klare opalescente Überstand wurde auf eine gekoppelte Kationen- (Dowex 50×8 , H-Form) und Anionen- (Lewatit MIH, Acetat-form)-Austauschersäule gegeben und mit 1 Liter destilliertem Wasser nachgewaschen. Aus dem Anionenaustauscher wurde dann die Neuraminsäure mit 250 ml 0,3 n Ameisensäure eluiert.

Ausbeute. 20,2 mg. Daraus mit Eisessig-Wasser kristallisiert 17,87 mg. Da sich bei dieser Aufarbeitung ein wesentlich niedrigerer Neuraminsäuregehalt ergab, als nach der Ausbeute bei der Papainspaltung zu erwarten war, wurden in einem zweiten Ansatz 6,3 g Retikulin (= 166 g Frischmilz) in 200 ml Wasser aufgeschwemmt, auf 75°C erwärmt und so lange tropfenweise 1 n Schwefelsäure zugegeben, bis die Lösung auch nach längerem Rühren ein pH von 2–3 behielt. Sodann wurden 6 ml 1 n H_2SO_4 zugegeben, so daß die Lösung 0,03 normal wurde, und wie oben weiter aufgearbeitet.

Ausbeute. 8,6 mg. Keine Kristallisierung. Das Retikulin enthält demnach 0,135 % Neuraminsäure, das Frischgewebe 5 mg-%.

Identifizierung Neuraminsäure. Die Identifizierung geschah 1. durch Papierchromatographie, 2. durch Glykolybestimmung, 3. durch Infrarotspektrographie. Nähere Einzelheiten s. SCHMITZ-MOORMANN (1961).

Weitere Bestimmungen. Neuraminsäure wurde mit Bials Reagens als Methoxyneuraminsäure bestimmt. Fucose wurde nach DISCHE und SHETTLER (1948), der Reduktionswert nach SOMOGYI (1937) mit Galaktose als Bezugssubstanz, Hexosamin nach MORGAN und ELSON (1933), N-Acetyl-Hexosamin nach MORGAN (1952) bestimmt.

Ergebnisse

Mit Papain ließ sich aus Milzretikulin eine neuraminsäurehaltige Substanz freisetzen, die durch wiederholte Alkoholfällung und Extraktion mit 90%igem Phenol weitgehend gereinigt dargestellt werden konnte. Bei der papierelektrophoretischen Untersuchung dieser Substanz (Fraktion 2) fand sich eine breite kräftige Bande, die mit Amidoschwarz, Ninhydrin, Perjodat-Benzidin und Bials Reagens anfärbbar war; es handelt sich somit um ein neuraminhaltiges Mucoprotein. Daneben bestand als Verunreinigung eine schmale, farbschwache Bande, die sich nur mit Perjodat-Benzidin und Ninhydrin anfärbte (Abb. 1). Hexuronsäurehaltige Mucopolysaccharide, sog. saure Mucopolysaccharide, die ja auch durch Papain freigesetzt werden (BUDDECKE 1960 a) konnten nur in Spuren gefunden werden; denn einmal blieb bei der Phenolextraktion, bei der die sauren Mucopolysaccharide nicht in Lösung gehen, nur ein Rückstand von 8 mg (= 0,03 % des Ausgangszustandes, Fraktion 2a), während die Ausbeute des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids 1,1 % (berechnet aus der Gesamtneuraminsäure der Fraktion 1, bezogen auf den Neuraminsäuregehalt der Fraktion 2) betrug; zum andern enthielt der Rückstand der Phenolextraktion (Fraktion 2a) noch Neuraminsäure, so daß der größte Teil dieser Fraktion dem neuraminsäurehaltigen Mucoprotein zugeordnet werden muß (Tabelle 1).

Bei der papierchromatographischen Zuckerbestimmung enthielten die Ausgangssubstanz (Retikulin), der Rückstand aus der Papainspaltung des Retikulins (Rückstand) und der säureunlösliche Anteil des Papainextraktes (Fraktion 1a)

Tabelle 1. *Analysendaten der verschiedenen Fraktionen bei der Aufarbeitung des Milzretikulins*

	Reti- kulin	Rück- stand	Fraktion					
			1	1a	1b	2	2a	2b
Ausbeute								
Gramm . . .	25	13,6	0,444	0,89	0,089	0,172 ¹	0,008 ¹	0,036 ¹
Prozent . . .	100	54,5	1,8	3,7	0,3	0,7	0,03	0,14
Asche (%) . . .	3,64	7,30	1,4	12,1	46,2	0,2	—	1,0
Stickstoff								
Prozent . . .	13,86	13,00	9,6	14,3	4,82	8,87	—	10,77
molar ² . . .	350	670	52	735	98	34	—	59
Eiweiß (%) ³ . . .	86	82	52	83	29	44	—	59
Reduktionswert								
Prozent . . .	5,1	2,5	23,8	2,5	6,3	33,4	31,1	21,8
molar ² . . .	10	10	10	10	10	10	10	10
Hexosamin								
Prozent . . .	1,46	1,35	16,6	1,67	1,51	22,1	—	14,4
molar ² . . .	3	5	7	7,5	2,5	8	—	8
Neuraminsäure								
Prozent . . .	0,135	n. b.	4,95	n. b.	n. b.	7,63	5,1	4,8
molar ² . . .	1,7	—	1,3	—	—	1,4	1,1	1,4

¹ Die Ausbeute wurde auf die Gesamtausgangssubstanz berechnet.
² Die molaren Verhältnisse beziehen sich auf den Reduktionswert, der gleich 10 gesetzt wurde.
³ Der Eiweißgehalt ergibt sich aus dem Stickstoffgehalt (abzüglich dem Hexosamin- und Neuraminsäurestickstoff) $\times 6,25$.
n. b.: nicht bestimmbar.
Retikulin: Ausgangssubstanz (Darstellung s. Methodik).
Rückstand: Rückstand aus dem Retikulin nach Papainbehandlung. Übrige Fraktionen s. Methodik.

Tabelle 2. *Zusammenfassende Darstellung der papierchromatographisch bestimmten Zucker der verschiedenen Fraktionen bei der Aufarbeitung des Milzretikulins*

	Retikulin	Rückstand	Fraktion				
			1	1a	1b	2	2b
Galaktose . . .	+	+	++	+	+	+++	+
Glucose . . .	++	+	(+)	(+)	(+)	—	—
Mannose . . .	(+)	(+)	+	(+)	(+)	+	(+)
Fucose . . .	(+)	(+)	+	(+)	(+)	+	(+)
Glucosamin . .	+	(+)	++	(+)	+	+++	+
Pentosen . . .	(+)	(+)	—	++	—	—	—

Pentosen (Tabelle 2). Außerdem fand sich Glucose, die aber nach der Phenol-extraktion nicht mehr nachweisbar war (Tabelle 2). Da sich bei der papier-elektrophoretischen Untersuchung der Fraktion 1 (Rohmucoproteid) neben den Banden der Fraktion 2 (gereinigtes Mucoproteid) noch eine weitere verwaschene Bande darstellte, die sich nur mit Perjodat-Benzidin anfärbte (Abb. 1), ist anzu-nehmen, daß die Glucose aus einem aminosäurefreien Polysaccharide stammt, wobei es sich am ehesten wohl um Glykogen handelt. Die in den ersten Fraktionen und in der Ausgangssubstanz nachweisbaren Pentosen stammen demgegenüber wohl aus den Ribo- und Desoxyribonucleinsäuren der Zellen und Kerne.
Im übrigen enthalten alle Fraktionen, die bei der Aufarbeitung des Retikulins anfallen, die gleichen Zucker, nämlich Galaktose, Mannose, Fucose und Glucos-

amin (Tabelle 2). Das trockne Milzretikulin enthält 0,135% Neuraminsäure. Sie wurde durch Papierchromatographie, Infrarotspektrographie und Glykolybestimmung als N-Acetyl-Neuraminsäure identifiziert. Bei der Papainbehandlung des Retikulins wird die neuraminsäurehaltige Substanz, wie sich aus dem

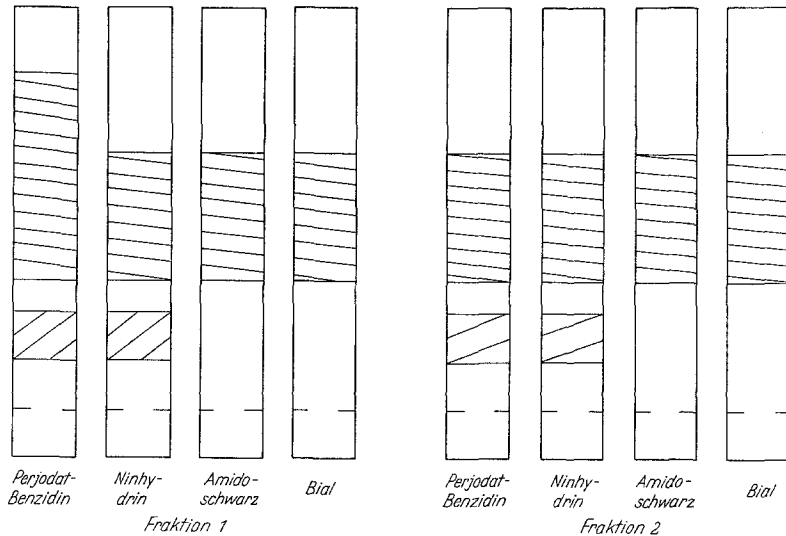


Abb. 1. Elektropherogramm des aus Milzretikulin dargestellten Mucoproteids. *Fraktion 1*: Rohmucoproteid, *Fraktion 2*: gereinigtes Mucoproteid. Die Streifen wurden mit Perjodat-Benzidin (zum Nachweis von Kohlenhydraten), Ninhydrin (zum Nachweis von Aminosäuren), Amidoschwarz (zum Nachweis von Eiweiß) und Bials Reagens (zum Nachweis von Neuraminsäure) angefärbt

Vergleich der Ausbeute bei der Isolierung der Gesamtneuraminsäure aus Retikulin und der Gesamtneuraminsäure des isolierten Mucoproteids ergibt, fast völlig abgespalten. Daß die Neuraminsäure nicht in allen Fraktionen der Retikulinaufarbeitung nachweisbar war (Tabelle 1), liegt in der Methode begründet. Bials Reagens reagiert nicht nur mit Neuraminsäure, sondern in geringem Umfang auch mit Eiweiß und Zuckern, so daß, wenn diese mengenmäßig stark überwiegen, grüne bzw. grünblaue Mischfarben entstehen (BÖHM 1959), die nicht ausgewertet werden können.

Das neuraminsäurehaltige Mucoproteid, das weitgehend gereinigt vorlag, wurde im weiteren näher untersucht. Als Zucker bzw. Zuckerabkömmlinge fanden sich Galaktose, Mannose, Fucose, Glucosamin und N-Acetyl-Neuraminsäure. Die Acetylbestimmung¹ ergab einen Acetylgehalt von 3,56%. Davon entfallen 1,16% auf die N-Acetyl-Neuraminsäure. Der Rest ist am

Tabelle 3. Zusammensetzung des aus Milzretikulin isolierten Mucoproteids

	Prozent	Molaritäten bezogen auf Neuraminsäure = 10
N-Acetyl-Neuraminsäure	8,4	10
Galaktose	4	8
Mannose	2,5	5
Fucose	2,5	6
N-Acetylglucosamin . . .	12,4	20
Glucosamin	12,1	25
Aminosäurenstickstoff . .	7,14	188
Eiweiß	44,6	

¹ Die Acetylbestimmung wurde im Mikroanalytischen Laboratorium im Max-Planck-Institut für Kohleforschung Mülheim (Ruhr) durchgeführt.

ehesten dem Glucosamin zuzuordnen. Demnach liegen 10% des Glucosamins als N-Acetyl-Verbindung vor. Das Mucoproteid enthält also 12,4% N-Acetyl-Glucosamin und 12,1% Glucosamin. Dabei kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß dieses Glucosamin einen anderen Substituenten an der Aminogruppe trägt. Bei der N-Acetyl-Hexosaminbestimmung nach MORGAN (1952) reagierte das Mucoproteid negativ. Demnach liegen an C₁ und C₄ des Glucosamins glykosidische Bindungen vor, die bei der Alkalibehandlung nicht gespalten werden, denn ein Chromogen kann bei der Morgan-Elson-Reaktion nur gebildet werden, wenn eine dieser Gruppen frei ist (KUHN und KRÜGER 1956). Mit Bariumchlorid ergab das Mucoproteid keinen Niederschlag; die Substanz ist also sulfatfrei. Dafür spricht ja auch der niedrige Aschegehalt des Mucoproteids (unter 0,2%). Die quantitative Zusammensetzung des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids ergibt sich aus Tabelle 3.

Als Aminosäuren fanden sich in größerer Menge Glutamin- und Asparaginsäure, Serin und Threonin, Glycin, Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin. Daneben konnten Cysteinsäure, Cystin und Methionin, Arginin, Histidin und Lysin, Tyrosin und Phenylalanin, Prolin und Hydroxyprolin sowie α -Aminobuttersäure nachgewiesen werden.

Histochemischer Teil

Um die Rolle des durch Papain aus Milzreticulum abspaltbaren Mucoproteids bei den verschiedenen histochemischen Farbreaktionen des Reticulums zu untersuchen, wurden Feingewebsschnitte von entbluteten normalen menschlichen Milzen mit Papain behandelt und den verschiedenen Färbungen zugeführt. Um speziell den Einfluß der Neuraminsäure auf die Anfärbbarkeit des Reticulums zu klären, wurde die Neuraminsäure mit stark verdünnter Schwefelsäure abgespalten und die Schnitte dann auf ihre Anfärbbarkeit geprüft.

Methodik

Material. Als Material wurden Teile von blutleer gespülten, normalen menschlichen Milzen verwandt, die in 10%igem Formalin bzw. in 75%igem Äthanol fixiert und in Paraffin eingebettet wurden.

Papainbehandlung. 500 ml Papainlösung (Herstellung wie oben, hier aber mit dem handelsüblichen Papain Merck 1:300) wurden auf 56° C erwärmt. In diese Lösung wurden die entparaffinierten und gründlich gewässerten Schnitte eingestellt, über Nacht bei 56° C im Brutschrank belassen und nach gründlichem Wässern den verschiedenen Färbungen zugeführt. Gleichzeitig wurden Kontrollschnitte mitgefärbt, die mit einer entsprechenden fermentfreien Lösung behandelt worden waren.

Abspaltung der Neuraminsäure. Die entparaffinierten Schnitte wurden in 0,03 n Schwefelsäure eingestellt und 1 Std auf 75–80° C erwärmt, gründlich gewaschen und gefärbt. Kontrollschnitte, die 1 Std in destilliertem Wasser auf 75–80° C erwärmt worden waren, wurden mitgefärbt.

Färbungen. 1. Methylblau. Mit Veronal-HCl-Puffer in der Modifikation von WIEDEMANN wurde eine Pufferreihe von pH 3,0–5,0 hergestellt mit Stufen von 0,1 pH-Einheiten. Zu je 100 ml Pufferlösung wurde 1 ml einer frisch hergestellten gesättigten Methylblaulösung gegeben. Die Schnitte wurden über Nacht in diese Farblösung eingestellt (etwa 15 Std), am nächsten Morgen abgespült, mit Glyceringelatine eingedeckt und sofort beurteilt.

2. Alcianblau. In einer Veronal-HCl-Pufferreihe von pH 3,0–6,0 mit Stufen von 0,5 pH-Einheiten wurde 0,5% Alcianblau gelöst. Die sorgfältig gewässerten Schnitte wurden für 1/2 Std in die Farblösung eingestellt, abgespült, mit Glyceringelatine eingedeckt und sofort beurteilt.

3. *Methylviolett (Kristallviolett)*. Mit Veronal-HCl-Puffer wurde eine Pufferreihe von p_H 3,0—6,0 angesetzt in Stufen von 0,5 p_H -Einheiten. Zu je 100 ml Pufferlösung wurden 0,1 ml einer frisch bereiteten, gesättigten Kristallviolettlösung gegeben. Die Schnitte wurden über Nacht in die Farblösung eingestellt und dann wie oben weiterverarbeitet.

4. *Kresylviolett (Kresylechtviolett)*. Da der Veronal-HCl-Puffer mit Kresylechtviolett einen Niederschlag bildete, wurde die Pufferreihe von p_H 3,5—6,0 mit 0,2 m Acetatpuffer angesetzt mit Stufen von 0,5 p_H -Einheiten. Zu je 100 ml Pufferlösung wurden 4 ml einer frisch bereiteten, gesättigten Kresylechtviolettlösung gegeben. Färbung und Weiterverarbeitung wie bei Methylenblau.

5. *Toluidinblau*. Mit Veronal-HCl-Puffer wurde eine Pufferreihe von p_H 3,0—6,0 angesetzt in Stufen von 0,5 p_H -Einheiten. Zu je 100 ml Pufferlösung wurde 1 ml einer 1%igen Toluidinblaulösung gegeben, so daß die Lösung also 0,01%ig war. Färbung und Weiterverarbeitung wie oben.

6. PAS-Färbung.

7. Pikro-Säurefuchsin-Färbung nach VAN GIESON.

Die metachromatischen Färbungen wurden mit Blaufilter, die orthochromatischen ohne Blaufilter beurteilt.

Kritik zur Methodik

Bei den Färbungen mit abgestuften p_H -Werten soll lichtmikroskopisch festgestellt werden, bei welchem p_H -Wert sich eine bestimmte Struktur des untersuchten Gewebes anfärbt, z. B. mit Methylenblau oder Alcianblau, oder metachromatisch reagiert, z. B. mit Methylviolett, Kresylviolett und Toluidinblau. Diese Methode ist immer subjektiv, ganz besonders aber, wenn es sich um so feine und damit schwach anfärbbare Strukturen wie das Retikulin handelt. Schon die Beobachtungsbedingungen, mit oder ohne Blaufilter, Lichtstärke usw. können Verschiebungen um 0,2—0,5 p_H -Einheiten vortäuschen. Zudem hängt es jeweils vom Beobachter ab, ob bei den Grenz- und Übergangsfällen die untersuchte Struktur als angefärbt oder nicht angefärbt angesprochen wird. So können die absoluten p_H -Werte, bei denen Anfärbbarkeit auftritt, von anderen Untersuchern durchaus um 0,1—0,5 p_H -Einheiten höher oder niedriger angesetzt werden als von uns. Als zweite Schwierigkeit kommt hinzu, daß die Reticulumfasern bei der sauren Hydrolyse sich verbreitern und aufquellen, bei der Papainbehandlung aber ihren Mucoproteidanteil verlieren und nur noch schmalste Strukturen zurückbleiben. Beide Veränderungen beeinflussen die Intensität der Anfärbung. Besonders schwierig ist die Beurteilung bei den metachromatischen Färbungen; denn bei den feinen Fasern des Reticulums kann eine Metachromasie nur schwach ausgebildet sein. Deswegen wurde bei diesen Färbungen auf eine engere Stufung der p_H -Werte in der Pufferreihe verzichtet.

Es ist aber bei sorgfältigem Vergleich zwischen normalen und vorbehandelten Schnitten bei mittelstarker und starker Vergrößerung immer möglich, den p_H -Wert festzulegen, bei dem gleiche Anfärbung auftritt. Demgemäß messen wir den p_H -Verschiebungen bei der Anfärbbarkeit von vorbehandelten und Kontroll- bzw. normalen Schnitten eine größere Bedeutung zu als den absoluten p_H -Werten, bei denen eine Anfärbung auftritt.

Ergebnisse

Die Kontrollschnitte entsprachen in ihrem Verhalten völlig dem der nicht vorbehandelten Schnitte (Tabelle 4—5). Mit PAS färbten sich die Media der Gefäße stark, die Trabekel mittelstark und das Reticulum deutlich rot an, während die Kerne nur schwach gefärbt wurden. Bei der van Gieson-Färbung wurde das Reticulum gelb mit einem leichten Rotton gefärbt, während sich Kerne und Media gelb, die Trabekel dagegen rot anfärbten. Nach Säurehydrolyse nahm die PAS-Reaktion der Trabekel deutlich zu, während an den übrigen Strukturen die Farbsintensität nicht geändert wurde; bei der van Gieson-Färbung fand sich nach der Säurehydrolyse eine Änderung lediglich an den Kernen, die nun gelbrot gefärbt wurden. Nach Papainbehandlung der Milzfeingewebschnitte zeigte das Reticulum bei der

Tabelle 4. *Beginn der Anfärbung bzw. der Metachromasie des unveränderten Reticulums, nach Säurehydrolyse und nach Papainbehandlung im histologischen Präparat*

	alkoholfixiert			formalinfixiert	
	normal pH	Hydrolyse pH	Papain pH	normal pH	Hydrolyse pH
Methylenblau	4,1	4,5	4,5	3,7	4,5
Alcianblau	4,0	4,5	—	3,5	4,5
Methylviolett	4,0	4,5	4,5—5,0	3,5	4,5
Kresylviolett	4,5	5,0	5,0	4,0	5,0
Toluidinblau	4,0	4,5	4,5—5,0	3,5	4,5

Tabelle 5. *Beginn der Anfärbung bzw. der Metachromasie des unbehandelten Kollagens (Trabekel), nach Säurehydrolyse und nach Papainbehandlung im histologischen Präparat*

	alkoholfixiert			formalinfixiert	
	normal pH	Hydrolyse pH	Papain pH	normal pH	Hydrolyse pH
Methylenblau	3,6	4,2	4,2	3,4	4,2
Alcianblau	3,5	3,5—4,0	—	3,0	3,5—4,0
Methylviolett	3,5—4,0	4,0—4,5	4,0—4,5	3,5	4,0—4,5
Kresylviolett	3,5—4,0	4,5	4,5	3,5	4,5
Toluidinblau	4,0	4,5	4,5	3,5	4,5

PAS-Färbung nur noch angedeutet eine schwach rote Tingierung, die Kerne waren ungefärbt, während die Anfärbbarkeit der Trabekel stark, die der Media nur eben abgeschwächt war. Bei der van Gieson-Färbung zeigten die papainbehandelten Schnitte eine Rotfärbung aller Strukturen; also nicht nur die Trabekel färbten sich rot, sondern auch das Reticulum, die Kerne und die Media der Gefäße. Bei der PAS- und van Gieson-Färbung des isolierten Retikulins und des Rückstandes aus der Papainspaltung des Retikulins (s. biochemischer Teil) färbten sich im isolierten Retikulin die Gitterfasern und die noch vorhandenen Trabekel genau so wie in den nicht vorbehandelten Schnitten. Beim Rückstand fand sich dagegen bei der PAS-Färbung eine Abschwächung der Anfärbbarkeit, die aber nicht so intensiv war wie an den papainbehandelten Schnitten; auch zeigten bei der van Gieson-Färbung Kerne und Reticulum noch eine gelbliche Tingierung, während sie sich in den Schnitten ja rot anfärbten. Die Papaineinwirkung ist also bei den Schnitten intensiver als beim Retikulin. Das ist aber nicht verwunderlich, da die Schnitte eine Dicke von 5 μ haben, während die Teilchengröße des im Starmix zerkleinerten Materials wesentlich höher liegt. Bei den übrigen Färbungen zeigten die nicht vorbehandelten und die Kontrollschnitte, daß die Anfärbbarkeit bei den formalinfixierten Schnitten um 0,3—0,5 pH-Einheiten niedriger auftritt als bei dem alkoholfixierten Material, wobei die Anfärbung beim Kollagen (Trabekel) wiederum um 0,3—0,5 pH-Einheiten eher auftrat als beim Reticulum.

Nach Säurehydrolyse verschob sich die Anfärbbarkeit der formalinfixierten Schnitte um 1 pH-Einheit, bei den alkoholfixierten um 0,5 pH-Einheiten. Nach Säurehydrolyse trat also bei beiden Fixierungen die Anfärbbarkeit beim gleichen pH-Wert auf. Dabei färbte sich das Kollagen (Trabekel) wiederum bei um 0,3 bis 0,5 pH-Einheiten niedrigeren Werten an als das Retikulin.

Um zu prüfen, ob bei der Säurehydrolyse außer der Neuraminsäure aus dem Reticulum noch andere Substanzen freigesetzt wurden, wurden einige Milligramm aus isoliertem Reti-

kulin dargestellten neuraminsäurehaltigen Mucoproteids (Fraktion 2) 1 Std lang mit 0,03 n Schwefelsäure bei 75–80° C hydrolysiert, mit Lewatit MIH von der Schwefelsäure befreit und papierchromatographisch auf Zucker und Aminosäuren untersucht. Es konnten aber weder freie Zucker noch Aminosäuren gefunden werden.

Die Papainspaltung wurde nur an alkoholfixiertem Material durchgeführt.

In Voruntersuchungen wurde sie auch an formalinfixierten Schnitten versucht. Jedoch kam es dabei zu uneinheitlichen Ergebnissen.

Teilweise trat die gleiche p_H -Verschiebung in der Anfärbbarkeit auf wie bei den alkoholfixierten Schnitten, teilweise war sie geringer. Wurden die Schnitte aber über längere Zeit (36–60 Std) mit Papain behandelt, so entsprach die p_H -Verschiebung der Anfärbbarkeit der der alkoholfixierten Schnitte. Es kommt also durch die Formalinfixierung zu einer Hemmung der Papainwirkung, die aber nicht komplett ist, sondern durch entsprechend längere Papainbehandlung überwunden werden kann.

Die Papainbehandlung führte beim Retikulin und Kollagen (Trabekel) zu der gleichen p_H -Verschiebung in der Anfärbbarkeit wie die Säurehydrolyse. Lediglich bei der Alcianblaufärbung fand sich schon bei p_H 3 eine Anfärbung des Kollagens und des Retikulins. Diese Anfärbung wurde auch nicht aufgehoben, wenn die Schnitte über Tage in 0,03; 0,1 und 1,0 normale Schwefelsäure eingestellt wurden, während bei den anderen verwandten Färbungen schon nach mehrstündigem Einstellen in 0,03 n Schwefelsäure eine völlige Entfärbung aller Strukturen auftrat. Demnach kann das Alcianblau in den papainbehandelten Schnitten nicht salzartig gebunden sein, sondern muß mit dem Eiweiß eine andere, nicht durch Säuren spaltbare Verbindung eingegangen sein. Damit aber verliert die Alcianblaufärbung für unsere Fragestellung ihren Aussagewert.

Diskussion

WINDRUM u. Mitarb. (1955) stellten durch Totalanalyse von Retikulin, das sie aus normalen menschlichen Nieren isoliert hatten, fest, daß das Retikulin 3,8–5,7% Neutralzucker enthält, nämlich Galaktose, Mannose und Fucose, sowie 0,16–0,17% Glucosamin. Wir konnten aus Milzretikulin ein Mucoprotein darstellen, das die gleichen Zucker enthält. Jedoch liegt der relative Hexosamingehalt bei der von uns isolierten Substanz wesentlich höher. Während bei uns der Quotient Hexosamingehalt/Reduktionswert (Hexosamin/Gesamtzucker) 0,67 ausmacht, ergibt sich aus den Analysendaten WINDRUMS für das Nierenretikulin ein Quotient von 0,04. Auch unsere Ausgangssubstanz, das isolierte Milzretikulin, weist einen deutlich höheren Quotienten auf, nämlich 0,3. Nun bestand das von WINDRUM untersuchte Material aber nicht nur aus Retikulin, sondern war ein Gemisch aus Glomerula, Basalmembranen und Retikulin im eigentlichen Sinne. Zwar nimmt WASSERMANN (1959) an, daß Retikulin und Basalmembranen chemisch identisch sind; demgegenüber konnte aber SCOTT (1957, 1959, 1960) mit Hilfe von Antikörpern, die mit Fluorochromen markiert waren, zeigen, daß Retikulin und Basalmembranen zwar miteinander verwandt, aber nicht identisch sind. Auch unsere Ergebnisse sprechen dafür, daß das von WINDRUM untersuchte Material kein reines Retikulin war.

Als weiteren Zuckerabkömmling konnten wir in Milzretikulin und in dem daraus isolierten Mucoprotein N-Acetyl-Neuraminsäure nachweisen. Dabei ergab sich für die Milz (bezogen auf das Frischgewicht der entbluteten Milz) ein Gehalt von 5 mg-%, für das Retikulin (bezogen auf das Trockengewicht) ein Gehalt von 148 mg-%; das isolierte Mucoprotein enthielt 8,4% N-Acetyl-Neuraminsäure.

Neuraminsäure konnte in der menschlichen Milz bisher nicht nachgewiesen werden (BÖHM 1959). Auch von WINDRUM u. Mitarb. (1955) wurde die Neuraminsäure nicht erfaßt. Das war aber auch nicht zu erwarten, da bei der von ihm durchgeführten Alkalibehandlung zur Isolierung des Retikulins die Neuraminsäure zerstört wird (BÖHM 1959).

GLEGG u. Mitarb. (1953) fanden im Retikulin außer den schon erwähnten Zuckern noch Glucose. Diese konnte auch von uns nachgewiesen werden, und zwar im isolierten Retikulin und in dem aus diesem Retikulin dargestellten Rohmucoproteid (Fraktion 1). Bei der Elektrophorese dieses Rohmucoproteids erhielten wir eine Bande, die nur Kohlenhydrate enthielt. Diese Bande konnte nicht mehr im Pherogramm des gereinigten Mucoproteids (Fraktion 2) nachgewiesen werden. Auch war in dieser Fraktion keine Glucose mehr nachweisbar. Aus diesen Gründen glauben wir, daß die Glucose aus Glykogen stammt.

Die Analysendaten sowie die papierchromatographischen Zuckerbestimmungen der verschiedenen Fraktionen, die bei unserer Aufarbeitung des Milzretikulins anfielen, machen es unwahrscheinlich, daß noch weitere Mucoproteide im Retikulin enthalten sind. Zwar fielen bei der Aufarbeitung des Rohmucoproteids auch saure Mucopolysaccharide vom Typ der kollagenen Kittsubstanzen an; jedoch war die Ausbeute so minimal, daß diese sauren Mucopolysaccharide gut aus den Trabekeln stammen können, die das von uns isolierte Retikulin noch verunreinigten. Auch ist nicht anzunehmen, daß durch die Papainbehandlung nur ein Mucoproteid aus dem Reticulum abgespalten würde, während andere nicht angegriffen würden; denn die Überprüfung an Feingewebsschnitten mit der PAS-Reaktion zeigt, daß die Kohlenhydrate des Retikulins durch Papain praktisch vollständig abgespalten werden.

Chemisch zeigt das von uns isolierte Mucoproteid Beziehungen zu den Serum-mucoproteiden. Jedoch konnte keine Identität oder auch nur enge Verwandtschaft mit den bisher isolierten und analysierten Serummucoproteiden festgestellt werden (Tabelle 6). Einmal enthalten die meisten Serummucoproteide Hexuronsäure, die wir in unserer Substanz nicht nachweisen konnten; zum andern liegt der Fucosegehalt unserer Substanz wesentlich höher als der der Serummucoproteide.

Wie schon eingangs betont, ist nach elektronenoptischen und röntgenspektrographischen Untersuchungen die Kollagenfibrille mit der Retikulinfibrille identisch (WASSERMANN 1959, HARTMANN 1959, 1960, BUDECKE 1960 b). Auch die Aminosäurezusammensetzung von Kollagen und Retikulin ist sehr ähnlich (WINDRUM u. Mitarb. 1955). Dabei fällt auf, daß bei dem von uns isolierten Mucoproteid gerade die Aminosäuren überwiegen, die auch im Retikulin gegenüber dem Kollagen vermehrt vorkommen. Der wesentliche Unterschied zwischen Kollagen und Retikulin liegt, wie schon WASSERMANN (1959) und ENGHUSEN (1957, 1959) betonen, in der Kittsubstanz. Während im kollagenen Bindegewebe sog. saure Mucopolysaccharide (Keratosulfat, Hyaluronsäure, Chondroitin, Chondroitinsulfat A und B, Heparin und Heparitinsulfat) die Kittsubstanz bilden (GIBIAN 1959, BUDECKE 1960 b), ist es im retikulären Bindegewebe ein neuraminsäurehaltiges Mucoproteid.

Somit ergibt sich bei Zusammenfassung der bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisse für den Aufbau der Reticulumfasern folgendes Bild: Die Reticulum-

Tabelle 6. *Analysendaten der Serum mucoproteide (nach SCHULZE 1960) und des von uns aus Milzretikulin isolierten Mucoproteids, ausgedrückt in Molaritäten, bezogen auf Neuraminsäure = 10*

	Galaktose	Mannose	Fucose	Hexosamin	Neuramin- säure	Hexuron- säure
α_1 -Seromucoid	12	7	1	16	10	0,6
Prothrombin	11	6	0,4	29	10	0,7
Thrombin	9	4	0,3	9	10	0,7
Coeruloplasmin	16	8	2	15	10	2
Haptoglobin 2—1	23	12	1	27	10	0,0
α_2 -Makroglobulin	17	17	1	23	10	1
β_1 -eisenbindendes Globulin	20	10	1	20	10	0,6
β_2 -A-Globulin	15	15	2	23	10	2
β_2 -Makroglobulin	30	16	6	30	10	—
Fibrinogen	9	20	0	21	10	5
γ -Globulin	23	52	13	61	10	8
Milzmucoproteid	8	5	6	46	10	0

faser besteht aus dünnen Kollagenfibrillen, die durch ein neuraminsäurehaltiges, ein sog. neutrales Mucoproteid miteinander verkittet sind. Außerdem enthält sie Fettsäuren, überwiegend Myristinsäure (WINDRUM u. Mitarb. 1955), die gerichtet in die Faser eingelagert sind (MISSMAHL 1957).

CASTELLANI u. Mitarb. (1960) isolierten aus Epiphysenknorpel junger Schweine, aus Rippenknorpel junger Kaninchen, aus Rindercornea und aus Rinderaorta in beträchtlicher Ausbeute Neuraminsäure (40—160 mg pro 100 g Frischgewicht). BUDDECKE (1960a) konnte aus normalen und arteriosklerotisch veränderten menschlichen Aorten neben sauren Mucopolysacchariden ein neutrales Mucoproteid isolieren, das in seiner Zusammensetzung dem von uns aus Milzretikulin isolierten Mucoproteid ähnelt. Demnach scheinen auch im kollagenen Bindegewebe Mucoproteide vom Typ des Reticulummucoproteids vorzukommen. Damit aber erhebt sich wieder die Frage, ob und wie weit das retikuläre Gewebe ein Vorläufer des kollagenen Bindegewebes ist.

Die histochemischen Untersuchungen ergaben für das Retikulin eine Abnahme der Basophilie, d. h. der Affinität zu basischen Farbstoffen, um 0,3—0,5 pH-Einheiten, sowohl nach Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure wie nach Papainbehandlung. Bei der Säurehydrolyse wird in erster Linie Neuraminsäure abgespalten. Daneben kann es natürlich auch zu einer Entacetylierung des Glucosamins kommen, so daß die Aminogruppe des Glucosamins ihre basischen Valenzen entfalten kann. Bei dem Aciditätsverlust des Reticulums nach Säurehydrolyse wirken dann also zwei Faktoren zusammen, einmal Verlust von Neuraminsäure, zum andern Entblockung der basischen Aminogruppen des Glucosamins. Jedoch spielt das Glucosamin für den Aciditätsverlust, bzw. für die Zunahme der Basizität praktisch keine Rolle; denn die N-Acetylneuraminsäure ist eine der stärksten organischen Säuren mit einer Dissoziationskonstanten von $4,0 \cdot 10^{-3}$ (pK 2,6) (SVENNERHOLM 1956), während das Glucosamin eine sehr schwache Base mit einer Dissoziationskonstanten von etwa $1,1 \cdot 10^{-9}$ (pK 9,04) (berechnet aus pH-Messungen von WESTPHAL und HOLZMANN 1942) ist. Die Dissoziationskonstante der N-Acetylneuraminsäure liegt also um rund 6 Zehnerpotenzen höher als die des Glucosamins.

Bei der Papainbehandlung des Retikulins kommt es zur Abspaltung des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids. Dabei werden sicher auch basische und

saure Gruppen von Aminosäuren entblockt, die dann ihre Valenzen entfalten können. Jedoch kann man einmal erwarten, daß die sauren und basischen Valenzen sich in etwa aufheben, zum andern liegen die Dissoziationskonstanten der Aminosäuren so niedrig (STAUFF 1956), daß sie gegenüber der Neuraminsäure praktisch nicht ins Gewicht fallen. Die Neuraminsäure des Mucoproteids ist also Träger der sauren Valenzen im Reticulum. Verlust der Neuraminsäure oder Abspaltung des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids führt zu einem gleich starken Abfall der Basophilie bzw. der Metachromasie mit basischen Farbstoffen. Auffallend ist, daß sich das Reticulum nach Papainbehandlung mit Säurefuchsin leuchtend rot anfärbt. Das könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Fibrillen des Reticulums mit denen des Kollagens identisch sind. Da aber auch die Kerne nach Papainbehandlung mit Säurefuchsin rot angefärbt werden, ist dieser Schluß wohl unzulässig.

Im Kollagen ist normalerweise die Kittsubstanz durch Eiweiß maskiert (LETTERER 1959). Dadurch ist die Fähigkeit zur Metachromasie und die Anfärbbarkeit mit PAS eingeschränkt. Bei der Säurehydrolyse kommt es nun im kollagenen Bindegewebe der Milztrabekel zu einer Verstärkung der PAS-Reaktion; die zu erwartende verstärkte Metachromasie bleibt aber aus, es kommt im Gegenteil zu einem Abfall der Anfärbbarkeit. Dieser Widerspruch ist aber nur scheinbar. Zwar werden bei der Säurehydrolyse die Kittsubstanzen demaskiert, gleichzeitig kommt es aber zu einer Abspaltung der Estersulfatgruppen der sauren Mucopolysaccharide (MEYER u. Mitarb. 1948). Damit gehen einmal saure Valenzen, die ja Träger der Fähigkeit zur Metachromasie sind (BANK und BUNGENBERG DE JEONG 1939) verloren, zum andern werden aber Hydroxylgruppen frei, die dann mit in die PAS-Reaktion eingehen können.

Nach der Papainbehandlung liegt die Anfärbbarkeit des Kollagens um 0,3 bis 0,5 pH-Einheiten niedriger als die des Retikulins. Da Kollagen und Retikulin die gleichen Fibrillen enthalten sollen, ist eigentlich zu erwarten, daß nach Papainbehandlung die Anfärbbarkeit des Kollagens der des Retikulins entspricht; denn auch die sauren Mucopolysaccharide werden durch Papain abgespalten (BUDDECKE 1960a). Wie jedoch die PAS-Färbung zeigt, ist am Kollagen die Abspaltung der zuckerhaltigen Substanzen nicht so komplett wie am Retikulin; denn das Kollagen behält nach der Papainspaltung noch eine deutliche Anfärbbarkeit für PAS, während das Reticulum praktisch völlig farblos ist. Somit enthält das Kollagen noch einen Teil seiner sauren Mucopolysaccharide und damit eine gegenüber dem Reticulum verstärkte Affinität zu basischen Farbstoffen.

Zusammenfassung

Aus Retikulin, das aus normalen menschlichen Milzen isoliert wurde, wurde mit Papain ein Mucoproteid freigesetzt, das 8,4% N-Acetyl-Neuraminsäure, 4% Galaktose, 2,5% Mannose, 2,5% Fucose, 12,4% N-Acetylglucosamin, 12,1% Glucosamin und 44,6% Eiweiß enthielt. Als Aminosäuren fanden sich in größerer Menge Glutamin- und Asparaginsäure, Serin und Threonin, Glycin, Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin. Daneben konnten Cysteinsäure, Cystin und Methionin, Arginin, Histidin und Lysin, Tyrosin und Phenylalanin, Prolin und Hydroxyprolin sowie α -Aminobuttersäure nachgewiesen werden. Weitere Mucoproteide konnten im Retikulin nicht gefunden werden.

Nach Freisetzen der Neuraminsäure sowie nach Extraktion des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids mit Papain kommt es im Feingewebsschnitt der Milz

zu einem gleich starken Abfall der Basophilie des Reticulums wie seiner Fähigkeit zur Metachromasie.

Bei Berücksichtigung der bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisse ergibt sich für den Aufbau der Reticulumfasern folgendes Bild: Die Reticulumfaser besteht aus dünnen Kollagenfibrillen, die durch ein neuraminsäurehaltiges, ein sog. neutrales Mucoproteid miteinander verkittet sind. Außerdem enthält sie Fettsäuren, vorwiegend Myristinsäure, die gerichtet in die Faser eingelagert sind.

Summary

A mucoprotein was extracted with papain from the reticulum which was isolated from the normal human spleen. This mucoprotein contained 8.4% N-acetyl-neuraminic acid, 4% galactose, 2.5% mannose, 2.5% fucose, 12.4% N-acetylglucosamine, 12.1% glucosamine, and 44.6% protein. The more abundant amino acids found were glutamine, asparagine, serine, threonine, glycine, alanine, valine, leucine, and isoleucine. In addition, cysteine, cystine, methionine, arginine, histidine, lysine, tyrosine, phenylalanine, proline, hydroxyproline, and α -aminobutyric acid could be demonstrated. Other mucoproteins could not be found in the reticulum.

After the release of the neuraminic acid and the extraction of the neuraminic acid containing mucoprotein with the papain, there was a concomitant marked decrease in the basophilia of the reticulum and in its ability to show metachromasia in thin sections of the spleen.

In consideration of the experimental results presented, the following may be said for the composition of the reticulum fiber: it consists of thin fibrils of collagen which are cemented together with a so-called neutral mucoprotein containing neuraminic acid. In addition, it contains fatty acids, chiefly myristinic acid, which are orderly bound within the fibers.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h. c. E. KLENK verpflichtet, in dessen Institut ich den Großteil dieser Untersuchungen durchführen konnte.

Literatur

- BANK, O., u. H. G. BUNGENBERG DE JONG: Mechanismen der Farbstoffaufnahme. I. Mitt. *Protoplasma* (Wien) **32**, 489 (1939).
- BÖHM, P.: Die Neuraminsäure. *Dtsch. Z. Verdau.- u. Stoffwechselkr.* **19**, 65, 129, 177 (1959).
- BUDDECKE, E.: Untersuchungen zur Chemie der Arterienwand. 5. Mitt. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **318**, 33 (1960a).
- *Biochemie des Bindegewebes*. *Angew. Chem.* **72**, 663 (1960b).
- CASTELLANI, A. A., G. FERRI, L. BOLOGNANI and V. GRAZIANO: Presence of sialic acids in connective tissue. *Nature* (Lond.) **185**, 36 (1960).
- CRICKSHANK, B., and A. G. S. HILL: *Nature and structure of collagen*, p. 27. London: Butterworth Sci. Publ. 1953.
- DISCHE, Z., and L. B. SHETTLER: A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. biol. Chem.* **175**, 595 (1948).
- ENGHUSEN, E.: Über Retikulin, Kollagen und die Interzellularsubstanz des Bindegewebes. *Acta anat. (Basel)* **31**, 46 (1957).
- Über die Entwicklung des Retikulins in vitro. *Acta anat. (Basel)* **36**, 264 (1959).
- GIBIAN, H.: *Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen*. Einzeldarstellungen aus dem Gesamtgebiet der Biochemie. Neue Folge. Herausgeg. von O. HOFFMAN-OSTENHOFF, Bd. 4. Wien: Deuticke 1959.
- GLEGG, R., D. EIDINGER and C. P. LESBLOND: Some carbohydrate components of reticular fibers. *Science* **118**, 614 (1953).
- GUSTAFSON, C., J. SUNDMAN u. T. LINDB: *Zit. nach HOPPE-SEYLER u. THIERFELDER*.

- HARTMANN, F.: Wesen der gestörten Funktion des Bindegewebes. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **65**, 852 (1959).
- Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes. 2. Symposion an der Med. Univ.-Klinik Münster (Westf.). Herausgeg. von W. H. HAUSS u. H. LOSSE 1960.
- HOPPE-SEYLER u. THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. Herausgeg. von K. LANG u. E. LEHNARTZ, 10. Aufl., Berlin: Springer 1955.
- JAYME, G., u. K. KNOLLE: Papierchromatographie von Zuckergemischen auf Glasfaserpapieren. Angew. Chem. **68**, 243 (1956).
- KIMMEL, J. R., and E. L. SMITH: Crystalline Papain. J. biol. Chem. **207**, 515 (1954).
- KUHN, R., u. G. KRÜGER: 3-Acet-Amino-Furan aus N-Acetyl-D-Glukosamin. Ein Beitrag zur Theorie der Morgan-Elson-Reaktion. Chem. Ber. **89**, 1473 (1956).
- LETTERER, E.: Allgemeine Pathologie, 1. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme 1959a.
- Allgemeine Pathologie des Bindegewebes. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **65**, 9 (1959b).
- MERCK, E.: Chromatographie, 2. Aufl. Darmstadt 1958.
- MEYER, K. H., M. E. ODIER u. A. E. SIEGRIST: Constitution de l'acide chondroïtine-sulfurique. Helv. chim. Acta **31** (5), 1400 (1948).
- MISSMAHL, H. P.: Doppelbrechung der retikulären Fasern und sich hieraus ergebender Nachweis von gerichtet eingelagerten Lipoiden in den retikulären Fasern. Z. Zellforsch. **45**, 612 (1957).
- MORGAN, W. T. J., D. AMINOFF and W. M. WATKINS: Studies in immunochemistry. 11. Mitt. Biochem. J. **51**, 379 (1952).
- , and L. A. ELSON: A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. Biochem. J. **27**, 1824 (1933).
- NELSON, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. biol. Chem. **153**, 375 (1944).
- RAUEN, G. M.: Biochemisches Taschenbuch, 1. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.
- ROBB-SMITH, A. H. T.: What is reticulin? Connective tissue. A Symposium by the Council for International Organisations of Medical Sciences. Herausgeg. von R. E. TUNBRIDGE, S. 177. Oxford: Blackwell 1957.
- ROULET, F.: Über das Verhalten der Bindegewebsfasern unter normalen und pathologischen Bedingungen. Lubarsch-Ostertag Ergebn. **32**, 1 (1937).
- SCHMITZ-MOORMANN, P.: Biochemische und histochemische Untersuchungen am Amyloid. Virchows Arch. path. Anat. **334**, 95 (1961).
- SCHULTZE, H. E.: Immunitätslehre. In: Klinik der Gegenwart. Herausgeg. von R. COBERT, K. GUTZEIT u. H. E. BOCK, S. 407. München: Urban & Schwarzenberg 1960.
- SCOTT, D. G.: A study of the antigenicity of basement membrane and reticuline. Brit. J. exp. Path. **38**, 178 (1957).
- Immuno-histochemical study of connective tissue. Ann. rheum. Dis. **18**, 207 (1959).
- Immuno-histochemical studies of connective tissues. Immunology **3**, 226 (1960).
- SOMOGYI, M.: A reagent for the copper-jodometric determination of very small amounts of sugar. Biol. Chem. **117**, 771 (1937).
- A new reagent for the determination of sugars. J. biol. Chem. **153**, 375 (1944).
- SPIRO, P. G.: Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. J. biol. Chem. **235**, 2860 (1960).
- STAUFF, J.: Zit. nach H. M. RAUEN.
- SVENNERHOLM, L.: On the isolation and characterisation of N-acetyl-neuraminic acid. Acta Soc. Med. upsalien. **61**, 75 (1956).
- A. MARTINSON and A. RAAL: Isolation of N-acetyl-sialic acid from normal liver. Biochim. biophys. Acta **23**, 652 (1957).
- WASSERMANN, W.: Die Feinstruktur des Bindegewebes in gegenwärtiger Sicht als Grundlage der Funktion und der pathologischen Veränderungen. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **65**, 852 (1959).
- WESTPHAL, O., u. H. HOLZMANN: Zur Chemie des Glukosamins. Chem. Ber. **75**, 1274 (1942).
- WIEDEMANN, E.: Zit. nach H. M. RAUEN.
- WINDRUM, G. M., P. W. KENT and J. F. EASTOE: The constitution of human reticulin. Brit. J. exp. Path. **36**, 49 (1955).

Dr. PAUL SCHMITZ-MOORMANN

Pathologisches Institut der Universität, Köln-Lindenthal, Josef Stelzmann-Str. 9