

Das Ehlers-Danlos-Syndrom aus morphologischer und chemischer Sicht*

K. HEILMANN, Th. NEMETSCHKE und A. VÖLKL

Pathologisches Institut der Universität Heidelberg (Prof. Dr. W. Doerr)

Eingegangen am 26. Juli 1971

Morphological and Chemical Aspects of the Ehlers-Danlos-Syndrome

Summary. Results are reported of morphological and chemical studies of various tissues of a patient with the clinical signs of an Ehlers-Danlos syndrome (EDS) who died from a spontaneous rupture of the renal artery. It is assumed that the cause for the remarkable properties of the tissues of EDS lies in a disorder of the elastin. This is caused by a diminished strength and a poor, and abnormal linkage of the elastic lamellae in tissue. A disturbed biosynthesis of desmosins is made responsible for the diminished strength and is reflected by an increased content in lysin.

The impaired linkage of the elastic lamellae is the result of an absent microfibrillar border. The collagen fibers are often swollen and therefore may be functionally impaired. The possibility of mistaking swollen collagen for elastin is discussed.

Zusammenfassung. Gewebe eines an einer spontanen Ruptur der Nierenarterie verstorbenen Mannes mit den klinischen Zeichen eines Ehlers-Danlos-Syndroms wurde morphologisch und chemisch untersucht.

Als Ursache für das auffällige Verhalten der EDS-Gewebe wird ein Fehlverhalten des Elastin angesehen. Dieses beruht auf einer verminderten Zugfestigkeit und einer schlechten bzw. gestörten Verankerung elastischer Lamellen im Gewebe.

Eine Störung der Biosynthese von Desmosinen wird für die verminderte Zugfestigkeit von Elastin verantwortlich gemacht und ist in einem erhöhten Lysingehalt widergespiegelt. Die schlechte Verankerung elastischer Lamellen im Gewebe wird auf das Fehlen eines peripheren Besatzes aus Mikrofibrillen zurückgeführt.

Das Kollagen liegt im EDS-Gewebe relativ oft im gequollenen Zustand vor und kann deshalb funktionell ebenfalls ein Fehlverhalten zeigen. Auf die Möglichkeit einer Verwechslung von gequollenem Kollagen und Elastin wird hingewiesen.

Das Ehlers-Danlos-Syndrom (EDS) ist eine seltene angeborene Störung des Bindegewebes. Die betroffenen Menschen leiden an einer Überdehnbarkeit und erhöhten Verletzlichkeit der Haut, Überstreckbarkeit der Gelenke, erhöhter Blutungsbereitschaft und Neigung zu Gefäßrupturen (McKusick, 1966). Obwohl die ersten Mitteilungen über histologische Veränderungen weit zurückreichen (Williams, 1892; Unna, 1896), herrscht immer noch Unklarheit darüber, ob dieses Syndrom auf einer generalisierten Störung des Bindegewebes oder auf einem Defekt einer seiner Komponenten beruht. Am Kollagen werden histologisch erfaßbare Veränderungen, wie Fragmentation, hyaline Verklumpungen und eine unregelmäßige Anordnung beschrieben (Beighton, 1970; Heilmann und Kolig, 1971). Am Elastin wurden hingegen außer einer quantitativen Zunahme keine groben strukturellen Veränderungen beobachtet.

* In Kurzfassung vorgetragen anlässlich der 2. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Darmstadt vom 1.—3. 10. 1971.

Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen sollen sowohl die Kollagenfibrillen als auch die elastischen Fasern keine Störungen zeigen (Turnbridge, 1952; Jansen, 1955; Wechsler und Fisher, 1964; Julkunen, 1965; Selliseth, 1965). Auch die Wärmestabilität des Kollagens aus EDS-Haut lässt keine signifikanten Unterschiede erkennen (Mason und Rigby, 1965; Nordschow und Marsolais, 1969). Schließlich wurden sowohl für Elastin (Varadi und Hall, 1965) als auch für Kollagen (Mason und Rigby, 1965) in der Aminosäurenanalyse keine Abweichungen vom Kontrollmaterial gefunden. Allein der Gehalt entsprechender Proben an Kollagen soll anhand histologischer Befunde verringert sein (Turnbridge, 1952; McFarland und Fuller, 1964; Rubinstein und Cohen, 1964; Wechsler und Fisher, 1964; Hegreberg u. Mitarb., 1970). Dementsprechend erscheinen Haut und Gefäße im ganzen wesentlich dünner und leichter als bei gesunden Menschen oder Tieren (Harris und Sjoerdsma, 1966; Rybka und O'Hara, 1967; Hegreberg u. Mitarb., 1970; Grahame, 1970).

Im folgenden soll nun über Ergebnisse berichtet werden, die mit Hilfe morphologischer und chemischer Untersuchungsmethoden erzielt wurden, in der Hoffnung, uns dem Verstehen dieser Systemerkrankung näherzubringen.

Material und Methoden

Das *Untersuchungsmaterial* wurde bei der Sektion eines an einer spontanen Ruptur der linken Nierenarterie verstorbenen 24jährigen Mannes mit den klinischen Zeichen eines EDS erhalten. Die klinischen Daten und patho-anatomischen Befunde wurden bereits besprochen (Heilmann und Kolig, 1971). Als *Kontrolle* diente Gewebe eines 25jährigen, gesunden Mannes, der durch einen Messerstich zu Tode kam. Die Sektion wurde ebenfalls ca. 15 h post mortem vorgenommen. Für die histologische und biochemische Verarbeitung wurde Gewebe aus unverletzten Regionen in 10% igem neutralem Formalin aufgehoben. Die Proben für die konventionelle *Histologie* wurden in Paraffin eingebettet und die Paraffinschnitte nach HE, HE-Elastica, Masson-Goldner, PAS, Alcian-blau gefärbt.

Morphometrische Bestimmungen an Paraffinschnitten der Haut, Aorta und Nierenarterie wurden mit Hilfe der Strichplatte des Leitz-Zähloculars durchgeführt (Zählfeldgröße $7200 \mu^2$, Zählpunktabstand = 20). Die Zählfelder werden wahllos in der Haut in drei Zonen, in der Aorta und der Nierenarterie in zwei Zonen verteilt und insgesamt 50 Zählungen pro Gebiet vorgenommen.

Zur *elektronenmikroskopischen* Untersuchung wurden Dünnschnitte von in Epoxyharz eingebetteten Gewebsblöcken mit dem Porter-Blum-Ultramikrotom angefertigt und mit dem Elmiskop Ia von Siemens & Halske betrachtet. Die Kontrastierung der mit auf pH 7,2 gepufferten Glutaraldehyd- und OsO₄-Lösung vorfixierten Proben erfolgte am Dünnschnitt mit 1% igem wäßrigen Uranylacetat (UO₂-Ac.) und Bleihydroxolösung (Pb-Hydroxo) oder 1%iger wäßriger Phosphorwolframsäure (PWS).

Die *enzymchemische* Untersuchung erfolgte an auf Platinnetzchen aufgefangenen, nicht kontrastierten Dünnschnitten mit *Elastase* (2mal krist., Serva Heidelberg) 0,1 mg/ml Trispuffer pH 8,8 und α -*Chymotrypsin* (3mal krist., Serva Heidelberg) 0,1 mg/ml 0,1 m NH₄HCO₃ pH 7,8; Inkubation 17 und 31 Std bei 37° C.

Der *Kollagengehalt* der Proben wurde nach Stegemann (1958) im Gesamthydrolysat der bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Proben mit Hilfe der Hydroxyprolinbestimmung ermittelt. Das Gewebe wurde hierzu 12 h mit 37%iger HCl bei 115° behandelt, nach Abrauchen der HCl in H₂O aufgenommen und mit Aktivkohle von den gebildeten Huminstoffen befreit.

Zur *Kupfer*-Bestimmung wurde das bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Gewebe 3mal mit je 10 ml 65%iger HNO₃ abgeraucht, der Rückstand in 2 ml H₂O aufgenommen und nach dem Atomabsorptionsverfahren mit dem Flammenphotometer FA 2 von Zeiss gemessen.

Zur *Isolierung von Elastin* wurde das über Alkohol, Aceton entwässerte und bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Gewebe nach einer Arbeitsvorschrift von Ross und Bornstein (1969) durch Inkubation mit Guanidinhydrochlorid und Kollagenase (reinst, ca. 250 Mandl-E/mg, Serva Heidelberg) von Kollagen befreit. Reinheitskontrolle erfolgte am Dünnschnitt mit Hilfe des Elektronenmikroskops.

Die gewaschenen und bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Elastinproben wurden im verschlossenen Rohr mit 6n HCl 5 h hydrolysiert. Die *Aminosäurenanalyse* erfolgte an Austauschersäulen unter Verwendung der automatisch registrierenden Anordnung von Technicon. Wegen einer fehlenden Eichsubstanz konnten Desmosin und Isodesmosin nicht bestimmt werden.

Die *Röntgenbeugung* erfolgte an unter Ringer-Lösung in Markröhrchen eingezogenen Kollagenfasern aus dem Centrum tendineum des Zwerchfells mit Hilfe der Kiessig- und Kratky-Kammer unter Verwendung von CuK- α -Strahlung.

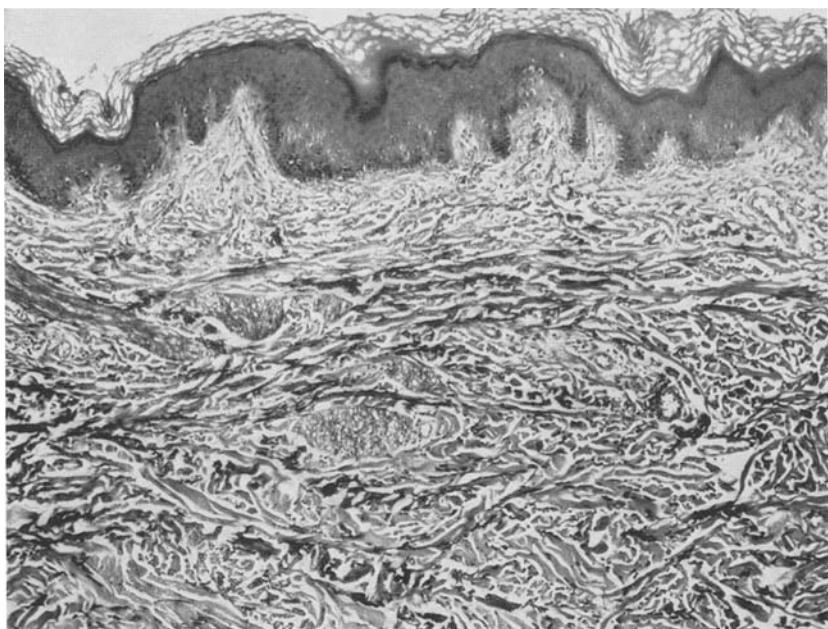
Ergebnisse

Aus der *lichtmikroskopischen* Gegenüberstellung in Abb. 1a und b erkennt man, daß die EDS-Haut eine dünnerne Dermis besitzt als die Kontrollhaut, verbunden mit einer Rarefizierung des Reticulums in der Hypodermis. Die Anordnung kollagener Fasern in breite Bündel fehlt größtenteils. Die Fasern selbst lassen eine Aufsplitterung oder Fragmentierung erkennen. In der Zona papillaris finden sich neben knotenförmigen Anhäufungen plumper und kürzerer elastischer Fasern auch lange gestreckte, unregelmäßige Bündel ebenso beschaffenen Elastins. In der darunter gelegenen Dermis treten immer wieder einzelne oder gebündelte elastische Lamellen auf, die sich dann in der Zona reticularis zu breiten, regelmäßigen, plumpen Bündeln formieren. Die Grundsubstanz ist aufgelockert und ödematos. Eine Zunahme der sauren Mucopolysaccharide (MPS) ist nicht festzustellen. Die Hautanhangsgebilde sind unauffällig.

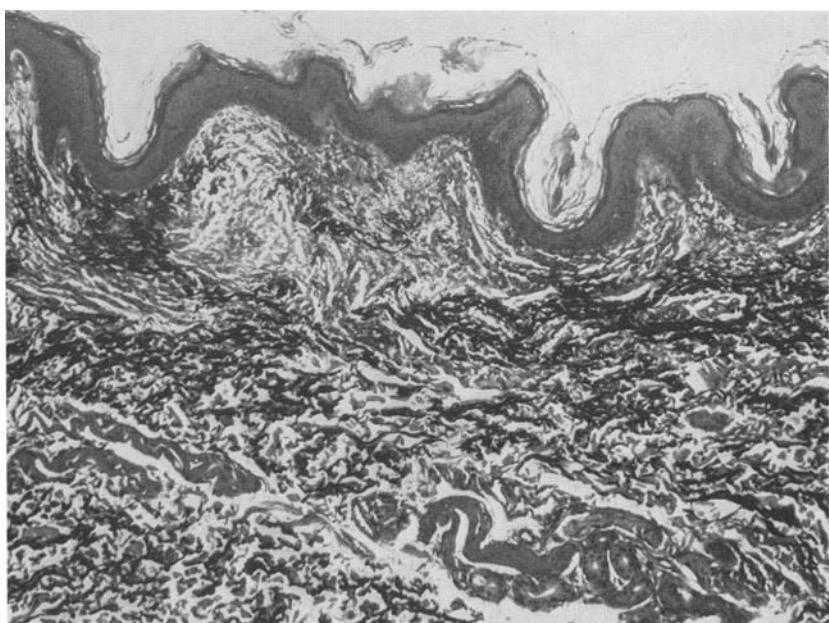
Auch die Aortenwand des Patienten ist gegenüber der der Kontrollperson deutlich im ganzen verschmälert. Das Gewebe ist lockerer gefügt, die Grundsubstanz (hier die sauren MPS) erscheint vermehrt, während Kollagen und Elastin im ganzen vermindert sein dürften. Immer wieder finden sich herdförmige ödematos Verquellungen der Grundsubstanz, wodurch die Media ein poröses Aussehen erlangt. In der Adventitia sind die Kollagenbündel kurz, aufgesplittet und im ganzen vermindert.

In der Nierenarterie (Abb. 2b), die wiederum an Dicke erheblich hinter der Kontrolle (Abb. 2a) zurücksteht, findet sich neben vermehrten, unregelmäßigen elastischen Lamellenbündeln in der Media der Hauptbefund in der Adventitia. Hier scheint nach der histologischen Untersuchung eine deutliche Verschiebung des Elastin-Kollagen-Gleichgewichts vorzuliegen, wobei Kollagen wiederum fragmentiert und unregelmäßig angeordnet ist. Die sauren MPS sind hier vermehrt.

Die *morphometrischen* Untersuchungen ergeben in der Haut eine scheinbare Abnahme des Kollagens in der Zona reticularis. Der Gehalt an Elastin ist hingegen in diesen Zonen deutlich erhöht. In der Aortenmedia findet man eine mäßige Abnahme des Kollagens und des Elastins gegenüber der Kontrolle. In der Adventitia schließlich ist die Kollagen-Elastinverschiebung wiederum deutlich. Auffallend ist auch eine dem histologischen Befund entsprechende Zunahme der Grundsubstanz. In der Media der Nierenarterie sind die Befunde weniger deutlich, während die Adventitia ein ähnliches Bild wie das in der Aorta bietet.

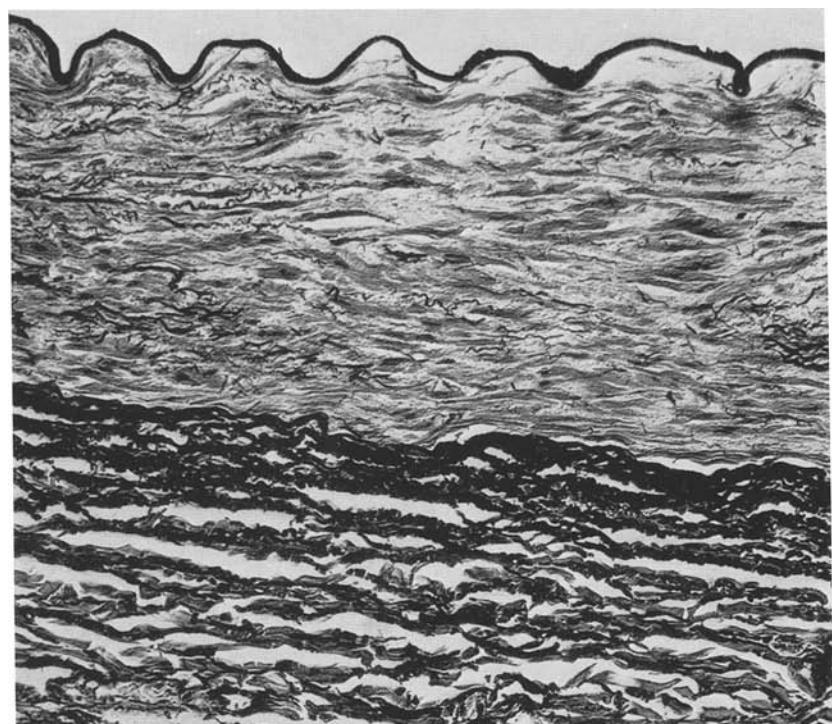


a

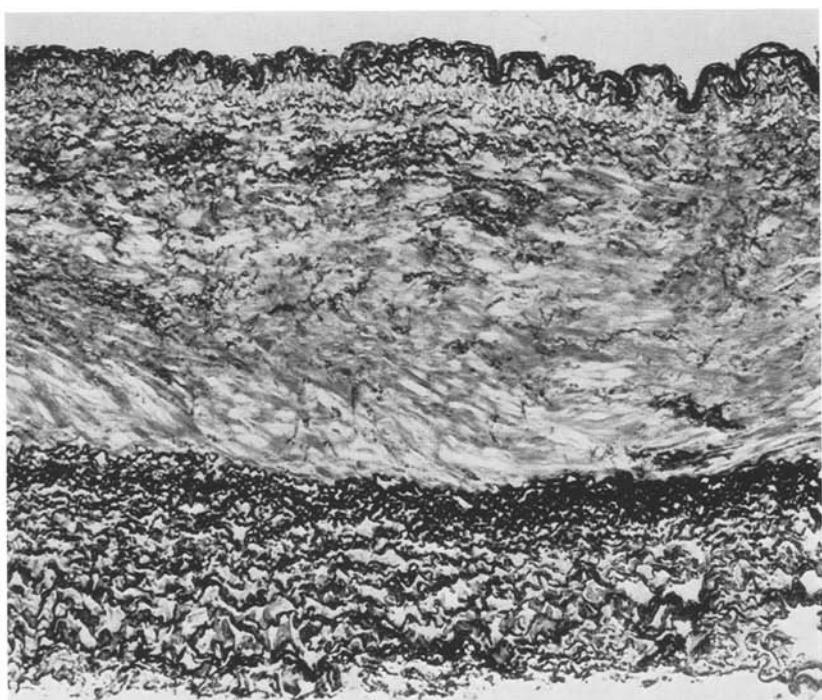


b

Abb. 1. a Gesunde, b EDS-Kniehaut. Neben einer dünneren Cutis und unregelmäßig angeordneten Kollagenfasern vermehrtes Vorkommen elastischer Lamellen, die in ungeordneten Bündeln bis zur Zona papillaris reichen. (HE-Elastica; 40:1) (Aufnahmen Derkks)



a



b

Abb. 2. a Gesunde, b EDS-Nierenarterie mit auffallend dünner Adventitia u. gehäuftem Vorkommen ungeordneter Bündel elastischer Lamellen in der Media (ESG 48:1)
(Aufnahmen Derk)

Die *elektronenmikroskopische* Untersuchung der Proben beschränkte sich wegen deren Provenienz (Sektionsmaterial) vorwiegend auf die Erfassung und Beurteilung der enthaltenen Skleroproteine. Dabei findet man, wie aus der Gegenüberstellung in Abb. 3 hervorgeht, oftmals anstelle kompakter Elastinlamellen unregelmäßige Anordnungen, die eine vorangegangene Fragmentierung des Elastins vermuten lassen (Abb. 3a). Befunde dieser Art sind allerdings keine Seltenheit und überall dort zu erheben, wo eine besondere Aktivität des Bindegewebes in Richtung Auf- und Abbau vorliegt. Des weiteren besitzt die sog. amorphe Elastinkomponente (Abb. 3b) eine im Vergleich zum Kontrollelastin grobkörnigere Struktur. Schließlich fällt auf, daß an der Peripherie des Kontrollelastins ein Besatz aus den sog. Mikrofibrillen (Greenlee, Ross, und Hartmann, 1966; Ross und Bornstein, 1969) vorliegt, während diese in Abb. 3b fehlen oder nur in den Zwischenräumen anzutreffen sind. Zum Teil sind diese Filamente durch anhaftende Partikel verdickt und auch sonst nicht unbedingt mit den sog. Mikrofibrillen identisch. Das Fehlen der Mikrofibrillen geht noch eindeutiger aus dem Vergleich in Abb. 4a und b hervor. Man erkennt hier nach Inkubation der Dünnschnitte mit Elastase infolge des teilweisen Abbaus des Elastins besonders eindrucksvoll in Abb. 4a einen dichten Besatz aus Mikrofibrillen, die sich zum Teil bis ins „Innere“ des Elastins verfolgen lassen, während in Abb. 4b Mikrofibrillen nur viel seltener anzutreffen sind. Aus Abb. 4a geht weiter hervor, daß am Kontrollelastin offenbar der enzymatische Abbau unvollständiger abließ als in Abb. 4b wiedergegeben und gleichzeitig gewissermaßen als Äquivalenzbild für die Längsstreifung in Abb. 3a in Abb. 4a parallel ausgerichtete Filamente anzutreffen sind. Im Unterschied hierzu findet man in Abb. 4b nur herdförmige Elastinreste, begleitet von mehr oder weniger großen Löchern.

Auch am Elastin der Nierenarterien findet man ähnliche Verhältnisse wie am Bindegewebe der untersuchten Hautproben. Einer Zerklüftung oder Fragmentierung der elastischen Lamellen der EDS-Arterien ist ein geringer oder gar fehlender Besatz mit Mikrofibrillen korreliert. Schließlich führt auch der enzymatische Abbau mit Elastase zu ähnlichen Befunden wie an den Hautproben. Im Unterschied zur Kontrollarterie und dem Kollagen aus den Hautproben unterliegt aber an der EDS-Arterie der Durchmesser der Kollagenfibrillen bereits auf kleinstem Raum großen Schwankungen mit Werten von 300—1800 Å. Auch findet man oftmals Fibrillen, die eine Aufweitung bzw. Auflockerung erkennen lassen (Abb. 5b), in der Art, wie sie auch bei der experimentellen Quellung zu finden ist (Nemetschek und Gansler, 1961). Die gelegentliche Beobachtung eines Abbaus kollagener Fibrillen aus der EDS-Haut und Arterienwand infolge der Elastaseeinwirkung am Dünnschnitt könnte mit einer solchen intrafibrillären Aufllockerung zusammenhängen. Natives Kollagen verliert nämlich mit zunehmender Desaggregierung an Resistenz auch gegenüber kollagenunspezifischen Proteasen.

Bei günstiger Schnittrichtung findet man ferner Bindegewebsebereiche, die ein scheinbares Verschmelzen gequollener Kollagenfibrillen mit Elastin erkennen lassen (Abb. 5a). Es handelt sich hierbei also *nicht* um eine Umwandlung von Kollagen in Elastin, sondern lediglich um eine zufällige Angleichung im Aussehen, die allerdings leicht dazu führen kann, gequollenes Kollagen irrtümlich für Elastin zu halten (Nemetschek und Gansler, 1961).

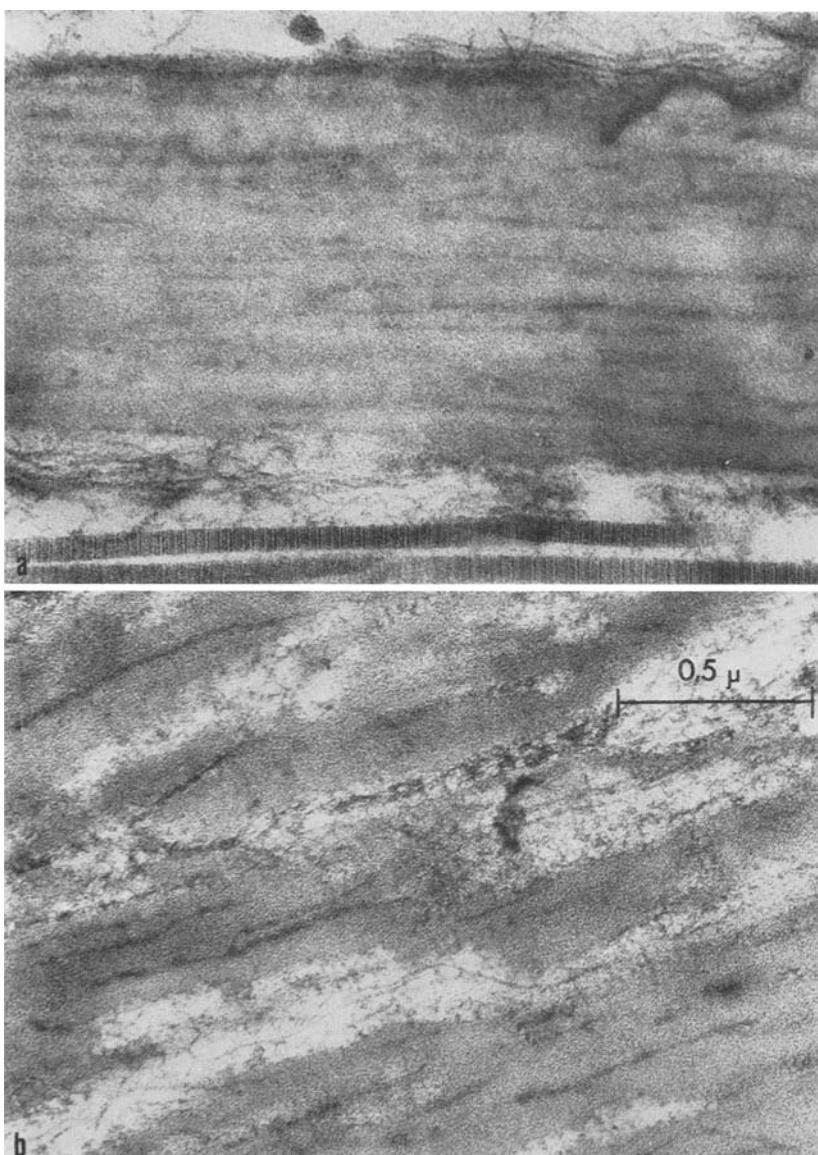


Abb. 3a u. b. Längsschnitte durch Elastin aus der Kniehaut. a gesunde, b EDS-Haut. Kontrastierung mit $\text{UO}_2\text{-Ac}$. und Pb-Hydroxo. Arch. Nr.: 1588/71 und 1577/71; el.opt.: 19000:1

Dieser Befund erscheint für die Beschreibung des vorliegenden Krankheitsgeschehens recht wichtig, da er insbesondere auf die Schwierigkeiten einer Differenzierung zwischen Kollagen und Elastin hinweist, sofern im Gewebe mit gequollenem Kollagen zu rechnen ist. Für einen solchen Fall liegt schließlich eine weitere Erschwernis auch darin, daß beim Versuch einer enzymchemischen

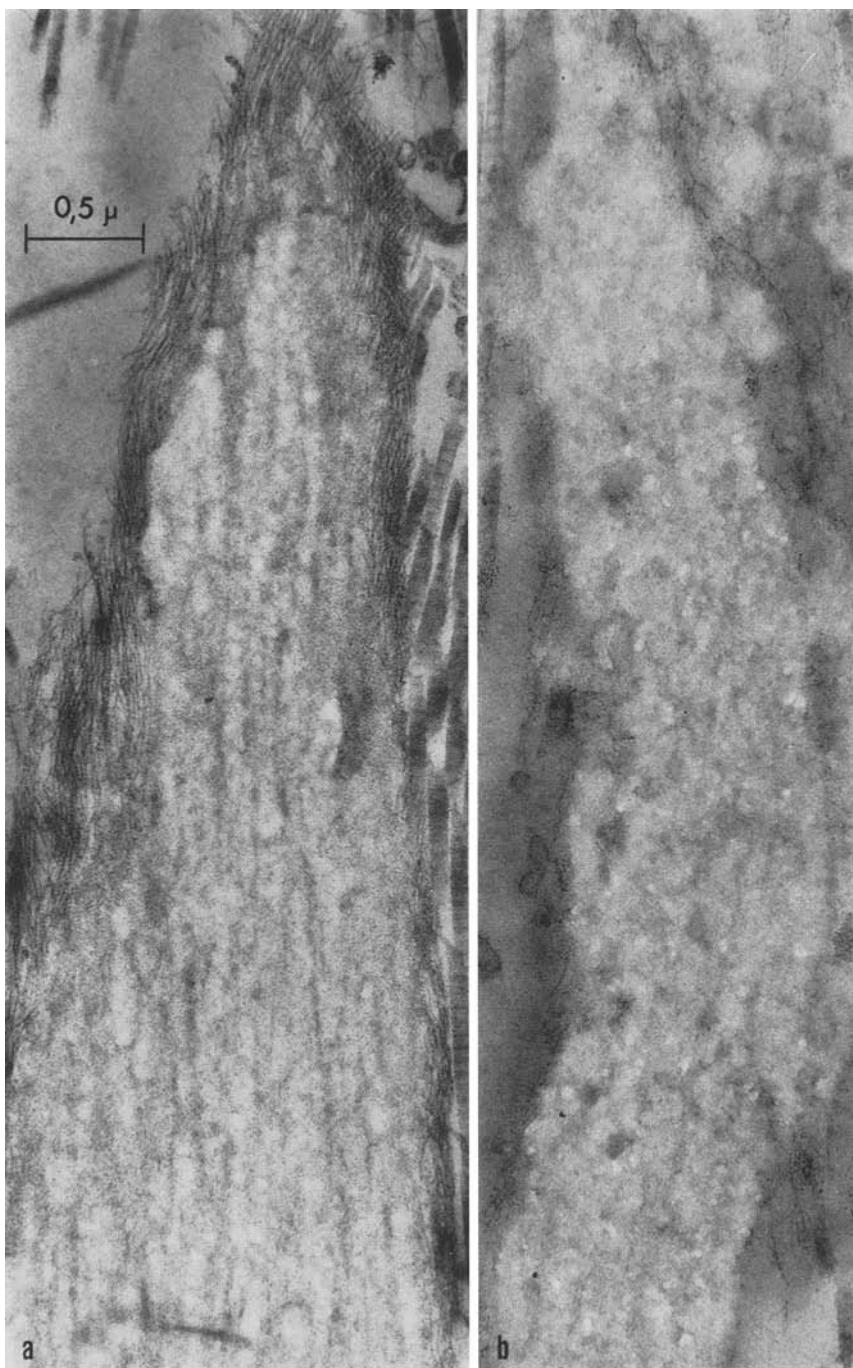


Abb. 4a u. b. Längsschnitte durch Elastin aus der Kniehaut nach Inkubation mit Elastase am Dünnschnitt. a gesunde, b EDS-Haut. Kontrastierung mit $\text{UO}_2\text{-Ac}$. und Pb-Hydroxo.
Arch. Nr.: 1590/71 und 1615/71; el.opt.: 10000:1

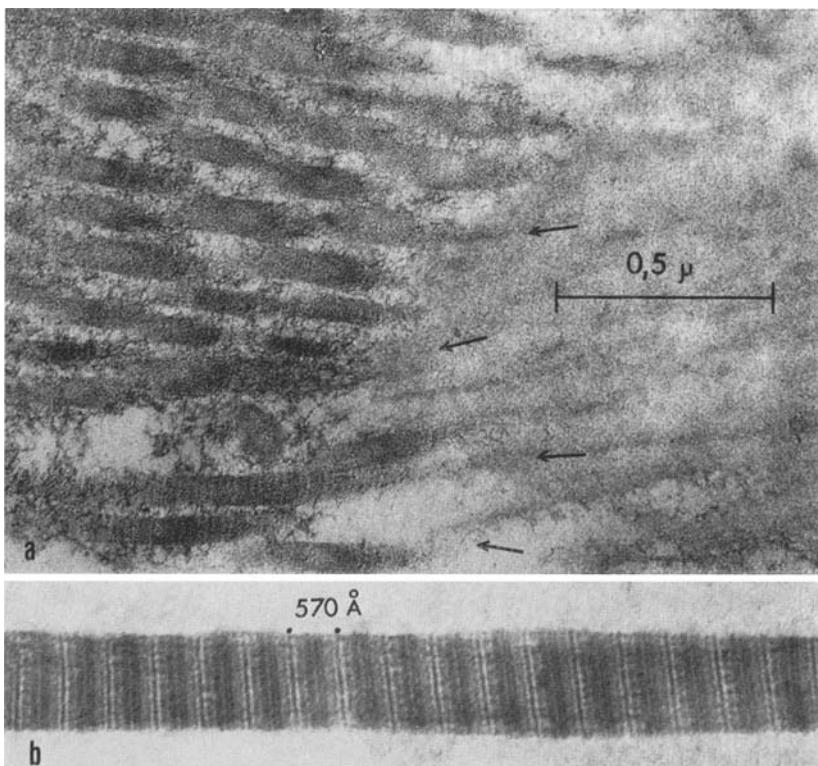


Abb. 5. a Scheinbares Verschmelzen (\uparrow) gequollener Kollagenfibrillen mit Elastin aus der EDS-Haut. Kontrastierung mit $\text{UO}_2\text{-Ac}$. und Pb-Hydroxo. b Ausschnitt einer Kollagenfibrille des gleichen Objektes. Man beachte das aufgelockerte Fibrillengefüge. Kontrastierung mit $\text{UO}_2\text{-Ac}$. und PWS. Arch. Nr.: 1913/71; el.opt.: 19000:1. 1923/71; el.opt.: 38000:1

Differenzierung damit zu rechnen ist, daß z. B. Elastase nicht nur Elastin, sondern auch aufgelockertes Kollagen abzubauen vermag. So ist auch zu verstehen, weshalb anhand der ermittelten Hydroxyprolinwerte (Tabelle 1) der Kollagengehalt der EDS-Hautproben gegenüber den Kontrollen erhöht ist, während nach histologischen Befunden eine Kollagenabnahme angegeben wird. Lediglich im Gewebe aus der EDS-Aorta liegt sowohl nach histologischen als auch chemischen Befunden ein gegenüber den Kontrollen erniedrigter Kollagengehalt vor. Für die Beurteilung des Kollagens ist noch die Beobachtung feinsten Filamente wichtig, die im Unterschied zur Kontrollhaut zwischen den Fibrillen aus der EDS-Haut nach $\text{UO}_2\text{-Ac}/\text{Pb-Hydroxo}$ -Kontrastierung anzutreffen sind (Abb. 5a). Auffälligerweise bleibt eine Darstellung dieser Filamente nach PWS-Kontrastierung aus. Hinsichtlich ihrer Affinität zu kationischen Schwermetallsalzen zeigen also diese Filamente Ähnlichkeit mit den von Greenlee, Ross und Hartman (1966) beschriebenen Mikrofibrillen. Im aldehydfixierten Zustand sind diese Filamente genauso wie die Mikrofibrillen gegen α -Chymotrypsin resistent, während die unfixierten Mikro-

Tabelle 1. Zusammenstellung der ermittelten Hydroxyprolin- und Kupfer-Werte der EDS-Gewebe und Kontrollen

Gewebeart	Hypro (mg/g TG)	Kollagen (mg/g TG)	Cu (μ g/g TG)
<i>Aorta</i>			
Kontrolle 1	33,9	253,8	29,0
Kontrolle 2	32,8	245,5	8,6
EDS-Probe	19,6	146,7	92,9
<i>Unterhaut</i>			
Kontrolle 1	29,7	222,3	20,7
Kontrolle 2	26,5	198,4	6,7
EDS-Probe	55,5	415,5	107,0
<i>Haut</i>			
Kontrolle 1	44,5	333,1	3,0
Kontrolle 2	41,2	308,4	5,7
EDS-Probe	64,2	480,6	25,9

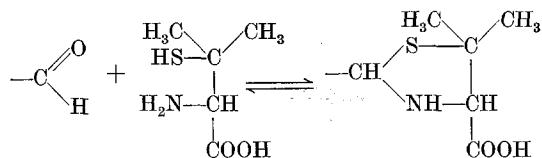
TG = Trockengewicht.

fibrillen von diesem Enzym abgebaut werden (Ross und Bornstein, 1969). Am vorliegenden Untersuchungsmaterial konnte deshalb keine enzymchemische Unterscheidung dieser fibrillären Elemente erfolgen. Sehr wahrscheinlich sind jedoch auch diese in ihrer chemischen Zusammensetzung von Elastin verschieden.

Abgesehen von der Anwesenheit gequollenen Kollagens im Bindegewebe der EDS-Haut und Nierenarterien, einer Vergesellschaftung mit feinsten Filamenten sowie einer Streuung des Fibrillendurchmessers, erscheint das fibrillär geordnete Kollagen sowohl nach morphologischen als auch nach röntgenographischen Kriterien normal. Das heißt im elektronenmikroskopischen Bild besitzen die Fibrillen eine aus mehreren Einzelstreifen zusammengesetzte Querstruktur und im Kleinwinkelröntgendiagramm die für natives Kollagen charakteristische Reflexfolge mit der 1. Ordnung bei $d = 660 \text{ \AA}$. Die Äquatorialreflexe im Weitwinkeldiagramm mit $d = 15 \text{ \AA}$ bestätigen den gequollenen Zustand des Kollagens. Die auf 570 \AA statt 650 \AA verkürzte Identitätsperiode der Fibrille in Abb. 5 b dürfte gleichfalls auf den gequollenen Zustand der Fibrille beruhen, wenngleich entsprechende Schwankungen auch präparationsbedingt sein können. Bemerkenswerterweise bleibt eine PWS-Einwirkung am Dünnschnitt ohne nennenswerten Einfluß auf das Querstreifenmuster, während die Kontrastierung mit $\text{UO}_2\text{-Ac}$. eine mit Abb. 5 b vergleichbare Quermusterung hervorbringt. Allerdings bewirkt die kombinierte $\text{UO}_2\text{-Ac}/\text{PWS}$ -Kontrastierung, wie in Abb. 5 wiedergegeben, eine Intensitätsfolge der Einzelstreifen, wie sie z. B. an Rattenschwanzkollagen ebenfalls nur nach einer kombinierten Kontrastierung hervorgeht. Daraus ist zu schließen, daß offenbar bei der direkten PWS-Einwirkung zum mindesten ein Teil der basischen Gruppen des Kollagens maskiert vorlag und erst nach der $\text{UO}_2\text{-Ac}$ -Kontrastierung zugängig wurde.

Diskussion

Das EDS ist eine generalisierte Mesenchymerkrankung mit Defekten in allen überwiegend mesenchymalen Geweben und Organen. Die Möglichkeit, Störungen in diesen mesenchymalen Geweben im Tierexperiment mit β -Aminopropionitril (BAPN), dem Wirkstoff der Süßerbse (*Lathyrus odoratus*) (Ponseti und Shepard, 1954; Doerr, 1960, 1970; Doerr u. Mitarb., 1960) oder durch Ernährung mit einer kupferarmen Diät (Carnes u. Mitarb., 1961; Shields u. Mitarb., 1961; O'Dell u. Mitarb., 1961; Carlton und Henderson, 1963; Simpson und Harms, 1964) hervorzurufen, trug viel zum Verstehen mesenchymaler Erkrankungen bei. Auch am Menschen wurden, wenn auch unfreiwillig, durch Langzeit-Therapie mit D-Penicillamin, einem Chelatbildner, Störungen der Integrität des Bindegewebes hervorgerufen (Beighton, 1970), die sich z. B. in einer erhöhten Verletzlichkeit der Haut der Patienten widerspiegeln. Tierexperimentell konnte ebenfalls gezeigt werden, daß unter der Wirkung von D-Penicillamin infolge eines Kupferentzuges aus dem Gewebe die Biosynthese von Desmosinen (Pinnell u. Mitarb., 1968; Franzblau u. Mitarb., 1970), wie auch die Biosynthese bestimmter Quervernetzungen am Kollagen (Nimni und Bavetta, 1965; Chvapil u. Mitarb., 1968; Deshmukh und Nimni, 1969; Bornstein, 1970) gestört ist. Darüber hinaus dürfte die Wirkung von D-Penicillamin auch in einer direkten Blockade der für die Vernetzung erforderlichen funktionellen Gruppen gemäß



bestehen und wahrscheinlich mit Lysinderivaten vom α -Amino-adipinsäure- δ -semialdehyd-Typ (s. Abb. 6) unter der Bildung eines Kollagen-Penicillaminkomplexes reagieren.

Nun wissen wir, daß die Funktion der in einem normalen Fibrocyten synthetisierten Bindegewebskomponenten erst durch die extracellulär ablaufenden Prozesse der Polymerisation und Vernetzung gewährleistet wird. Eine wichtige Stellung nehmen dabei Aldehydgruppen ein, die bei der extracellulären oxydativen Desaminierung der ϵ -Aminogruppen von Lysin und Hydroxylysin unter der Wirkung einer durch Cu^{2+} -Ionen aktivierten Lysyloxidase gemäß des in Abb. 6 aufgezeigten Reaktionsschema entstehen (Bornstein u. Mitarb., 1966; Bornstein und Piez, 1966; Siegel u. Mitarb., 1970). Diese tragen nun über Aldolkondensation zur Stabilisierung der Quartärstruktur von Kollagen bei und sind für die Ausbildung der die Elastinstruktur verfestigenden Desmosine verantwortlich (Thomas, Elsden und Partridge, 1963; Partridge, 1970). Es ist daher verständlich, daß sowohl Störungen im Cu-Haushalt als auch eine unmittelbare Hemmung der Lysyloxidase z. B. durch β -Aminopropionitril (Miller, Martin, Mecca und Piez, 1965; Miller und Fullmer, 1966; Bornstein, 1970) die Biosynthese stabilisierender Brückenbindungen am Kollagen und Elastin beeinflussen. Die Folge davon muß sein, daß sowohl Elastin als auch Kollagen hinsichtlich ihres Verfestigungsgrades auf einer niedrigeren Stufe gehalten werden als es dem tatsächlichen biologischen Alter entspricht. Damit verbunden wird sowohl das Quellungsver-

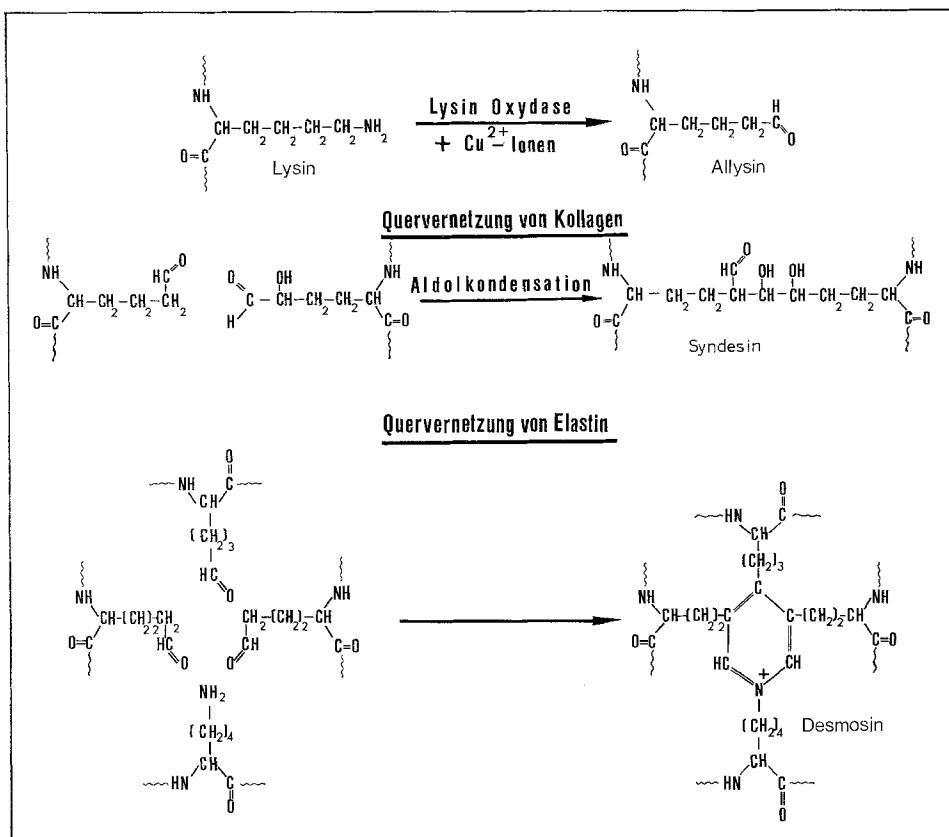


Abb. 6. Reaktionsmechanismus der enzymatisch gesteuerten oxydativen Desaminierung von Lysin und der über Aldolkondensation ablaufenden Vernetzung von Kollagen und Elastin

mögen als auch der Stoffwechsel dieser Bindegewebskomponenten bedeutend höher liegen als normalerweise bei einem erwachsenen Individuum (Beneke, 1971; Nemetschek, 1971).

In diesem Zusammenhang ist noch die klinische Beobachtung an Sklerodermiepatienten von Interesse, die über längere Zeit mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt wurden. Die Finger dieser Patienten zeigten nämlich eine Überdehnbarkeit, der histologisch eine Abnahme des Kollagengehalts korreliert zu sein schien bei unverändert gebliebenem Elastin gehalt (Scherbel, McCormack und Poppo, 1965). Nun ist bekannt, daß die Einwirkung von DMSO auf Kollagen eine Auflockerung des fibrillären Gefüges bewirkt, da es die Quartärstruktur von Kollagen stabilisierende Wasserassoziate stört und verdrängt (Nemetschek, 1969). Das über Desmosin stabilisierte Elastin ist nicht quellfähig und erfährt daher keine entsprechende Beeinflussung durch DMSO. Allerdings muß damit gerechnet werden, daß die über hydrophobe Wechselwirkung stabilisierte Primärstruktur von Elastin durch DMSO erheblich gestört wird.

Es ist wahrscheinlich, daß die gröbere Körnigkeit der in Abb. 3 b wiedergegebenen Elastinfragmente aus der EDS-Haut ebenso wie die Fragmentierung

selbst auf einer unvollständigen oder gestörten Vernetzung des Elastins beruhen. Entsprechend ist der Lysingehalt des EDS-Elastins höher als in der Kontrolle, was für eine gestörte Desmosinbildung sprechen dürfte.

Die Quellung des Kollagens schließlich ist sicher auf eine geringe oder herabgesetzte intermolekulare Stabilisierung der Fibrillen zurückzuführen. Dementsprechend ist es auch verständlich, daß beim EDS genauso wie bei den hier angegebenen tierexperimentellen Bedingungen die Menge des neutralsalzlöslichen Kollagens erhöht ist (Harris und Sjoerdsma, 1966 b). Der auch von uns gefundene erniedrigte Gesamtgehalt an Kollagen in der Aortenwand ist hiermit ebenfalls in Einklang, ohne daß aber notwendigerweise der erhöhte Kollagengehalt in der EDS-Haut (Tabelle 1) hierzu im Widerspruch zu stehen braucht. Es wäre nämlich denkbar, daß in der EDS-Haut der Anteil des neutralsalzlöslichen Kollagens höher war als in der Kontrollhaut, so daß für das fibrillär geordnete Kollagen in Übereinstimmung mit dem histologischen Befund ein erniedrigter Wert gefunden worden wäre. Die Unterscheidung zwischen löslichem und unlöslichem Kollagen war jedoch am bereits formolfixierten Material chemisch nicht mehr möglich.

Im Tierexperiment infolge Cu-Mangel unvernetzt gebliebenes Elastin ist ebenfalls löslich und konnte von Sandberg u. Mitarb. (1969) aus Schweinearten isoliert werden. Diese als Tropoelastin bezeichnete Komponente besitzt einen relativ hohen Gehalt an Lysin und einen geringen Gehalt an Desmosin und entspricht einem jugendlichen Elastin. Mit ansteigendem Alter des Wirtindividuums nimmt nämlich der Desmosingehalt zu, während gleichzeitig der Gehalt an Lysin um eine äquivalente Menge sinkt (Miller, Martin und Piez, 1964).

Eine weitere Abhängigkeit vom Cu-Gehalt des Gewebes wird im Zusammenhang mit der Aktivität des Elastase-inhibitor-Systems (EI) diskutiert (Beighton, 1970) und konnte bereits von Carnes u. Mitarb. (1961) durch einen erniedrigten EI-Spiegel bei mit Cu-Mangeldiät aufgezogenen Tieren nachgewiesen werden. Diese Tiere zeigten auch Aortenaneurysmen, deren Auftreten von Carnes u. Mitarb. (1961) als ein Hinweis auf eine erhöhte Elastolyse gedeutet wird. Beim EDS fanden Hall u. Mitarb. (1955) sowie Goltz und Hult (1965) erhöhte EI-Spiegel, während aber der EI-Spiegel bei den von Beighton (1970) untersuchten Patienten normal war.

Ein erhöhter EI-Spiegel könnte als Überkompensation auf eine extrem gesteigerte Elastolyse verstanden werden (Bangs, 1966).

Während nun Goltz und Hult (1965) bei drei EDS-Patienten normale Kupfer-Coeruloplasminwerte im Serum fanden, ist der Gehalt der von uns untersuchten EDS-Haut und Aorta an Kupfer gegenüber gleichaltrigen Kontrollen, wie aus der Tabelle 1 zu erscheinen, signifikant erhöht. Daraus könnte auf eine blockierte Freisetzung des Kupfers in den Geweben geschlossen werden, die allerdings nicht zwangsläufig mit einem erhöhten Kupfer-Coeruloplasminspiegel im Serum einhergehen müßte. Als Bindungsort für das Kupfer könnten unter speziellen Voraussetzungen eventuell aufgeweitete Kollagenfibrillen dienen. Diese zunächst rein spekulative Annahme findet eine Parallele in der Bindung von Ca^{2+} -Ionen am Kollagen. Es konnte nämlich wahrscheinlich gemacht werden, daß diese Ionen benachbarte COO^- -Gruppen über Brückenbindungen vernetzen und dabei fest in die Kollagenstruktur eingebaut werden (Nemetschek und Gansler, 1961). Im Sinne dieser Annahme würde auch sprechen, daß die Radian dieser Ionen un-

gefähr gleich groß sind und somit ähnliche sterische Bedingungen vorliegen. Die Richtigkeit dieser Hypothese soll im Experiment überprüft werden.

Eine blockierte Freisetzung des Kupfers oder Bindung an Kollagen würde, wie bereits erwähnt, die Umwandlung der ϵ -Aminogruppen von Lysin und Hydroxylysin in Aldehydgruppen und somit die Biosynthese kovalenter Vernetzungen stören. Eine hierdurch bedingte Schwächung elastischer Lamellen und Quellung von Kollagen würde unsere morphologischen Ergebnisse erklären und die klinischen Erscheinungen des EDS verständlich machen. Bekanntlich bewirkt vor allem Elastin das elatische Verhalten einer unter Spannung gesetzten Haut, während das Netzwerk aus Kollagenfasern dabei nur leicht verformt wird. Die auffällige Überdehnbarkeit der EDS-Haut sowie die Neigung zu Gefäßrupturen führen wir deshalb primär auf ein Fehlverhalten von Elastin zurück, das sich manifestiert in 1. einer verminderten Festigkeit und 2. einer schlechten bzw. gestörten Verankerung der Lamellen im Gewebe.

Im Gegensatz hierzu soll nach Grahame (1970) die Elastizitätseigenschaft der Haut durch den Kollagengehalt bedingt sein, weshalb er seine Ergebnisse an der EDS-Haut im Sinne eines Schadens im Kollagenaufbau interpretiert und dabei der Ansicht Jansens (1955), der in diesem Zusammenhang von einem defekten Kollagennetzwerk spricht, folgt.

Punkt 1 wird gestützt durch die Beobachtung einer auffälligen Fragmentierung des Elastins und einer verminderten enzymatischen Resistenz im Vergleich zu den Lamellen aus gesundem Gewebe.

Zur Untermauerung von Punkt 2 werden elektronenmikroskopische Aufnahmen vor und nach Elastaseinkubation herangezogen, aus denen hervorgeht, daß den Elastinfragmenten aus dem EDS-Gewebe in der Regel der für das Kontrollelastin charakteristische periphere Besatz aus den sog. Mikrofibrillen fehlt. Hieraus ergibt sich zwangsläufig, daß die Verankerung des Elastins im EDS-Gewebe gestört sein muß. Das Fehlverhalten elastischer Lamellen findet schließlich auch eine Erklärung im niedrigeren Vernetzungsgrad. Während der Zugbeanspruchung des EDS-Gewebes aus der Haut oder einer Gefäßwand müßten somit die elastischen Lamellen wegen fehlender Verankerung eine gleitende Verschiebung erfahren und hierdurch, selbst bei ungestörter Festigkeit, eine stärkere Nachgiebigkeit des Gewebes verursachen als normalerweise. Eine Rückverformung wird nur solange zu erwarten sein, bis durch einsetzende Fragmentierung ein elastisches Verhalten der Lamellen mehr und mehr verloren geht. Parallel hierzu dürfte auch die Gefahr eines Reißens sowohl der Haut als auch der Gefäßwand ansteigen. Diese Vorgänge werden weiter durch eine stellenweise auftretende Quellung des Kollagens begünstigt, wodurch sicherlich auch die Zugfestigkeit dieser Fibrillen beeinträchtigt ist. Allerdings muß die naheliegende Frage, ob hierdurch auch ein Reißen einzelner Kollagenfibrillen wahrscheinlich wird, unbeantwortet bleiben, da eine solche Beweisführung sehr schwierig sein dürfte.

Herrn Prof. Dr. K. Kühn, München, danken wir für die Aminosäurenanalysen. Fräulein E. M. Finze, Fräulein I. Rochell und Herrn cand. chem. R. Rensch danken wir für ihre Mitarbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Bereitstellung von Sachbeihilfen.

Literatur

- Banga, I.: Structure and function of elastin and collagen, p. 54—59. Budapest: Akadémia Kiadó 1966.
- Beighton, P.: The Ehlers-Danlos syndrome. London: W. Heineman Medical Books 1970 (dort ältere Literatur).
- Beneke, G.: Altersabhängige Veränderungen des Kollagens und der Bindegewebszellen. In: Altern und Entwicklung, Bd. III, 1-37. Stuttgart-New York: Schattauer 1971.
- Bornstein, P.: The crosslinking of collagen and elastin and its inhibition in osteolathyrism. Amer. J. Med. **49**, 429—435 (1970).
- Kang, A. H., Piez, K. A.: The nature and localisation of intermolecular crosslinks in collagen. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **55**, 417 (1966).
 - Piez, K. A.: The nature of the intramolecular crosslinks. The separation and characterization of peptides from the crosslink region of rat skin collagen. Biochemistry **5**, 3460 (1966).
 - Carlton, W. W., Henderson, W.: Cardiovascular lesions in experimental copper deficiency in chickens. J. Nutr. **81**, 200 (1963).
 - Carnes, W. H., Shields, G. S., Cartwright, G. E. Wintrobe, N. M.: Vascular lesions in copper deficient swine. Fed. Proc. **20**, 118—130 (1961).
 - Chvapil, M., Hurých, J., Ehrlichová, E.: Effect of long term in vivo application of phenanthroline, penicillamine and further chelating agents on the synthesis of collagenous and non-collagenous proteins in fibrotic liver and wound granulation tissue. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **349**, 218—222 (1968).
 - Coulson, W. F., Carnes, W. H.: Mechanical properties of aortas from swine on a copper-deficient diet. Lab. Invest. **11**, 674 (1962).
 - Deshmukh, K., Nimni, M. E.: A defect in the intramolecular and intermolecular crosslinking of collagen caused by penicillamine. J. biol. Chem. **244**, 1787 (1969).
 - Doerr, W.: Experimenteller Lathyrismus. Verh. dtsch. Ges. Path. **44**, 145—149 (1960).
 - Allgemeine Pathologie der Organe des Kreislaufs. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. III, Teil 4, S. 550—555. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970.
 - Rossner, A. J., Schreil, W.: Experimentelle Mesenchymschäden durch *Lathyrus odoratus*. Langenbecks Arch. klin. Chir. **294**, 426—449 (1960). - Franzblau, C., Faris, B., Lent, R. W., Salcedo, L. L., Smith, B., Jaffe, R., Crombie, G.: Chemistry and biosynthesis of crosslinks in elastin. In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix, ed. E. A. Balazs, vol. 1, p. 617—639. London-New York: Academic Press 1970.
 - Goltz, R. W., Hult, A. M.: Generalised elastolysis (*cutis laxa*) and Ehlers-Danlos syndrome (*cutis hyperelastic*). Sth med. J. (Bgh., Ala.) **58**, 848—854 (1965).
 - Grahame, R.: Physical properties of the skin in Ehlers-Danlos syndrome. In: P. Beighton, The Ehlers-Danlos syndrome, p. 151—155. London 1970.
 - Greenlee, T. K., Jr., Ross, R., Hartman, J. L.: The fine structure of elastic fibers. J. Cell Biol. **30**, 59 (1966).
 - Hall, D. A., Keech, K. M., Reed, R., Saxl, H., Turnbridge, R. E., Wood, M. J.: Collagen and elastin in connective tissue. J. Geront. **10**, 388—401 (1955).
 - Harris, E. D., Sjoerdsma, A.: Collagen profile in various conditions. Lancet **1966 IIa**, 707—711.
 - — Effect of penicillamine on human collagen and its possible application to treatment of scleroderma. Lancet **1966 IIb**, 996—999. - Heilmann, K., Kolig, G.: Nierenarterienruptur bei Ehlers-Danlos-Syndrom. Z. Kreisl.-Forsch. **60**, 519—533 (1971).
 - Hergreberg, G. A., Padgett, G. A., Henson, J. B.: Connective tissue disease of dogs and minks resembling Ehlers-Danlos syndrome. Arch. Path. **90**, 159—167 (1970).
 - Jansen, L. H.: The structure of the connective tissue, an explanation of the Ehlers-Danlos syndrome. Dermatologica (Basel) **110**, 108—120 (1955).

- Julkunen, H.: Ehlers-Danlos syndrome with bone changes. *Med. intern. Fenn.* **54**, 99—103 (1965).
- Mason, P., Rigby, B. J.: Ehlers-Danlos syndrome: Physical and biochemical aspects. *Arch. Path.* **80**, 363—364 (1965).
- McFarland, W., Fuller, D.: Mortality in Ehlers-Danlos syndrome due to spontaneous rupture of large arteries. *New Engl. J. Med.* **271**, 1309—1310 (1964).
- McKusick, V. A.: Heritable disorders of connective tissue, 3rd ed., p. 179—229. St. Louis: C. V. Mosby 1966.
- Miller, E. J., Fullmer, H. M.: Elastin: Diminished reactivity with aldehyde reagents in copper deficiency and lathyrism. *J. exp. Med.* **123**, 1097—1108 (1966).
- Martin, G. R., Mecca, Ch. E., Piez, K. A.: The biosynthesis of elastin crosslinks. The effect of copper deficiency and lathyrogen. *J. biol. Chem.* **240**, 3623—3627 (1965).
- — Piez, K. A.: The utilization of lysine in the biosynthese of elastin crosslinks. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **17**, 248 (1964).
- Nemetschek, Th.: Intermolekulare Abläufe am Kollagen. Einfluß wässriger Lösungen. *Virchows Arch. B* **2**, 255—264 (1969).
- Altersabhängige Abläufe am Kollagen. In: Altern und Entwicklung, Bd. III, S. 38—68. Stuttgart-New York: Schattauer 1971.
- Gansler, H.: Quellung von Kollagen: Reaktionen mit anorganischen und organischen Ionen. *Z. Naturforsch.* **16b**, 496—509 (1961).
- Nimni, M. E., Bavetta, L. A.: Collagen defect induced by penicillamine. *Science* **150**, 905 (1965).
- Nordschow, C. D., Marsolais, E. B.: Ehlers-Danlos syndrome. *Arch. Path.* **88**, 65—69 (1969).
- O'Dell, B. L., Hardwick, B. C., Reynolds, G., Savage, J. E.: Connective tissue defect in the chick resulting from copper deficiency. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **108**, 402—415 (1961).
- Partridge, S. M.: Isolation and characterisation of elastin. In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix, ed. Balazs, E. A., vol. 1, p. 593. London-New York: Academic Press 1970.
- Pinnell, S. R., Martin, G. R., Miller, E. J.: Desmosine biosynthesis. Nature of inhibition by D-penicillamine. *Science* **161**, 475—476 (1968).
- Ponseti, J. V., Shephard, R. S.: Lesions of the skeleton and of other tissues in rats fed sweet peas. (*Lathyrus odoratus* seeds.) *J. Bone Jt Surg. A* **36**, 1031—1052 (1954).
- Ross, R., Bornstein, P.: The elastic fiber: The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J. Cell Biol.* **40**, 366 (1969).
- Rubinstein, M. K., Cohen, N. H.: Ehlers-Danlos syndrome with multiple intracranial aneurysms. *Neurology (Minneapolis)* **14**, 125—132 (1964).
- Rybka, F. J., O'Hara, E. T.: Surgical significance of the Ehlers-Danlos syndrome. *Amer. J. Surg.* **113**, 431—445 (1967).
- Sandberg, L. B., Weissman, N., Smith, D. W.: The purification and partial characterization of a soluble elastin-like protein from Cu-deficient porcine aorta. *Biochemistry* **8**, 2940 (1969).
- Scherbel, A. L., McCormack, L. J., Poppe, M. J.: Alteration of collagen in generalized scleroderma after treatment with dimethyl sulfoxide. *Cleveland Clin. Quart.* **32**, 47—56 (1965).
- Selliseth, N. E.: Dental conditions in a patient with Ehlers-Danlos syndrome. *Acta odont. scand.* **23**, 91—99 (1965).
- Shields, G. S., Carnes, W. H., Cartwright, G. E., Wintrobe, M. M.: The dietary induction of cardiovascular lesions in swine. *Clin. Res.* **9**, 62 (1961).
- Siegel, R. C., Martin, G. R.: Collagen crosslinking. *J. biol. Chem.* **245**, 1653 (1970).
- Simpson, C. F., Harms, R. H.: Pathology of the aorta of chicks fed a copper deficient diet. *Exp. molec. Path.* **3**, 390 (1964).
- Stegemann, H.: Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-Dimethylaminobenzaldehyd. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **311**, 41—45 (1958).

- Thomas, J., Elsden, D. F., Partridge, S. M.: Partial structure of two major degradation products from the crosslinkages in elastin. *Nature (Lond.)* **200**, 651 (1963).
- Turnbridge, R. D., Tattersall, R. N., Hall, D. A., Astbury, W. T., Reed, R.: Fibrous structure of normal and abnormal human skin. *Clin. Sci.* **11**, 315—323 (1952).
- Unna, P. G.: The histopathology of the diseases of the skin, p. 984—988. New York: The Macmillan Co. 1896.
- Varadi, D. P., Hall, D. A.: Cutaneous elastin in Ehlers-Danlos syndrome. *Nature (Lond.)* **208** 1224—1225 (1965).
- Wechsler, H. L., Fisher, E. R.: Ehlers-Danlos syndrome. *Arch. Path.* **77**, 613—619 (1964).
- Williams, A. W.: Cutis laxa. *M. H. Derm.* **14**, 490—501 (1892).

Dr. K. Heilmann
Institut für Allgemeine Pathologie und
Pathologische Anatomie
Priv.-Doz. Dr. Th. Nemetschek
Arbeitsgruppe für Ultrastrukturforschung
Dr. A. Völkl
Institut für Pathochemie
D-6900 Heidelberg 1
Postfach 1368
Berliner Str. 5
Deutschland

Berichtigung

zu der Arbeit HÜBNER, G., KLEINSASSER, O., KLEIN, H. J.: Zur Feinstruktur der Basalzelladenome der Speicheldrüsen. Ein Beitrag zur Zelldifferenzierung in Speicheldrüsengeschwülsten

Virchows Arch. Abt. A **353**, 333—346 (1971)

S. 340/341 „Diskussion der Befunde“. Der Seitenanschluß muß richtig heißen: Die meisten Geschwulstzellen enthalten nur spärliche Zellorganelles sowie Einschlüsse von Lipopigment und Glykogen. Einzelne Geschwulstzellen sind vollgestopft mit vergrößerten teilweise verformten Mitochondrien; zweifellos handelt es sich hier um onkocytär umgewandelte Tumorzellen (Hamperl, 1931; Hübner u. Mitarb., 1967; Übersicht bei Tandler u. Mitarb., 1970).

Prof. Dr. G. Hübner
Pathologisches Institut der Universität Köln
D-5000 Köln 41, Josef Stelzmann-Str. 9
Deutschland