

Biochemie des Bindegewebes

Von Priv.-Doz. Dr. E. BUDDECKE

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen

Um die physiologischen und pathologischen Funktionen des Bindegewebes verstehen zu können, sind Untersuchungen über seine chemische Zusammensetzung erforderlich. Wesentliche Bauelemente des Bindegewebes sind die Eiweißkörper Kollagen und Elastin sowie die polymeren, aminozucker-haltigen Kohlenhydrate. Dadurch ergibt sich eine enge Verknüpfung mit den Problemen der Chemie und des Stoffwechsels von Faserproteinen und Polysacchariden. Die Übersicht zeigt, daß zwischen den gesicherten Teilbefunden zur Chemie und zum Stoffwechsel des Bindegewebes und den Vorstellungen über die chemischen Grundlagen seiner pathologischen Veränderungen noch erhebliche Lücken zu schließen sind.

Einleitung

Die chemische Untersuchung des Bindegewebes hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Erkenntnis, daß dem Bindegewebe entgegen der hergebrachten Auffassung nicht nur rein mechanische Funktionen als Füll- oder Stützgewebe zwischen den Organen der höher differenzierten Lebewesen zukommen, sondern daß es zugleich morphologisches Substrat bedeutsamer physiologischer Phänomene ist — z. B. der Alterungsvorgänge, der Wundheilung, des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes —, hat die Biochemie zu umfangreichen Untersuchungen veranlaßt. Das Interesse der Medizin an der chemischen Anatomie des Bindegewebes geht darauf zurück, daß das Bindegewebe als funktionelle Einheit Sitz von Systemerkrankungen ist, zu denen z. B. der Rheumatismus, die sogenannten „Kollagenkrankheiten“ (Kollagenosen) und bestimmte generalisierte Erkrankungen des Blutgefäßsystems, u. a. auch die Arteriosklerose, gehören. Den Schlüssel für ein tieferes Verständnis dieser pathologischen Vorgänge bilden naturgemäß Kenntnisse über den chemischen Bau des Bindegewebes und seinen speziellen Stoffwechsel sowie vor allem über die den Erkrankungen zugrunde liegenden chemischen Reaktionsketten.

Das Bindegewebe durchzieht mehr oder weniger kontinuierlich den ganzen Organismus, verbindet oder unterteilt einzelne Organe als Stütz- und Gerüstwerk, kann aber auch in speziellen Formen (Sehnen, Knorpel, Knochen, Hornhaut des Auges, Blutgefäßsystem) auftreten. Die Funktionseinheit der verschiedenen Bindegewebstypen ergibt sich daraus, daß sie alle einem undifferenzierten Grundtyp — dem embryonalen Bindegewebe (Mesenchym) — entstammen und im Laufe der Ontogenese über verschiedene Entwicklungsstufen einen bestimmten funktionsspezifischen Differenzierungsgrad erreichen. Bei aller Vielfalt der morphologischen Erscheinungsformen läßt sich in jedem Bindegewebe eine immer wiederkehrende typische Grundkonstruktion erkennen, die auf drei in sehr variablem Mengenverhältnis beteiligten Bausteinen beruht (s. Abb. 1 sowie Farbtabelle nach S. 668):

1. Die zellulären Elemente (Fibroblasten), die das Bindegewebe aufbauen und erneuern. Sie sind verantwortlich für die Bildung der nicht zellulären Bindegewebsbestandteile. Spezielle Zellformen sind Makrophagen (Histiozyten) und Mastzellen (Heparinozyten). Quantitativ treten die zellulären Elemente gegenüber den anderen Bestandteilen zurück.
2. Kollagene und elastische Fasern bilden als fibrilläre Elemente ein dreidimensionales Netzwerk, dessen Struktur und Ausrichtung für die einzelnen Bindegewebsformen typisch ist.
3. Die strukturlose Grundsubstanz (Kittsubstanz) bildet eine Matrix von gelartiger Beschaffenheit, in die Fasern und Zellen eingebettet sind.

Es empfiehlt sich, diese morphologische Einteilung des Bindegewebes in verschiedene Bauelemente auch bei einer chemischen Betrachtung zu beachten. Abb. 1 soll die Beziehung zwischen morphologischer Erscheinungsform und der chemischen Grundstruktur herstellen. Dabei ergibt sich, daß die einzelnen Bindegewebsbestandteile ganz verschiedenen chemischen Stoffklassen angehören: Die Fibroblasten (Bindegewebszellen) stellen ein komplexes Sys-

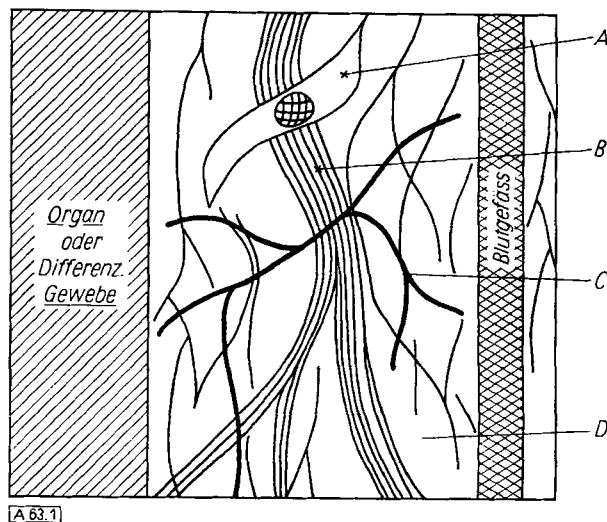


Abb. 1

	Morphologie	Chemie
A	Bindegewebszelle (Fibroblast)	Chemisch heterogenes System mit Baubestandteilen aus allen biogenen Stoffklassen. Enzym-Ausstattung für Biosynthese und Stoffumsatz im Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Lipid-Stoffwechsel.
B	Kollagene Faser spez. Färbbarkeit, charakt. Röntgeninterferenz (650-700 Å), elektronenoptisch: Querstreifung	Kollagen: zu Skleroproteiden gehörendes Faserprotein. Hauptbestandteile: Hydroxyprolin, Prolin, Glycin. 0,5 % Kohlenhydrate. Unlöslich in verdünnten Säuren und Alkalien.
C	Elastische Faser spez. Farbreaktionen, keine Achsenperiodizität	Elastin: zu Skleroproteiden gehörendes Faserprotein. Hauptbestandteile: Aminosäuren (uncharakt. Aminosäurespektrum mit Vorwiegen apolarer Aminosäuren). Unlöslich in verdünnten Säuren und Alkalien.
D	Strukturlose Grundsubstanz lichtoptisch „leer“, z. T. metachromatisch färbbar.	Glykoproteide (und Proteine). Eiweiß-Polysaccharid-Komplexe mit neutralen und anionischen Polysacchariden (neutralen und sauren Mucopolysacchariden) als prosthetischen Gruppen. Hauptbestandteile der Mucopolysaccharide: Aminozucker, Uronsäuren. Neutralzucker, Sulfat, Acetat.

Abb. 1. Schema eines „idealisierten“ Bindegewebes. Beziehungen zwischen Morphologie und Chemie. Siehe auch Farbtabelle nach S. 668.

stem nahezu aller biogenen organischen Verbindungen dar. Da sie gleichzeitig Träger der synthetischen Leistungen des Bindegewebes sind, werden sie bei den Erörterungen über den Stoffwechsel des Bindegewebes von Bedeutung sein (siehe Abschnitt 4). Der chemische Bau der kollagenen und elastischen Fasern berührt dagegen Probleme der Struktur und chemischen Zusammensetzung von Faser

proteinen. Die Chemie der Grundsubstanz ist eng mit der Biochemie hochpolymerer Kohlenhydrate verknüpft.

Die folgende Übersicht stellt das Thema unter verschiedenen Aspekten dar: Nach der deskriptiven Chemie der Bausteine des Bindegewebes werden Stoffwechselvorgänge einschließlich der Biosynthese behandelt und schließlich werden medizinische Probleme des Bindegewebes und seiner Erkrankungen besprochen. Es entspricht der Bedeutung des Themas, daß in den letzten Jahren zusammenfassende Darstellungen über Teilprobleme in deutscher¹⁻⁴⁾ und englischer⁵⁻⁸⁾ Sprache erschienen sind.

Chemie der Faserproteine des Bindegewebes

I. Kollagen

Chemische und physikochemische Untersuchungen hochgereinigter („kristalliner“) Kollagene verschiedener Herkunft haben die Proteinatur des Kollagens erwiesen und gezeigt, daß Kollagen bezüglich seiner Aminosäurezusammensetzung, seiner makromolekularen Struktur und seiner Löslichkeit besondere Charakteristika aufweist.

a) Aminosäurezusammensetzung

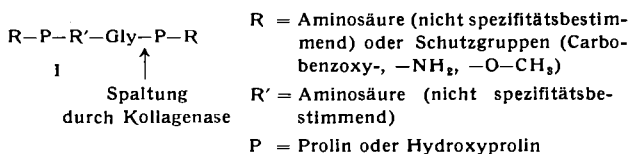
Die Aminosäurezusammensetzung⁹⁾ auf Grund neuerer Analysen ist in Tabelle 1 im Auszug wiedergegeben. Das ungewöhnliche Aminosäurespektrum des Kollagens zeigt sich in dem hohen Gehalt an Hydroxyprolin, der für Kollagen typisch ist und zu seiner quantitativen Bestimmung^{10,11)} ausgenutzt werden kann, ferner in dem hohen Prolin- und Glycinanteil. Bemerkenswert ist das vollständige Fehlen von Cystin, der niedrige Anteil von aromatischen Aminosäuren und das Vorhandensein von Hydroxy-

lysin.

In carbamidischer Bindung verknüpft bilden die Aminosäuren des Kollagens langgestreckte Peptidketten (Länge etwa 3000 Å, Durchmesser etwa 15 Å) mit einem Molekulargewicht von etwa 340 000–360 000^{12,13)}. Freie Aminoendgruppen und endständige Carboxyle lassen sich im Kollagen nicht nachweisen^{14,15)}. Das bedeutet, daß die Peptidketten sehr lang sein müssen und wahrscheinlich als endlose Molekülketten die Faser in ihrer gesamten Länge durchziehen.

Die Arbeiten über die Aminosäuresequenz sind noch nicht abgeschlossen. Die besondere Schwierigkeit liegt darin, daß natives Kollagen enzymatisch nur von den Kollagenasen abgebaut wird. Diese proteinspaltenden Enzyme werden von Mikroorganismen (*Clostridium histolyticum*, *Clostridium Welchii*) gebildet. Die Resistenz des Kollagens gegenüber anderen proteolytischen Enzymen hängt vermutlich damit zusammen, daß das Kollagen über Aminosäuresequenzen verfügt, die in anderen Proteinen nicht vorkommen. Andererseits hat die ausgeprägte Spezifität der Kollagenase gegenüber Kollagen (und der aus Kollagen gebildeten Gelatine) den Vorteil, daß die Spaltungsweise Aussagen über die Struktur des Kollagens gestattet.

Nach Prüfung einer großen Anzahl synthetischer Substrate durch Grassmann und Mitarb.¹⁶⁾ sowie Heyns und Legler¹⁷⁾ muß der Ausschnitt (1) der Peptidkette des Kollagens als typische und sich wiederholende Aminosäuresequenz angesehen werden.



Carboxybenzoyltetrapeptide vom Typ Cbo-Hydroxypro-Gly-Gly-Pro-O-CH₃¹⁸⁾ oder Cbo-Pro-Ala-Gly-Pro-NH₂¹⁷⁾ stellen optimale synthetische Substrate für Kollagenase dar (siehe auch¹³⁾).

Diese an der Spezifitätsregel für Kollagenase gewonnenen Erkenntnisse über die Primärstruktur der Kollagenpeptidkette stimmen überein mit den Befunden, daß 1. die Tripeptide Glycyl-prolyl-alanin und Glycyl-prolyl-hydroxyprolin aus Sehnenhydrolysaten nach Abbau durch Kollagenase isoliert werden konnten¹⁹⁾, daß 2. im Kollagenmolekül die Sequenz Glycyl-prolyl relativ häufig ist²⁰⁾ und daß 3. auf Grund der prozentualen Aminosäurezusammensetzung im Durchschnitt jede dritte Aminosäure Glycin sein muß.

Verschiedene neuere Befunde sprechen dafür, daß die Struktur des Kollagenmoleküls nicht ausschließlich durch Peptidbindungen unter Beteiligung der α-Amino- und Carboxylgruppen bestimmt wird, sondern auch andere Bindungstypen am Aufbau des Makromoleküls beteiligt sind. So lassen sich durch Abbau von Gelatine (aus Kalbshaut-Kollagen) mit Hydroxylamin (oder Hydrazin)^{21,22)} bei Raumtemperatur nicht dialysable Proteinspaltprodukte

Aminosäure	N als % Protein-N	Zahl der Aminosäurereste
Aminostickstoff	2,5	—
Glycin	26,3	136
Alanin	8,0	41
Leucin	3,2	17
Isoleucin	2,2	11
Valin	1,9	10
Phenylalanin	0,6	3
Tyrosin	0,0	—
Tryptophan	2,5	13
Serin	1,5	8
Threonin	0,0	—
Cystin	0,4	2
Methionin	9,9	51
Prolin	8,0	41
Hydroxyprolin	4,7	12
Lysin	1,2	3
Hydroxylisin	15,3	20
Arginin	1,2	2
Histidin	3,6	19
Asparaginsäure	5,8	30
Glutaminsäure	3,5	18
Amidostickstoff	99,8	419

Tabelle 1. Aminosäurezusammensetzung des Kollagens⁹⁾

- ¹⁾ W. H. Hauss u. H. Loose: Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes. G. Thieme, Stuttgart 1960.
- ²⁾ H. Gibian: Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen. F. Deuticke, Wien 1959.
- ³⁾ Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knochengewebe (7. Mosbacher Colloquium). Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956.
- ⁴⁾ R. Emmrich: Chronische Krankheiten des Bindegewebes. G. Thieme, Leipzig 1959.
- ⁵⁾ S. Roseman, Ann. Rev. Biochemistry 28, 545 [1959].
- ⁶⁾ J. H. Page: Connective Tissue, Thrombosis and Atherosclerosis. Academic Press, New York-London 1959.
- ⁷⁾ P. W. Kent u. M. W. Whitehouse: Biochemistry of Aminosugars. Butterworths Scientific Publications, London 1955.
- ⁸⁾ G. E. W. Wolstenholme u. M. O'Connor: Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides. Ciba Foundation Symposium. Little, Brown u. Co., Boston, Mass., 1958.
- ⁹⁾ K. H. Gustavson: The Chemistry and Reactivity of Collagen. Academic Press, New York 1956.
- ¹⁰⁾ R. E. Neumann u. M. A. Logan, J. biol. Chemistry 186, 549 [1950]; 184, 299 [1950].
- ¹¹⁾ E. Stegemann, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 311, 41 [1958].

- ¹²⁾ J. J. Gross, Biophys. Biochem. Cytol. Suppl. 2, 261 [1951].
- ¹³⁾ P. Doty u. T. Nishihara: Recent Advances in Gelatin and Glue Research. Pergamon Press, New York 1958. S. 92.
- ¹⁴⁾ W. Grassmann u. H. Hörmann, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 292, 24 [1953].
- ¹⁵⁾ J. H. Bowes u. J. A. Moss, Biochem. J. 55, 735 [1953].
- ¹⁶⁾ W. Grassmann, H. Hörmann, A. Nordwig u. E. Wünsch, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 316, 287 [1959].
- ¹⁷⁾ K. Heyns, u. G. Legler, ebenda 315, 288 [1959].
- ¹⁸⁾ Y. Nagai, S. Sakakibara, H. Noda u. S. Akabori, Biochim. biophysica Acta 37, 567 [1960].
- ¹⁹⁾ R. E. Schrotenloher, J. D. Ogle u. M. A. Logan, J. biol. Chemistry 234, 59 [1959].
- ²⁰⁾ W. A. Schroeder, L. M. Kay, J. Legette, L. Honnen u. C. F. Green, J. Amer. chem. Soc. 76, 3556 [1954].
- ²¹⁾ P. M. Gallop, S. Seifter u. E. Meilman, Nature [London] 183, 1659 [1959].
- ²²⁾ J. Bello, Nature [London] 185, 241 [1960].

Struktur	beteiligter Baustein
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{R}' \end{array}$	Glutamin und Asparaginsäure (Asparagin und Glutaminsäure)
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{N} \\ \quad \parallel \\ \text{R}-\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{R}' \\ \quad \parallel \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array}$	Arginin und Glutaminsäure (oder Asparaginsäure)
$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{C} \quad \text{CH} \\ \quad \parallel \quad \quad \parallel \\ \text{O} \quad \text{H}_2\text{C}-\text{N} \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \quad \text{R}'' \end{array}$	Hydroxyprolin und Glutaminsäure (oder Asparaginsäure)
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C} \quad \text{CH} \quad \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \quad \text{CH} \quad \text{C}-\text{R}' \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{N} \quad \quad \quad \text{NH} \\ \quad \quad \quad \parallel \\ \quad \quad \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \quad \text{R}'' \end{array}$	Hydroxylysin und Glutaminsäure (oder Asparaginsäure) (Oxazolinstruktur)
$\begin{array}{c} \text{R}' \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \quad \parallel \quad \parallel \quad \parallel \\ \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{R} \quad \text{R} \quad \text{R} \quad \text{R} \quad \text{R} \end{array}$	Hexose und Glutaminsäure (oder Asparaginsäure)

Tabelle 2. Mögliche alkali-(hydroxylamin)-labile Bindungstypen im Kollagenmolekül²¹⁾

mit Molekulargewichten um 200 000 bzw. 25 000–35 000 erhalten. Da durch Hydroxylamin-Einwirkung unter diesen Bedingungen nicht peptidartige, wohl aber esterartige Bindungen gespalten werden, muß geschlossen werden, daß im Kollagen alkali-empfindliche Bindungen enthalten sind, die größere Untereinheiten des Proteinmoleküls zusammenhalten. Einige der möglichen Bindungstypen sind in Tabelle 2 zusammengestellt²¹⁾. Der durch Hydroxamat-Bestimmungen gemessene Verbrauch an Hydroxylamin wird unterschiedlich mit 1–2 bzw. 10 Mol/10⁵ Kollagen angegeben. Diese Differenzen lassen sich aber durch Strukturunterschiede in Kollagen verschiedener Altersklassen erklären.

Weiterhin fand sich in salzsauren Teilhydrolysaten aus Sehnenkollagen ein Tripeptid, das durch Abbau und Synthese als ϵ -N-(Glycyl- α -L-glutamyl)-L-lysin erkannt wurde²³⁾. Das Kollagen enthält demnach Peptidbindungen, an denen die ϵ -Aminogruppe des Lysins beteiligt ist und die möglicherweise der Verknüpfung von Peptidketten dienen.

b) Makromolekulare Struktur

Die heutigen Vorstellungen über die makromolekulare Struktur des Kollagens basieren vorwiegend auf Röntgendiagrammen und elektronenoptischen Untersuchungen der Kollagenfaser. Bei der Untersuchung der „Weitwinkelinterferenzen“ (die kleinen Abständen innerhalb kristalliner Bereiche der Faser entsprechen) hat man schon früh charakteristische Reflexe gefunden, die in Faserrichtung (Meridianreflexe) Abständen von 2,86, 4,0 und 9,5 Å, quer zur Faserrichtung einem Abstand von 11,5 Å zuzuordnen sind (Übersicht s.²⁴⁾). Mit verbesserter Technik – vor allem an gestreckten Fasern – wurden weitere Einblicke erhalten²⁵⁾. Als beste Interpretation dieser Diffraktionsdiagramme wird

heute die 3-Kettenspirale angesprochen, die die Grundeinheit des Kollagens darstellt und aus drei zusammengeordneten Polypeptidspiralen besteht²⁶⁾. Für die in Abb. 2 wiedergegebene Struktur des Kollagens²⁷⁾ müssen zwei Typen diskutiert werden, die sich unterscheiden, indem die Hydroxylgruppen des Hydroxyprolins entweder nach außen gerichtet sein und Wasserstoffbrücken mit C=O-Gruppen benachbarter Makromoleküle bilden können (Struktur II) oder bei Ausrichtung nach innen Bindungen zwischen den drei Peptidketten vermitteln (Struktur I).

Bei der Aufstellung solcher Strukturmodelle spielen neben den Röntgendiagrammen Betrachtungen über Symmetrieverhältnisse der Aminosäuren, Atomabstände, Valenzwinkel und mesomere Grenzformen eine Rolle. Der hohe Prolin- bzw. Hydroxyprolingehalt ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Aus Formel (II) läßt sich ableiten, daß die C–N-Bindung einer gewöhnlichen Peptidkette durch Mesomerie den Charakter einer Doppelbindung erhält und damit die freie Drehbarkeit um diese Bindung aufgehoben wird. Durch Einbau eines Hydroxyprolinrestes verringert sich die Zahl der möglichen räumlichen Anordnungen weiterhin stark, die Kette wird starr²⁴⁾.

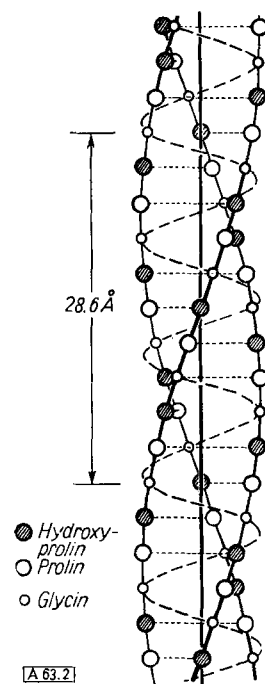
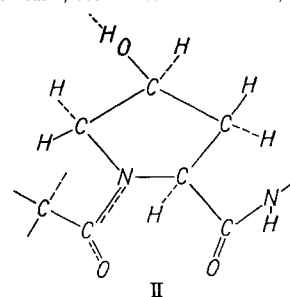


Abb. 2. Dreiadriige Helixstruktur des Kollagenmakromoleküls²⁷⁾



Messungen von Kleinwinkelinterferenzen, mit deren Hilfe sich die periodische Wiederkehr identischer Anordnungen in Abständen von mehreren 100 Å erkennen läßt, haben eine Identitätsperiode von 640 Å (650 Å für die trockene Faser) ermittelt. Es ist bemerkenswert, daß hier eine Analogie zu elektronenmikroskopischen Beobachtungen besteht, nach denen die Kollagenfibrille eine periodisch nach rund 640 Å wiederkehrende Querstreifung besitzt (Übersicht s.²⁸⁾). Eine Interpretation dieser Querstreifung (Banden und Zwischenbanden) durch die chemische Struktur der Kollagenfaser fußt auf der Annahme geordneter Bereiche und ungeordneter Zwischenbereiche der Faser. Dies würde der in Abb. 3 skizzierten Anordnung des Makromoleküls entsprechen, bei der Teile mit vorwiegend unpolaren Aminosäuren und kurzen Seitenketten („Interbands“) abwechseln mit solchen, an denen polare Aminosäuren mit langen Seitenketten („Bands“) vorhanden sind. Diese „Bands“ werden auch mit der periodisch bevorzugten Einlagerung von Farbstoffen, Silber, Phosphorwolframsäure und mit Quellungsvorgängen in Beziehung gebracht.

²³⁾ G. L. Mehanic u. M. Levy, J. Amer. chem. Soc. 81, 1889 [1959].

²⁴⁾ W. Grässmann, Beiträge zur Silikoseforschung, Sonderband 7, 137 [1955].

²⁵⁾ L. J. T. Randal, Soc. Leather Trade's Chemists 38, 362 [1954].

²⁶⁾ A. Rich u. F. H. C. Crick: Recent Advances in Gelatin and Glue Research. Pergamon Press, New York 1958, S. 20.

²⁷⁾ A. Rich u. F. H. C. Crick, Nature [London] 176, 915 [1955].

²⁸⁾ W. Schwarz: Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes. G. Thieme, Stuttgart 1960, S. 106.

Im Kollagen befinden sich geringe Mengen Kohlenhydrate (weniger als 1%), unter denen Glucose, Galaktose, Fucose und Glucosamin gefunden wurden. Die Kohlenhydrat-Komponenten lassen sich jedoch durch Umkristallisieren löslichen Kollagens, durch Ausschütteln saurer

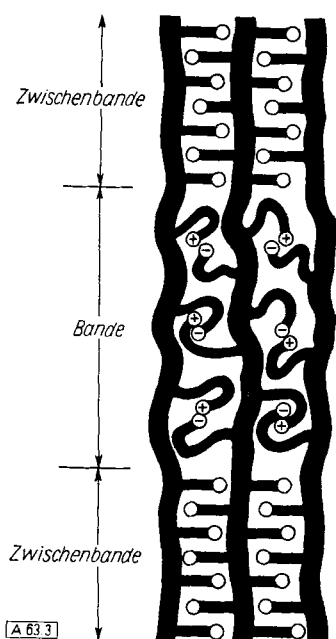


Abb. 3.
Deutung der Kleinwinkelinterferenz und elektro-nenoptischen Querstreifung (nach²⁹⁾)

Kollagenlösungen mit Chloroform oder durch Oxydation mit Natriumperjodat weitgehend entfernen. Obwohl hierbei die Glucosaminfraktion vollständig, die Hexosen bis auf 0,2% abgetrennt werden, erhält man aus solchen Lösungen Kollagenfibrillen mit dem typischen Querstreifungsmuster. Glucosamin und der durch Perjodat zerstörbare Hexosenanteil sind also zur Bildung einer normalen Querstreifung nicht erforderlich³⁰.

II. Reticulin

Ob der Reticulinfaser, die sich morphologisch von der kollagenen Faser auf Grund ihrer feinen netzartigen Struktur unterscheidet, ein spezifisches Bauprotein — das Reticulin — zugrunde liegt, scheint noch nicht gesichert zu sein. Beziehungen zum Kollagen bestehen auf Grund der ähnlichen Aminosäurezusammensetzung³¹ und seiner Löslichkeitseigenschaften³², doch scheint es Unterschiede je nach Herkunft aus verschiedenen Organen zu geben³³. So soll das aus der Basalmembran parenchymatöser Organe isolierbare Reticulin aus einem unlöslichen Komplex von Kollagen, einem Lipid und einem Polysaccharid bestehen³⁴. Da die Reticulinfaser unter den Faserproteinen des Bindegewebes quantitativ kaum ins Gewicht fällt und zudem als morphologischer Begriff häufig mit Elastin und Prokollagen verwechselt wird, wurde vorgeschlagen, das Reticulin als chemischen Begriff überhaupt auszumerzen³⁵.

III. Elastin

Im Gegensatz zum Kollagen sind die chemischen Daten über das Elastin, dem Hauptbestandteil der elastischen Faser, wenig aufschlußreich. Zwar ist die Proteinnatur des Elastins sowie seine Aminosäurezusammensetzung bekannt, es ist ebenso wie das Kollagen unlöslich in Wasser, verdünnten Säuren, Alkalien und Salzlösungen, dagegen ist es beim Elastin nicht möglich, Besonderheiten des Aminosäurespektrums, charakteristische Röntgendiagramme oder elektronenmikroskopische Phänomene zur Erklärung sei-

ner besonderen Eigenschaften heranzuziehen. Hochgereinigtes Elastin³⁶ ist gekennzeichnet durch einen ungewöhnlich hohen Gehalt an Monoamino-monocarbonsäuren, die zusammen 93% ausmachen und unter denen Glycin (27%), Alanin (23%), Leucin, Isoleucin (12%), Valin (17%) und Prolin (12%) die Hauptmenge bilden. Möglicherweise hängen hiermit die charakteristischen Eigenschaften des Elastins (reversible Dehnbarkeit, Unlöslichkeit und geringer Quellungsgrad in wäßriger Lösung) zusammen — Eigenschaften, die auch für den stark apolaren Naturgummi charakteristisch sind. Auf Grund dieses Verhaltens wurde das Vorhandensein starker Vernetzungen angenommen, doch ist deren Natur noch völlig unklar. Auszuschließen sind Sulfidbrücken (da der Cystingehalt des Elastins nur 0,4% beträgt) sowie Bindungen über die ϵ -Aminogruppen des Lysins oder über phenolische Hydroxylgruppen des Tyrosins, da beide mit Dinitrofluorbenzol reagieren und also frei im Molekül vorliegen müssen. Die Peptidketten des Elastins treten zu Fasern von 200–2500 Å Länge zusammen, die jedoch keine axiale Periodizität erkennen lassen.

Gereinigte Elastinpräparate lassen sich durch kurze Hydrolyse mit Oxalsäure sowie verschiedene Fraktionierungsmethoden in zwei Komponenten von verschiedenem Molekulargewicht (α -Elastin 60000–80000, β -Elastin etwa 6000) zerlegen, die aber fast gleiche Aminosäurezusammensetzung aufweisen, weshalb das Faserprotein des Elastins als weitgehend einheitlich angesehen wird³⁷. Elastin enthält etwa 0,3% eines Kohlenhydrates³⁸, mit dem es fest assoziiert ist und das den Charakter eines sulfathaltigen Mucopolysaccharids besitzt^{38,39}. Ob die Kohlenhydrat-Komponente verantwortlich ist für die Reaktion zwischen Elastin und Orcin, von dem $2,5 \cdot 10^3$ Mol/100 g in chemischer Bindung angelagert werden⁴⁰, ist noch nicht entschieden.

Chemie der strukturlosen Grundsubstanz

Der Ausdruck strukturlose Grundsubstanz bezeichnet im morphologischen Sinne die lichtoptisch ohne Struktur erscheinende Interzellularsubstanz, die Zellen und Fasern als amorphe Matrix dient. Obwohl aus der morphologischen Definition der Eindruck einer gewissen Homogenität entsteht, stellt die strukturlose Grundsubstanz chemisch doch ein außerordentlich komplexes Gemisch aus Verbindungen der verschiedensten Stoffklassen dar: Sie enthält

1. Proteine, die zum größten Teil noch unbekannt oder — wie verschiedene Glykoproteide — chemisch nur ungenügend charakterisiert sind. Unter ihnen befinden sich auch lösliche Stoffwechselstufen des Kollagens (Prokollagen, Tropokollagen).
2. Chemisch für die strukturlose Grundsubstanz charakteristische und nie fehlende Bestandteile (anionische Polysaccharide, sogenannte saure Mucopolysaccharide), deren regelmäßiges Vorkommen und deren typische Struktur für eine enge Beziehung zur Funktion der bindegewebigen Grundsubstanz spricht.

Da sich der Stoffaustausch zwischen Blutgefäßen und Organen durch das zwischengeschaltete Bindegewebe (siehe Abb. 1) abspielt, enthält die Grundsubstanz weiterhin alle niedrigmolekularen Bestandteile des Blutes und zum Teil auch dessen Eiweißkörper.

I. Saure Mucopolysaccharide

Bei den Polysacchariden der Grundsubstanz handelt es sich um anionische Linearpolymere, die alternierend einen

²⁹⁾ R. S. Bear, *Advances in Protein Chemistry* 7, 69 [1952].

³⁰⁾ K. Kühn, W. Grassmann u. U. Hoffmann, *Z. Naturforsch.* 14b, 436 [1959].

³¹⁾ A. H. T. Robb-Smith in R. E. Tunbridge: *Connective Tissue*, Blackwell, Oxford 1957, S. 177.

³²⁾ D. S. Jackson u. G. Williams, *Nature* [London] 178, 915 [1956].

³³⁾ L. Holcinger, *Acta Histochem.* 3, 19 [1956].

³⁴⁾ G. M. Windrum, P. W. Kent u. J. E. Eastoe, *Brit. J. exptl. Pathol.* 36, 49 [1955].

³⁵⁾ A. Kuntzel, *Leder* 8, 73 [1957].

³⁶⁾ S. M. Partridge u. H. F. Davis, *Biochem. J.* 61, 21 [1955].

³⁷⁾ S. M. Partridge, H. F. Davis u. G. S. Adair, *Biochem. J.* 61, 11 [1955].

³⁸⁾ D. A. Hall, R. Reed u. R. E. Tunbridge, *Nature* [London] 170, 264 [1952].

³⁹⁾ L. Gotte u. V. Moret, *Atti accad. naz. Lincei Rend. Classe sci. fis. mat. nat.* 23, 281 [1957]; *Chem. Abstr.* 52, 12940 [1958].

⁴⁰⁾ V. Scarselli, *Nature* [London] 183, 1739 [1959].

Name	Struktur der monomeren Disaccharid-Einheit	typisch für
Hyaluronsäure	$[Gs (1 \xrightarrow{\beta} 3) N-Ac-Gl (1 \xrightarrow{\beta} 4)]_n$	Nabelschnur, Glaskörper des Auges, Aorta
Chondroitinschwefelsäure(sulfat) A	$[Gs (1 \xrightarrow{\beta} 3) N-Ac-Gal-4-sulfat (1 \xrightarrow{\beta} 4)]_n$	Knorpel
Chondroitinschwefelsäure(sulfat) B	$[Is (1 \xrightarrow{\beta} 3) N-Ac-Gal-4-sulfat (1 \xrightarrow{\beta} 4)]_n$	Haut
Chondroitinschwefelsäure(sulfat) C	$[Gs (1 \xrightarrow{\beta} 3) N-Ac-Gal-6-sulfat (1 \xrightarrow{\beta} 4)]_n$	undifferenziertes (embryonales) Bindegewebe
Chondroitin	$[Gs (1 \xrightarrow{\beta} 3) N-Ac-Gal (1 \xrightarrow{\beta} 4)]_n$	Hornhaut des Auges
Keratoschwefelsäure(sulfat)	$[Gal (1 \xrightarrow{\beta} 3) N-Ac-Gl-6-sulfat (1 \xrightarrow{\beta} 4)]_n$	Hornhaut des Auges, Zwischenwirbelscheiben, Aorta
Heparin	unbekannt; Bausteine: N-Sulfonyl-D-glucosamin, Glucuronsäure, Sulfat, α -glykosid. Bindung	Lunge, Leber
Heparin-monosulfat (Heparitinsulfat)	unbekannt; Bausteine: N-Sulfonyl-D-glucosamin, N-Acetylglucosamin, Glucuronsäure, Sulfat	Lunge, Aorta

$N-Ac-Gl = N\text{-Acetyl-D-glucosamin (2-Acetamido-2-desoxy-}\beta\text{-D-Glucopyranosyl)}$
 $N-Ac-Gal = N\text{-Acetyl-D-galaktosamin (2-Acetamido-2-desoxy-}\beta\text{-D-galaktopyranosyl)}$
 $Gs = D\text{-Glucuronsäure(-pyranosyl)}$
 $Is = D\text{-Iduronsäure(-pyranosyl)}$
 $Gal = D\text{-Galaktose(-pyranosyl)}$

Tabelle 3. Saure Mucopolysaccharide des Bindegewebes

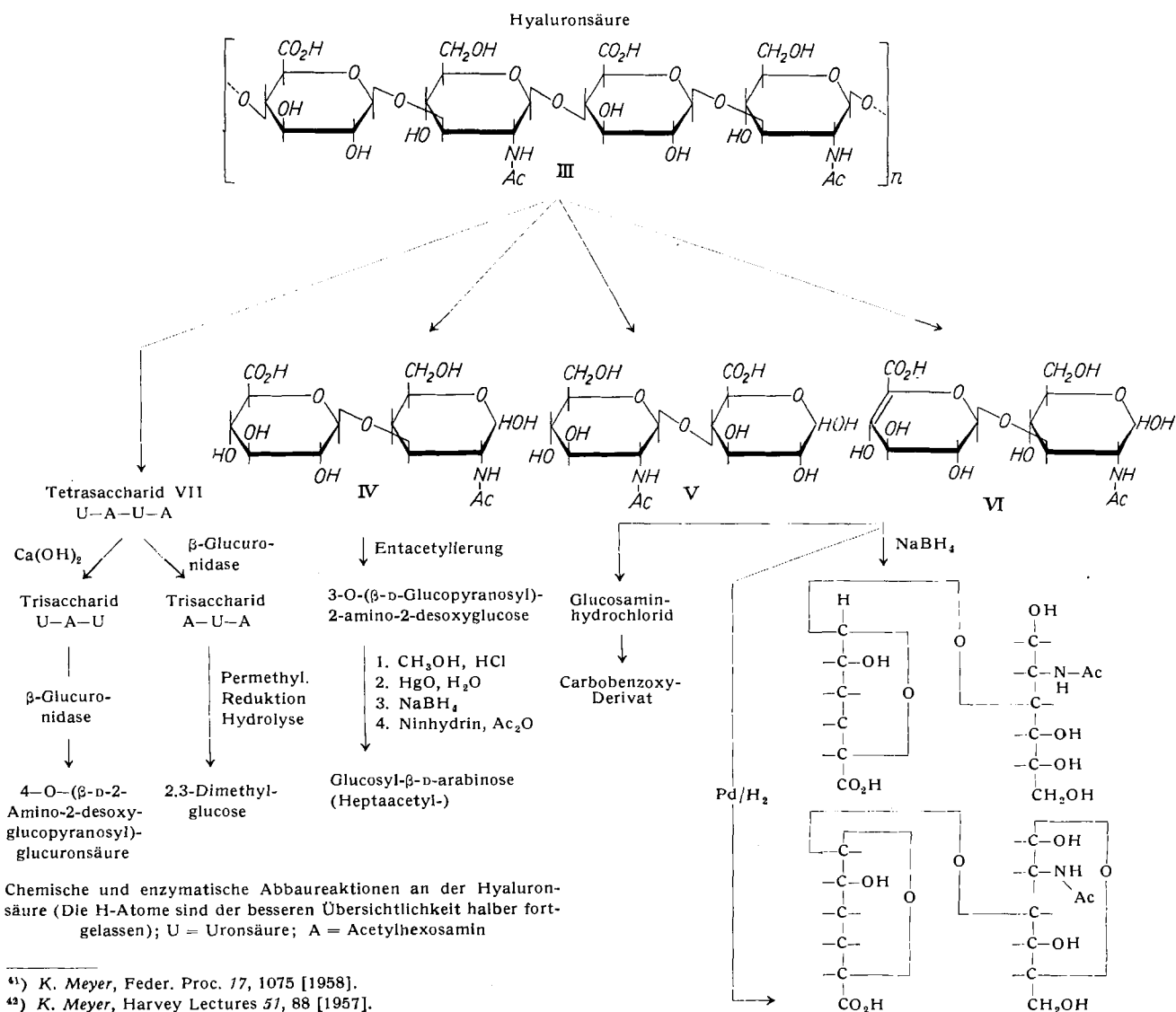
N-acetylierten (sulfatierten) Aminosucker und eine Uronsäure (Neutralzucker) enthalten. In Tabelle 3 sind einige Daten über die bisher in der strukturlosen Grundsubstanz

aminidische Bindungen abwechseln⁴²⁾. Die Untersuchungen zur Strukturaufklärung basieren auf einer Kombination chemischer und enzymatischer Methoden. Da sie

aufgefundenen sauren Mucopolysaccharide (Mucopolysaccharid-säuren) zusammengestellt. Bei aller Variation der chemischen Zusammensetzung liegt doch immer ein ähnliches Bauprinzip vor.

a) Hyaluronsäure (Übersicht s.⁴¹⁾⁾

Die Hyaluronsäure gehört zu den nicht nur am weitesten verbreiteten, sondern auch am besten untersuchten anionischen Mucopolysacchariden. Die chemische Struktur entspricht einem unverzweigten Polymer eines Disaccharids vom Typ eines β -D-Glucopyranosyluronsäure-3-O-N-acetyl-glucosamins, bei dem β -1-3-glucuronidische und β -1-4-hexos-



⁴¹⁾ K. Meyer, Feder. Proc. 17, 1075 [1958].

⁴²⁾ K. Meyer, Harvey Lectures 51, 88 [1957].

für die Strukturaufklärung saurer Mucopolysaccharide repräsentativ sind, seien einige Grundzüge dargestellt.

Enzymatische und chemische Abbaureaktionen an der Hyaluronsäure

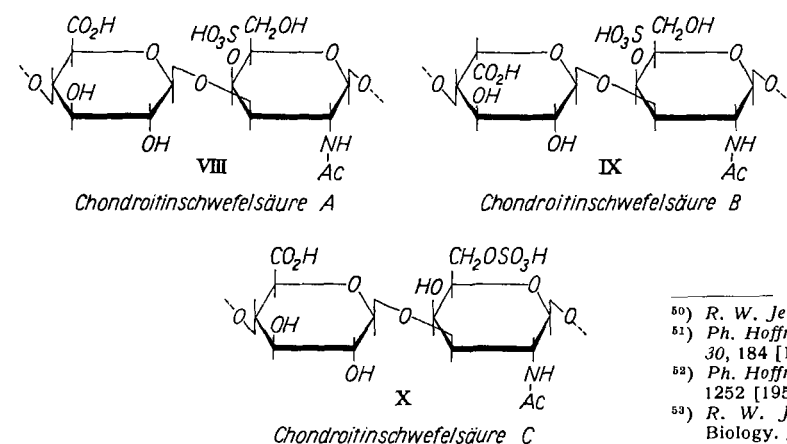
Schon bald nach der Reindarstellung der Hyaluronsäure gelang die Isolierung eines kristallinen Disaccharids nach Einwirkung eines Hyaluronsäure abbauenden Enzyms aus Hoden (Testes-Hyaluronidase)⁴³. Das ubiquitäre Vorkommen von Hyaluronsäure und von hyaluronsäure-spaltenden Enzymen hat zur Auf-
findung zweier weiterer enzymatischer Abbaureaktionen mit Endprodukten unterschiedlicher Konfiguration geführt. Das Schema auf S. 667 gibt die Formeln der Disaccharide nach Einwirkung von Testes-Hyaluronidase (IV), Blutegel-Hyaluronidase (V)⁴⁴ und Streptococcen-Hyaluronidase (VI)⁴⁵ wieder. Es ist ersichtlich, daß die Blutegel-Hyaluronidase als Glucuronidase, die anderen Enzyme als Hexosaminidasen wirken. Die Tatsache, daß beim Abbau durch Bakterien-Hyaluronidase ein ungesättigtes Disaccharid ($\Delta^{4,5}$ -Uronid, VI) entsteht, läßt sich nur mit der Annahme einer 1-4-glucosaminidischen Bindung erklären. Salzsäure Hydrolyse dieses Disaccharids führt zu kristallinem Glucosamin-hydrochlorid, Einwirkung von NaBH_4 oder katalytische Hydrierung zu charakteristischen Umwandlungsprodukten.

Das Disaccharid IV läßt sich nach Entacetylierung als 3-O-(β -D-Glucopyranosyluronosäure)-2-amino-2-desoxy-glucose identifizieren⁴⁶. Beweise für die Natur der 1-4-glucosaminidischen Bindung ließen sich durch Abbau eines nach Einwirkung von Testes-Hyaluronidase gewonnenen kristallinen Tetrasaccharids erhalten (VII)⁴⁷. Enzymatischer Abbau mit β -Glucuronidase (Kalbsleber) entfernt die terminale Glucuronsäure und bildet ein Trisaccharid vom Typ A—U—A, während bei Reaktion mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ein Trisaccharid vom Typ U—A—U entsteht. Das nach Enzym-Einwirkung erhaltene Trisaccharid ergibt nach Permethylierung und Reduktion der COOH -Gruppe mit LiAlH_4 2,3-Dimethylglucose⁴⁸.

Die chemische Konstitution aller bisher untersuchten Hyaluronsäurepräparate erwies sich als völlig identisch, ganz gleich, ob es sich um Hyaluronsäure aus Glaskörper des Auges, Gelenkflüssigkeit, Nabelschnur, Haut, Aorta oder Bakterien (Streptococcen) handelte. Dagegen sind erhebliche Unterschiede im Polymerisationsgrad vorhanden. Molekulargewichte von 20000 und niedriger (z. B. Glaskörper) bis zu mehreren Millionen (Liposarkom, Streptococcen) wurden gefunden.

b) Chondroitinsulfate und Chondroitin (Übersicht s. 49))

Die Grundstruktur der Hyaluronsäure kehrt auch in den sulfatierten Polyuroniden Chondroitinsulfat A, B und C wieder. Obwohl alle drei Vertreter schon lange Zeit bekannt und auch auf Grund ihrer unterschiedlichen optischen Drehung und Alkohollöslichkeit unterschieden wurden,



⁴³ B. Weissmann, M. M. Rapport, A. Linker u. K. Meyer, J. biol. Chemistry 205, 205 [1953].

⁴⁴ A. Linker, Ph. Hoffmann u. K. Meyer, Nature [London] 180, 810 [1957].

⁴⁵ A. Linker, K. Meyer, u. Ph. Hoffmann, J. biol. Chemistry 219, 13 [1956].

⁴⁶ B. Weissmann u. K. Meyer, J. Amer. chem. Soc. 76, 1753 [1954].

⁴⁷ B. Weissmann, J. biol. Chemistry 216, 781 [1955].

⁴⁸ A. Linker, K. Meyer u. B. Weissmann, J. biol. Chemistry 213, 237 [1953].

⁴⁹ Ph. Hoffmann, A. Linker u. K. Meyer, Feder. Proc. 17, 1078 [1958].

konnte ihre Strukturaufklärung erst in den letzten Jahren abgeschlossen werden. Die Formeln der charakteristischen Disaccharid-Einheiten sind hier wiedergegeben.

Alle Chondroitinsulfat-Formen besitzen unverzweigte Ketten, in denen eine β -1-3-uronidische Gruppe mit einer β -1-4-galaktosaminidischen Gruppe abwechselt. Die eigentlichen Unterschiede bestehen in der Position des Sulfatrestes, der als Ester beim Chondroitinsulfat A (VIII) und B (IX) am C-Atom 4 des Galaktosamins, beim Chondroitinsulfat C (X) dagegen am C-Atom 6 lokalisiert ist^{50,51}, und in der Struktur der Hexuronsäure. Sie ist im Chondroitinsulfat A und C D-Glucuronsäure, in B (zum größten Teil) das 5-Epimer, D-Iduronsäure^{52,53}. Hiermit stimmt überein, daß Extrakte aus Flavobakterien, die auf Chondroitinsulfat B adaptiert wurden, Chondroitinsulfat A, B und C unter Sulfataspaltung zu einem $\Delta^{4,5}$ -ungesättigten Disaccharid abbauen. Nach Reduktion mit LiBH_4 und Peracetylierung erhält man nach Ausweis der IR-Spektren identische, kristallisierte Acetate. Unterschiede bestehen dagegen in der Angreifbarkeit durch Testes-Hyaluronidase, die nur Chondroitinsulfat A und C abbaut. Das Molekulargewicht der einfachen Polysaccharidkette beträgt beim Chondroitinsulfat etwa 50000, doch ist zu beachten, daß das Chondroitinsulfat im Gegensatz zur Hyaluronsäure in seiner Nativform als Polysaccharid-Protein-Komplex mit Molekulargewichten von 1–10 Millionen vorliegt (siehe Abschnitt 3, II).

Während die Chondroitinschwefelsäuren A, B und C je einen Sulfatrest pro Disaccharid-Einheit enthalten, wurde aus Hornhaut des Auges ein Mucopolysaccharid isoliert, von dem man ursprünglich vermutete, daß es sich um ein sulfatfreies Analog des Chondroitinsulfates handle und das den Namen Chondroitin erhielt⁵⁴. Es ist bisher jedoch nicht gelungen, ein völlig sulfatfreies Produkt zu isolieren, so daß man annehmen muß, daß auch das Chondroitin eine geringe Anzahl von (statistisch über die Polysaccharidkette verteilten?) Sulfatresten besitzt, die auch in den reinsten Präparaten immer noch 2 % ausmachen. Die Kenntnisse über die chemische Struktur des Chondroitins basieren auf der Isolierung kristallinen Chondrosins, der sich wiederholenden Disaccharid-Einheit des Chondroitins, und ihrer Identität mit aus Chondroitinsulfat A und C isoliertem Chondrosin. Enzymatischer Abbau durch Testes- und Bakterien-Hyaluronidase ergibt Di- und Oligosaccharide, die als galaktosamin-isomere Verbindungen der aus Hyaluronsäure erhaltenen Bruckstücke anzusprechen sind.

c) Keratinsulfat

Ein uronsäurefreies Mucopolysaccharid, das N-Acetylglucosamin, D-Galaktose und Sulfat in äquimolaren Mengen enthält, wurde ursprünglich nur in der Cornea⁵⁵, später jedoch auch aus Zwischenwirbelscheiben⁵⁶, Kalbsknochen⁵⁷, menschlichem Knorpel⁵⁸ und menschlicher Aorta⁵⁹ isoliert. Die Struktur der typischen Disaccharid-Einheit entspricht einem 4-O- β -D-Galaktopyranose-3-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-6-sulfat)⁶⁰. Bemerkenswert erscheint, daß hier die sonst in keinem sauren Mucopolysaccharid fehlende Uronsäure durch einen Neutralzucker ersetzt ist.

d) Heparin und Heparinsulfat (Übersicht s. 61))

Obwohl Heparin schon vor 40 Jahren isoliert und als biologisch hoch wirksame Verbindung erkannt wurde, ist seine Struktur noch nicht endgültig aufgeklärt. Zwar ist die qualitative Zusammensetzung der typischen Disaccharid-Einheit aus Glucosamin, Glucuronsäure und Sulfat bekannt, doch ist sicher, daß dem Heparin unter den sauren Mucopoly-

⁵⁰ R. W. Jeanloz u. P. J. Stoffyn, Feder. Proc. 17, 249 [1958].

⁵¹ Ph. Hoffmann, A. Linker u. K. Meyer, Biochim. biophysica Acta 30, 184 [1958].

⁵² Ph. Hoffmann, A. Linker u. K. Meyer, Science [Washington] 124, 1252 [1956].

⁵³ R. W. Jeanloz: 4th Macy Conference on Polysaccharides in Biology. Josiah Macy Foundation, New York 1959, S. 28.

⁵⁴ K. Meyer, J. biol. Chemistry 217, 605 [1954].

⁵⁵ K. Meyer, A. Linker, E. A. Davidson u. B. Weissmann, J. biol. Chemistry 205, 611 [1953].

⁵⁶ S. Gardell, Acta chem. scand. 9, 1035 [1955].

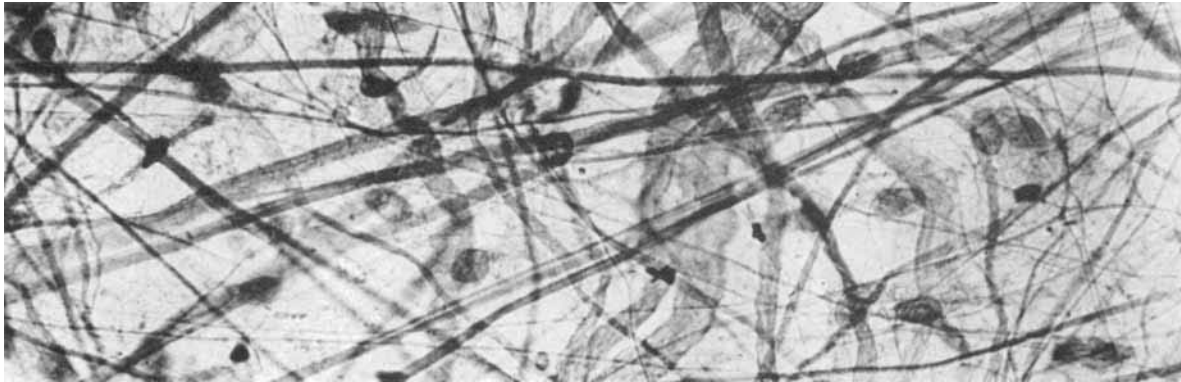
⁵⁷ K. Meyer, E. A. Davidson u. A. Linker u. Ph. Hoffmann, Biochim. biophysica Acta 21, 506 [1956].

⁵⁸ K. Meyer, Ph. Hoffmann u. A. Linker, Science [Washington] 128, 896 [1958].

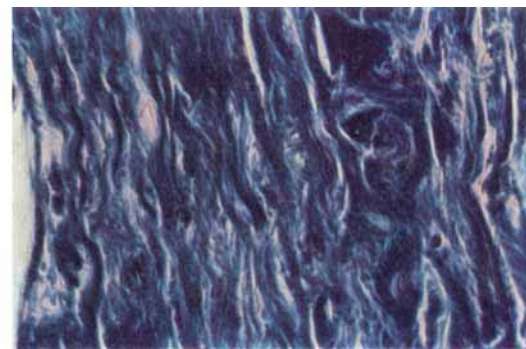
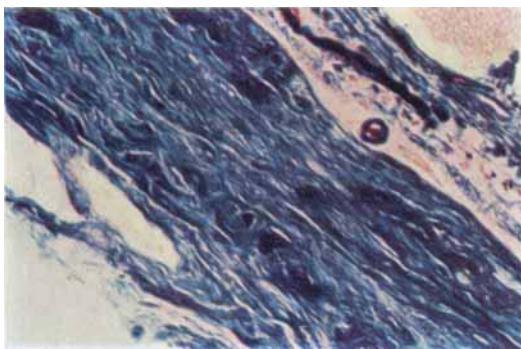
⁵⁹ E. Buddecke, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 318, 33 [1960].

⁶⁰ S. Hivano, Ph. Hoffmann u. K. Meyer, 44th Annual Meeting of Federation of Amer. Soc. exptl. Biol., Chicago, April 1960.

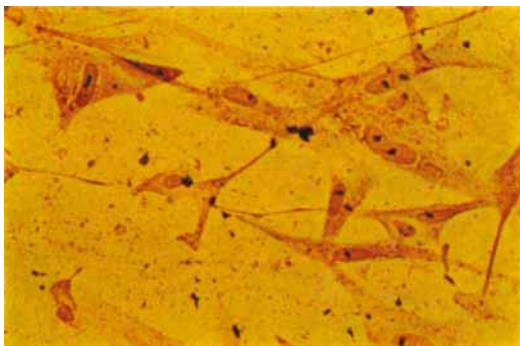
⁶¹ R. W. Jeanloz, Feder. Proc. 17, 1082 [1958].



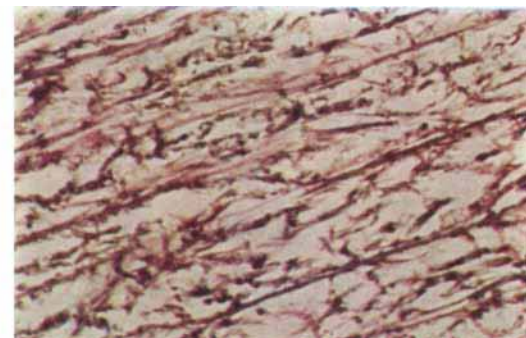
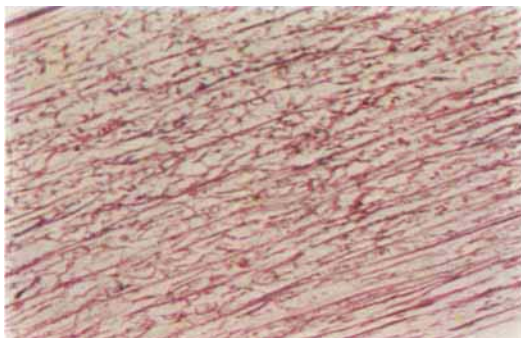
Fibrilläres Bindegewebe aus der Bauchfellfalte (omentum majus) einer Katze. *Bindegewebszellen* (Fibrocyten) und das als Scherengitter ausgebildete Netzwerk *kollagener* und *elastischer Fasern* sind eingebettet in strukturlose Grundsubstanz (Interzellulärsubstanz). Färbung: Benzollichtbordeaux.



Kollagene Fasern aus der Bindegewebshülle (dura mater) des Sehnerven (fasciculus opticus) vom Menschen. Färbung: Azan.



Fibrocyten aus einer Gewebeskultur (ganglion spinale vom neugeborenen Kaninchen). Synthese von Kollagen und Mucopolysacchariden ist den Zellen auch im Kulturmilieu möglich. Färbung: Silberinprägnation nach *Rio-Hortega*.

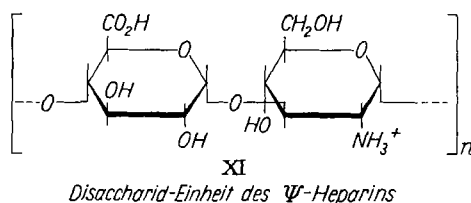


Elastische Fasern aus der Arterienwand (arteria axillaris) des Menschen. Die Faserbündel bilden ein longitudinal bzw. radiär ausgerichtetes elastisches Raumgitter, das die mechanischen Eigenschaften der Arterie bestimmt. Färbung: Resorcinfuchsin.

sacchariden eine gewisse Sonderstellung zukommt. Nicht nur, daß Heparin nicht in den typischen Bindegewebszellen, den Fibroblasten, sondern in den Mastzellen (Heparinozyten) gebildet und gespeichert wird⁶²), es bestehen auch chemisch charakteristische Unterschiede: Im Gegensatz zu den anderen sauren, sulfathaltigen Mucopolysacchariden enthält Heparin drei Sulfatgruppen pro Disaccharid-Einheit, von denen eine (an Stelle der Acetylgruppe) sulfonamidisch an die Aminogruppe des Glucosaminrestes gebunden ist^{63, 64}). Die Position der O-Sulfatgruppen ist nicht mit Sicherheit bekannt. Weiterhin sind im Heparin die Monosaccharide nicht in β -, sondern in α -glykosidischer Bindung miteinander verknüpft⁶⁵), und in polarisiertem Licht zeigt es als einziges Mucopolysaccharid Rechtsdrehung.

Neuere Versuche zur Bestimmung der chemischen Struktur basieren auf Studien über das Hydrolyseverhalten⁶⁶). Milde Hydrolyse führt zuerst zur Abspaltung der Sulfonamidgruppe mit Bildung eines Polysaccharids mit freien Aminogruppen, das ausschließlich α -hexosaminidische, gegen weitere Hydrolyse sehr beständige Bindungen enthält. In der Formel dieses desulfurierten sogenannten Ψ -Heparins (XI) sind mögliche Sulfatreste nicht enthalten. Die Lage der glykosidischen Bindung entspricht den Angaben Wolfstroms⁶⁷).

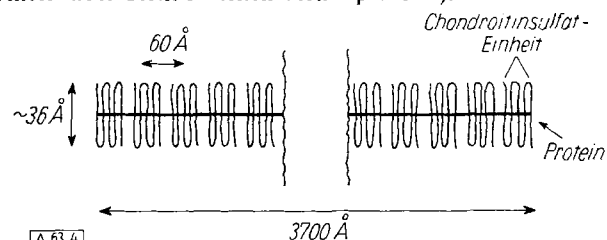
Ursprünglich als Verunreinigung in Heparinpräparaten entdeckt⁶⁸), handelt es sich beim Heparitinsulfat (Heparinmonosulfat) um ein Mucopolysaccharid sui generis. Die chemische Verwandtschaft mit dem Heparin zeigt sich im Aufbau aus dem gleichen Aminosucker und Glucuronsäure und in den optischen Drehwerten, jedoch ist (im Durchschnitt) jedes zweite N-Sulfat durch eine N-Acetylgruppe ersetzt. Im Heparitinsulfat liegen also ein N-Sulfat und ein N-Acetyl in einer Tetrasaccharid-Einheit vor⁶⁹). Es ist noch nicht sicher, ob es sich hier nicht um eine Gruppe ähnlicher Verbindungen handelt.



II. Polysaccharid-Protein-Komplexe

Daß die beschriebenen sauren Mucopolysaccharide im Bindegewebe in ihrer nativen Zustandsform nicht als freie Polysaccharide, sondern in Bindung an Proteine bestimmter Zusammensetzung und Konfiguration vorliegen, ist bisher für das Chondroitinsulfat bewiesen^{70, 71}), für die ande-

ren Mucopolysaccharide sehr wahrscheinlich, vor allem deshalb, weil eine Isolierung und Reindarstellung saurer Mucopolysaccharide im allgemeinen erst nach (meist enzymatischer) Zerstörung der Gewebsproteine möglich ist. Mit schonenden Extraktionsmethoden läßt sich z. B. aus Knorpel ein Chondroitinsulfat-Protein-Komplex mit einem Molekulargewicht von wenigstens $4 \cdot 10^6$ isolieren. In diesem Kohlenhydrat-Eiweiß-Komplex, dessen Aufbau schematisch Abb. 4 zeigt, ist ein stabförmiger Proteinkern, der 20% des Gesamtmoleküls ausmacht, mit etwa 62 Chondroitinsulfat-Ketten (Molekulargewicht je 50000) verbunden. Die Natur der (alkalilabilen) Bindung zwischen Protein und Chondroitinsulfat ist noch unbekannt. Es wurde vermutet, daß der Eiweißanteil, dessen Zusammensetzung von der des Kollagens abweicht, mit dem Polysaccharid-Anteil über Serin-Brücken verknüpft ist⁷²).



III. Neutrale Mucopolysaccharide

Neben den sauren Mucopolysacchariden und ihren Proteinkomplexen kommt im Bindegewebe eine Anzahl kohlenhydrat-haltiger Proteine vor. Die für sie häufig verwendete Bezeichnung „neutrale Mucopolysaccharide“ (Glykoproteide) geht auf ihren sehr niedrigen oder fehlenden Gehalt an Urnsäuren und Estersulfat zurück, durch den sie sich chemisch von den sauren Mucopolysacchariden unterscheiden. Zwar lassen die bisher noch lücken-

Substrat	Hexosamin (gesamt)	Glucosamin/Galaktosamin	Neutralsucker (Orcin)	Galaktose/Mannose	Fucose	Urnsäure	Neuraminsäure	N
Aorta	15,2	6,7:1	14,6	3:1	1,49	—*)	7,8	8,5
α_1 -Seromucoid***)	14,3**)	—	15,5	2:1	1,1	0,48	12,1	—

*) Nicht meßbar. **) N-Acetyl-hexosamin. ***) Analysenwerte für α_1 -Seromucoid nach⁷⁶).

Tabelle 4. Zusammensetzung eines neutralen Mucopolysaccharids aus menschlicher Aorta im Vergleich mit α_1 -Seromucoid⁶⁹)

haften Kenntnisse über die chemische Struktur dieser Stoffklasse, zu der u. a. auch die Blutgruppensubstanzen, Serumglykoproteide, Gonadotropine und Ovomucin gehören, noch keine weitere Unterteilung zu, doch weisen die neben den Hexosaminen regelmäßig gefundenen Neutralsucker D-Galaktose, D-Mannose, L-Fucose (6-Desoxy-L-galaktose) sowie die stets feste, gegenüber proteolytischen Enzymen resistente Verknüpfung mit Proteinen auf ein bestimmtes Bauprinzip hin. Ihre Bedeutung für die bindegewebige Grundsubstanz ist um so weniger zu vernachlässigen, als sie oft z. B. in der Gefäßwand in gleicher Menge wie die sauren Mucopolysaccharide vorhanden sind. Jedoch weisen sie, wie Tabelle 4 zeigt, eine gänzlich andere chemische Zusammensetzung auf, an der auch die Neuraminsäure⁷³⁻⁷⁵) beteiligt ist. Bei einer Beurteilung der Analysenwerte fällt eine enge Beziehung zu den Glykoproteiden des Blutplasmas⁷⁶) auf, die zu der bisher noch nicht entschiedenen Frage führt, wie weit die neutralen Mucopolysaccharide überhaupt echte konstitutive oder zufällige mit dem Saftstrom aus den Blutgefäßen eingedrungene Bestandteile der bindegewebigen Grundsubstanz sind.

Stoffwechsel des Bindegewebes

Es entspricht dem Prinzip des Stoffwechsels, daß alle Bausteine lebender Substanz innerhalb eines bestimmten Zeitraumes gegen neu synthetisierte oder mit der Nahrung

- ⁶²) S. Schiller u. A. Dorfman, Biochim. biophysica Acta 31, 278 [1959].
⁶³) E. J. Jorpes, H. Boström u. V. Muft, J. biol. Chemistry 183, 607 [1950].
⁶⁴) K. Meyer u. D. E. Schwartz, Helv. chim. Acta 33, 1651 [1950].
⁶⁵) A. B. Foster u. A. Huggard, Advances in Carbohydrate Chemistry 10, 335 [1955].
⁶⁶) A. B. Foster, D. Horton u. M. Stacey, J. chem. Soc. [London] 1957, 81.
⁶⁷) M. L. Wolfstrom, R. Montgomery, J. V. Karabinos u. P. Rathgeb, J. Amer. chem. Soc. 72, 5796 [1950].
⁶⁸) J. E. Jorpes u. S. Gardell, J. biol. Chemistry 176, 267 [1948].
⁶⁹) A. Linker, Ph. Hoffman, P. Sampson u. K. Meyer, Biochim. biophysica Acta 29, 443 [1958].
⁷⁰) M. Schubert, Feder. Proc. 17, 1099 [1958].
⁷¹) M. B. Mathews, Arch. Biochem. Biophysics 74, 158 [1958].

- ⁷²) H. Muir, Biochem. J. 69, 195 [1958].
⁷³) Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides, Little, Brown u. Co., Boston, Mass., 1958; A. Gottschalk: S. 287, E. Klenk: S. 297.
⁷⁴) D. Comb u. S. Roseman, J. Amer. chem. Soc. 80, 487, 3166 [1958].
⁷⁵) R. Kuhn u. R. Brossmer, Liebigs Ann. Chem. 616, 221 [1958].
⁷⁶) H. Schulze, R. Schmidtberger u. H. Haupt, Biochem. Z. 329, 490 [1958].

zugeführte Bausteine ausgetauscht werden. Das bedeutet, daß die lebende Substanz sich in einem ständigen durch Biosynthese und Abbau bedingten Umsatz befindet.

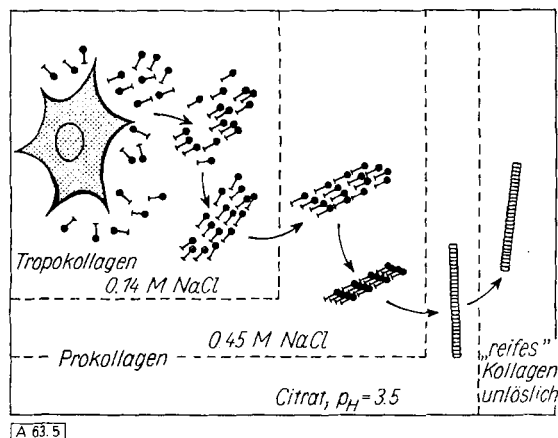
Stoffwechselversuche mit radioaktiven Isotopen haben es ermöglicht, die Umsatzgeschwindigkeit der am Aufbau des Bindegewebes beteiligten Komponenten zu bestimmen. Eine hierbei charakteristische Größe ist die „biologische Halbwertszeit“, worunter jener Zeitraum zu verstehen ist, der verstreichen muß, damit die nach Inkorporierung der radioaktiv markierten Synthesevorstufe erreichte Maximalaktivität einer Verbindung wieder auf die Hälfte abgesunken ist.

Das wichtigste Ergebnis solcher Untersuchungen mit radioaktiven Isotopen war, daß das Bindegewebe eine weit höhere Stoffwechselaktivität besitzt, als bisher vermutet wurde, und daß die Vorstellung, daß z. B. Knorpel oder Gefäßwände als primär „stoffwechselträge“ Organe zu bezeichnen sind, zumindest für physiologische Verhältnisse nicht zutrifft. Für die Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeiten eignen sich bevorzugt die chemisch gut definierten und relativ leicht sehr rein isolierbaren sauren Mucopolysaccharide, die als typische Inhaltsstoffe des Bindegewebes für dessen Stoffwechselaktivität repräsentativ sind. Für das Chondroitinsulfat (aus Kaninchenhaut) ließen sich z. B. durch Einbauversuche mit ^{35}S -Sulfat, ^{14}C -Acetat und ^{14}C -Glucose in guter Übereinstimmung Halbwertszeiten von 8–10 Tagen ermitteln⁷⁷⁾. Für Chondroitinsulfat aus Knorpel⁷⁸⁾ und Aorta⁷⁹⁾ ergeben sich in der gleichen Größenordnung liegende Werte (8–14 Tage), und für die Hyaluronsäure wurden sogar Halbwertszeiten von 2 bis 4 Tagen angegeben. Die relativ hohe Aktivität des Mucopolysaccharid-Umsatzes ergibt sich aus einem Vergleich mit Werten anderer Organe: So beträgt die Halbwertszeit für Bluteiweißkörper und Leberprotein 6–7 Tage, für Gehirn-Eiweiß etwa 12 Tage und für Skelettmuskulatur 32 Tage (Ratte).

Obwohl die Zellen des Bindegewebes in jedem Falle Träger dieser durch Biosynthese und Abbau gekennzeichneten Stoffwechselleistungen sind, macht doch die chemische Heterogenität der Bindegewebs-Komponenten eine getrennte Darstellung des Stoffwechsels der fibrillären Elemente einerseits und der Grundsubstanz-Polysaccharide andererseits erforderlich.

I. Biosynthese des Kollagens

Für die Biosynthese des Kollagens gilt nicht nur die Problematik der Proteinsynthese überhaupt, sondern sie wird durch zusätzliche Besonderheiten kompliziert. Die



[A 63.5]

Abb. 5. Schema der Kollagenbiosynthese zur Erläuterung der biologischen Signifikanz der verschiedenen aus Bindegewebe extrahierbaren Kollagenfraktionen (nach⁸⁰⁾)

⁷⁷⁾ S. Schiller, M. B. Mathews, J. A. Cifonelli u. A. Dorfman, J. biol. Chemistry 218, 139 [1956].

⁷⁸⁾ H. G. B. Slack, Biochem. J. 65, 459 [1957].

⁷⁹⁾ E. Odeblad u. H. Boström, Acta chem. scand. 7, 233 [1953].

⁸⁰⁾ J. Gross in J. H. Page: Connective Tissue, Thrombosis and Atherosclerosis. Academic Press, New York-London 1959, S. 77.

Tatsache, daß das Kollagen im Verlauf seiner Biosynthese einen (extrazellulären) Reifungsprozeß durchläuft, erklärt das Vorhandensein verschiedener — vor allem durch ihr Löslichkeitsverhalten charakterisierter — Kollagenfraktionen im Bindegewebe.

Die erste im Verlauf der Kollagenbiosynthese faßbare und bereits extrazellulär lokalisierte Zwischenstufe ist das Tropokollagen⁸¹⁾. Es stellt das „makromolekulare Monomer“ des Kollagens dar (siehe Abb. 5), das nach seiner Synthese in der Bindegewebszelle an das Außenmedium abgegeben wird. Die noch fehlende oder aber nur sehr geringe Aggregation der Grundeinheiten bedingen die (später verlorengehende) Löslichkeit in kalter 0,14 M NaCl-Lösung. Aus Tropokollagen-Lösungen lassen sich Fibrillen erhalten, die elektronenoptisch eine Achsenperiodizität von 2700 Å zeigen⁸²⁾.

Eine Aggregation der Tropokollagen-Moleküle führt zur Bildung des Prokollagens⁸³⁾, das als Fibrille bereits die typische elektronenoptisch sichtbare Querstreifung und im Röntgendiagramm auch die für das reife Kollagen charakteristische Periode von 650 Å besitzt, jedoch (im Gegensatz zu diesem) durch seine Löslichkeit in Citratpuffer bei $pH = 3,5$ („säurelösliches Kollagen“) gekennzeichnet ist und sich durch Dialyse gegen Na_2HPO_4 -Lösungen wieder in Fibrillenform abscheiden läßt.

Die zusätzliche Verfestigung des Prokollagens durch Quervernetzungen führt schließlich zum säure- und alkali-stabilen reifen Kollagenmolekül mit den oben beschriebenen Eigenschaften.

Bei einer Diskussion über die Verbindlichkeit eines solchen Syntheseschemas ist die Tatsache von Bedeutung, daß alle löslichen Kollagenfraktionen sich bezüglich ihrer physikochemischen Eigenschaften⁸⁴⁾, ihrer Aminosäure-Zusammensetzung⁸⁵⁾, ihrer makromolekularen Form ($2800 \cdot 14 \text{ Å}^2$) und ihres Molekulargewichtes (3600) weitgehend gleichen und auch in vitro ineinander überführbar sind. Eine wichtige Stütze für die Umwandlung der Kollagenfraktionen ineinander läßt sich aus Isotopenversuchen erhalten^{86, 87)}: Nach einmaliger Gabe von ^{14}C -Glycin erreicht die Aktivität des Tropokollagens (0,14 M NaCl bzw. Phosphatpuffer, $pH = 9$) nach 8–24 Stunden ihr Maximum und fällt innerhalb von drei Tagen auf Null ab. Die Aktivität des säurelöslichen Prokollagens (Citratpuffer, $pH = 3,5$) steigt sehr viel langsamer an, wobei der Anstieg parallel mit dem Abfall der Aktivität des Tropokollagens geht. Das unlösliche, reife Kollagen schließlich zeigt eine sehr späte und nur geringfügige ^{14}C -Inkorporierung, so daß dessen Zeit-Aktivitäts-Kurve einen fast ebenen Verlauf nimmt. Aus diesen Versuchen geht nicht nur hervor, daß die frühen Synthesestufen des Kollagens die höchste Umsatzrate aufweisen, sondern auch daß radioaktiv markiertes Glycin nacheinander zuerst im Tropokollagen, dann im Prokollagen und schließlich im Kollagen erscheint.

Die morphologische Erscheinungsform der Kollagenfibrille hängt von verschiedenen Faktoren ab. Ein langsames Zusammenlagern der Tropokollagen-Moleküle führt zu dicken kontrastreichen, wohlgeformten Fibrillen. Bei schneller Zusammenlagerung werden die Fibrillen dünner und bei plötzlichem Ausfällen bilden sich nur noch dünne, nicht quergestreifte Fäden neben unstrukturiertem Eiweiß. Durch in-vitro-Versuche läßt sich zeigen, daß auch die Gegenwart von Polyanionen Struktur und Aufbau der Kollagenfibrille beeinflusst, wobei z.T. Fibrillen mit abartigem Querstreifungsmuster entstehen. Beispiele hierfür sind das in Gegenwart von Mucopolysacchariden (und dem α_1 -Glykoproteid) entstehende „fibrous long-spacing“ Kollagen (FLS)^{88, 89)} oder das

⁸¹⁾ J. Gross, J. H. Highberger u. F. O. Schmitt, Proc. nat. Acad. Sci. USA 41, 1 [1955].

⁸²⁾ C. E. Hall u. P. Doty, J. Amer. chem. Soc. 80, 1269 [1958].

⁸³⁾ V. N. Orekhovitch, Science [Washington] 127, 1371 [1958].

⁸⁴⁾ J. Gross, J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl. 2, 261 [1956].

⁸⁵⁾ D. S. Jackson, A. A. Leach u. S. Jacobs, Biochim. biophysica Acta 27, 418 [1958].

⁸⁶⁾ D. S. Jackson in J. H. Page: Connective Tissue, Thrombosis and Atherosclerosis. Academic Press, New York-London 1959, S. 67.

⁸⁷⁾ R. D. Harkness, A. R. Mako, H. M. Muir u. A. Neuberger, Biochem. J. 56, 558 [1954].

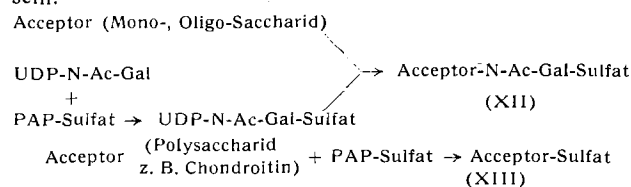
⁸⁸⁾ J. H. Highberger, J. Gross u. F. O. Schmitt, Proc. nat. Acad. Sci. USA 37, 286 [1951].

⁸⁹⁾ J. Gross, J. H. Highberger u. F. O. Schmitt, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 80, 462 [1952].

amin zum UDP-Acetylgalaktosamin (und auch der acetylfreien Verbindungen) durch eine UDP-Glucose-4-Epimerase katalysiert zu werden¹⁰⁹).

Die Glucuronsäure-Synthese hat neben ihrer Beteiligung am Mucopolysaccharid-Aufbau Bedeutung auch für eine Reihe weiterer Stoffwechselvorgänge. Der Synthesemechanismus und das Eingreifen des Uridin-Coenzym konnten in der letzten Zeit geklärt werden¹¹⁰).

Die Frage, in welchem Stadium der Chondroitinschwefelsäure-Synthese das Sulfat eingebaut wird, war lange Zeit Gegenstand eingehender Diskussionen. Zwar konnte *Lipmann*¹¹¹) beweisen, daß die Vorbedingung für den Sulfat-Einbau die Bildung eines aktiven Sulfats ist, das als 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat identifiziert wurde und auch an anderen sulfat-übertragenden Reaktionen (Phenolsulfat, Steroidsulfat) beteiligt ist, doch ist bislang nicht entschieden, ob der Sulfat-Einbau auf der Stufe eines Mono-(Oligo)-Saccharids oder erst am Polysaccharidmolekül stattfindet. Nach neueren Untersuchungen *Stromingers*¹¹²) (am Eileiter des Huhnes) scheint beides möglich zu sein.



Sulfat kann demnach auf Monosaccharide übertragen werden mit anschließendem Einbau des sulfatierten Monosaccharids in eine Mucopolysaccharid-Kette (XII), es kann aber auch auf sulfat-freie oder teilweise sulfatierte Polysaccharide (z. B. Chondroitin) übertragen werden (XIII), wobei die C-Atome 4 und 6 des Aminozuckers die bevorzugten Positionen darstellen. *Delbrück*¹¹³) konnte den Mechanismus der Sulfurierung von Chondroitinschwefelsäure im Kalbsembryo-Knorpel aufklären und zeigen, daß die Sulfat-Übertragung auf der Stufe des Polysaccharids stattfindet. Eine Sulfat-Übertragung auf Heparin durch Extrakte aus Mastzellentumoren¹¹⁴) spricht ebenfalls für die Rolle polymerer Sulfat-Acceptoren.

Die Kenntnisse über den Abbau von Mucopolysacchariden beruhen hauptsächlich auf Untersuchungen über die Verteilung von Mucopolysacchariden und ihren Abbauprodukten im Gewebe und ihre Ausscheidung im Urin nach oraler oder parenteraler Zufuhr. Welche Rolle hierbei den Enzymen²) Hyaluronidase, Heparinase oder den Glucuronidasen und Hexosaminidasen zukommt, ist noch unklar. Insbesondere beschränken sich die Kenntnisse über depolymerisierende Enzyme, die Mucopolysaccharide in kleinere Bruchstücke zu spalten vermögen, vorwiegend auf Hyaluronidase. Das Vorkommen einer animalischen Heparinase ist ungewiß. Anhaltspunkte für das Vorhandensein einer Chondroitinsulfat-Dopolymerase konnten nicht erhalten werden, obwohl — wie Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Chondroitinsulfat ergeben haben — nach subcutaner Injektion ein Teil der Aktivität im Urin als anorganisches Sulfat ausgeschieden wird¹¹⁵). Über Stoffwechselversuche mit radioaktiv markiertem D-Glucosamin und D-Galaktosamin (1-¹⁴C) berichtete *R. Kuhn*¹¹⁶).

Beziehungen des Bindegewebes zu Problemen der Physiologie und Pathologie

I. Das Bindegewebe als funktionelle Einheit

Die vielfältigen funktionellen Aufgaben des Bindegewebes ergeben sich aus der Verschiedenartigkeit seines Baus und seiner Lokalisation.

a) Mechanische Funktionen

Es ist ohne weiteres verständlich, daß dem Kollagen als Faserprotein mechanische Funktionen zukommen, z. B. in Sehnen und in der Gefäßwand. Eine optimale, den organspezifischen Erfordernissen angepaßte Funktion wird jedoch erst durch die Anwesenheit der sauren Mucopolysaccharide ermöglicht. Wie erwähnt, können Polyanionen Bau und Bildung kollagener Fibrillen beeinflussen. Es ist wahrscheinlich, daß die polaren Gruppen der Mucopolysaccharide mit z. B. regelmäßigen Sulfatlücken¹¹⁷) ein Verteilungsmuster besitzen, das — ähnlich wie bei den Nucleinsäuren — eine Art Information für die Bildung der kollagenen Faser enthält, und daß diese Information durch ihre Lokalisation im Bindegewebe den Ort der Faserbildung bestimmt und damit für die Entstehung eines gerichteten (straffen) oder eines mehr ungeordneten (lockeren) Bindegewebes verantwortlich ist.

Auch zwischen dem Mucopolysaccharid-Typ und der Dicke der Kollagenbündel bestehen Beziehungen: Im wachsenden und embryonalen Bindegewebe findet man Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat C in Begleitung feiner Kollagenbündel, im erwachsenen Gewebe dagegen grobe Kollagenbündel und Chondroitinsulfat B. An den mechanischen Aufgaben der kollagenen Fasern sind die Mucopolysaccharide oder deren Proteinkomplexe ebenfalls beteiligt. Die relativ hohe Konzentration der hochviscosen Hyaluronsäure in der Gefäßwand oder in den Sehnen des Nackenbandes, dagegen ihr Fehlen in immobilem Bindegewebe, z. B. in der Lederhaut des Auges, spricht für ihre Funktion als „Gleitmittel“ für die kollagenen und elastischen Fasern, die durch ständige Expansion und Kontraktion einer starken mechanischen Beanspruchung ausgesetzt sind. Auch die Erhaltung der Formkonstanz im Ohr- und Nasenknorpel wird durch das elastisch-viscose System der Chondroitinschwefelsäure-Protein-Komplexe garantiert. Die allgemeine Anschauung, daß Chondroitinsulfat durch Ausbildung interfibrillärer Brücken zwischen einzelnen Kollagenbündeln als „Kittsubstanz“ fungiert, ist allerdings niemals bewiesen worden.

b) Wasser- und Elektrolythaushalt

Die engen Beziehungen zwischen Kollagen und sauren Mucopolysacchariden zeigen sich weiterhin darin, daß beide als Funktionseinheit ein stark hydratisiertes System darstellen, an dem das Kollagen mit polaren Seitenketten und Peptidbindungen¹¹⁸), aber auch die sauren Mucopolysaccharide beteiligt sind. Für die Hyaluronsäure liegen Messungen über ihr großes Hydratations-Volumen vor¹¹⁹). Auch aus Befunden über die Hydratisierung von Rattenschwanz-Sehnen unter verschiedenen Bedingungen¹²⁰) geht hervor, daß eine wichtige physiologische Funktion des Kollagen-Mucopolysaccharid-Systems in der Speicherung und Fixierung von extrazellulärem Wasser besteht.

Die Fähigkeit der sauren Mucopolysaccharide, mit Kationen sehr feste Komplexe zu bilden, ist mehrfach beschrieben worden^{121–123}). Hierbei nimmt die Stärke der Kationen-Bindung mit der Wertigkeit zu. Das bedeutet, daß Calcium und Magnesium gegenüber Kalium und Natrium bevorzugt festgehalten werden und daß die sauren Mucopolysaccharide Austauscher-Funktionen ausüben können. Von Interesse sind in diesem Zusammenhang Studien über die Komplexbildung zwischen Chondroitinsulfat und dem $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ -Ion insofern, als sich zeigen läßt, daß nicht nur die Zahl und die Lage der sauren Gruppen, sondern auch ihre räumliche Beziehung für die Stärke der

¹⁰⁹) S. Roseman, Ann. Rev. Biochemistry 28, 562 [1959].

¹¹⁰) M. F. Utter, Ann. Rev. Biochemistry 27, 245 [1958].

¹¹¹) P. W. Robbins u. F. Lipmann, J. biol. Chemistry 229, 837 [1957].

¹¹²) S. Suzuk u. J. L. Strominger, ebenda 235, 257, 267, 271 [1960].

¹¹³) A. Delbrück, Tagung Dtsch. Ges. physiol. Chem., Berlin 1959.

¹¹⁴) E. D. Korn, J. biol. Chemistry 234, 1647 [1959].

¹¹⁵) D. D. Dziewiatkowski, J. biol. Chemistry 223, 239 [1956].

¹¹⁶) R. Kuhn, H. J. Leppelmann u. H. Fischer, Liebig's Ann. Chem. 620, 15 [1959].

¹¹⁷) K. Meyer: The Mucopolysaccharides of Bone. Little, Brown u. Co., Boston, Mass., 1956, S. 65.

¹¹⁸) K. H. Gustavson: The Chemistry and Reactivity of Collagen. Academic Press, New York 1956.

¹¹⁹) E. Balazs, Feder. Proc. 17, 1086 [1958].

¹²⁰) H. R. Eiden u. R. J. Boncek, Biochim. biophysica Acta 38, 205 [1960].

¹²¹) M. B. Mathews, Biochim. biophysica Acta 37, 288 [1960].

¹²²) M. Vouras u. M. Schubert, J. Amer. chem. Soc. 79, 792 [1957].

¹²³) S. J. Farber u. M. Schubert, J. clin. Invest. 36, 1715 [1957].

Komplexbildung entscheidend ist: Obwohl die linearen Polyelektrolyte Chondroitinsulfat A und B als Isomere sich nur durch die räumliche Konfiguration der COOH-Gruppe der Uronsäure (Glucuronsäure/Iduronsäure) unterscheiden, bindet Chondroitinsulfat B $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ wesentlich stärker als Chondroitinsulfat A¹²¹).

Die Bildung solcher Metall-Polysaccharid-Komplexe, an denen neben hauptvalenten auch koordinative Bindungen beteiligt sind⁵⁹), hat Konsequenzen, die in Abb. 6 schematisch dargestellt sind: Einmal wird die molekulare Form der Polysaccharidkette verändert: die Kette geht bei der Bildung von Ionenpaaren zwischen Kation und Anion aus der gestreckten in eine Zickzackform über. Zum anderen können nicht an der Komplexbildung beteiligte Ionen im Potentialfeld des Polyanions immobilisiert und als Reserve gespeichert werden.

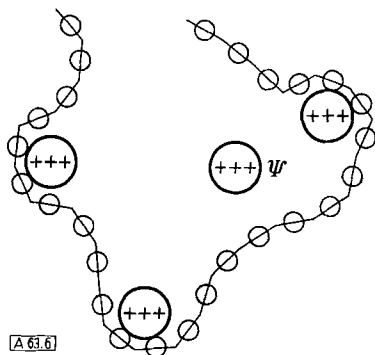


Abb. 6. Schematische Darstellung der Assoziation von $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ und Chondroitinsulfat durch Ionenpaarbildung bei gleichzeitiger Deformation der Polysaccharid-Kette. ψ = immobilisiertes Kation im Potentialfeld des Polyanions¹²¹)

Diese Befunde zeigen, daß die sauren Mucopolysaccharide den Austausch von Elektrolyten zwischen Blutgefäßsystem und Extrazellulärraum einerseits und Extrazellulärraum und Zellen andererseits kontrollieren können. Diese Funktion wird ganz evident bei der Beteiligung saurer Mucopolysaccharide an den Vorgängen der Calcifikation im Knochengewebe, wobei sie als „Calciumfänger“ die Ablagerung von tertiärem Calciumphosphat steuern.

c) Infektionsabwehr

Eine ganz andere, aber in gleichem Maße der Lebenserhaltung dienende Funktion fällt dem Bindegewebe im Rahmen der Infektabwehr zu. Über die Rolle, welche die sauren oder neutralen Mucopolysaccharide hierbei spielen, sind jedoch vorerst nur Vermutungen möglich. Man weiß zwar, daß Heparin¹²⁸) als Aktivator oder Inhibitor bestimmter Enzyme (Lipoproteinlipase, Hyaluronidase) auftreten kann und daß es biogene Wirkstoffe mit basischem Charakter wie 5-Hydroxytryptamin oder Histamin in biologisch inaktiver Form festhalten kann^{124, 125}), doch sind seine Fähigkeiten zur Bindung von bakteriellen Toxinen, Histaminliberatoren oder anderen entzündungserregenden Agentien noch hypothetisch. Dagegen gibt es Hinweise dafür, daß die Neuraminsäure am Infektionsgeschehen beteiligt ist, was z. B. in ihrer Funktion (und der ähnlich gebauter Derivate) als Virusagglutinationshemmer bzw. Virusrezeptorsubstanz zum Ausdruck kommt¹²⁶).

Eindeutige Anhaltspunkte, daß das Bindegewebe Träger solcher Abwehrfunktionen ist, ergeben sich aus Tierversuchen¹²⁷): Bei Ratten läßt sich nach Infektion mit *Pa-*

teurella multocida ein erhöhter Sulfateinbau (³⁵S) in das Chondroitinsulfat des Bindegewebes von Herz, Leber, Milz und Nieren nachweisen, während in nicht bindegewebigen Organen (z. B. Muskulatur) keine Unterschiede bestehen. Diese Zunahme der Stoffwechselaktivität ist als biosynthetische Leistung ein Zeichen dafür, daß das Bindegewebe auf Infektionen als funktionelle Einheit reagiert und daß den Vorgängen, die klinisch als „Aktivierung des mesenchymalen Systems“ bezeichnet werden, Veränderungen im Stoffwechsel des Bindegewebes zugrunde liegen.

d) Wundheilung

Die reparativen Leistungen des Bindegewebes in der Wundheilung stellen chemisch eine forcierte Synthese strukturloser Grundsubstanz und kollagener Fasern dar mit dem Ziel, defekte Strukturen zu schließen und gegen mechanische Beanspruchung widerstandsfähig zu machen. Diese Tendenz zeigt sich schon in der Einbaurate von ³⁵S, die im Wundheilungsgebiet (Granulationsgewebe) einen viermal höheren Wert aufweist als im Normalgewebe¹²⁹). Interessant ist hierbei, daß der Kollagensynthese zeitlich ein steiler Anstieg des Hexosamin-Gehaltes vorausgeht, ein Zeichen, daß die Mucopolysaccharid-Synthese der Primärvorgang und für die Ausbildung reifer Kollagenfasern Voraussetzung ist¹³⁰).

Der Einfluß des Vitamin C auf den Bindegewebsstoffwechsel ist gerade am Beispiel der Wundheilungsvorgänge häufig studiert worden. Der Befund, daß es unter Vitamin-C-Mangel im Granulationsgewebe einerseits zur Reduktion der Kollagen- und auch der Chondroitinsulfat-Synthese¹³¹), andererseits aber zur Anreicherung von Hyaluronsäure kommt¹³²), kann vorläufig nur so gedeutet werden, daß Vitamin C nur mit bestimmten Enzymsystemen des Fibroblasten zusammenwirkt, wobei die Sulfat-Übertragung, nicht jedoch die Mucopolysaccharid-Synthese betroffen sein könnte. Die Kollagensynthese scheint bei Vitamin-C-Mangel generell geschädigt zu sein (nicht, wie früher vermutet, nur die Hydroxylierung des Prolins), da sowohl die Einbaurate von Prolin wie die von Hydroxyprolin herabgesetzt ist⁹³).

II. Pathologie des Bindegewebes

a) Alterungsvorgänge

Veränderungen des Bindegewebes spielen im Rahmen der Alterungsvorgänge höherer Organismen vermutlich eine viel bedeutendere Rolle als bisher angenommen wurde. Daß mit zunehmendem Alter quantitative Veränderungen im Sinne einer Reduktion des Gesamtstoffwechsels einsetzen, ist bekannt. Im Bindegewebe äußert sich dies z. B. in einem verminderten ³⁵S-Einbau in die mesenchymalen Gewebe (Luftröhrenknorpel¹³³) und Aorta¹³⁴). Dem entspricht, daß die kollagenen Fasern jüngerer Lebewesen wesentlich mehr Prokollagen enthalten¹³⁵) als die älterer Individuen, deren Kollagenumsatz kontinuierlich abnimmt.

Viel bedeutsamer ist jedoch, daß sich im Alter auch die Zusammensetzung des Bindegewebes ändert. So enthält menschlicher Rippenknorpel des Neugeborenen als Muco-

¹²⁴) E. Werle u. R. Amann, Naturwissenschaften 42, 583 [1955].

¹²⁵) E. P. Benditt u. Mitarb., Proc. Soc. expt. Biol. Med. 90, 303 [1955].

¹²⁶) E. Klenk u. W. Stoffel, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 303, 78 [1956].

¹²⁷) G. Junge-Hülsing u. W. H. Hauss: Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes, G. Thieme, Stuttgart 1959, S. 83.

¹²⁸) Die blutgerinnungshemmende Wirkung des Heparins bleibt in diesem Zusammenhang außer Betracht. Literatur: E. Deutsch: Blutgerinnungsfaktoren, F. Deuticke, Wien 1955.

¹²⁹) L. L. Layton, D. R. Frankel, I. H. Sehr, S. Scapa u. G. Friedler, Nature [London] 181, 1543 [1958].

¹³⁰) J. E. Dunphy u. K. N. Dupa, New England J. Med. 253, 847 [1955].

¹³¹) L. L. Layton, Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. 8, 74 [1952].

¹³²) H. G. B. Slack, Biochem. J. 69, 125 [1958].

¹³³) H. Boström u. B. Månsson, Acta chem. scand. 7, 1014 [1953].

¹³⁴) M. O. Dyrbye, J. Gerontol. 14, 32 [1959].

¹³⁵) H. Hörmann, Beiträge zur Silikoseforschung. Sonderband 2, 619 [1956].

polysaccharid fast ausschließlich Chondroitinsulfat A. Mit dem Alter nimmt jedoch nicht nur die Gesamtkonzentration an Chondroitinsulfat ab, sondern das Chondroitinsulfat A wird gleichzeitig durch Chondroitinsulfat C ersetzt. Im ersten Lebensdezennium erscheint weiterhin das Keratinsulfat, das relativ zum Chondroitinsulfat ansteigt und im Alter schließlich 50 % der Gesamtmucopolysaccharide ausmacht¹³⁶). Die Veränderung des Verhältnisses Chondroitinsulfat: Keratinsulfat läßt sich durch Aminosäure-Analysen verfolgen¹³⁷). In der Haut (Schwein) nimmt die Hyaluronsäure mit zunehmendem Alter zugunsten von Chondroitinsulfat B ab¹³⁸). Es wäre zu prüfen, ob das für das Alter typische Nachlassen des Spannungszustandes (Turgor) und der Elastizität der Haut auch beim Menschen auf qualitativen Veränderungen des Mucopolysaccharid-Spektrums beruht.

b) Arteriosklerose

Die vitale Bedeutung einer funktionsoptimalen Zusammensetzung des Bindegewebes wird besonders am Beispiel der Arterienwände und ihrer wichtigsten pathologischen Veränderung, der Arteriosklerose, deutlich.

Neben der Einlagerung von Cholesterin bzw. Cholesterinestern und Lipiden kommt es in arteriosklerotischen Abschnitten der Arterienwand zu einem tiefgreifenden Umbau des Gefäßbindegewebes, dessen Bedeutung lange vernachlässigt wurde. Der relativ hohe Elastingehalt der gesunden Aorta (etwa 30 %) sinkt bei Arteriosklerose auf 50 % seines Ausgangswertes ab und erklärt so den für Arteriosklerose typischen Elastizitätsverlust¹³⁹). Diese Abnahme des Elastins, das in seiner chemischen Zusammensetzung auch qualitative Veränderungen erleidet¹⁴⁰), kann in „arteriosklerotischen Geschwüren“ zum völligen Verlust der elastischen Fasern unter Ersatz durch kollagenes Bindegewebe führen. Gleichzeitig nimmt der Hexosamingehalt als Ausdruck eines Anstiegs saurer und neutraler Mucopolysaccharide in arteriosklerotischen Bezirken erheblich zu. Ein Vergleich der Mucopolysaccharid-Spektren in normalen und arteriosklerotischen Aorten⁵⁹) (Abb. 7) zeigt, wie Einschränkung oder Verlust physiologischer Funktionen durch morphologischen Umbau mit ganz bestimmten chemischen Veränderungen einhergeht: Das Absinken des Hyaluronsäure-Gehaltes entspricht einmal dem herabgesetzten Wassergehalt in alten und arteriosklerotischen Aorten. Zum anderen ist das Vorkommen von Hyaluronsäure ein Cha-

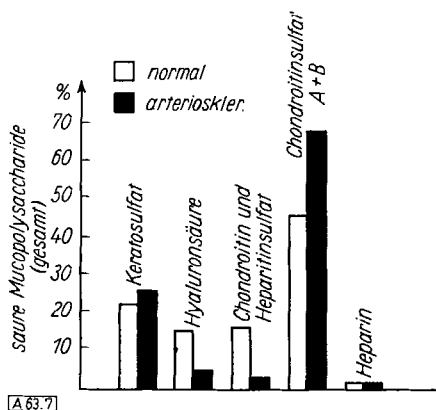


Abb. 7. Verteilung saurer Mucopolysaccharide (in % der Gesamt-Mucopolysaccharide) in der normalen und arteriosklerotischen Aorta des Menschen⁵⁹)

- ¹³⁶) D. Kapland u. K. Meyer, Nature [London] 183, 1267 [1959].
¹³⁷) R. Kuhn u. H. J. Leppelmann, Liebigs Ann. Chem. 611, 254 [1958].
¹³⁸) G. Loewi u. K. Meyer, Biochim. biophysica Acta 27, 453 [1958].
¹³⁹) E. Buddecke, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 310, 171 [1958].
¹⁴⁰) A. J. Lansing, E. Roberts, G. B. Ramasarma, T. B. Rosenthal u. M. Alex, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 76, 714 [1951].

rakteristikum bindegewebiger Organe mit hoher mechanischer Beanspruchung: Die starken in der Aorta zwischen den elastischen und kollagenen Fasern auftretenden Reibungskräfte werden von der viscosen, als Gleitsubstanz wirkenden Hyaluronsäure aufgefangen — eine Funktion, die mit der bei zunehmender Arteriosklerose steigenden Verfestigung der Aorta und dem damit verbundenen Elastizitätsverlust an Bedeutung verliert und sich chemisch in einer beträchtlichen Herabsetzung des Hyaluronsäure-Gehaltes ausdrückt.

Die Vermehrung des Chondroitinsulfates in der arteriosklerotischen Aorta ist bedeutungsvoll im Hinblick auf die Ionenaustauscher-Funktion der sulfatierten Mucopolysaccharide. Aus potentiometrischen Titrationen von Chondroitinsulfat in Gegenwart von Calcium muß geschlossen werden, daß zwischen Chondroitinsulfat-Vermehrung und erhöhter Calcium-Ablagerung mit zunehmender Arteriosklerose ein kausaler Zusammenhang besteht. Möglicherweise ist die Chondroitinsulfat-Vermehrung der primäre Vorgang, bedingt durch ein Nachlassen der Stoffwechselkapazität der Gefäßwand. Die gleichzeitige Verminderung der Konzentration an Chondroitin, das als Stoffwechselvorstufe des Chondroitinsulfats fungiert, ist in diesem Sinne zu werten. Daß die Chondroitinsulfat-Vermehrung das Ergebnis einer beträchtlichen Steigerung der Synthese der sulfathaltigen Mucopolysaccharide ist, läßt sich auch im Tierversuch bei experimenteller Arteriosklerose demonstrieren¹⁴¹).

Von Bedeutung ist ferner das Vorkommen von Heparitinsulfat in Blutgefäßen⁶⁹) und seine Abnahme bei Arteriosklerose. Die Tatsache, daß Heparitinsulfat in gleicher Weise wie das Heparin als „clearing-factor“*) im Sinne einer Aktivierung der in den Lipidstoffwechsel eingreifenden Lipoprotein-Lipase wirksam ist, führt zur Frage, ob das Heparitinsulfat in der Gefäßwand nicht das verbindende Glied zwischen Bindegewebs- und Fettstoffwechsel darstellt. Hier ergeben sich ganz neue Aspekte für die Pathogenese der Arteriosklerose.

c) Rheumatismus und Kollagenkrankheiten

Der Formenkreis rheumatischer Erkrankungen ist außerordentlich vielgestaltig. Neben den Veränderungen an Blutgefäßkapillaren wird das Krankheitsbild beim entzündlichen Rheumatismus bestimmt durch das Auftreten sogenannter „Rheumaknötchen“, bei rheumatischen Gelenkerkrankungen durch morphologische Veränderungen des Gelenknorpels. Chemische Untersuchungen hierzu stehen noch ganz in den Anfängen. Immerhin ließ sich zeigen, daß auch beim Rheumaknötchen beide Fundamentalkonstrukturen des Bindegewebes verändert sind: Die Grundsubstanz, die als Sitz der Primärveränderungen gilt, zeigt eine Vermehrung sowohl des Nichtkollageneiweißes (Glykoproteide) als auch der (gegen Hyaluronidase empfindlichen) sauren Mucopolysaccharide¹⁴⁴), beim Kollagen findet sich eine Veränderung des Fibrillen-Durchmessers und ein abartiges Färbemuster bei der Behandlung mit Osmiumtetroxyd¹⁴⁵). In der Gelenkflüssigkeit rheumatisch verän-

¹⁴¹) H. Hiltz, Biochem. Z. 232, 376 [1960].

*) clearing factor: Nach Injektion von Heparin erscheint im Blut eine Substanz, die die Fähigkeit besitzt, ein durch Lipoproteinkomplexe (sog. Chylomikronen) getrübbtes Serum klar und durchsichtig zu machen. Die Deutung, daß es sich hierbei um eine durch Heparin aktivierte Lipoprotein-Lipase handelt¹⁴²), wird neuerdings bestritten¹⁴³).

¹⁴²) E. D. Korn, J. biol. Chemistry 215, 1, 15 [1955].

¹⁴³) N. Zöllner in: Moderne Probleme der Pädiatrie. Verlag S. Karger, Basel-New York 1958.

¹⁴⁴) F. Hartmann, Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 1959, 65.

¹⁴⁵) W. Schwarz, zit. nach¹), Abschnitt 1.

der Gelenke ist die normalerweise vorhandene Hyaluronsäure vermehrt und vielleicht in ihrem Polymerisationsgrad verändert¹⁴⁶⁾.

Die günstige therapeutische Wirkung von Cortison und Hydrocortison bei rheumatischen Erkrankungen erklärt sich (zum Teil) aus deren Wirkungen auf die Mucopolysaccharid-Synthese. Eine Herabsetzung der Synthese von Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat¹⁴⁷⁾ sowie eine Hemmung der in den Fibroblasten ablaufenden biosynthetischen Vorgänge führen zu einer verzögerten Reaktion des Bindegewebes auf die Gewebsschädigung und mithin zu einer Unterdrückung des Entzündungsvorganges. Neben den zellulären sind extrazelluläre Angriffspunkte des Cortisons (polymerisierende Enzyme) wahrscheinlich.

Als Kollagenkrankheiten (Kollagenosen) faßt man eine Reihe von Krankheiten zusammen**), deren gemeinsames morphologisches Merkmal eine systemartige, als „fibrinoide Degeneration“ bezeichnete Schädigung des Bindegewebes darstellt. Die hierzu vorliegenden chemischen oder histochemischen Untersuchungen reichen für eine Systematik oder pathogenetische Deutung aus biochemischer Sicht bei weitem nicht aus. Sie weisen aber nachdrücklich darauf hin, daß alle Störungen, ob sie zunächst Bindegewebszellen, Grundsubstanz oder Fasern betreffen, letztlich das gesamte System des Bindegewebes in Mitleidenschaft ziehen, das man unbeschadet seines komplizierten und heterogenen chemischen Aufbaues als funktionelle Einheit ansehen muß.

d) Tumoren des Bindegewebes

Jedes Bindegewebe besitzt ein charakteristisches Mucopolysaccharid-Spektrum, zu dem mindestens zwei — meistens jedoch mehr — der bekannten sauren Mucopolysaccharide gehören. Es wird allgemein angenommen, daß jeder Mucopolysaccharid-Typ nur von ganz bestimmten,

¹⁴⁶⁾ J. P. Johnston, *Biochem. J.* 59, 626 [1955].

¹⁴⁷⁾ S. Schiller u. A. Dorfman, *Endocrinology* 60, 376 [1957].

**) Lupus erythematosus disseminatus, generalisiertes Skleroderma, Dermatomyositis, Serumkrankheit, Periarteritis nodosa u. a. (s. hierzu ⁴⁾).

für dessen Synthese eingerichteten Bindegewebszellen produziert wird. Eine wichtige Stütze für diese Annahme ist darin zu sehen, daß aus Bindegewebstumoren nur ein einziges Mucopolysaccharid isoliert werden kann. In einem von K. Meyer analysierten Chondrosarkom wurden große Mengen Chondroitinsulfat C isoliert. Diese Beobachtung bildete die Grundlage für den Versuch, Patienten, die an Chondrosarkom leiden, mit großen Dosen ³⁵S markierten Sulfats zu behandeln¹⁴⁸⁾. Natürlich lassen die ersten Erfolge endgültige Schlußfolgerungen über diese Form der Strahlentherapie noch nicht zu, doch tritt auch beim Versuchstier nach großen Dosen ³⁵S-Sulfat eine deutliche Retardierung des Knorpelwachstums ein¹⁴⁹⁾. Auch die höhere Sulfat-Aufnahme von chondrosarkomatösem Gewebe konnte bewiesen werden¹⁵⁰⁾.

e) Genetische Defekte

Es ist zu erwarten, daß genetische Defekte im Bereich des Bindegewebes sich durch Fehler in der Biosynthese der Mucopolysaccharide ausweisen müssen. Das einzige bisher bekannte Beispiel für eine solche angeborene und ererbte Mißbildung ist das *Hurlersche Syndrom* (Gargoylismus, Dysostosis multiplex). Bei diesem Krankheitsbild werden in fast allen Organen intrazellulär Mucopolysaccharid-sulfate gespeichert, die sich in den bisher untersuchten Fällen^{151, 152)} als Chondroitinsulfat B und Heparitinsulfat erwiesen, und die auch in großen Mengen im Urin ausgeschieden werden. Bemerkenswerterweise findet man das Chondroitinsulfat B auch in Organen, in denen es normalerweise nicht vorhanden ist (Gehirn).

Eingegangen am 19. Juli 1960 [A 63]

¹⁴⁸⁾ R. G. Gottschalk, L. K. Alpert u. P. O. Miller, *Proc. Amer. Cancer Res.* 23, 1 [1959].

¹⁴⁹⁾ R. G. Gottschalk u. H. N. Beers, *A. M. A. Arch. Pathol.* 65, 298 [1958].

¹⁵⁰⁾ R. G. Gottschalk u. H. G. Allen, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 80, 334 [1952].

¹⁵¹⁾ A. Dorfman u. A. E. Lorincz, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 43, 443 [1957].

¹⁵²⁾ K. Meyer, M. Grumbach, A. Linker u. Ph. Hoffman, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 91, 275 [1958].

Amoebizide

Von Dr. J. DRUEY*)

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel, Pharmazeutische Abteilung

Nach einem Rückblick auf die geschichtliche Entwicklung von Diagnostik und Therapie der Amoebenruhr (Amoebiasis) werden folgende zur Bekämpfung dieser Krankheit verwendete Substanzen besprochen: A. Naturprodukte: Pflanzeninhaltsstoffe aus *Ipecacuanha* (Emetin), *Holarrhena* (Conessin), *Simaruba glauca*, *Brucea* u. a.; Antibiotica. B. Synthetica: Emetin-Analoga und verschiedene Diamine, Chinoline, Acridine, Arsen-Verbindungen, Haloacetamide und andere Strukturen; Phenanthroline. Die zuletzt genannten Stoffe aus der Phenanthrolin-Gruppe werden ausführlicher dargestellt und die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bei diesem neuen Typ von Amoebiziden erläutert.

Die Amoebenruhr (Amoebiasis) ist eine Infektionskrankheit, die durch die Ruhramoeba *Entamoeba histolytica* hervorgerufen wird. Diese ist ein besonders in tropischen Gebieten häufiger Dickdarmparasit des Menschen, der auch ohne äußere Krankheitszeichen im Lumen des Darmes leben kann. Unter bestimmten Bedingungen, z. B. nach Schädigungen des Darmes, kann es zum Ausbruch der Ruhrkrankheit kommen. Die pathogene Form der *Entamoeba histolytica* dringt in die Darmwand ein und löst die Darmzellen unter Bildung von Geschwüren auf. Diese intestinale

Amoebiasis ist durch verschieden starken Befall der Darmschleimhaut charakterisiert; er reicht von tiefen definierten Einzelgeschwüren bis zur flächigen Zerstörung der Mucosa mit schweren Anfällen von Dysenterie als Folgeerscheinung. Vom Darm aus können die Erreger in verschiedene Organe des Körpers gelangen, besonders die Leber wird befallen (Leberabszesse, Amoeben-Hepatitis).

Die Verbreitung der Amoebiasis ist sehr groß. Sie ist in gemäßigten Zonen nicht selten, in tropischen Gebieten dagegen endemisch mit sehr hohen Befallsraten der Bevölkerung; sie gehört daher mit der Malaria und der Schistosomiasis (Bilharziose) zu den häufigsten Tropenkrankheiten. Die Erreger werden durch Trinkwasser, Nahrung und infizierte Gegenstände übertragen.

*) Nach einem Vortrag gehalten beim Symposium on Amoebiasis in Lucknow (Indien), November 1959. Dr. O. Schier für die redaktionelle Umarbeitung des englischen Manuskriptes bestens gedankt.