Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 487–493

Über eine Sphingolipidose mit Anreicherung von neutralen Glykosphingolipiden, $A_{02}(G_{M3})$ - und $A_1(G_{M2})$ -gangliosid

Von L. Kerényi

Neurologisch-Psychiatrische Universitätsklinik Pécs, Ungarn,

R. Kannan

Radio-Isotope-Research, Veterans Administration Los Angeles/Calif.,

W. Gielen

Pharmakologisches Institut der Universität zu Köln

und

Hildegard Debuch

Physiologisch-chemisches Institut der Universität zu Köln

(Eingegangen am 4. April 1974)

Die Glykolipide aus neun Formalin-fixierten Gehirnbereichen eines Patienten mit einer ungewöhnlichen Lipidspeicherkrankheit, die zunächst als *Tay-Sachs*'sche Erkrankung diagnostiziert war, wurden qualitativ und quantitativ analysiert und deren Fettsäurezusammensetzungen gaschromatographisch bestimmt. Wir fanden in allen Hirnregionen eine Anreicherung von $A_{02}(G_{M3})$ -gangliosid (Hämatosid), von $A_1(G_{M2})$ -gangliosid (*Tay-Sachs*-gangliosid), sowie von Lactosylceramid und Monoglykosylceramid. Die Monoglykosylceramidfraktion der grauen Substanz war ein Gemisch von Galaktosylceramid und Glucosylceramid, mit 62 % Galaktosylceramid und 38 % Glucosylceramid. Eine Anhäufung von Trihexosylceramid und Tetrahexosylceramid konnte nicht nachgewiesen werden. Das Lactosylceramid steht in enger metabolischer Beziehung zu den Gangliosiden entsprechend dem übereinstimmenden Fettsäuremuster, in dem Stearinsäure und Palmitinsäure vorherrschen. Die Fettsäuren des Glucosylceramids hingegen weichen deutlich von diesem Muster ab.

A sphingolipidosis with the accumulation of neutral glycosphingolipids, $A_{02}(G_{M3})$ and $A_1(G_{M2})$ -ganglioside.

Analyses have been made of glycosphingolipids from formalin-fixed sections of grey and white matter from nine different regions from the brain of a patient with an unusual lipid storage disease, diagnosed initially as *Tay-Sachs*-disease. The fatty acid compositions of the accumulated glycosphingolipids were determined. This patient was found to have abnormally high concentrations of $A_{02}(G_{M3})$ -ganglioside (hematoside), $A_1(G_{M2})$ -ganglioside (*Tay-Sachs*-ganglioside), besides monohexosylceramide and dihexosylceramide in much higher than normal amounts. The dihexosylceramide was identified as lactosylceramide. The monohexosylceramide of the grey matter was a mixture of galactosyl- and glucosylceramide, with 62 % galactosyl- and 38 % glucosylceramide. The levels of trihexosylceramide and tetrahexosylceramide were no higher than normal. The fatty acid composition of the lactosylceramide is similar to that of the corresponding ganglioside, which contains predominantly stearic and palmitic acids. The fatty acid components of the glucosylceramide, however, show a markedly different pattern.

Wir beschreiben den Lipidstatus einer schwer einzuordnenden Lipidose, charakterisiert durch eine Anreicherung von $A_{02}(G_{M3})$ -gangliosid¹⁾ (Hämatosid),

$A_1(G_{M2})$ -gangliosid (*Tay-Sachs*-Gangliosid), Glucosylceramid und Lactosylceramid. Über einen ähnlichen Fall dieser wohl seltenen Speicherkrankheit haben Pilz, Sandhoff und Jatzkewitz (3) im Jahre 1966 berichtet. Diese Krankheit war von Jørgensen et al. (4) aufgrund von histochemischen Untersuchungen als *Niemann*-

1) Abkürzungen

Ganglioside:	Nomenklatur nach Klenk (1), in Klammern Nomenklatur nach Svennerholm (2).
A_{01}	= Neuraminosylgalaktosylceramid
$A_{02}(G_{M3})$	= Neuraminosyllactosylceramid (Hämatosid)
$A_1(G_{M2})$	= N-Acetylgalaktosaminyl-(neuraminosyl)-lactosylceramid (<i>Tay-Sachs</i> -Gangliosid)
$A_2(G_{M1})$	= Galaktosyl-N-acetylgalaktosaminyl-(neuraminosyl)-lactosylceramid
$B_1(G_{D1a})$	= Neuraminosyl-galaktosyl-N-acetylgalaktosaminyl-(neuraminosyl)-lactosylceramid

B_3	= N-Acetylgalaktosaminyl-(dineuraminosyl)-lactosylceramid
$C_1(G_{D1b})$	= Galaktosyl-N-acetylgalaktosaminyl-(dineuraminosyl)-lactosylceramid
$C_3(G_{T1})$	= Neuraminosyl-galaktosyl-N-acetylgalaktosaminyl-(dineuraminosyl)-lactosylceramid
C_4	= Dineuraminosyl-galaktosyl-N-acetylgalaktosaminyl-(dineuraminosyl)-lactosylceramid

Pick'sche Krankheit mit neuronaler Beteiligung klassifiziert worden. Das übereinstimmende Fettsäuremuster im Lactosylceramid, Hämatosid und Tay-Sachs-Gangliosid ließ auf die Herkunft des Diglykosylceramid aus dem Gangliosidstoffwechsel schließen. Hauptspeichersubstanz war das Lactosylceramid, angereichert waren ebenfalls Hämatosid und Tay-Sachs-Gangliosid. Die Autoren (3) vermuteten eine Störung im Gangliosidstoffwechsel auf der Stufe des Lactosylceramids. Allerdings war nicht auszuschließen, daß die ursprüngliche Speichersubstanz auch das Hämatosid sein könnte, das durch das lange Lagern der Gewebeproben in Formalin N-Acetylneuraminsäure verloren hat (5). Bis auf die Quantität des Glucosylceramids in der grauen Substanz scheinen beide Fälle, der hier beschriebene und der von Jatzkewitz et al (3) analysierte, identisch zu sein. Das hier isolierte Glucosylceramid weist ein Fettsäuremuster auf, das von dem des Lactosylceramids und der Ganglioside erheblich abweicht.

Bei einer Variante einer spätinfantilen amaurotischen Idiotie wurden ebenfalls große Mengen an Lactosylceramid gefunden (6), zusammen mit einer Vermehrung des Tetrahexosylceramids und der vier hauptsächlichen Ganglioside. Damit ist dieser Fall mit dem hier beschriebenen nicht vergleichbar, da weder eine generelle Vermehrung der Hauptganglioside noch des Tetrahexosylceramids festgestellt werden konnte.

In neuerer Zeit hat Dawson (7) über eine Lipidose berichtet, die durch hohe Konzentration von Lactosylceramid im Plasma, in den Erythrocyten, in der Leber, der Milz, den Nieren und im Gehirn ausgezeichnet war. Neben Lactosylceramid wurden Glucosylceramid, Hämatosid und Tay-Sachs-Gangliosid vermehrt angetroffen. Diese Lipidose wurde als Lactosylceramidose bezeichnet. Der Enzymdefekt lag auf der Stufe der Lactosylceramid-galaktosylhydrolase (8), in der Leber betrug die Enzymaktivität dieser Lactosylceramidase nur noch 16–20% des Normalwertes. In Fibroblastenkulturen aus Haut- und Knochenmarkbiopsien konnte dieser Enzymdefekt ebenfalls nachgewiesen werden (9), auch war die β -Glucosidaseaktivität auf 55% der Norm reduziert. In Gaucher-Fibroblasten hingegen betrug die Aktivität der β -Glucosidase nur noch 5% der Norm. Die Verminderung der β -Glucosidaseaktivität auch in den Fibroblasten der Lactosylceramidose gibt eine Erklärung für das erhöhte Vorkommen des Glucosylceramids in der hier beschriebenen Lipidose.

Das Defizit an spezifischer Galaktosylhydrolase dürfte bei einigen Lipidosen die primäre Ursache sein, bei der $A_2(G_{M1})$ -gangliosidose (10), bei der Krabbe'schen Krankheit (11), bei der das Galaktosylceramid nicht hydrolysiert werden kann, bei der hier wohl vorliegenden Lactosylceramidose (8) und bei der Fabry-Erkrankung (12), bei der das Triglykosylceramid, Galaktosyl-galaktosylglucosylceramid, gespeichert wird.

Material und Methoden

Material

Die Gehirnstücke wurden uns freundlicherweise von Dr. L. Balta-vary, Szambathely (Ungarn) überlassen. Sie wurden dem Gehirn unmittelbar nach dem Tode eines im Alter von 11 Jahren verstorbenen Patienten entnommen. Aus der Anamnese ging hervor, daß seit dem zweiten Lebensjahr eine geistige und körperliche Retardierung vorlag. Die histologischen Befunde nach der Obduktion lenkten den Verdacht auf das Vorliegen einer ungewöhnlichen Lipidose. Die Gehirnstücke wurden nach der Entnahme in Formalin fixiert und 2 Jahre bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Aus den Hirnregionen wurden jeweils 3–6 g herauspräpariert, nach dem gründlichen Abspülen mit destilliertem Wasser wurden die Hirnrinde und das Mark getrennt und gesondert weiterverarbeitet. Es wurden folgende Areale untersucht: Lobus frontalis, weiß und grau; Lobus parietalis, weiß und grau; Lobus occipitalis, weiß und grau; Cerebellum, weiß und grau; Putamen; Thalamus; Marklager der Brücke. Nach der weitgehenden Entfernung des Formalins durch Dialyse gegen dest. Wasser wurden die Gewebstücke jeweils in 10 ml Wasser/g Feuchtwicht homogenisiert und anschließend gefriergetrocknet. Zum Vergleich wurde ein Gewebstück aus dem Lobus frontalis eines frischen Normalgehirns in gleicher Weise aufgearbeitet.

Präparation der Ganglioside

Das gefriergetrocknete Gewebe (0,5–1,0 g Trockengewicht) wurde 12 Stunden lang bei Raumtemperatur mit 20 ml Chloroform/Methanol (200 ml + 100 ml) behandelt. Der Extrakt wurde filtriert, der Rückstand mit dem gleichen Volumen Chloroform/Methanol (200 ml + 100 ml), mit Chloroform/Methanol (100 ml + 100 ml) und dann mit Chloroform/Methanol (100 ml + 200 ml) jeweils 15 min unter Rückfluß extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und im Vakuumrotationsverdampfer bei 30°C eingedampft. Die Rohganglioside wurden durch Folch'sche Verteilung (13) aus dem Gesamtlipidextrakt dargestellt.

Der Extraktionsrückstand wurde in 50 ml Chloroform/Methanol (200 ml + 100 ml) aufgenommen und mit 10 ml 0,1 mol/l KCl und anschließend 2 mal mit reiner Oberphase nach Folch, die aus 50 ml Chloroform/Methanol (200 ml + 100 ml) und 10 ml 0,1 mol/l KCl hergestellt wurde, ausgeschüttelt. Der Lipidextrakt wurde dann noch 2 mal mit reiner Oberphase, die kein KCl enthielt, zweiphasig verteilt. Die gesammelten Oberphasen mit den Gangliosiden wurden 48 h bei 4°C gegen destilliertes Wasser dialysiert, bei 30°C auf 5 ml eingedampft und gefriergetrocknet. Zur weiteren Reinigung wurde das Rohgangliosid zunächst über eine kleine Säule mit Dowex-50 (H^+ -Form) filtriert, gefriergetrocknet und durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G-Platten Schichtdicke 0,5 mm (Kieselgel G, Merck, Darmstadt) im Laufmittel Chloroform/Methanol/0,3 % CaCl_2 /konz. NH_4OH (60 ml + 35 ml + 7 ml + 1,5 ml) (14) in die Einzelganglioside getrennt. Nach der Entwicklung der Platten, Markierung der Glykolipide durch Joddampf und Entfernung des Jods im Luftstrom, wurden die abgelösten Kieselgelschichten zuerst bei Raumtemperatur und anschließend 3 mal unter Rückfluß mit jeweils 5 ml Chloroform/Methanol/Wasser (10 ml + 20 ml + 3 ml) extrahiert. Der Gangliosidextrakt wurde nach dem Eindampfen in 0,5 ml Chloroform/Methanol (200 ml + 100 ml) gelöst, auf Kieselgel G-Fertigplatten (Merck, Darmstadt) im Laufmittel Chloroform/Methanol/0,3 % CaCl_2 /konz. NH_4OH (60 ml + 35 ml + 7 ml + 1,5 ml) entwickelt und nach dem Besprühen mit Bials Orcinreagenz 25 min bei 120°C in einer geschlossenen Kammer erhitzt (15).

Isolierung der neutralen Glykolipide

Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 100 mg des Lipidgemisches aus den Folch'schen Unterphasen. Die Glykolipide der organischen Phase wurden nach der Methode von Vance und Sweeley (16) an Kieselgelsäulen abgetrennt. (8 g Kieselgel (Mallinckrodt) 0,09 mm Korngröße, 12 Stunden bei 120°C aktiviert. Säule: Länge 260 mm, Durchmesser: 13 mm).

Das 1. Eluat (200 ml Chloroform) enthielt vorwiegend Neutral-lipide, das 2. Eluat (400 ml Aceton/Methanol (900 ml + 100 ml), enthielt die Hauptmenge der Glykolipide, und das 3. Eluat (300 ml Methanol) schließlich bestand im wesentlichen aus Phospholipiden.

Das 2. Eluat wurde bei 30 °C zur Trockne eingedampft und der Rückstand nach der Methode von Dawson (17) einer milden alkalischen Hydrolyse unterzogen. Dazu wurde der Rückstand mit Chloroform/1,2 mol/l methanol. NaOH (10 ml + 10 ml) (0,2 ml/mg Trockenrückstand) versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Nach der Neutralisation mit 0,6 mol/l methanol. HCl wurde die Lösung 48 Stunden lang bei 4 °C gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Die Zusammensetzung der Glykolipidfraction wurde dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel G-Fertigplatten (Merck, Darmstadt) im Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (60 ml + 25 ml + 4 ml), nach Besprühen mit 500 g/kg H₂SO₄ und Erhitzen (20 min bei 120 °C) ermittelt. Die einzelnen Glykosylceramide wurden aus dem gefriergetrockneten Material durch präparative Dünnschichtchromatographie isoliert. Dazu wurden frisch aktivierte Kieselgel G-Platten Schichtdicke 0,5 mm (Kieselgel G, Merck, Darmstadt) mit jeweils 10 mg Glykolipidgemisch beladen und im Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (97,5 ml + 37,5 ml + 6 ml) entwickelt. Die einzelnen Banden der Glykolipide wurden durch Aufsprühen von wenig Wasser sichtbar gemacht, markiert und, nach dem Trocknen im kalten Luftstrom, von den Platten abgeschabt. Das abgelöste Material wurde in eine kleine Säule überführt und die Glykolipide daraus mit Chloroform/Methanol/Wasser (10 ml + 5 ml + 1 ml) eluiert. Die Eluate wurden zur Trockne eingedampft. Das Glucosylceramid wurde anschließend aus der Monohexosylceramidfraktion durch präparative Dünnschichtchromatographie an Borax-impregnierten Kieselgel G-Platten (18) im Laufmittel Chloroform/Methanol/14% NH₄ OH (40 ml + 10 ml + 1 ml) vom Galaktosylceramid abgetrennt und in dünnschichtchromatographisch reiner Form erhalten. Die Oligohexosylceramide wurden nochmals durch präparative Dünnschichtchromatographie im Laufmittel n-Propanol/12,5% NH₄ OH (8 ml + 1 ml) (19) gereinigt, dabei konnte eine gute Trennung des Dihexosylceramids vom Sulfatid erreicht werden.

Analytische Methoden

Fettsäuremethylester

1 mg der reinen Glykolipide wurde nach Gaver und Sweeley (20) in 10 ml 1 mol/l wässriger HCl in Methanol hydrolysiert, nach Zugabe von 2 ml Wasser wurden die Fettsäuremethylester durch fünfmaliges Ausschütteln mit Petroläther (Kp 40–60 °C) extrahiert. Die Petrolätherextrakte wurden mit Wasser neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingedampft. Die Fettsäuremethylester wurden gaschromatographisch an einem Varian Aerograph Modell 1800 FID, ausgerüstet mit einem Digital Integrator Elektronik 481, bestimmt. Die verwendete Glassäule (2000 × 2 mm) enthielt 4,4 % DEGS auf Chromosorb W (80–100 mesh). Die Gaschromatographie wurde bei konstanter Temperatur von 170 °C, bei einer Injektortemperatur von 225 °C und einer Detektortemperatur von 250 °C durchgeführt. Als Trägergas diente N₂ mit einer Durchflußrate von 20 ml/min.

Neuraminsäure

Die lipidgebundene N-Acetylneuraminsäure bestimmten wir nach der Methode von Warren (21). 1 mg Gangliosid wurde in 1 ml 0,05 mol/l H₂SO₄ gelöst und 45 min bei 100 °C erhitzt. In 0,2 ml des Hydrolysates ermittelten wir den N-Acetylneuraminsäuregehalt mit Perjodat/Thiobarbitursäure.

Die quantitative Bestimmung des Gangliosidmusters erfolgte nach der von Suzuki (22) beschriebenen Methode. Dazu wurde jeweils 50 µg Gangliosid auf Kieselgel G-Platten (0,5 mm Schichtdicke) strichförmig aufgetragen und im Laufmittel Chloroform/Methanol/0,3 % CaCl₂/konz. NH₄OH (60 ml + 35 ml + 7 ml + 1,5 ml) entwickelt. Die Glykolipide wurden mit Joddampf sichtbar gemacht und markiert. Nach dem Verdampfen des Jods im kalten Luftstrom wurden die einzelnen gangliosidhaltigen Kieselgelzonen von der Dünnschichtplatte in Zentrifugen-gläser überführt und mit 0,5 ml H₂O versetzt. Nach 5 min wurde 0,5 ml Resorcin-Reagenz (23) hinzugefügt, 1 min intensiv gerührt und anschließend 15 min im siedenden Wasserbad erwärmt. Der Farbstoff wurde mit 1,5 ml Butylacetat/n-Butanol (85 ml + 15 ml) (24) extrahiert. Die Extinktion wurde bei 580 nm gegen einen Leerwert, der dieselbe Menge Kieselgel aus einem gangliosidfreien Areal derselben Dünnschichtplatte enthielt, gemessen.

Neutralsucker

Die Analyse der Neutralsucker erfolgte durch Gaschromatographie der Alditolacetate (25). Apparat wie oben beschrieben, Trennung in Glassäulen an 1% OV-225 auf Gaschrom Q (80–100 mesh), Säulentemperatur: 190 °C, Injektortemperatur: 225 °C, Detektortemperatur: 250 °C; Trägergas: N₂, Durchflußrate: 20 ml/min.

Partielle Hydrolyse

Zur Bestimmung der Zuckersequenz des Diglykosylceramid wurde das Präparat einer partiellen Hydrolyse nach der Methode von Ledeen (26) unterzogen. Dazu wurden 2 mg der Verbindung in 0,1 ml Methanol und 2 ml 0,1 mol/l HCl suspendiert und in einem Schliffzentrifugenglas 1 h bei 100 °C hydrolysiert. Nach Zugabe von 10 ml Chloroform/Methanol (200 ml + 100 ml) wurde die organische Phase durch mehrmaliges Ausschütteln mit jeweils 2 ml Folch'scher Oberphase neutral gewaschen und eingedampft. Das entstandene Monoglykosylceramid wurde einerseits auf Borax-impregnierten Kieselgel G-Platten (18) analysiert und andererseits durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (Schichtdicke 0,5 mm) im Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (60 ml + 25 ml + 4 ml) in reiner Form isoliert. Die Zuckerkomponente des Monoglykosylceramid wurde dann nach der Hydrolyse (1 mol/l HCl, 6 h, 100 °C) gaschromatographisch als Alditolacetat bestimmt.

Ergebnisse

Die Glykolipidverteilung einiger Hirngebiete ist in der Tabelle 1 dargelegt. Der Gesamtlipidgehalt der weißen Hirnsubstanz in den einzelnen Regionen beträgt einheit-

Tab. 1. Glykolipide einiger Hirngebiete (in % vom Trocken-Gewicht).

	Lobus frontalis		Lobus parietalis		Lobus occipitalis		Putamen	Thalamus	Cerebellum		Pons
	weiß	grau	weiß	grau	weiß	grau			weiß	grau	
Gesamtlipide	47,2	34,6	49,8	31,4	47,8	30,8	43,4	47,1	50,2	31,6	50,9
Roh-Ganglioside	2,7	3,3	2,2	3,3	2,2	3,4	2,3	2,5	1,8	3,6	2,1
Ganglioside, rein	1,4	2,5	1,1	2,5	1,1	2,3	1,7	1,9	1,4	2,9	1,7
Monoglykosylceramid	9,3	3,5	—*)	—	—	—	—	—	10,9	4,1	—
Diglykosylceramid	0,9	1,7	—	—	—	—	—	—	1,1	1,4	—
Sulfatid	2,6	2,0	—	—	—	—	—	—	3,7	2,2	—

*) Proben nicht untersucht, da qualitativ gleiche Zusammensetzung wie aus Abb. 5 ersichtlich

lich 50%, in der grauen Substanz wenig mehr als 30% (berechnet auf Trockengewicht). Die Gesamtmenge an Gangliosid ist sowohl in der grauen Substanz als auch in der weißen Substanz vermehrt. Die Normalwerte bezogen auf Trockengewicht werden für die weiße Substanz mit 0,31 (0,64) %, für die graue Substanz mit 1,33 (1,21) % (19,27) angegeben. Ungewöhnlich hoch ist bei dieser Lipidose die Anhäufung von Monoglykosylceramid in der grauen sowie von Diglykosylceramid in der grauen und der weißen Hirnsubstanz. Normalerweise ist das Diglykosylceramid in der weißen Substanz nicht anzutreffen, in der grauen Substanz nur in Spuren (0,02% des Trockengewichtes) (7,19).

Die Gangliosidmuster der einzelnen Regionen sind aus der Abbildung 1 ersichtlich.

In allen untersuchten Regionen ist die deutliche Vermehrung des Gangliosids $A_{02}(G_{M3})$ und des *Tay-Sachs*-Gangliosids $A_1(G_{M2})$ sichtbar, mit besonderer Deutlichkeit treten diese Ganglioside in der grauen Substanz des Lobus frontalis und in der grauen Substanz des Cerebellum hervor.

Der größere Anteil der bei dieser Erkrankung angereicherten Ganglioside verbleibt bei der *Folch*'schen Verteilung auf Grund des lipophilen Charakters dieser Substanzen

Abb. 1. Ganglioside der *Folch*'schen Oberphase
Bahn 1: Normalgehirn, Bahnen 2–8: Pathologisches Gehirn.
Kieselgel G-Fertigplatte (Merck, Darmstadt), Laufmittel: Chloroform/Methanol/0,3 % CaCl_2 /konz. NH_4OH (60 ml + 35 ml + 7 ml + 1,5 ml). Zweimal in diesem Laufmittel entwickelt. Anfärbung: *Bial's* Orcin-Reagenz (120 °C, 25 min).

Abb. 2. Ganglioside der *Folch*'schen Oberphase. Methode wie unter Abbildung 1 beschrieben.

Abb. 3. Ganglioside der *Folch*'schen Unterphase. Methode wie unter Abbildung 1 beschrieben.

in der unteren, organischen Phase. In den Abbildungen 2 und 3 sind daher die Ganglioside der *Folch*'schen Unter- und Oberphasen aus dem Lobus frontalis dargestellt. Das Ausmaß der Speicherung wird beim direkten chromatographischen Vergleich eines in gleicher Weise aufgearbeiteten Gangliosidextraktes aus einem normalen Lobus frontalis offensichtlich.

Eine ausführliche Analyse des Gangliosidmusters der einzelnen Hirnregionen ist in der Tabelle 2, aufgegliedert nach *Folch*'scher Ober- und Unterphase, dargelegt. Hier zeigt es sich erneut, daß der Hauptanteil der lipophilen Ganglioside in der *Folch*'schen Unterphase bleibt.

Tab. 2. Gangliosid-Analyse in den verschiedenen Regionen des pathologischen Gehirns.

Region	Folch'sche Phase	N-Acetylneuraminsäure-Verteilung (%)								
		A ₀₁	A ₀₂ (G _{M3})	A ₁ (G _{M2})	*)	A ₂ (G _{M1})	B ₁ (G _{D1a})	C ₁ (G _{D1b})	C ₃ (G _{T1})	C ₄
Lobus frontalis weiß	obere Phase	—	7,0	14,5	—	41,1	20,9	9,5	6,1	4,9
	untere Phase	—	28,5	15,0	Spur	29,0	5,5	8,0	7,8	6,2
Lobus frontalis grau	obere Phase	—	12,1	15,3	—	33,8	21,5	9,9	4,1	3,3
	untere Phase	—	52,1	22,9	10,7	14,3	Spur	—	—	—
Lobus parietalis weiß	obere Phase	—	8,2	11,8	—	42,9	20,9	7,9	6,1	2,2
	untere Phase	—	26,2	12,8	Spur	33,1	6,8	8,1	8,0	5,0
Lobus parietalis grau	obere Phase	—	11,1	16,2	—	31,7	23,6	8,5	5,2	3,7
	untere Phase	—	56,9	19,1	8,8	15,2	Spur	—	—	—
Lobus occipitalis weiß	obere Phase	—	7,9	10,4	—	45,3	22,0	7,1	3,9	3,4
	untere Phase	—	31,2	13,9	Spur	32,0	5,1	6,6	6,0	5,2
Lobus occipitalis grau	obere Phase	—	10,9	14,3	—	29,6	22,7	9,5	8,8	4,2
	untere Phase	—	48,5	24,6	11,1	15,8	Spur	—	—	—
Putamen	obere Phase	—	8,2	11,8	—	37,3	25,0	9,1	5,6	3,0
	untere Phase	Spur	39,5	26,3	Spur	24,1	10,1	—	—	—
Thalamus	obere Phase	Spur	8,4	9,7	—	33,9	19,2	17,6	7,7	3,5
	untere Phase	Spur	36,4	28,0	Spur	25,6	10,0	—	—	—
Cerebellum weiß	obere Phase	Spur	9,4	13,6	—	31,2	17,8	15,8	7,1	5,1
	untere Phase	Spur	29,5	14,1	—	30,2	6,8	7,3	7,0	5,1
Cerebellum grau	obere Phase	—	10,5	22,6	—	21,0	24,7	8,9	8,1	4,2
	untere Phase	—	52,6	21,9	12,5	13,0	Spur	—	—	—
Pons	obere Phase	Spur	6,5	8,9	—	37,0	19,6	18,5	6,1	3,4
	untere Phase	—	12,9	16,1	—	26,5	28,5	7,8	8,2	—

*) = nicht identifiziert. Dem chromatographischen Verhalten nach könnte es sich um ein Dineuraminosyllactosylceramid handeln.

Abbildung 4 gibt einen Überblick über die Gesamtlipide der einzelnen Hirnregionen dieses patholog. Gehirns. Der hohe Anteil an Diglykosylceramid in der grauen Substanz von Lobus frontalis, parietalis, occipitalis und Cerebellum ist gut erkennbar.

Das Chromatogramm (Abb. 5) zeigt die gesamten Glykolipide dieses pathologischen Gehirns. Das Vorkommen des Diglykosylceramids in der grauen Substanz von Lobus frontalis und Cerebellum wird auch auf diesem Chromatogramm nachgewiesen.

Die Fettsäurezusammensetzung des Gangliosids A₀₂(G_{M3}), des Gangliosids A₁(G_{M2}) und der neutralen Glykolipide, des Glucosylceramids und des Lactosylceramids, sind in der Tabelle 3 zusammengestellt. Die Fettsäuren der Ganglioside und des Lactosylceramids bestehen im wesentlichen aus Stearinsäure, so daß auf die Herkunft des Lactosylceramids aus dem Hämatosid geschlossen werden kann. Überraschenderweise gilt das aber nicht für das Glucosylceramid. Neben der Stearinsäure als hauptsächlicher Fettsäure fanden wir auch einen größeren Anteil an Palmitinsäure und noch kürzeren Fettsäuren.

In der Tabelle 4 sind die prozentualen Anteile an Glucose und Galaktose im Monoglykosylceramid aus dem Lobus frontalis und im Diglykosylceramid aufgezeichnet.

Tab. 3. Zusammensetzung der Fettsäuren aus einigen Glykolipiden der grauen Substanz aus dem Lobus frontalis des pathologischen Gehirns (in % der gesamt-Fettsäuren)

	Glucosylceramid	Lactosylceramid	Hämatosid A ₀₂ (G _{M3})	Tay-Sachs-Gangliosid A ₁ (G _{M2})
C _{12:0}	—	—	—	1,1
C _{14:0}	6,8	—	—	2,2
C _{14:1}	3,6	—	—	—
C _{15:0}	4,0	—	—	—
C _{16:0}	21,6	2,9	5,6	6,7
C _{16:1}	8,5	—	—	—
C _{17:1}	0,5	—	—	—
C _{18:0}	45,0	92,8	87,6	83,1
C _{18:1}	7,9	—	—	—
C _{20:0}	0,9	4,2	6,8	6,9
C _{21:0}	0,8	—	—	—

Tab. 4. Prozentualer Kohlenhydratanteil der neutralen Glykolipide.

	Glucose	Galaktose
1. Monoglykosylceramid		
Lobus frontalis, grau	38	62
Lobus frontalis, weiß	—	100
2. Diglykosylceramid		
Lobus frontalis, grau	51	49

Abb. 4. Dünnschichtchromatogramm der Gesamtlipide
Kieselgel G-Fertigplatten, Laufmittel: Chloroform/
Methanol/Wasser (65 ml + 25 ml + 4 ml). Anfärbung:
500 g/kg Schwefelsäure 120 °C/25 min.

Abb. 5. Dünnschichtchromatogramm der Glykolipide des pathologischen Gehirns
Bahn 8 Testgemisch: Cerebrosid und Sulfatid.
Kieselgel G-Fertigplatte, Laufmittel: Chloroform/
Methanol/Wasser (65 ml + 25 ml + 4 ml). Anfärbung:
500 g/kg Schwefelsäure 120 °C/25 min.

Abb. 6. Dünnschichtchromatogramm der Monoglykosylceramide aus der grauen Substanz des Lobus frontalis.
Bahnen 1 und 4: Testsubstanzen
Kieselgel G, Borax-impregniert, Laufmittel: Chloroform/Methanol/14% NH₄OH (40 ml + 10 ml + 1 ml),
Sprühmittel: 500 g/kg H₂SO₄.

Das Monoglykosylceramid aus der grauen Substanz des Lobus frontalis ist demnach ein Gemisch aus Glucosyl- und Galaktosylceramid. Das Glucosylceramid, das im normalen Gehirn nur in minimalen Mengen angetroffen wird (7), erreicht einen Anteil von fast 40% der Monoglykosylceramidfraktion. Das Monoglykosylceramid aus der weißen Substanz des Lobus frontalis besteht hingegen ausschließlich aus Galaktosylceramid. Abbildung 6 zeigt die Auftrennung der Monoglykosylceramide aus der grauen Substanz des Lobus frontalis.

Nach der partiellen Hydrolyse des Diglykosylceramids konnte dünnschichtchromatographisch auf Borax-impregnierten Kieselgelplatten nur Glucosylceramid nachgewiesen werden. Dieser Befund wurde auch durch die gaschromatographische Analyse des Alditolacetats bestätigt, so daß das Diglykosylceramid, bei einem Glucose-Galaktoseverhältnis von 1:1, als Lactosylceramid vorliegt.

Diskussion der Ergebnisse

Nach den vorliegenden Befunden dürfte es sich bei der hier analysierten Lipidose um eine Lactosylceramidose handeln, die sich von den von Pilz et al (3) und von Dawson (7) beschriebenen Fällen durch eine zusätzliche starke Anreicherung von Glucosylceramid in der grauen Hirnsubstanz unterscheidet. Der primäre Enzymdefekt besteht in einer Aktivitätsminderung der spezifischen Lactosylceramidase, einer spezifischen β -Galaktosylhydrolase (8). Durch eine stärkere Beeinträchtigung

auch der β -Glucosidase-Aktivität könnte das überhöhte Vorkommen des Glucosylceramids bedingt sein, das aufgrund des komplexen Fettsäuremusters teils aus dem Gangliosid- teils aus dem Globosidstoffwechsel stammen dürfte. Möglicherweise verzögert eine Blockade auf einer späten Stufe des Glykolipidabbaus diesen derart, daß die Speichersubstanz, das Lactosylceramid, sowohl auf die β -N-Acetylgalaktosaminyl-hydrolase, die das *Tay-Sachs*-Gangliosid in Hämosid überführt, als auch auf die N-Acetylneuraminyldhydrolase, die den Abbau des Hämosids in Lactosylceramid katalysiert, inhibitorisch wirkt (28).

Die zweijährige Formalinfixierung bei -20°C dürfte in unseren Präparationen eine wesentliche Veränderung des

Gangliosidmusters nicht herbeigeführt haben, denn weder war der Gehalt an Gangliosid $\text{A}_2(\text{GM}_1)$ erhöht, noch konnte das neuraminsäurefreie Derivat der Hauptganglioside des Gehirns, das Tetrahexosylceramid, vermehrt aufgefunden werden.

Danksagung

Wir danken dem Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen für ein Stipendium für einen von uns (L. K.) sowie für die Unterstützung der Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der chem. Industrie. Frau G. Spelten, Frau R. Schaper und Frau A. Blachetta sei für ihre ausgezeichnete technische Hilfe auch an dieser Stelle gedankt.

Literatur

- Klenk, E. (1969), *Progr. Chem. Fats Lipids* 10, 411–431.
- Svennerholm, L. (1963), *J. Neurochem.* 10, 613–623.
- Pilz, H., Sandhoff, K. & Jatzkewitz, H. (1966), *J. Neurochem.* 13, 1273–1282.
- Jørgensen, L., Blackstad, T. W., Harkmark, W. & Stein, J. A. (1964), *Acta Neuropath.* 4, 90–106.
- Jatzkewitz, H., Pilz, H. & Sandhoff, K. (1965), *J. Neurochem.* 12, 135–144.
- Bartsch, G. G. (1970), *J. Lipid Res.* 11, 241–247.
- Dawson, G. (1972), *J. Lipid Res.* 13, 207–219.
- Dawson, G. & Stein, A. O. (1970), *Science* 170, 556–558.
- Dawson, G., Matalon, R. & Stein, A. O. (1971), *J. Pediat.* 79, 423–429.
- Okada, S. & O'Brien, J. S. (1968), *Science* 160, 1002–1004.
- Suzuki, K. & Suzuki, Y. (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 66, 302–309.
- Brady, R. O., Gal, A. E., Bradley, R. M., Martensson, E., Warshaw, A. L. & Laster, L. (1967), *New Engl. J. Med.* 276, 1163–1167.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957), *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- modifiziert nach van den Eijnden, D. H. (1971), *Hoppe-Seylers' Z. Physiol. Chem.* 352, 1601–1602.
- Klenk, E. & Gielen, W. (1961), *Hoppe-Seylers' Z. Physiol. Chem.* 326, 144–157.
- Vance, D. E. & Sweeley, C. C. (1967), *J. Lipid Res.* 8, 621–630.
- Dawson, R. M. C. (1954), *Biochim. Biophys. Acta* 14, 374–379.
- Kean, E. L. (1966), *J. Lipid Res.* 7, 449–452.
- Naoi, M. & Klenk, E. (1972), *Hoppe-Seylers' Z. Physiol. Chem.* 353, 1684–1694.
- Gaver, R. C. & Sweely, C. C. (1965), *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 42, 294–298.
- Warren, L. (1959), *J. Biol. Chem.* 234, 1971–1975.
- Suzuki, K. (1964), *Life Sci.* 3, 1227–1233.
- Svennerholm, L. (1957), *Biochim. Biophys. Acta* 24, 604–611.
- Miettinen, T. & Takki-Luukkainen, I. T. (1959), *Acta Chem. Scand.* 13, 856–858.
- Kannan, R., Seng, P. N. & Debuch, H. (1974), *J. Chrom.* 92, 95–103.
- Ledeer, R., Salsman, K., Gonatas, J. & Taghavy, A. (1965), *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 24, 341–351.
- Abe, T. & Okada, R. (1972), *Japan. J. Exp. Med.* 42, 543–551.
- Kennaway, N. G. & Woolf, L. I. (1968), *J. Lipid Res.* 9, 755–765.

Prof. Dr. Hildegard Debuch
D-5000 Köln 41
Josef-Stelzmann-Straße 52