

Kolorimetrischer Nachweis von Chondroitinsulfat B im Gemisch mit anderen sauren Mucopolysacchariden

Von W. TELLER¹⁾

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg a. d. Lahn (Direktor: Prof. Dr. F. Linneweb)

(Eingegangen am 5. April 1966)

Es wurde das Verhalten von drei Hexuronsäuren (D-Glukuronsäure, L-Iduronsäure, D-Galakturonsäure) und vier gereinigten sauren Mucopolysacchariden (Chondroitinsulfat A, B, C und Heparitinsulfat) in der Carbazol- und in der Naphthoresorcin-Reaktion untersucht. Dabei fiel die geringe Farbentwicklung von L-Iduronsäure und Chondroitinsulfat B in der Carbazol-Reaktion auf. In der Naphthoresorcin-Reaktion zeigten diese Substanzen eine ausgeprägte Chromogenität. In einem Gemisch aus Chondroitinsulfat A, C und Heparitinsulfat konnte bei konstanter Gesamtmenge die Farbentwicklung durch steigenden Zusatz von Chondroitinsulfat B in der Carbazol-Reaktion linear vermindert, in der Naphthoresorcin-Reaktion linear gesteigert werden. Für verschiedene prozentuale Mengen von Chondroitinsulfat B im Gemisch mehrerer saurer Mucopolysaccharide wurden die Carbazol/Naphthoresorcin- („C/N“-) Quotienten ermittelt. Sie standen zueinander in einfacher exponentieller Beziehung. Der mittlere C/N-Quotient der sauren Mucopolysaccharide im Harn von 37 Normalpersonen betrug $15,1 \pm 5,6$ ($M \pm \sigma$). 13 Patienten mit typischer *Pfaundler-Hurler*'scher Krankheit wiesen einen mittleren C/N-Quotienten von $4,2 \pm 1,2$ ($M \pm \sigma$) auf. Dieser signifikant unterhalb der Norm liegende Wert ist durch eine vermehrte Ausscheidung von Chondroitinsulfat B bei Patienten mit Gargoylismus bedingt.

The chromogenicities of three hexuronic acids (D-glucuronic acid, L-iduronic acid, D-galacturonic acid) and four acid mucopolysaccharides (chondroitin sulfates A, B, C and heparitin sulfate) were examined in the carbazole as well as in the naphthoresorcinol reaction. L-iduronic acid and chondroitin sulfate B revealed only slight color development in the carbazole reaction, while in the naphthoresorcinol reaction their color yield was considerable. The stepwise addition of chondroitin sulfate B to a mixture containing constant amounts of chondroitin sulfates A, C and heparitin sulfate caused a linear depression of color development in the carbazole reaction and a linear increase of optical density in the naphthoresorcinol reaction. Carbazole/naphthoresorcinol („C/N“) ratios were determined for several mixtures of acid mucopolysaccharides containing various percentages of chondroitin sulfate B. These C/N ratios followed a linear function on a semilogarithmic scale. 37 normal persons revealed a urinary acid mucopolysaccharide excretion with the mean C/N ratio of 15.1 ± 5.6 ($M \pm \sigma$). In 13 patients with gargoylism the C/N ratio of urinary acid mucopolysaccharides was 4.2 ± 1.2 ($M \pm \sigma$). This decreased C/N ratio appears to be due to the increased excretion of chondroitin sulfate B by patients with *Hurler's* syndrome.

In Zusammenhang mit der Feststellung einer Mucopolysaccharidurie bei der *Pfaundler-Hurler*'schen Krankheit (Gargoylismus) durch DORFMAN und LORINCZ (1), sowie MEYER und Mitarbeiter (2) hat sich bei Patienten mit enchondralen Dysostosen die Notwendigkeit einer quantitativen Mucopolysaccharid-Bestimmung im Harn ergeben. In zahlreichen Fällen von Gargoylismus scheint sie das zuverlässigste diagnostische Hilfsmittel zu sein (3). Die säulen- und/oder papierchromatographische Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide („SMP“) im Harn hat weiterhin eine Einteilung der *Pfaundler-Hurler*'schen Krankheit in 5 verschiedene Gruppen mit einem jeweils charakteristischen Ausscheidungsmuster der SMP ermöglicht (4). Allerdings sind die verwandten Methoden aufwendig und nicht in jedem Laboratorium durchführbar.

Da die typische Form des Gargoylismus mit einer abnormen Ausscheidung von Chondroitinsulfat B (Dermatansulfat) und Heparitinsulfat (Heparansulfat) einhergeht (1, 2), ist es bei Patienten mit Verdacht auf enchondrale Dysostosen von klinisch-chemischer Bedeutung, neben der quantitativ erhöhten Mucopolysaccharidausscheidung auch eines dieser beiden qualitativ nachzuweisen. Die Methoden sollten dabei relativ einfach und in klinischen Routinelaboratorien anwendbar sein.

Der Nachweis von Chondroitinsulfat B („CSB“) in einem Gemisch mehrerer Mucopolysaccharide gelingt bei der Carbazol-Methode durch Veränderung der Reaktionsbedingungen (5). Auch durch die Verwendung zweier oder mehrerer kolorimetrischer Verfahren, in denen CSB gegenüber anderen SMP unterschiedliche Farbentwicklung (Chromogenität) besitzt, läßt sich dieses, normalerweise nur in Spuren im Harn vorkommende Mucopolysaccharid bestimmen. In der vorliegenden Arbeit soll über unsere Versuche zur gleichzeitigen Anwendung der Carbazol- und der Naphthoresorcin-Reaktion zum Nachweis von Chondroitinsulfat B in Mucopolysaccharid-Gemischen und im Harn berichtet werden.

Methodik

Reagenzien

Hexuronsäuren

D-Glukuronsäure, purum (Fa. Fluka); D-Galakturonsäure, puriss. (Fa. Fluka); L-Iduronsäure, wurde uns freundlicherweise von Herrn Professor WOLFROM, Ohio State University, Columbus, Ohio (USA) zur Verfügung gestellt.

Gereinigte Saure Mucopolysaccharide

Für ihre Überlassung sind wir Herrn Professor K. MEYER, Columbia University, New York (USA) zu großem Dank verpflichtet. Chondroitinsulfat A (Chondroitin-4-Sulfat¹⁾ (CSA) Chondroitinsulfat C (Chondroitin-6-sulfat¹⁾ (CSC) Chondroitinsulfat B (Dermatansulfat¹⁾ (CSB) Heparitinsulfat (Heparansulfat¹⁾ (HMS).

¹⁾ Mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg.

¹⁾ Bezeichnung gemäß des Vorschlages von Herrn Professor MEYER, New York, zur Polysaccharid-Nomenklatur, American Chemical Society, Mai 1959.

Sonstige

Naphthoresorcin, puriss. (Fa. Fluka)
 Carbazol, sublimiert, purum (Fa. Fluka)
 Cetavlon (CTAB): n-Hexadecyltrimethylammoniumbromid, purum (Fa. Fluka)
 Dialysierschlauch (Fa. Kalle und Co., Wiesbaden)

Kolorimetrische Reaktionen

Hexuronsäurebestimmung mit *Carbazol* nach DISCHE (6). Diese Reaktion wurde ohne wesentliche Modifikationen nach der Originalmethode durchgeführt.

Hexuronsäurebestimmung mit *Naphthoresorcin*, modifiziert nach PELZER und STAIB (7): 250 mg Naphthoresorcin wurden in 100 ml dest. Wasser gelöst und 3 Min. lang unter kräftigem Schütteln auf 100° erhitzt. Dann erfolgte Abkühlen im Wasserbad bei Zimmertemperatur, Filtrieren, Stehenlassen über Nacht bei 0–4° im Kühlschrank. 2 ml Analysensubstanz, 2 ml Naphthoresorcin-Reagenz und 4 ml 40-proz. H₂SO₄ wurden gut gemischt und 30 Min. lang auf 100° erhitzt. Nach Abkühlen im Wasserbad wurden 1 ml absol. Äthanol und 4 ml Toluol zugegeben. Genau 15 Sek. lang erfolgte kräftiges Extrahieren. Nach Zentrifugieren wurde die organische Phase in 1 cm-Küvetten bei Filter S 57 E im Elko-Photometer (Fa. Zeiss) gegen Toluol gemessen. Eichkurve mit Glukuronolacton.

Bestimmung der Sauren Mucopolysaccharide im Harn
 Es wurde die Methode von DI FERRANTE und RICH (8) in der Modifikation nach TELLER (3) verwandt: nach Fällung der SMP mit Cetavlon bei pH 5,0 wurde das Präzipitat mehrmals mit 95-proz. NaCl-gesättigten Äthanol gewaschen und in 0,05N NaOH aufgenommen. In aliquoten Teilen wurde die Hexuronsäurebestimmung mit Carbazol (1 ml) und Naphthoresorcin (2 ml) durchgeführt.

Ergebnisse

Da die Hexuronsäurebestimmung mit Naphthoresorcin gewisse Störanfälligkeiten zeigte, prüften wir zunächst verschiedene Reaktionsbedingungen.

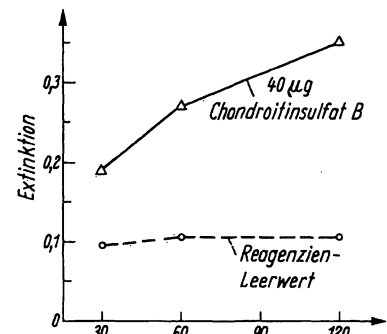
Abhängigkeit der Farbentwicklung von der Dauer der Erhitzung

40 µg Chondroitinsulfat B wurden nach Zugabe von Naphthoresorcin-Reagenz im Doppelansatz 30, 60, 90 und 120 Min. lang auf 100° erhitzt. Die anschließende Extraktion und Messung erfolgte wie bei der Originalmethode. Die Extinktionen, einschließlich der Reagenzienleerwerte, wurden gegen Wasser gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1a dargestellt. Obwohl mit längerer Erhitzung eine zunehmende Menge CSB hydrolysiert und als Hexuronsäure meßbar wurde, fand die relativ stärkste Farbentwicklung nach 30min. Erwärkung statt. Diese Zeit schien somit für eine Chondroitinsulfat B-Bestimmung ausreichend zu sein.

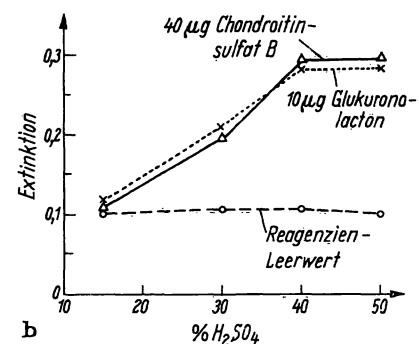
Abhängigkeit der Farbentwicklung von der Schwefelsäure-Konzentration

Zur Hydrolyse von 40 µg Chondroitinsulfat B wurde im Doppelansatz Schwefelsäure in 15, 30, 40 und 50-proz. Konzentration verwandt. Als Vergleich dienten 10 µg Glukuronolacton. Alle Proben, einschließlich der Reagenzienleerwerte, wurden gegen Wasser gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1b graphisch dargestellt. Bis zu 40% konnte mit steigender H₂SO₄-Konzentration eine verstärkte Farbentwicklung erzielt werden; dann

blieben die Extinktionen sowohl für Glukuronolacton als auch für CSB konstant. Daher wurde zur routinemäßigen Chondroitinsulfat B-Bestimmung eine 40-proz. H₂SO₄ gewählt.



a) Dauer der Erwärkung (100°) in Min.



b)

Abb. 1

Verschiedene Reaktionsbedingungen zur Hexuronsäurebestimmung mit der Naphthoresorcin-Methode

a) Abhängigkeit von der Dauer der Erhitzung; b) Abhängigkeit von der H₂SO₄-Konzentration.

Um Anhaltspunkte über die Empfindlichkeit der Carbazol- und der Naphthoresorcin-Methode zur Hexuronsäure- bzw. Mucopolysaccharid-Bestimmung zu gewinnen, wurden in beiden Reaktionen die spezifischen Extinktionskoeffizienten von drei Hexuronsäuren (D-Glukuronsäure, L-Iduronsäure, D-Galakturonsäure) und vier Mucopolysacchariden (Chondroitinsulfat A, B und C, Heparitinsulfat) ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Bemerkenswert war die ge-

Tab. 1

Spezifische Extinktions-Koeffizienten von Hexuronsäuren und sauren Mucopolysacchariden

| | Carbazol [E × (g/ml) ⁻¹] (cm) | Naphthoresorcin [E × (g/ml) ⁻¹] (cm) | C/N Quotient |
|---------------------------------|--|---|-----------------|
| Hexuronsäuren | | | |
| D-Glukuronsäure | 16200 | 12000 | 1,35 |
| L-Iduronsäure | 4050 | 21500 | 0,19 |
| D-Galakturonsäure | 13300 | 22500 | 0,59 |
| Saure Mucopolysaccharide | | | |
| Chondroitinsulfat A | 2300 | 230 | 10 |
| Chondroitinsulfat B | 970 | 1620 | 0,6 |
| Chondroitinsulfat C | 2300 | 190 | 12 |
| Heparitinsulfat | 2600 | 240 | 11 |

ringe Farbentwicklung von L-Iduronsäure und Chondroitinsulfat B in der Carbazol-Reaktion, obwohl diese Substanzen in der Naphthoresorcin-Reaktion ausgeprägte Chromogenitäten zeigten. Die Quotienten der spezifischen Extinktionskoeffizienten in den beiden Farbreaktionen (Carbazol/Naphthoresorcin- oder C/N-Quotienten) verhielten sich bei den Hexuronsäuren wie folgt: D-Glukuronsäure > D-Galakturonsäure > L-Iduronsäure. Diejenigen Mucopolysaccharide, die als Hexuronsäure D-Glukuronsäure enthalten, zeigten in beiden Reaktionen annähernd gleiche spezifische Extinktionskoeffizienten, während Chondroitinsulfat B, das aus L-Iduronsäure besteht, eine stärkere Farbentwicklung in der Naphthoresorcin-Reaktion aufwies. Der C/N-Quotient war nahezu 20fach niedriger als bei den drei anderen Mucopolysacchariden.

In einem Mucopolysaccharid-Gemisch aus Heparitinsulfat und Chondroitinsulfat A und C konnte bei konstanter Gesamtmenge die Farbentwicklung in der Carbazol-Reaktion durch steigenden Zusatz von Chondroitinsulfat B linear vermindert werden, während in der Naphthoresorcin-Reaktion der CSB-Zusatz zu einem linearen Farbanstieg führte (Abb. 2). Für jeden beliebigen Anteil von Chondroitinsulfat B an der Mucopolysaccharid-Gesamtmenge ließen sich C/N-Quotienten ermitteln, die zueinander in einfacher exponentieller Beziehung standen und im halblogarithmischen Koordinatensystem eine Gerade bildeten (Abb. 3).

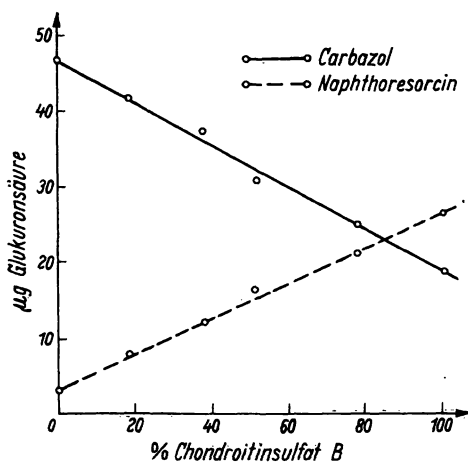
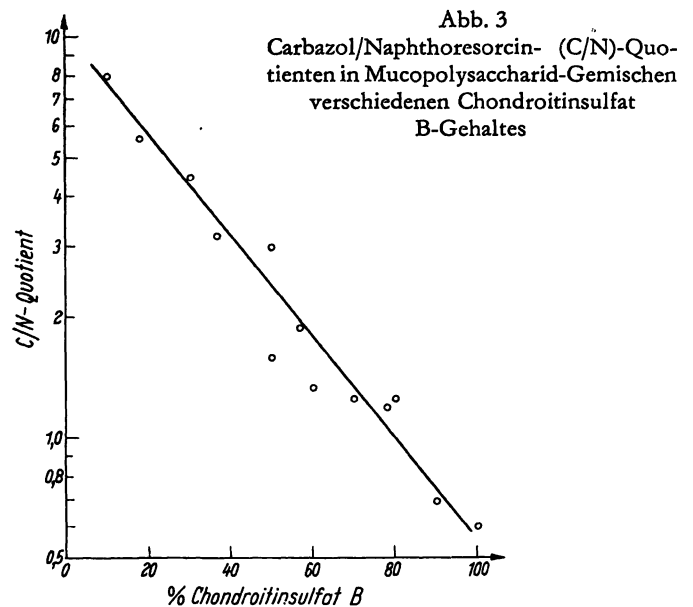


Abb. 2

Der Einfluß steigenden Chondroitinsulfat B-Gehaltes auf die Farbentwicklung eines Gemisches saurer Mucopolysaccharide in der Carbazol- und der Naphthoresorcin-Reaktion

Bei der Bestimmung der C/N-Quotienten der Gesamt-Mucopolysaccharide im Harn von 37 Normalpersonen verschiedenen Alters ergab sich ein Mittelwert von $15,1 \pm 5,6$ ($M \pm \sigma$). 13 Patienten mit typischer Pfaundler-Hurler'scher Krankheit wiesen einen durchschnittlichen C/N-Quotienten von $4,2 \pm 1,2$ ($M \pm \sigma$) auf. Dieser Wert lag statistisch signifikant unterhalb der Norm und ist auf den erhöhten Anteil von Chondroitinsulfat B am Gesamt-Mucopolysaccharid-Material im Harn von Patienten mit Gargoylismus zurückzuführen.



Diskussion

Verschiedene Autoren haben bei der Bestimmung der Neutralzucker und Hexuronsäuren in Mucopolysacchariden versucht, die Reaktionsbedingungen so zu variieren, daß für jedes Mucopolysaccharid typische Farbentwicklungen auftreten. Dabei verwandten HELBERT und BROWN (9) die Anthron-Methode. RADHAKRISHNAMURTHY und BERENSON (5) ermittelten in der Carbazol-Reaktion durch Veränderung der Erwärmungstemperatur und -dauer die Bedingungen, bei denen L-Iduronsäure oder Chondroitinsulfat B eindeutig andere Extinktionen als D-Glukuronsäure bzw. Chondroitinsulfat A ergeben. Die Anwendung dieses Verfahrens auf die qualitative Untersuchung der Mucopolysaccharide im Harn schien nach Ansicht der Autoren eine Aussage über den relativen Chondroitinsulfat B-Gehalt zuzulassen.

Im Anschluß an die in unserem Laboratorium routinemäßig durchgeführte Bestimmung der sauren Mucopolysaccharide im Harn (3) können diejenigen Proben, die einen eindeutig erhöhten Carbazol/Kreatinin-Quotienten aufweisen, durch die anschließende Naphthoresorcin-Reaktion ohne größeren Aufwand auch qualitativ hinsichtlich Chondroitinsulfat B analysiert werden. Ergibt sich dabei ein niedrigerer C/N-Quotient (etwa < 4), so bestehen nach unseren Erfahrungen an der Diagnose eines Gargoylismus keine ernsthaften Zweifel mehr. Schwieriger wird die biochemische Diagnostik der verschiedenen Untergruppen des Gargoylismus. Sie gehen nämlich teilweise nicht mit einer prozentual erhöhten Chondroitinsulfat B-Ausscheidung einher, sondern weisen größere Mengen Heparitinsulfat im Harn auf. Die C/N-Quotienten sind in diesen Fällen normal. Auch die aus Keratinsulfat bestehende Mucopolysaccharidurie der Morquioschen Krankheit kann mit der beschriebenen Methode nicht erfaßt werden. Hier wird nur durch die chromatographische Fraktionierung der Mucopolysaccharide eine weitere Klärung möglich sein (4, 10).

Literatur

1. DORFMAN, A. und A. E. LORINCZ, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 43, 443 (1957). — 2. MEYER, K., M. M. GRUMBACH, A. LINKER und P. HOFFMAN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 97, 273 (1958). — 3. TELLER, W., Mschr. Kinderhk. 113, 244 (1965). — 4. MAROTEAUX, P. und M. LAMY, J. Pediatr., S. Louis 67, 312 (1965). — 5. RADHAKRISHNAMURTHY, B. und G. S. BERENSON, Analytic. Chem. 35, 1316 (1963). — 6. DISCHE, Z., J. biol. Chemistry 167, 189 (1947). — 7. PELZER, H. und W. STAIB, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 2, 407 (1957). — 8. DI FERRANTE, N. und C. RICH, J. Laborat. clin. Med., S. Louis 48, 491 (1956). — 9. HELBERT, J. R. und K. D. BROWN, Analytic. Chem. 33, 1610 (1961). — 10. TELLER, W. und A. ZIEMANN, Klin. Wschr. 44, 1142 (1966).

Privat-Dozent Dr. med. W. Teller
Universitäts-Kinderklinik
355 Marburg/Lahn

Darstellung der Haptoglobintypen durch Elektrophorese in Polyacrylamidgel

Von F. SCHLEYER und P. SCHAIBLE

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer)

(Eingegangen am 21. Juni 1966)

Es wird eine Abwandlung der Acrylamidgel-Elektrophorese als geschlossenes System zur optimalen Darstellung der Haptoglobintypen im menschlichen Serum beschrieben. Für die Aufnahme der Gelsäulen wurde eine besondere Färbewanne konstruiert. Die entstehenden Bandenspektren erlauben eine hervorragende Differenzierung der Phänotypen. Bei Typ 2—1 konnten bis zu 13 Banden gezählt werden.

A modification of acrylamide gel electrophoresis is described, which employs a closed system and gives an optimum separation of haptoglobin types in human sera. A special dish was constructed for staining the gel columns. The band spectra produced by this method permit an excellent differentiation of phenotypes. Up to 13 bands could be detected in type Hp 2—1.

BAUMGARTEN (1) hat im Jahre 1963 als erster Autor das Acrylamid als Gelmedium zur speziellen Darstellung der Hp-Typen empfohlen. GERVAIS und VESCOU (2) haben die Methode zur Hp-Diagnostik an Blutfleckenausstrichen erprobt. Im folgenden wird eine einfache Standardtechnik beschrieben, die eine hervorragende Hp-Typendarstellung erlaubt. Die physikalisch-chemischen Grundlagen und Methoden der Acrylamidgel-Elektrophorese findet man u. a. bei (3—10) beschrieben.

Methodik

Herstellung des Gels: Als optimale Polymerkonzentration ermittelten wir einen Acrylamidgehalt von 5,5% und eine Vernetzerkonzentration (N,N'-methylbisacrylamid, „MBA“) von 5%, bezogen auf Acrylamid („AA“). Dieses Verhältnis ergibt offenbar den für die Hp-Molekülgröße günstigsten Porendurchmesser und trennt die Hp-Banden bei der gewählten Trennzeit am weitesten und schärfsten. Die durch den relativ hohen MBA-Gehalt bedingte Opaleszenz stört nicht. In dem Präparat „Cyanogum 41“ der „Cyanamid Company“ sind die Monomeren gebrauchsfertig gemischt; der MBA-Gehalt dürfte, der Opaleszenz nach zu urteilen, bei 4—5% liegen. Die Ergebnisse sind gleich. Als Katalysatoren wählten wir β -Dimethylaminopropionitril („DMAPN“) und Ammoniumpersulfat. Das optimale Mischungsverhältnis der Komponenten ist (in dieser Reihenfolge):

| | |
|---|-------|
| Gelpuffer (s. u.) | 94,0 |
| AA | 5,5 |
| MBA | 0,275 |
| DMAPN | 0,1 |
| (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ | 0,1 |

Jede Komponente muß vor Zugabe der nächsten vollständig gelöst sein. Nach 25—30 Min. (bei Konzentrationen der Katalysatoren von je 0,4% schon nach 2—3 Min.) ist das Gel gebrauchsfertig.

Einfüllen des Gels: Wir arbeiteten in einem geschlossenen, vertikalen Zylindersystem. In senkrecht gestellte Präzisionsglasröhren (13,0 × 0,5 cm), die eine Nummer und bei 10,5 cm eine Marke tragen und am unteren Ende zunächst mit einem Serumstopfen verschlossen werden, pipettiert man etwa 2,3 ml des noch flüssigen Gemisches bis zur Marke. Um bei der Polymerisationszeit von 30 Min., die sich bei Anfall einer größeren Serumprobenzahl empfiehlt, eine glatte Abschlußfläche des Gels zu erzielen, gibt man oben 2 Tropfen Wasser hinzu. Die vollendete Erstarrung ist an einer leichten Opaleszenz zu bemerken. Das überstehende Wasser wird abgossen.

Beschicken des Gels: Nunmehr werden in jede Röhre 0,02 ml des in der üblichen Weise bereiteten Serum-Hp-Gemisches eingetroppt. Sodann werden 2—3 Tropfen einer schnellpolymerisierenden, d. h. mit je 0,4% der Katalysatoren-Komponenten zubereiteten Monomerenmischung (oder eines solchen Cyanogum-Ansatzes) zugegeben. Ist dieses Verschlussgel fest, so wird die überstehende Flüssigkeit abgossen.

Das Elektrophoresegerät: Wir konstruierten ein 3 cm tiefes, zylindrisches, offenes Kathodengefäß von 12 cm Ø aus Trovidur (Hersteller: Fa. Kniese, 355 Marbach bei Marburg). Der Boden dieses Aufsatzes enthält in kreisförmiger Anordnung zwei Reihen von insgesamt 16 leicht konischen Bohrungen von 0,12 cm Ø für die Aufnahme der Röhren. In den Bohrungen stecken passend durchbohrte Gummistopfen. Durch die Mitte des Gefäßbodens führt in einem Trovidur-Rohr die Zuleitung zur Anode. Dem Aufsatz ist ein 13 cm hohes und 10 cm weites Standgefäß aus Glas eingepaßt. Auf seinem Boden kommt die Anode zu liegen (Abb. 1). Nachdem die Stopfen am unteren Röhrende (ohne Sog!) entfernt wurden, werden die gefüllten Glasröhren soweit durch die durchbohrten Gummistopfen im Boden des Kathodenaufsatzes eingedreht, daß sie gerade mit dem oberen Stopfenende abschließen. Sodann wird so viel Elektrodenpuffer (s. u.) in den Glaszylinder eingefüllt, daß die Röhren etwa 0,5 cm tief eintauchen. Die Anode wird durch einen Steckkontakt mit der Zuleitung im Trovidur-Rohr verbunden, und der Aufsatz mit den Röhren eingesetzt. Auf die Gelsäulen in den Röhren wird Puffer bis zum Überlaufen