

Biochemische Untersuchungen bei erblichen Aminosäurestoffwechselstörungen in der Pädiatrie

VON ILSE ANTENER

unter technischer Mitarbeit von MARIANN KAESER und JUTTA MESLE

Forschungslaboratorium der Nestle-Produkte — Vevey/Schweiz

(Eingegangen am 10. Juni 1969)

Es werden biochemische Untersuchungen bei Aminosäurestoffwechselstörungen — Phenylketonurie, Tyrosinose, Ahornsirupkrankheit, Histidinämie, Argininbernsteinsäureurie, Cystinurie, Cystinose und Debré-de Toni-Fanconi-Syndrom — beschrieben. Die angewandten Methoden — Säulenchromatographie, Hochspannungselektrophorese, Dünnschicht- und Papierchromatographie — werden näher beschrieben. Aus diesen Untersuchungen geht deutlich hervor, daß nicht nur die vom Enzymdefekt betroffenen Aminosäuren bestimmt werden sollten, sondern auch deren Metabolite. Bei der Phenylketonurie, Tyrosinose und Ahornsirupkrankheit zum Beispiel die Keto-säuren und Hydroxysäuren, bei der Histidinämie die Imidazole, bei der Cystinurie Cystin, Lysin, Arginin und Ornithin im Stuhl und deren Metabolite (Cadaverin und Putrescin) in Stuhl und Harn. Dadurch ist es möglich, den Grad der Stoffwechselstörung genau zu erfassen, der ja von Patient zu Patient variieren kann. Diese genauen biochemischen Untersuchungen tragen dazu bei, die Pathologie der Stoffwechselstörung besser zu erfassen. Sie sind Voraussetzung für die diätetische Behandlung der Patienten.

Biochemical studies on genetic defects of amino acid metabolism in paediatrics

Biochemical studies are described on metabolic defects of phenylketonuria, tyrosinosis, maple syrup disease, histidinaemia, arginino-succinic aciduria, cystinuria, cystinosis and Debré-de Toni-Fanconi-syndrome. The methods employed, column chromatography, high voltage electrophoresis, thin layer and paper chromatography, are described in detail. These studies clearly demonstrate that in addition to the amino acid affected by the enzyme defect, its metabolites should also be determined. For example, in phenylketonuria, tyrosinosis and maple syrup disease, the keto acids and hydroxy acids should be measured; imidazole should be measured in histidinaemia; cystine, lysine, arginine and ornithine in faeces and their metabolites (cadaverine and putrescine) in faeces and urine should be measured in cystinuria. In this way it is possible to assess exactly the severity of the metabolic defect, which certainly varies from patient to patient. It is then also possible, to standardize exactly the patient's dietary requirements. In addition, these exact biochemical studies help to define the pathology of the metabolic defect more closely.

Unsere Kenntnisse des Aminosäurestoffwechsels im normalen und pathologischen Zustand sind in den letzten Jahren, dank der Entwicklung neuerer, empfindlicher und vor allem spezifischer Methoden, vollständiger geworden. Dies hat dazu geführt, den Pool der freien Aminosäuren und auch deren Transport im Körper besser zu kennen und zu beschreiben. Vor allem sind diese biochemischen Kenntnisse zur Aufklärung der pathologischen Verhältnisse unerlässlich. Solche Forschungen haben zum Ziele, dem Kliniker die Elemente für eine erfolgreiche Behandlung in die Hand zu geben.

Im folgenden Schema (Abb. 1) ist der Abbau der Aminosäuren aus dem Nahrungseiweiß und ihr Transport im Körper dargestellt. Das Studium von erblichen Stoffwechselstörungen im Aminosäurehaushalt in der Pädiatrie hat gezeigt, daß die meisten dieser Störungen auf einem Defekt eines bestimmten Enzyms im Stoffwechselabbau einer oder auch mehrerer Aminosäuren beruhen. Die bei diesen Aminosäurestoffwechselstörungen vorhandenen Enzymdefekte sind im Schema (Abb. 1) gekennzeichnet (vgl. unten).

Diese Enzymdefekte führen zu typischen primären Aminoacidurien. Die primären Aminoacidurien lassen sich nach M. L. EFRON (1, 2) einteilen in sogenannte

- I. „Overflow“-Aminoacidurien,
- II. „No-Threshold“-Aminoacidurien und
- III. Renale (Transport)-Aminoacidurien.

Beim ersten Typ (I) hat der Enzymdefekt zur Folge, daß sich die vom Defekt betroffenen Aminosäuren und deren Metabolite im Blut anstauen und durch den „Overflow“ auch im Harn erscheinen. Die Stoffwechselstörungen, die zu diesem Typ gehören, können deshalb durch die erhöhten Aminosäurewerte im Blut und auch im Harn nachgewiesen werden. Auch gewisse Metabolite der betroffenen Aminosäuren sind im Blut und Harn erhöht.

Beim zweiten Typ, den sogenannten „No-Threshold“-Aminoacidurien (II) liegen auch Enzymdefekte zugrunde. Jedoch sind die Blutwerte der vom Enzymdefekt betroffenen Aminosäuren nicht oder nur leicht erhöht, die Aminosäuren erscheinen jedoch im Urin, weil sie im Nierentubulus wegen einer Störung nicht rückresorbiert werden können. Die Clearance dieser Aminosäuren ist gleich hoch oder höher als die Inulin-clearance (z. B. β -Aminoisobuttersäure). Diese Störungen sind klinisch hauptsächlich durch mentale Retardierung und durch neurologische Störungen charakterisiert.

Tab. 1
Übersicht über die im Laboratorium der Autorin untersuchten Aminoacidurien

A. Primäre Aminoacidurien			
Krankheit	Enzymdefekt	Klinische Symptome	Behandlung
I „Overflow“-Aminoacidurien			
Histidinämie	Histidase (EC 4.3.1.3)	Mentale Retardierung, Sprachfehler	Histidinarme Diät
Ahornsirupkrankheit	Decarboxylase der Ketosäuren von Leucin, Isoleucin und Valin (EC 4.1.1.1)	Konvulsionen, Spastizität, mentale Retardierung	Leucin-, Isoleucin- und Valinarne Diät
Phenylketonurie	Phenylalanin-Hydroxylase (EC 1.99.1.2)	Mentale Retardierung, helle Haare und Haut (Albinismus), Konvulsionen	Phenylalaninarne Diät
Tyrosinose	p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure Oxydase (EC 1.99.1.14)	Lebererkrankung, Fanconi-Syndrom	Phenylalanin- und Tyrosinarne Diät
II „No-Threshold“-Aminoacidurien			
Argininbernsteinsäure-Aminoacidurie	Argininosuccinase (EC 4.3.1.2)	Mentale Retardierung, Konvulsionen, Ammoniak-Intoxikation	Eiweißarme Diät
III Renale-(Transport)-Aminoacidurie			
Cystinurie	Unvollständige, renale und intestinale Absorption von Cystin, Lysin, Arginin, Ornithin	Nierensteine (Cystin) evtl. Kleinwuchs	Evtl. Cystin- und Methioninarne Diät
B. Sekundäre Aminoacidurien			
Cystinose	unbekannt	Cystin-Speicherung in den Organen, Fanconi-Syndrom	Cystin- und Methioninarne Diät?
Debré-de Toni-Fanconi-Syndrom	unbekannt	Rachitis	Vitamin D

Wir möchten besonders die Vorteile der Hochspannungselektrophorese beim Studium solcher Stoffwechselstörungen hervorheben:

1. Ist keine Entsalzung des Harns nötig, die Trennungen sind scharf.
2. Können mehrere Harn-, Serum- oder Stuhlproben nebeneinander untersucht werden; genetische Studien können bei einer ganzen Familie in einem Lauf ausgeführt werden; eine Behandlung kann während längerer Zeit verfolgt werden.

Resultate

Im folgenden teilen wir unsere Resultate mit, die wir bei den in Tabelle 1 angeführten Stoffwechselstörungen von Aminosäuren erhalten haben.

Histidinämie

Im Harn von drei Patienten, wovon zwei einen deutlichen mentalen Rückstand und ebenfalls die für die Histidinaemie typischen Sprachschwierigkeiten zeigen, haben wir mit der Hochspannungselektrophorese auf Aminosäuren eine deutliche Erhöhung von Histidin und dessen Methylderivaten festgestellt. Auf Abbildung 2 ist die Hochspannungselektrophorese von Harn zweier Patienten abgebildet.

Die von uns angewandten Hochspannungselektrophorese-Bedingungen sind die folgenden:

Apparat der Firma Hölzel, Technik, Bernöderweg 7, D-825 Dorfen.
Trennkammer: Fläche 105 × 45 cm

Papier: Schleicher & Schüll Nr. 2043b in Rollen. Streifenlänge 105 cm, Streifenbreite 18 cm

Puffer: pH 1,9 (Gemisch von 120 ml Eisessig (Merck pro Analyse), 26 ml Ameisensäure 98–100% (Merck pro Analyse) ad 1000 ml mit dest. Wasser)

Angewandte Spannung: 7500–7900 Volt, 30–35 Milliampère
Sprühreagens: Ninhydrin-Collidin.

Wir tragen in gewöhnlichen Fällen die Harnmenge, die 500 µg Stickstoff entspricht, auf.

Auf das Resultat der Hochspannungselektrophorese gestützt, haben wir im Harn dieser drei Patienten die quantitative Aminosäurebestimmung nach STEIN und MOORE durchgeführt. Diese Chromatographie ist in der Abbildung 3 dargestellt, wo wir neben der erhöhten Ausscheidung von Histidin ebenfalls die Ausscheidung von 1- und 3-Methylhistidin feststellen können. Des weiteren fiel uns bei dieser Analyse ein uns noch unbekannter Peak auf. Wir konnten diese Substanz als Carnosin (Dipepid aus Histidin und β-Alanin) identifizieren. Wir fanden nach saurer Hydrolyse des Harns (1 ml Harn + 39 ml 6N HCl, 24 Stdn. am Rückfluß) eine Erhöhung des Histidins und das Auftreten von β-Alanin in der dem Carnosin-Gehalt entsprechenden Menge. Dieser Carnosin-Beweis ist in Abbildung 4 abgebildet. Die quantitativen Resultate dieser Analysen sind in der Tabelle 2 dargestellt, wir stellen eine deutliche Erhöhung von Histidin und 1-Methylhistidin fest. Der Carnosin-gehalt ist ebenfalls erhöht. Die Carnosinausscheidung wurde in der uns zugänglichen Literatur über Histidinämie noch nie erwähnt, dagegen bei der Imidazol-Amino-acidurie (3).

Unsere Kolonnenchromatographiebedingungen sind die folgenden:

Puffer:

Citratpuffer, Calbiochem.

Puffer A = pH 3,25 NaOH 0,2N

Puffer B = pH 4,25

Puffer C = pH 4,26

Puffer D = pH 5,28

Trennungsschema für die neutralen und sauren Aminosäuren:

Harz Aminex A-5 oder A-6

Höhe des Harzes in der Kolonne 57 cm

Ninhydrindurchfluß 30 ml/Std.

Pufferdurchfluß 60 ml/Std.

Puffer A	0—130 Min.	30° (Ninhydrin und Schreiber)
	130—160 Min.	50° (Ninhydrin und Schreiber)
Puffer B	160—330 Min.	50° (Ninhydrin und Schreiber)
NaOH	330—360 Min.	50° (Ninhydrin und Schreiber)
Puffer A	360—440 Min.	30°

Trennungsschema für die basischen Aminosäuren

Harz: Aminex A-5

Höhe des Harzes in der Kolonne 26 cm

Ninhydrindurchfluß	30 ml/Std.
Pufferdurchfluß	60 ml/Std.
Puffer C	0—70 Min. 30°
Puffer C	70—185,0 Min. 30° (Ninhydrin und Schreiber)
Puffer C	185,0—185,1 Min. 55° (Ninhydrin und Schreiber)
Puffer D	185,1—360 Min. 55° (Ninhydrin und Schreiber)
NaOH	360—370 Min. 55°
Puffer C	370—450 Min. 30°

Tab. 2
Untersuchungsergebnisse bei drei Patienten mit Verdacht auf Histidinämie

Patient	Jahr	Alter (Jahre)	Histidin		Aminosäuren im Harn (mg/24 Stdn.)			Carnosin	
			Mittel	Schwankungen	1-Methyl-histidin	3-Methyl-histidin	Mittel	Schwankungen	
Patient 1	1969	1 ³ / ₄	96,2		17,2	7,7	33,4		
Patient 2	1968	7	173,1		6,0	9,5	18,1		
Patient 3	1965	10	289,6		82,3	23,5	29,7		
Normalwerte			Mittel	Schwankungen	Mittel	Schwankungen	Mittel	Schwankungen	
Kinder		3 ¹ / ₂ —2	46,5	15,3—82,6	8,8	0—42,3	< 5*	—	
Kinder		4—6	57,7	55,0—59,0	39,2	10,5—63,2	4,3—36,1*	2—3**	

*) O'BRIEN, D. und F. A. IBBOTT (Hrsg.) Laboratory Manual of Pediatric Micro- and Ultramicro-Biochemical Techniques, 3. Auflage. S. 30. Harper u. Row, New York (1962).

***) WESTALL, R. G. Biochem. J. 60, 247 (1955).

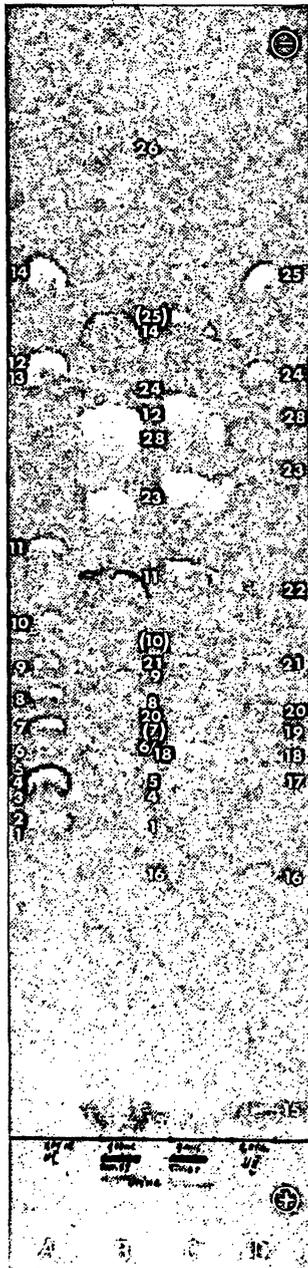


Abb. 2
Elektropherogramm des Harns zweier Patienten mit Verdacht auf Histidinämie. Elektrophoresebedingungen s. Text

A: Standard I
B: Urin von Patient 1
C: Urin von Patient 2
D: Standard II

- 1: Tyrosin
- 2: Hydroxy-prolin
- 3: Cystin
- 4: Asparaginsäure
- 5: Phenylalanin
- 6: Glutamin
- 7: Methionin
- 8: Leucin, Isoleucin
- 9: Valin
- 10: α -Amino-buttersäure
- 11: Alanin
- 12: Histidin
- 13: γ -Amino-buttersäure
- 14: Lysin
- 15: Taurin
- 16: Tryptophan
- 17: Cystein
- 18: Glutaminsäure
- 19: Prolin
- 20: Threonin
- 21: Serin
- 22: Sarcosin
- 23: Glycin
- 24: Arginin
- 25: Ornithin
- 26: Äthanolamin
- 28: Methyl-histidin

Wir haben dann weiter versucht, die Histidinmetabolite im Harn dieser Patienten zu identifizieren. Wie wir aus dem folgenden Stoffwechselschema (Abb. 5) ersehen, liegt der Enzymblock bei der Histidinämie (Histidase) in der Überführung von Histidin zu Urocaninsäure. Dieser Enzymblock hat zur Folge, daß sich im Harn Histidin (I), Imidazolyl-Brenztraubensäure (II), Imidazolylmilchsäure (III) und Imidazolylelessigsäure (IV) anreichern. Dazu haben wir die Methode von EDNA NEUFELD und R. CHAYEN (4) in etwas abgeänderter Form angewendet. Wir haben DC-Alu-Folien Cellulose Merck ohne Fluoreszenzindikator mit einer Schichtdicke von 0,1 mm 20 x 20 cm verwendet, welche sehr scharfe Trennungen zeigen und deren Empfindlichkeit sehr groß ist. Diese eindimensionale Chromatographie ist auf Abbildung 6 zu sehen: Bei dem Patienten, dessen Serumwert von Histidin am deutlichsten erhöht ist, zeigt sich eine sehr klare Erhöhung der Ausscheidung von Imidazolylmilchsäure und Imidazolylelessigsäure. Daneben erscheinen wieder Histidin und seine Methyl-derivate, ebenfalls Acetylhistidin. Des weiteren stellen wir eine Spur Imidazolylpropionsäure und Urocaninsäure sowie zwei noch nicht identifizierte Substanzen fest. Imidazolylbrenztraubensäure konnten wir mit dieser Methode nicht nachweisen: nach Untersuchungen von H. GHADIMI und Mitarbeitern (5) müssen bei der Papierchromatographie 100—200 μ g Imidazolylbrenztraubensäure aufgetragen werden, um einen Fleck beim Besprühen mit Paulys Reagenz sichtbar zu machen. Aus diesem Grunde hat VICTOR H. AUERBACH (6) die Enol-Borat-Methode angewendet. In unserem Laboratorium haben wir für die Ketosäurebestimmung die Methode mit 2,4-Dinitrophenylhydrazon entwickelt und haben auch im Harn des Patienten versucht, das 2,4-Dinitrophenylhydrazon zu identifizieren. Diese Methode erfordert bei Imidazolylbrenztraubensäure etwas andere Bedingungen, und unsere Versuche sind noch nicht abgeschlossen.

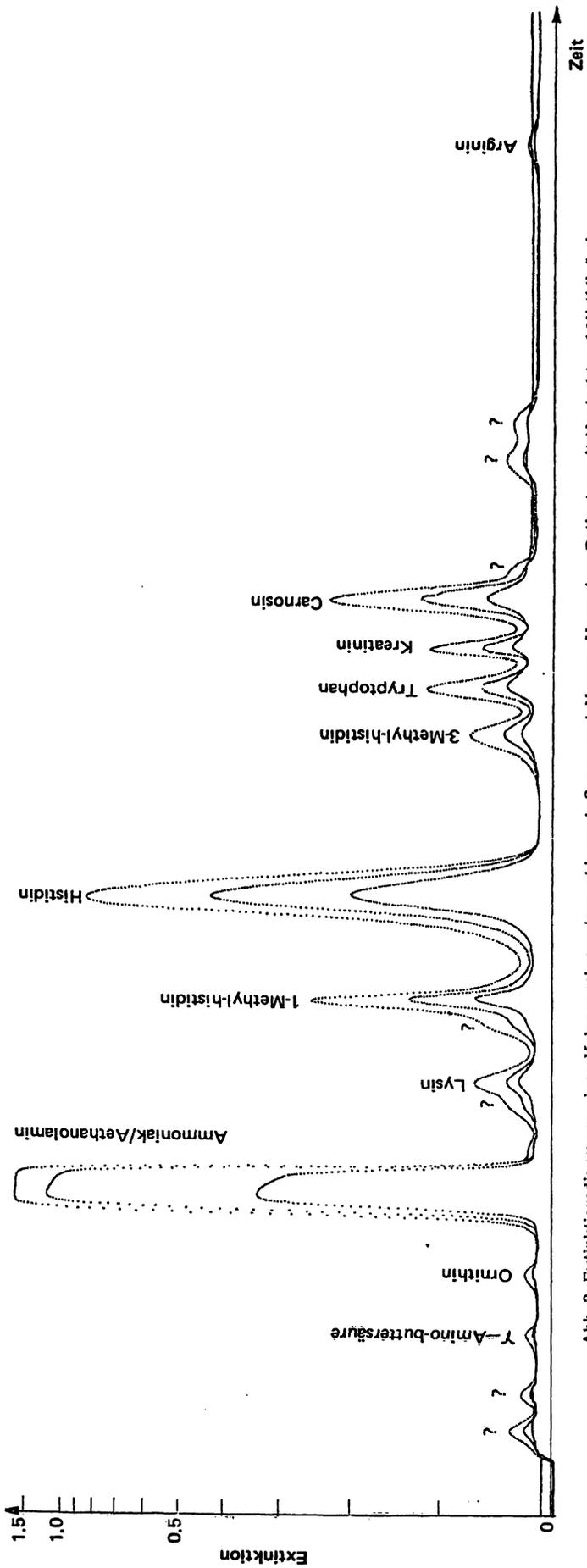


Abb. 3. Extinktionsdiagramm einer Kolonnenchromatographie nach STEIN und MOORE. Harn eines Patienten mit Verdacht auf Histidinämie

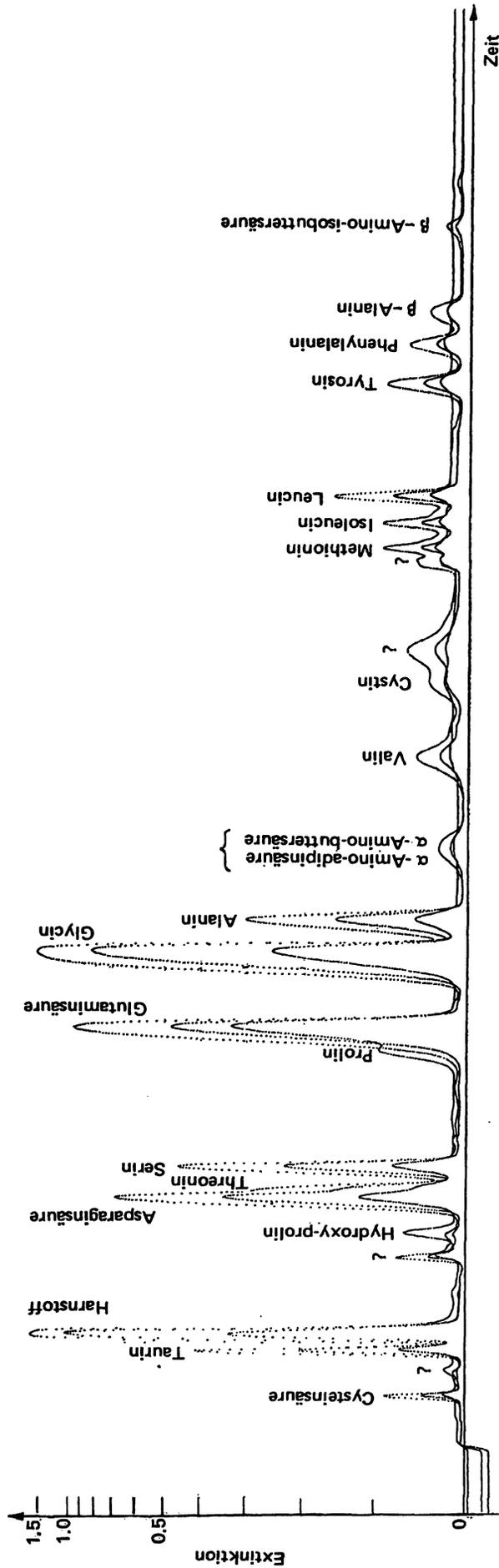


Abb. 4. Extinktionsdiagramm (vgl. Abb. 3). Harn des gleichen Patienten nach Hydrolyse (vgl. Text). Man beachte das Auftreten von β -Alanin

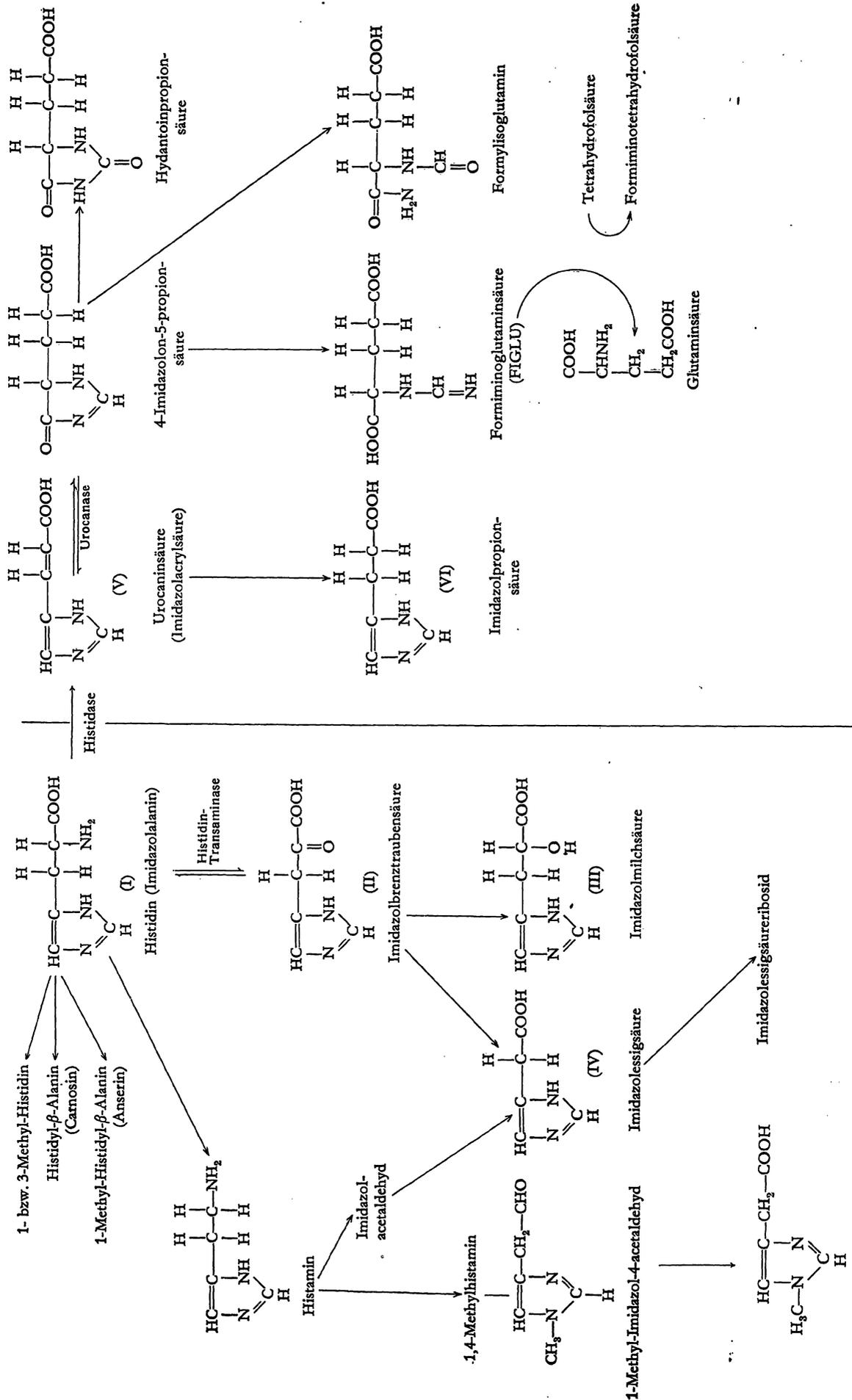


Abb. 5
Der Stoffwechsel des Histidins

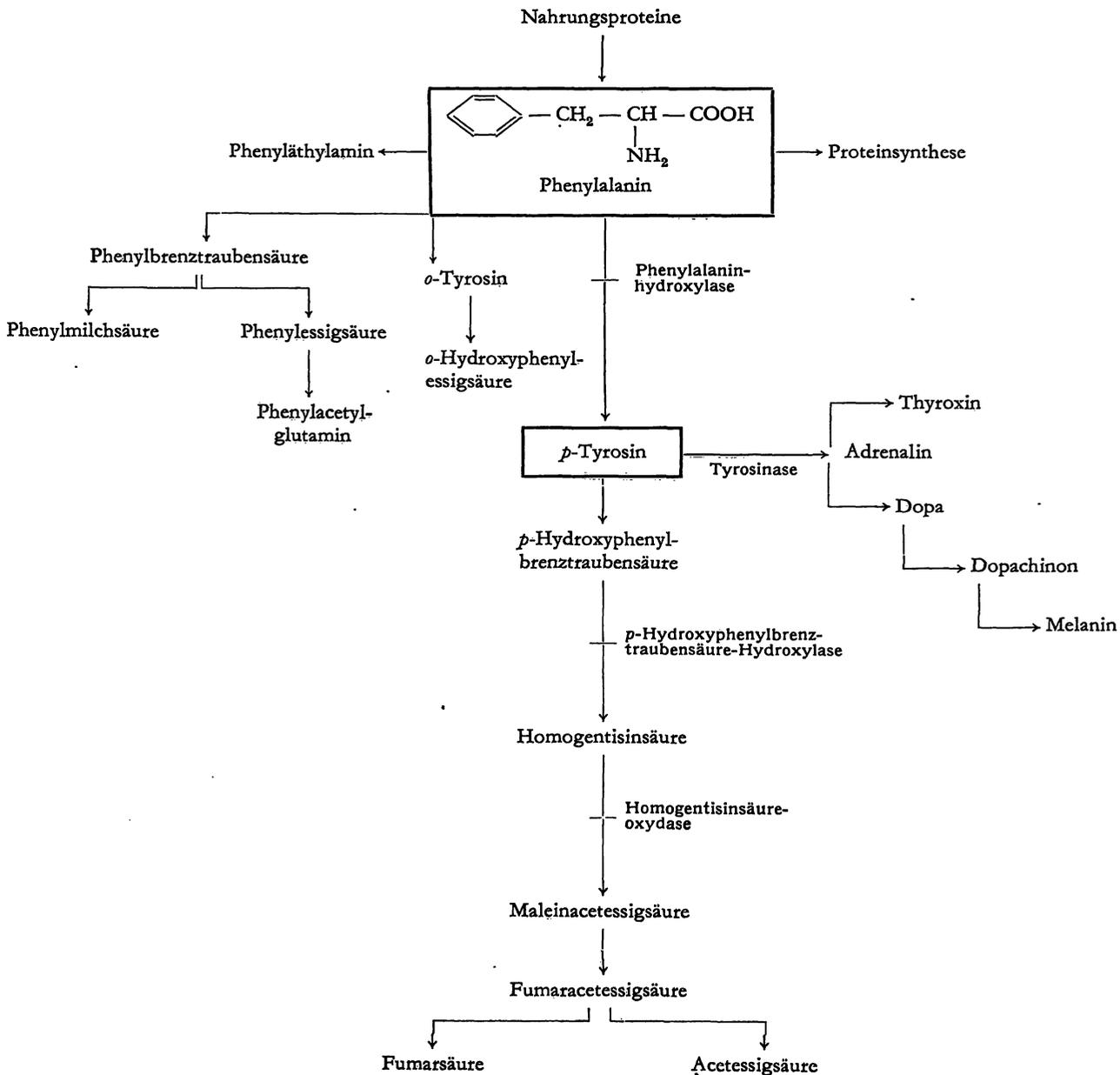


Mit der Feststellung der Imidazolylmilchsäure und Imidazolyllessigsäure, die in schon so deutlichen Quantitäten im Harn unseres Patienten auch ohne Histidinbelastung sichtbar sind, ist ein weiterer Beweis für das Vorhandensein einer Histidinämie erbracht. Bei den beiden anderen Patienten konnten wir im Harn ohne Histidinbelastung nur kleine Quantitäten von Imidazolylmilchsäure feststellen. MOZZICONACCI und Mit-

Abb. 6
Dünnschichtchromatogramm. Harn eines Patienten mit Histidinämie

- | | |
|---------------------|---------------------------------|
| A: Standard | 3: Imidazolylmilchsäure (rot) |
| B: Standard | 4: Imidazolyllessigsäure (rot) |
| C: Harn | 5: Imidazolylpropionsäure (rot) |
| 1: Histidin (rot) | 6: Urocaninsäure (rotbraun) |
| 2: 1-Methylhistidin | ?: (gelb) |
| 3-Methylhistidin | ?: (violett) |
| Acetylhistidin | |

Abb. 7
Stoffwechsel von Phenylalanin und Tyrosin



autoren (7) stellten auch vor Histidinbelastung Imidazolylmilchsäure fest, jedoch in deutlicher Quantität. Sicher handelt es sich bei den beiden anderen Patienten um eine leichtere Form dieser Krankheit. Das könnte mit einer Histidinbelastung abgeklärt werden.

Phenylketonurie, Tyrosinose und Ahornsirupkrankheit

Bei Stoffwechselstörungen, bei denen die ketogenen Aminosäuren betroffen sind, weisen wir auf die Bedeutung der Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Ketosäuren und der aus ihnen entstehenden Hydroxysäuren hin. Aus dem folgenden Schema (Abb. 7) ist ersichtlich, daß durch den Enzymblock (Hydroxylase) bei der Phenylketonurie Phenylalanin, Phenylbrenztraubensäure, Phenyllessigsäure, Phenylacetylglutamin und Phenylmilchsäure entstehen. Des weiteren ersehen wir aus dem Schema, daß bei der Phenylketonurie aus Phenylalanin *o*-Hydroxyphenyllessigsäure entstehen kann. Das Entstehen der *o*-Hydroxyphenyllessigsäure ist sehr wichtig, weil es mit dem Enzymblock nicht in Beziehung gesetzt werden kann. Diesen Weg nimmt jedoch ein Teil des mit der Nahrung zugefügten Phenylalanins, so daß die *o*-Hydroxyphenyllessigsäure bei jeder Phenylketonurie bestimmt werden sollte. Wir wissen, daß jeder Patient mit Phenylketonurie noch eine gewisse Menge Phenylalanin abbauen kann. Aus diesem Grunde ist es wichtig, eine genaue Bilanz seines Phenylalanins und dessen Metabolite auszuführen. Das Bestimmen einer Phenylalaninbilanz ermöglicht die Berechnung, welche Menge vom zugefügten Phenylalanin noch in Tyrosin übergeführt werden kann, welche Menge als Phenylalanin im Blut und Harn erscheint und besonders wieviel vom zugeführten Phenylalanin in *o*-Hydroxyphenyllessigsäure, Phenyllessig-, Phenylbrenztraubensäure und Phenylmilchsäure umgewandelt werden. Die genaue Kenntnis dieser Größen erleichtert es, den Patienten mit der Diät die Menge Phenylalanin zur Verfügung zu stellen, die sie noch abbauen können. Wir sind daran, solche Bilanzen, die natürlich sehr zeitraubend sind, zu bestimmen.

Das oben Erwähnte gilt ebenfalls für die Tyrosinose, bei der durch einen Defekt der *p*-Hydroxyphenylbrenz-

traubensäure-Oxydase eine Stauung von Tyrosin, *p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, *p*-Hydroxyphenylmilch- und *p*-Hydroxyphenyllessigsäure erfolgt, die im Harn erhöht ausgeschieden werden. Unsere Untersuchungen bei einem Patienten mit Phenylketonurie und Tyrosinose sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Wir haben für diese Untersuchungen folgende Methoden angewandt: Für die Phenylalanin- und Tyrosinbestimmung im Harn und Serum die Kolonnenchromatographie nach STEIN und MOORE. Für die Ketosäurebestimmung die Papierchromatographie der 2.4-Dinitrophenylhydrazone (8), für die Bestimmung der Hydroxysäuren die 2-dimensionale Papierchromatographie (8). Wir sind gegenwärtig daran, eine Methode zur Dünnschichtchromatographie auf Folien für die Ketosäuren und ebenfalls für die Hydroxysäuren zu entwickeln, die wesentlich kürzer ist als die Papierchromatographie.

Auf Abbildung 8 und 9 ist die Papierchromatographie der Ketosäuren als 2.4-Dinitrophenylhydrazone und der Hydroxysäuren abgebildet. Aus Tabelle 3 ist sehr deutlich die Erhöhung der bei diesen Störungen typischen Metabolite ersichtlich.

Wie aus dem folgenden Schema (Abb. 10) ersichtlich ist, haben wir bei der Ahornsirupkrankheit einen Enzymblock bei der oxydativen Decarboxylierung der Ketosäuren, die Leucin, Isoleucin und Valin entsprechen, so daß diese 3 Aminosäuren und ebenfalls deren Ketosäuren angestaut werden.

Bei der Ahornsirupkrankheit haben wir bei 4 Fällen die Ketosäuren als 2.4-Dinitrophenylhydrazone im Harn bestimmt. Auf Abbildung 8 ist diese Bestimmung abgebildet. Wir ersehen, daß sich α -Ketoisocaproinsäure (Leucin) in zwei Isomere aufteilt, wobei im zweiten Isomer die α -Keto- β -methyl-valeriansäure (Isoleucin) ist. Die α -Ketoisovaleriansäure (Valin) befindet sich relativ gut getrennt zwischen den beiden Substanzen. Die bestimmten Werte befinden sich in Tabelle 4. Interessant ist festzustellen, daß bei der Hydrierung der 2.4-Dinitrophenylhydrazone bei einem Patienten sehr deutlich mehr Isoleucin entstand als Leucin, bei den 3 anderen dominierte das Leucin (siehe Abb. 11). So ist auch mit dieser Ketosäurebestimmung eine weitere Aufklärung der Pathologie dieser Krankheit möglich und ebenfalls eine bessere diätetische Einstellung durch die genaue Erfassung der Menge der Abbauprodukte dieser drei

Tab. 3
Untersuchungsergebnisse bei Patienten mit Tyrosinose oder Phenylketonurie

Krankheit	Jahr	Alter Jahre	Phenylalanin		Tyrosin		Metabolite im Harn				
			Serum mg/100 ml	Harn mg/24 Std.	Serum mg/100 ml	Harn mg/24 Std.	Phenyl- brenz- traubensäure (mg/24 Std.)	Hydroxy- phenylbrenz- traubensäure (mg/24 Std.)	<i>p</i> -Hydroxy- phenyl- milchsäure	<i>p</i> -Hydroxy- phenyl- essigsäure	<i>o</i> -Hydroxy- phenyl- essigsäure
Phenylketonurie	1968	2½	19,5	187,2	0,75	14,1	224,7	0	(+)	+	++++
Tyrosinose	1959	6	—	—	6,80	700,0	0	375,0	++++	+++	Spur
Normalwerte Kinder*)		4—6		2,6—6,3 Mittel 3,96		4,3—14,3 Mittel 7,4					
Kinder**)			0,69—1,22 Mittel 0,89		0,64—1,45 Mittel 0,99						

*) BERGER, H., Kinderspital, Basel.

**) LINNWEH, F.: Erbliche Stoffwechselkrankheiten, S. 145, Urban u. Schwarzenberg, München/Berlin (1962)

— nicht bestimmt.

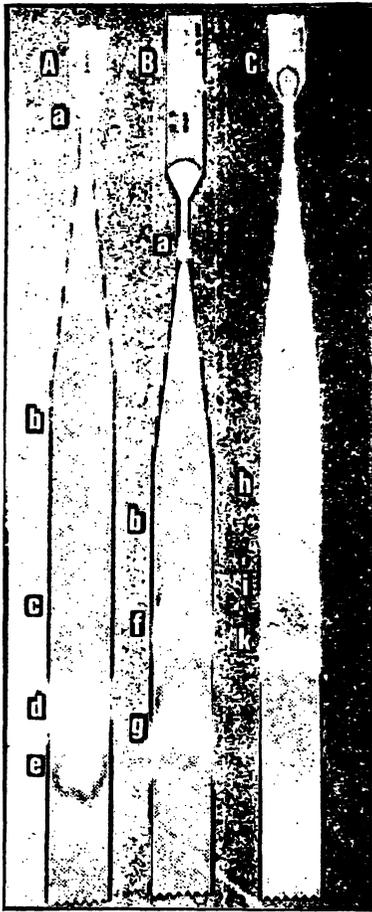


Abb. 8

Papierchromatogramme der Ketosäuren als 2,4-Dinitrophenylhydrazonzone. Harn von Patienten mit:

- A: Phenylketonurie
- B: Tyrosinose
- C: Ahornsirupkrankheit (Leucinose)
- a: α -Keto-glutarsäure
- b: Brenztraubensäure
- c: Isomer der Brenztraubensäure
- d: Phenylbrenztraubensäure
- e: Isomer der Phenylbrenztraubensäure
- f: Hydroxy-phenylbrenztraubensäure
- g: Isomer der Hydroxy-phenylbrenztraubensäure
- h: α -Keto-isocaproensäure
- i: α -Keto-isovaleriansäure
- k: Isomer der α -Keto-isocaproensäure + α -Keto- β -methyl-valeriansäure

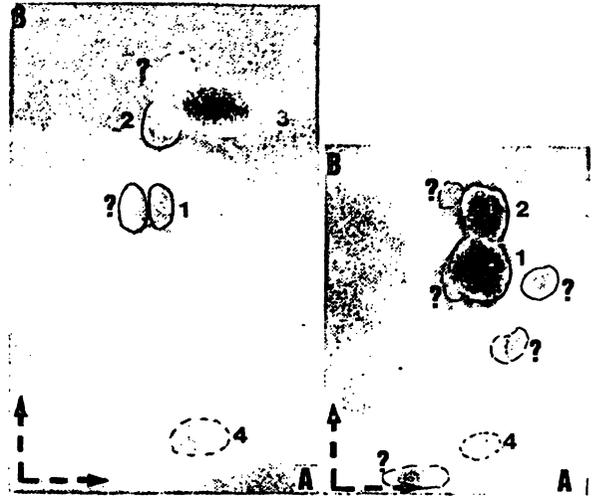


Abb. 9

Zweidimensionale Papierchromatogramme der Hydroxysäuren. Harn eines Patienten mit Phenylketonurie (links, groß) bzw. Tyrosinose (rechts, klein)

- 1: *p*-Hydroxy-phenylmilchsäure
- 2: *p*-Hydroxy-phenyllessigsäure
- 3: *o*-Hydroxy-phenyllessigsäure
- 4: HCl

Laufrichtung A: Aethanol absolut/ NH_3 , 25%/H₂O (400:25:75)

Laufrichtung B: Eucalyptol/*n*-Propanol/HCOOH/H₂O (200:200:80:18)

Spray: Nitroanilin
 NaNO_2
 Na_2CO_3

Aminosäuren. Sicher ist bei dieser Krankheit auch die Bestimmung der aus den Ketosäuren entstandenen Hydroxysäuren von Nutzen.

Argininbernsteinsäure-Aminoacidurie

Im Harn eines mental retardierten Kindes konnten wir mittels Hochspannungselektrophorese eine breite Bande einer Ninhydrin-positiven Substanz feststellen, die sich zwischen Valin und Alanin befand. Es gelang uns, diese Substanz als Argininbernsteinsäure zu identifizieren, die reine Säure, dem pathologischen Harn zugesetzt, wanderte an die gleiche Stelle. Auf Abbildung 12 ist diese Hochspannungselektrophorese abgebildet. Bei dieser

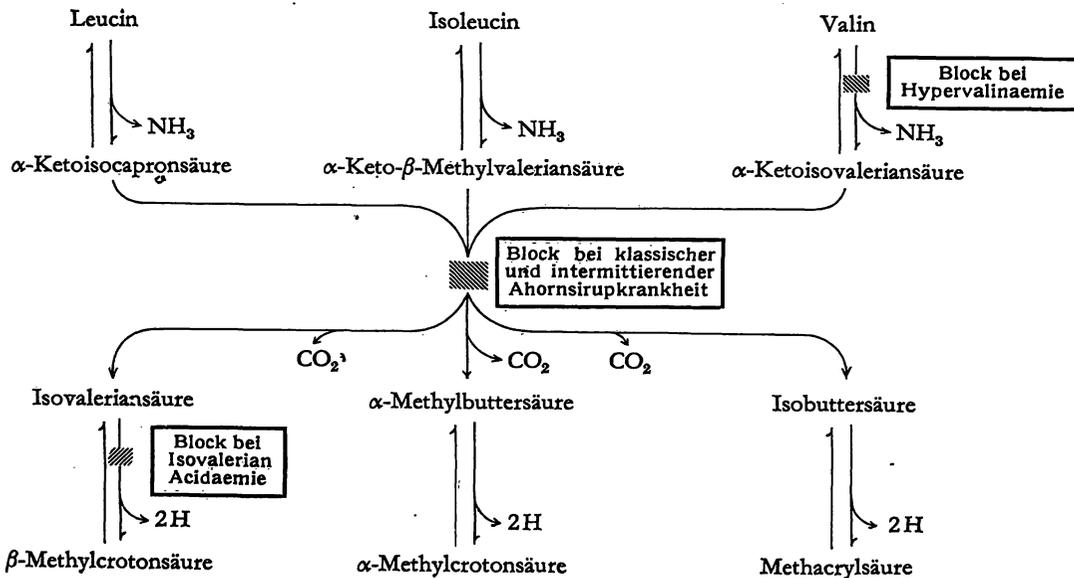
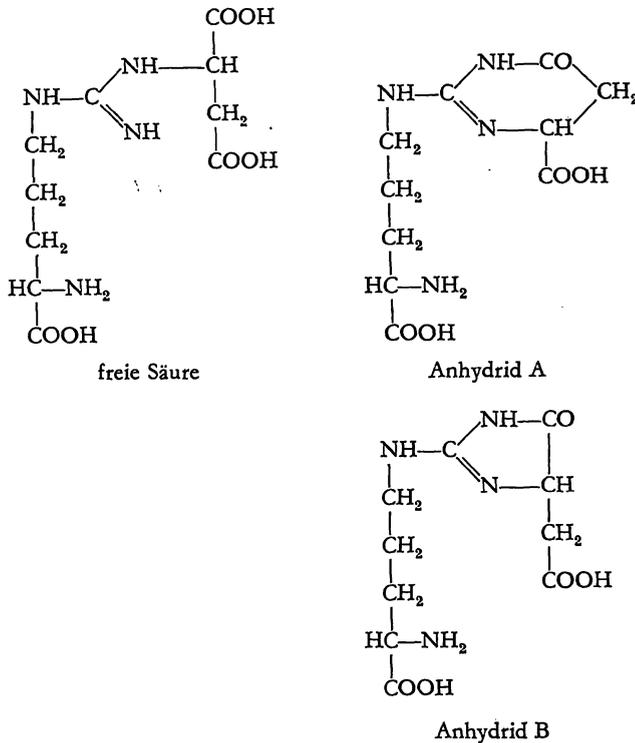


Abb. 10

Stoffwechsel der verzweigtkettigen Aminosäuren

Krankheit besteht eine Enzymstörung im Harnstoffcyclus zwischen der Argininbernsteinsäure und dem Arginin durch mangelhaftes Funktionieren der Argininosuccinase, welche Argininbernsteinsäure zu Arginin und Fumarsäure abbaut. Dieser Enzymblock führt zur Anhäufung von Argininbernsteinsäure im Körper. Sie wird in großen Mengen im Harn ausgeschieden, weil die Rückresorption durch die Niere sehr gering ist (No-Threshold-Aminoacidurie). Bei der Säulenchromatographie zeigte die reine Säure, frisch gelöst, einen Peak vor Methionin, der Harn des Patienten jedoch drei Peaks. Dies ist darauf zurückzuführen, daß sich die freie Säure cyclisiert und die beiden folgenden Anhydride bildet:



Argininbernsteinsäure, der sich vor dem Methionin befindet. Abbildung 13b zeigt die hydrolysierte Säure, ebenfalls dem Standard zugesetzt. Der Peak der freien Säure ist verschwunden, dagegen ist Anhydrid A und B entstanden. Aus der reinen Säure ist nach Hydrolyse die Hauptmenge als Anhydrid B vorhanden (Peak nach β -Alanin), eine kleine Menge Anhydrid A befindet sich im Peak von Phenylalanin. Abbildung 13c zeigt den Harn des Patienten vor Hydrolyse. Wir stellen die freie Säure, Anhydrid A und Anhydrid B fest, Anhydrid B wieder in größerer Konzentration. Abbildung 13d zeigt den Harn nach Hydrolyse, der Peak der freien Säure ist verschwunden, dagegen ist Anhydrid A und B entstanden, das letztere wieder in größerer Konzentration. Wir konnten im Harn unseres Patienten 729 mg freie Argininbernsteinsäure feststellen, die Menge der Anhydride im unhydrolysierten Harn ist in der gleichen Größenordnung.

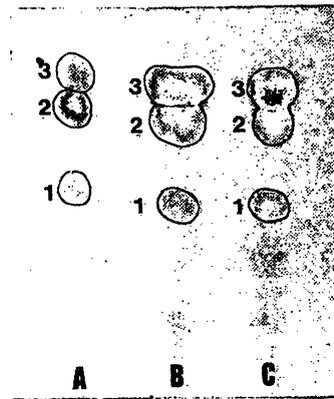


Abb. 11
Chromatogramm von Aminosäuren, die durch Hydrierung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Ketosäuren aus dem Harn eines Ahornsirupkranken erhalten wurden

- A: Standard
- B: Urin
- C: Urin + Standard
- 1: Valin
- 2: Isoleucin
- 3: Leucin
- Laufmittel: 2-Butanol, gesättigt mit NH_3 , 3%
- Spray: Ninhydrin/Collidin



Abb. 12
Elektropherogramm. Harn eines Patienten mit Argininbernsteinsäure-Aminoacidurie

- x: Argininbernsteinsäure
- 11: Alanin + Anhydride der Argininbernsteinsäure
- 12: Histidin
- 23: Glycin

Bei der Kolonnenchromatographie mit unseren Bedingungen, befindet sich Anhydrid A im Peak von Phenylalanin, Anhydrid B ist der Peak nach β -Alanin. Diese Bestimmung der Lage von Anhydrid A und Anhydrid B geht aus Untersuchungen von WESTALL (9) hervor. Unsere Untersuchungen mit der Säulenchromatographie sind in der Abbildung 13 zusammengestellt. Abbildung 13a zeigt den Peak der frisch gelösten reinen

Tab. 4
Untersuchungsergebnisse bei Patienten mit Ahornsirupkrankheit

Patient	Jahr	Ketosäuren mg/24 Stdn.		Aminosäuren erhalten aus Ketosäuren durch Hydrierung der 2,4-Dinitro-phenylhydrazone		
		α -Keto-isovaleriansäure	α -Keto-isocaproensäure + α -Keto- β -methylvaleriansäure	Valin	Leucin	Isoleucin
Patient 1	1962	90,3	226,5	+ (+)	++++	(+)
Patient 2	1964	27,4	88,7	+ (+)	++++	++
Patient 3	1964	42,0	68,0	+ (+)	+ (+)	+++ (+)
Patient 4*	Juni 1965	8,8	20,8	+ (+)	++++	++ (+)
Patient 4**	Aug. 1965	2,8	6,4	—	—	—

*) unter proteinarmer Diät
 **) unter spezifischer Valin-, Leucin- und Isoleucinarmer Diät
 — nicht bestimmt

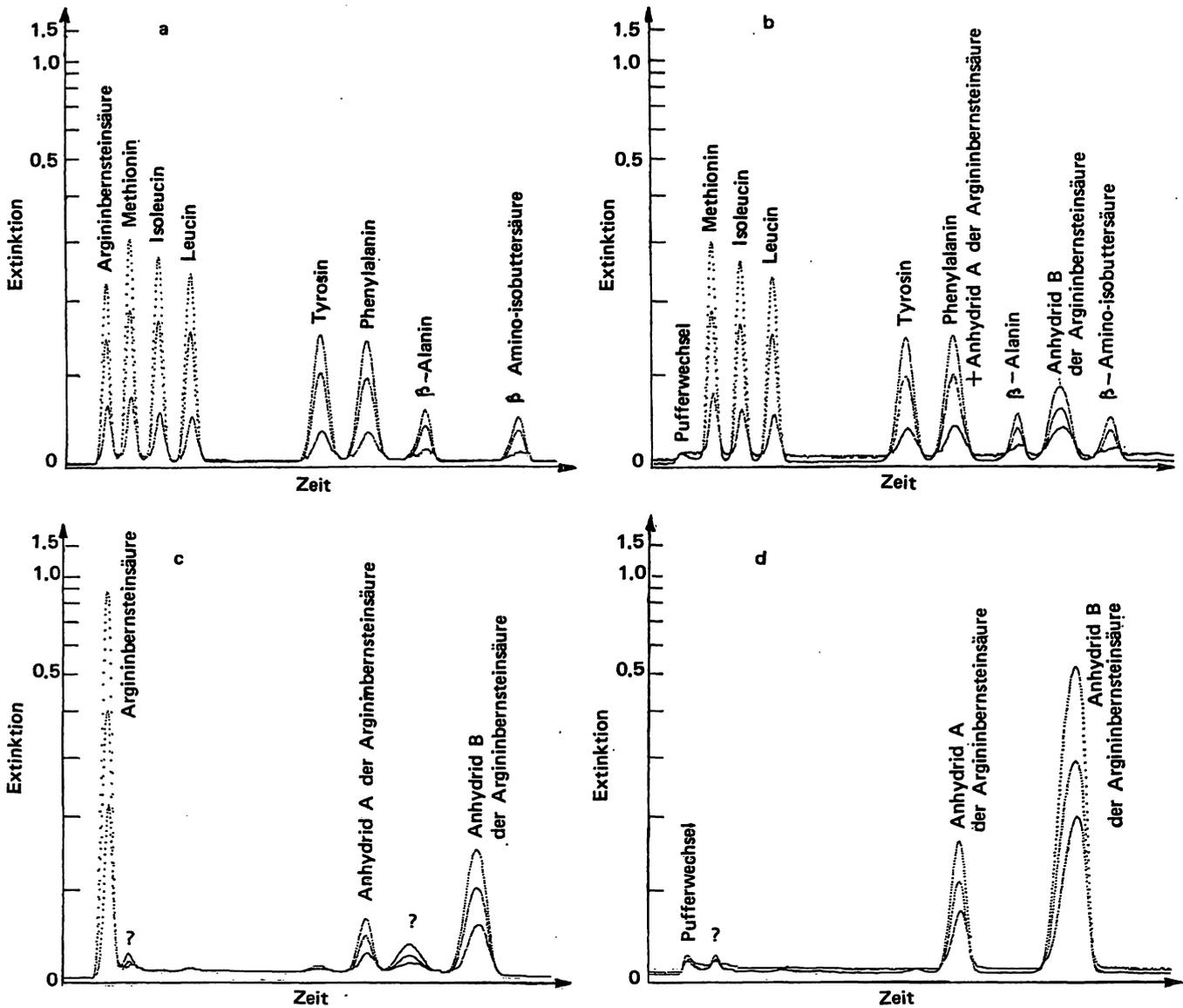


Abb. 13

Extinktionsdiagramme von Kolonnenchromatographien nach STEIN und MOORE

a: Darstellung von frisch gelöster, reiner Argininsteinsäure b: Darstellung ihrer Anhydride c: Harn eines Patienten, nativ d: Harn des gleichen Patienten, nach Anhydridbildung

Cystinurie

Bei der Cystinurie ist es besonders wichtig, nicht nur die Ausscheidung von Cystin, Lysin, Arginin und Ornithin im Harn, sondern wegen der Resorptionsstörung der gleichen Aminosäuren im Darm auch im Stuhl zu bestimmen. Außerdem sollten auch die Metabolite Cada-

verin, das im Darm aus nicht resorbiertem Lysin und Putrescin, welches aus Arginin und Ornithin entsteht, bestimmt werden. Diesen Patienten können durch zu große Aminosäurenverluste im Harn und Stuhl die essentielle Aminosäure Lysin nicht mehr in genügender Menge erhalten, was sich in einem Nanismus ausdrücken würde. In Tabelle 5 sind unsere Untersuchungen bei vier

Tab. 5
Untersuchungsergebnisse bei Patienten mit Cystinurie

Patient	Jahr	Alter Jahre	Cystin	Harn mg/24 Stdn.			Stuhl (vor Hydrolyse) mg/100 mg N ₂				Putrescin	
				Lysin	Ornithin	Arginin	Cystin	Lysin	Ornithin	Arginin		Cadaverin
Patient 1	1964	2 ³ / ₄	78,5	247,7	51,4	131,8	vorhand.	7,4	2,2	23,0	++ (+)	++++
Patient 2	1968	2	34,8	179,7	40,3	153,1	0	13,3	3,2	87,8	++	(+)
Patient 3	1967	1	14,6	65,2	4,9	3,6	0	9,7	7,2	2,0	+	++(+)
Patient 4	1967	10 ¹ / ₄	66,2	115,8	12,1	5,1	0	17,9	1,4	3,8	Spur	schwache Spur
Normalwerte												
Kinder*)		³ / ₄ -2	0-9,4 Mittel 1,2	1,5-20,0 Mittel 10,2	0-7,3 Mittel 2,9	0-2,1 Mittel 1,2						
Kinder*)		4-6	5,9-9,8 Mittel 8,2	10,8-29,3 Mittel 17,2	0-1,8 Mittel 1,2	0-6,8 Mittel 1,2						

*) Prof. H. BERGER, Kinderspital, Basel

Tab. 6
Untersuchungsergebnisse bei Patienten mit Debré-de Toni-Fanconi-Syndrom und Cystinose

Alter z. Z. der Untersuchung	Debré-de Toni-Fanconi-Syndrom		Cystinose				Normalwerte von Kindern		Mittelwert	Mittelwert
	1. Patient	2. Patient	1. Patient	2. Patient	3. Patient	4. Patient	¹ / ₄ —2 Jahre	4—6 Jahre		
	1 ¹ / ₁₂ Jahre	6 ¹ / ₁₂ Jahre	2 ¹ / ₁₂ Jahre	1 ¹ / ₁₂ Jahre	1 Jahr	3 Jahre				
Aminosäuren (mg/24 Stdn.)										
Taurin	8,19	—	—	—	—	—	2,3—14,0	6,5	7,9—27,1	17,8
Hydroxyprolin	36,49	—	—	—	~26,42	—	—	—	—	—
Asparaginsäure	+	—	6,76	—	—	7,47	0 — 5,1	1,6	0 — 0,4	0,3
Threonin	136,69	75,73	14,23	73,5	149,40	24,59	3,1—8,8	5,7	4,9—15,4	9,4
Serin	123,41	108,6	9,33	77,7	153,55	19,42	6,8—12,6	9,9	7,6—17,5	12,2
Glutamin/Asparagin	824,71	227,93	143,37	437,9	650,86	457,39	2,0—60,0	25,0	—	—
Glutaminsäure	+	9,21	5,21	—	—	—	4,4—4,7	4,5	—	—
Prolin	97,19	49,89	13,45	85,7	266,01	0	—	~0,3	0	0
Citrullin	56,98	11,27	7,15	+	~32,09	8,47	—	—	—	—
Glycin	260,45	197,91	46,26	149,3	340,30	66,83	10,7—42,1	27,8	21,3—70,6	49,1
Alanin	132,85	78,92	46,81	130,0	113,64	52,00	5,7—14,6	9,5	10,8—23,5	17,3
Cystin	65,02	35,75	6,76	70,4	39,70	Spuren	0 — 8,4	1,2	5,9—9,8	8,2
Valin	33,21	7,91	12,28	43,1	23,38	23,00	0 — 4,9	0,7	0 — 2,9	1,9
Methionin	5,90	1,95	~0,47	Spuren	Spuren	Spuren	1,5—8,9	2,5	1,8—8,0	5,96
Isoleucin	8,74	3,58	2,41	8,8	3,46	5,42	0,4—5,5	2,2	3,1—6,9	5,4
Leucin	17,23	6,57	5,91	18,7	15,28	13,40	0,8—6,2	2,8	3,0—5,2	4,2
Tyrosin	76,87	50,34	9,02	41,5	49,45	13,53	1,1—9,1	4,5	4,3—14,3	7,4
Phenylalanin	34,64	18,20	10,26	22,2	19,43	12,79	0,83—7,8	3,8	2,6—6,3	3,96
β -Amino-iso-buttersäure	12,67	Spuren	~3,73	—	—	—	0 — 9	5,0	—	—
γ -Aminobuttersäure	—	—	—	—	9,96	—	0 — 1,5	0,3	0 — 0	—
Ornithin	41,60	nicht bestimmt	4,04	20,8	13,69	5,42	0 — 7,3	2,9	0 — 1,8	1,2
Lysin	271,99	nicht bestimmt	15,86	103,2	150,23	25,21	1,5—20,0	10,2	10,8—29,3	17,2
Histidin	173,75	nicht bestimmt	24,88	83,6	180,94	24,00	15,3—82,6	46,5	55,0—59,0	57,7
3-Methylhistidin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tryptophan	~26,92	—	vorhanden	—	~24,90	—	—	—	—	—
Carnosin	~26,22	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arginin	~25,17	nicht bestimmt	4,20	23,0	+	++	0 — 2,1	1,2	0 — 6,8	1,2
Methioninsulfoxyd	—	—	vorhanden	—	—	++	—	—	—	—

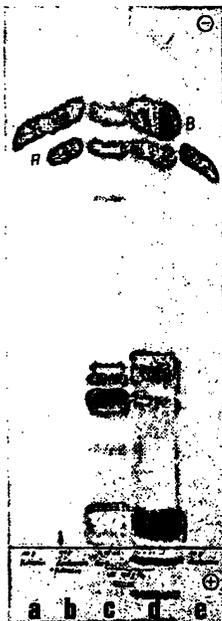


Abb. 14
Elektropherogramm, Stuhlultrafiltrate von Patienten mit Cystinurie
a: Putrescin
b: Cadaverin, Putrescin
c: Stuhlultrafiltrat von Patient 2
d: Stuhlultrafiltrat von Patient 1
e: Cadaverin
A: Cadaverin
B: Putrescin
V: 8000 V/cm; 76
mA: 36—38
pH: 3,6
Minuten: 70
Spray: Ninhydrin/Collidin

Cystinurie-Patienten im Harn und Stuhl abgebildet. Namentlich Patient 1 zeigt eine sehr erhöhte Lysinurie. Lysin ist ebenfalls im Stuhl vorhanden. Wir konnten bei diesem Patienten im Stuhl auch Cadaverin in großer Menge nachweisen (Abb. 14). Beim zweiten Patienten ist die Argininmenge im Harn und Stuhl erhöht, Putrescin jedoch nur in kleiner Menge vorhanden. Bei den zwei anderen Patienten ist der Arginin- und ebenfalls der Ornithingehalt im Stuhl gering, bei Patient 3 stellen wir jedoch eine erhöhte Menge Putrescin fest. Da die im Darm aus diesen Aminosäuren durch die Bakterienflora gebildeten Metabolite resorbiert werden, sollten sie auch im Harn bestimmt werden. Die von uns

Tab. 7
Ketosaureausscheidung bei Cystinose

Patient	Alter	Datum	α -Ketoglutar-säure mg/24 Stdn.	Brenztraubensäure mg/24 Stdn.
1 ♂	1 ¹ / ₁₂	27. 10. 61	18,6	49,0
2 ♀	10 ¹ / ₁₂	16. 7. 63	14,5	28,3
3 ♂	4 ¹ / ₁₂	19. 8. 63	6,1	2,4
4 ♂	1 ¹ / ₁₂	30. 3. 62	19,1	18,2
5 ♀	1 ¹ / ₁₂	14. 11. 62	14,5	13,8
6 ♀	1 ¹ / ₁₂	15. 5. 63	12,8	23,7
7 ♀	1 ¹ / ₁₂	10. 2. 62	4,2	5,4
8 ♀	7 ¹ / ₁₂	26. 10. 62	2,6	3,6
9 ♀	7 ¹ / ₁₂	9. 11. 61	6,0	14,7
10 ♂	7 ¹ / ₁₂	8. 11. 61	22,5	25,7
11 ♀	3 ¹ / ₁₂	8. 12. 64	5,1	4,0
12 ♀	3 ¹ / ₁₂	29. 3. 66	13,0	19,7
13 ♀	3 ¹ / ₁₂	23. 11. 65	1,4	2,0
14 ♂	1 ¹ / ₁₂	22. 8. 66	8,7	3,0
15 ♀	2 ¹ / ₁₂	2. 9. 66	5,4	4,6
16 ♀	2 ¹ / ₁₂	11. 11. 66	5,3	3,9
17 ♂	4 ¹ / ₁₂	15. 11. 67	4,5	3,6
18 ♂	9 ¹ / ₁₂	10. 9. 66	14,7	7,9
19 ♂	1 ¹ / ₁₂	28. 2. 67	17,8	21,3
20 ♀	1 ¹ / ₁₂	25. 1. 68	26,8	23,0
21 ♂	1 ¹ / ₁₂	10. 5. 68	22,7	15,8
22 ♀	1 ¹ / ₁₂	15. 5. 66	18,9	14,2

für diese Untersuchungen angewandten Methoden sind für die Aminosäuren im Harn und Stuhl die Kolonnenchromatographie, für den Nachweis der Metabolite wenden wir die Hochspannungselektrophorese an.

Sekundäre Aminoacidurien

In Tabelle 6 haben wir die Aminoacidurien bei zwei Patienten von Debré-de Toni-Fanconi-Syndrom und bei 4 Patienten bei Cystinose dargestellt. Es handelt sich in beiden Fällen um generalisierte Aminoacidurien, wobei hauptsächlich die sehr erhöhte Menge von Glutamin, Glycin, Alanin, Citrullin, Serin, Threonin, der Leucine, Valin und Lysin auffällt.

In einer früheren Arbeit (10) haben wir bei der Cystinose auf die erhöhte Ausscheidung der Ketosäuren, namentlich der Brenztraubensäure, hingewiesen. Wir konnten inzwischen noch bei mehreren Patienten mit Cystinose die Ketosäuren bestimmen und unsere früheren Befunde erhärten. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Es ist sehr deutlich ersichtlich,

daß beim 1—2jährigen Kind, wenn die Niere noch nicht stark geschädigt ist, namentlich die Brenztraubensäure stark erhöht ist. Beim Debré-de Toni-Fanconi-Syndrom ist diese weniger deutlich erhöht, dagegen die α -Ketoglutarsäure (11), wie wir in einigen Fällen feststellen konnten.

Literatur

1. EFRON, M. L., *New Engl. J. Med.*, 272, 1058, 1107 (1965). —
2. EFRON, M. L. und M. G. AMPOLA, *Ped. Clin. North. Amer.* 14, 881 (1967). —
3. BESSMAN, S. P. und R. BALDWIN, *Science Washington* 135, 789 (1962). —
4. NEUFELD E. und R. CHAYEN, *J. Chromatog.* 35, 445 (1968). —
5. GHADIMI, H., M. W. PARTINGTON und A. HUNTER, *Pediatrics, Springfield, Ill.* 29, 714 (1962). —
6. AUERBACH, V. H., A. M. DIGEORGE, R. C. BALDRIDGE, C. TOURTELLOTTE und R. C. BRIGHAM, *J. Pediatr. S. Louis* 60, 487 (1962).
7. MOZZICONACCI, P., J. BOISSE, C. ATTAL, PHAM-HUU-TRUNG, A. LEMONNIER und H. LÉVY, *Sem. Hôp. Ann. Péd.* 40, 680 (1964).
8. NORDIO, S., I. ANTENER, M. KAESER und R. GATTI, *Ann. paediatr. Basel* 207, 201 (1966). —
9. WESTALL, R. G., *Biochem. J.* 77, 135 (1960). —
10. SCHÄRER K. und I. ANTENER, *Ann. paediatr. Basel* 203, Supplementum 1 (1964). —
11. NORDIO, S., I. ANTENER, R. GATTI und E. DENTAN, *Med. exp.* 18, 193 (1969).

Dr. Ilse Antener
8 Av. des Baumes
CH 1814 La Tour de Peilz