Zeitschrift: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen

Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences

médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

Herausgeber: Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften

**Band:** 34 (1978)

**Artikel:** Pathophysiologie des Sulfatidmetabolismus bei metachromatischen

Leukodystrophien

Autor: Wiesmann, U.N.

**DOI:** https://doi.org/10.5169/seals-308139

### Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

### Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

**Download PDF: 27.11.2025** 

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

### Universitäts-Kinderklinik, Bern

# PATHOPHYSIOLOGIE DES SULFATIDMETABOLISMUS BEI META-CHROMATISCHEN LEUKODYSTROPHIEN\*

### U. N. WIESMANN

### Zusammenfassung

Die metachromatischen Leukodystrophien umfassen eine Gruppe innerhalb der heredodegenerativen Erkrankungen des Nervensystems. Der Mangel an Sulfatidsulfatase oder Arylsulfatase
A, der allen klinischen Formen der MLD zugrunde liegt, führt zur Akkumulation von Sulfatid
in den Lysosomen von Nervengewebe und in den Nieren. Aufgrund von Tierversuchen, Experimenten an Fibroblastenkulturen der Patienten, sowie ultrastrukturellen Untersuchungen an
einem Foeten mit pränataler MLD, kann für die MLD folgender Pathomechanismus vorgeschlagen werden.

- Ein quantitativ beträchtlicher lysosomaler Abbau von neu synthetisiertem Sulfatid während der Entwicklung des Nervensystems reguliert normalerweise die Sulfatidnettosynthese, resp. den Einbau von Sulfatid im Myelin. Beim Fehlen der Arylsulfatase A führt
  dies bereits intrauterin zur Akkumulation von Sulfatid in den Lysosomen von Oligodendroglia, Schwannzellen und auch in den Neuronen.
- 2. Obwohl schon intrauterin Sulfatid in den Lysosomen akkumuliert wird, ist jedoch die Myelinisierung nicht gestört. Die Demyelinisierung erfolgt sekundär möglicherweise infolge der Speicherung eines zytotoxischen Abbauproduktes des Sulfatids, des Psychosinsulfats, das ebenso wie das Sulfatid wegen der fehlenden Enzymaktivität nicht weiter obgebaut werden kann.

Eine Prävention der MLD ist durch pränatale Diagnose in kultivierten Amnionzellen möglich. In den Fibroblastenkulturen von Patienten mit MLD ist es möglich, das fehlende Enzym durch Substitution von aussen in die lebenden Zellen zu bringen. Dadurch kann der Abbaudefekt der Sulfatiddegradation korrigiert werden. Durch diese Untersuchungen sind die Grundlagen zu einer Behandlung der Patienten geschaffen worden, deren Problematik am Patienten selbst jedoch zurzeit noch nicht gelöst ist.

<sup>\*</sup> Herrn Prof. E. Rossi in Dankbarkeit gewidmet

### Summary

Metachromatic leucodystrophies (MLD) comprise a small group of heredodegenerative disorders of the nervous system. Deficiency of sulfatide-sulfatase or arylsulfatase A is the common defect in all forms of MLD leading to lysosomal sulfatide storage in the nervous tissue and in the kidney. On the basis of animal experiments, experiments with cultured fibroblasts of the patients as well as ultrastructural studies in a case of prenatal MLD, the following pathomechanism is proposed:

- Lysosomal degradation of a large portion newly synthetised sulfatide normally regulating
  the net synthesis and incorporation of sulfatide into myelin, causes early accumulation
  of sulfatide in lysosomes of myelinating cells and in neurons in the genetic deficiency
  of arylsulfatase A.
- Early accumulation of sulfatide does not lead to disturbance in myelination. Demyelination occurs possibly by storage of a cytotoxic compound, psychosin sulfate, also a substrate for the missing enzyme.

Prevention of MLD is possible by prenatal diagnosis of arylsulfatase A deficiency in cultured amniotic cells.

Enzyme substitution of the missing arylsulfatase A is possible by exogenous uptake of the enzyme in cultured fibroblasts. Thereby the defect of sulfatide degradation can be corrected. Although principles of enzyme substitution have been demonstrated, the problems of treating patients with MLD with arylsulfatase A infusions have yet to be overcome.

Die metachromatischen Leukodystrophien (MLD) sind innerhalb der heredodegenerativen Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) eine gut abgrenzbare Gruppe von autosomal vererbten lysosomalen Speicherkrankheiten, die zu einer progredienten Demyelinisierung im ZNS sowie in den peripheren Nerven führen.

Gleich wie viele der heredodegenerativen Erkrankungen des ZNS sind sie klinisch gekennzeichnet durch Familiarität (erkrankte Geschwister) sowie durch eine zunächst normale psychomotorische Entwicklung, die auf einer bestimmten Stufe abbricht und zum Verlust der bereits erworbenen Fähigkeiten führt. Nach langdauerndem geistigem und körperlichem Siechtum führen sie schliesslich zum vorzeitigen Tod. Bei der klassischen MLD werden von der
Art der Erkrankung und zum Zeitpunkt des Beginns der ersten Symptome her drei Formen unterschieden, die alle autosomal rezessiv vererbt werden:

1. Die spätinfantile, 2. die juvenile und 3. die adulte Form. Ueber den Beginn der Art der ersten klinischen Symptome sowie die Art der geistigen Behinderung gibt Tabelle 1 Auskunft.

Tabelle 1. Klinik der metachromatischen Leukodystrophien

TYP	SPAETINFANTIL	JUVENIL	ADULT
BEGINN	~2 J	5-7 J	30-40 J
PROGRED IENZ	Z rasch	langsam	langsam
Neurolog. Symptome	Spastizität Ataxie	Ataxie	
PSYCHE	sec. Demenz	sec. Demenz	Psychose
Biochem. Defekt	ASA #	ASA 👯	ASA 👯
Speicherung		— Sulfatid ——	
Erbgang	———— autosomal rezessiv ————		

Für eine Differentialdiagnose der klassischen MLD mit dem multiplen Sulfatasedefekt sei auf die Literatur verwiesen (1, 2). Der allen Formen von MLD zu Grunde liegende primäre Defekt ist das praktische Fehlen der lysosomalen Sulfatidsulfatase oder Arylsulfatase A, was zur lysosomalen Speicherung eines sauren Lipids, dem Sulfatid, in allen Organen führt, die dieses Lipid zu synthetisieren vermögen; in erster Linie im zentralen und im peripheren Nervensystem sowie in den Tubuluszellen der Nieren. Zwischen der Kenntnis des primären Enzymdefektes und der erschöpfenden Kenntnis des Pathomechanismus der Krankheit, der letztlich zur Entwicklung der klinischen Symptome der Demyelinisierung führt, klafft bei der MLD eine ansehnliche Lücke. Diese trifft auch für die meisten anderen heredodegenerativen Erkrankungen des ZNS zu, bei denen der primäre biochemische Defekt bekannt ist. Mit der Darstellung der Resultate unserer Untersuchungen bei der spätinfantilen Form der MLD soll versucht werden, einen Beitrag zum Mechanismus der Entwicklung dieser Krankheit zu leisten, Mittel zu ihrer Prävention zu zeigen, sowie Grenzen und Möglichkeiten einer Behandlung am Modell der kultivierten Fibroblasten der Patienten zu erwägen.

# CHEMIE

# LOKALISATION VON SULFATID

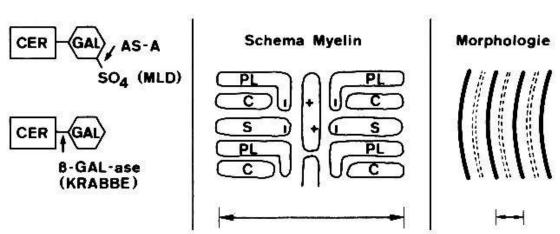


Abb. 1 Chemie und Lokalisation von Sulfatid. PL = Phospholipid, S = Sulfatid + Cerebrosid, C = Cholesterol

## Untersuchungen zum Pathomechanismus

### Metabolismus des Sulfatids

Das Sulfatid ist ein Sphingolipid, das durch Sulfatierung von Galactocerebrosid durch eine microsomale Sulfotransferase (E.C. 2.8.2.1.1) überwiegend in Oligodendrozyten und in Schwannzellen des Nervensystems synthetisiert wird (3, 4). Dieses saure Lipid wird zusammen mit dem Myelin-basischen Protein, sowie Phospholipiden und Cerebrosid in das Myelin eingebaut. Es bestehen Hinweise dafür, dass das basische Protein durch die ionische Verbindung stabilisiert wird (5). Der Komplex der Myelinlipide mit dem basischen Protein bilden die sog. "Intraperiod line", die ultrastrukturell als feine Doppellinie zwischen den sog. "Major dense lines" erscheint (Abb. 1). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch Neuronen Sulfatid synthetisieren können (3). Es wird vermutet, dass hier Sulfatid als Bestandteil der Plasmamembran Rezeptorfunktion haben könnte. Die Desulfatierung von Sulfatid zu Cerebrosid erfolgt in den Lysosomen durch die Sulfatid-Sulfatase (EC 3.1.6.1) resp. durch die Arylsulfatase A. Die Lysosomen sind als Zellorganellen mit der Aufgabe der hydrolytischen Degradation von Makromolekülen betraut und in jeder bisher untersuchten Zelle des Organismus zu finden.

#### Biochemische Diagnose der MLD

Da ein genetischer Defekt der Arylsulfatase A allen Formen der MLD zu Grunde liegt, ist der Nachweis der verminderten Aktivität bei den Patienten das ausschlaggebende diagnostische Kriterium. Normalerweise wird die Arylsulfatase zusammen mit anderen lysosomalen Enzymen in geringer Menge im Urin ausgeschieden. Das isolierte Fehlen der Enzymaktivität im

dialysierten Urin der Patienten wird seit langem als das diagnostische Hilfsmittel bei Verdacht auf MLD benützt (6). Beweisend ist jedoch nur die fehlende Aktivität des Enzyms in isolierten Leukocyten und in den kultivierten Fibroblasten der Patienten (7). Die lysosomale Speicherung des Sulfatids als unmittelbare Folge des lysosomalen Enzymdefekts in den Tubuluszellen der Niere, die Sulfatid ebenfalls synthetisieren können, führt zu einer vermehrten Ausscheidung von Sulfatid in den Zellen des Urinsedimentes. Der histochemische Nachweis von metachromatischen Substanzen in diesen Zellen (8) oder besser die direkte Bestimmung von Sulfatid nach dünnschichtchromatographischer Trennung der extrahierten Lipide im Urinsediment ergibt damit ein weiteres diagnostisches Hilfsmittel.

Die Speicherung von Sulfatid in den Lysosomen der myelinbildenden Zellen kann auch direkt ultrastrukturell in Biopsien von peripheren Nerven (N. suralis) sowie in den bemarkten Nerven von Hautbiopsien nachgewiesen werden. Anhand der kristalloiden Feinstruktur kann sogar die Natur des gespeicherten Lipids vermutet werden.

### Entwicklung des Sulfatidmetabolismus

Das Entwicklungsmuster des Sulfatid-synthetisierenden Enzyms (CST) und des Sulfatid-abbauenden Enzyms (AS-A) im menschlichen Gehirn von der Geburt bis zum mittleren Lebensalter ist in der Abb. 2 schematisch dargestellt. Die Aktivitäten beider Enzyme sind bei der Geburt niedrig. Die CST-Aktivität steigt sofort, die AS-A mit einer Verzögerung von zwei Jahren bis zur moximalen Aktivität um fünf Jahre an. Gleichzeitig mit dem Anstieg der CST-Aktivität setzt beim Menschen im Grosshirn eine intensive Periode der Myelinisierung ein, die mit etwa 15 Jahren abgeschlossen ist (9). Die Aktivitäten beider Enzyme fallen bis zum 10. Lebensjahr wieder ab und bleiben dann konstant niedrig. Bemerkenswert ist, dass der Beginn der klinischen Symptome bei der spätinfantilen Form der MLD am Beginn der Aktivitätszunahme der AS-A liegt und die ersten Symptome bei juvenilen MLD etwa mit dem Gipfel der CST und der AS-A Aktivität zusammenfallen.

Die Fragen nach der Art und dem Ausmass der metabolischen Kooperation zwischen SulfatidSynthese und Sulfatiddegradation sind am Menschen naturgemäss nicht zu lösen und wurden
deshalb an sich entwickelnden Hirnen von Mäusen im Tiermodell weiter untersucht (10, 11).
Bekannt ist, dass bei Mäusen die Myelinisierung des Gehirns zwischem dem 8. und dem 10.
Tag post natal einsetzt und mit etwa 30 Tagen abgeschlossen ist. Abb. 3 zeigt die Aktivität
der CST und der AS-A während der Entwicklung im Kleinhirn weisser Mäuse. Aehnlich wie
beim Menschen ist eine gewisse Uebereinstimmung des Entwicklungsmusters zu erkennen, wobei aber die Entwicklungskurve der AS-A gegenüber der CST um zwei Tage verschoben er-

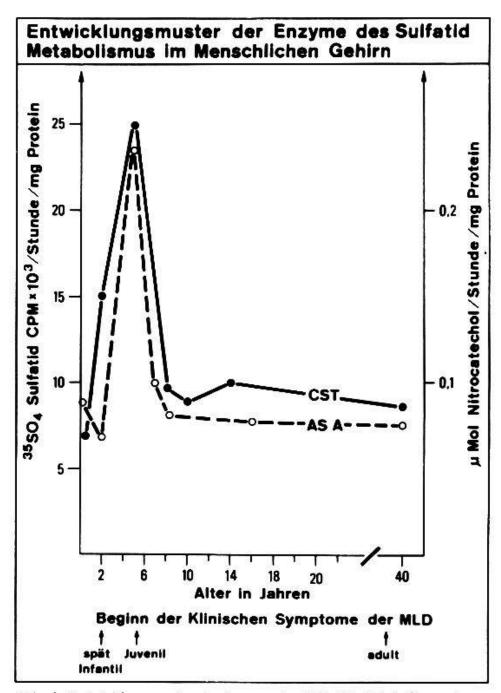


Abb. 2. Entwicklungsmuster der Enzyme des Sulfatid-Metabolismus im menschlichen Gehirn

scheint. Die Zunahmerate (Inkrement) der Sulfatidakkumulation im Kleinhirn scheint mit dem relativen Quotient aus den beiden Enzymaktivitäten bis zum 25. Lebenstag gut zu korrelieren, was für eine metabolische Kooperation im Sulfatidmetabolismus sprechen würde. Das Ausmass dieser funktionellen Verknüpfung zwischen mikrosomaler Synthese und lysosomalem Abbau, die in voneinander getrennten Zellräumen funktionieren, wurde am Tiermodell, an sich entwickelnden Gehirnen von Mäusen in vivo untersucht. Den Tieren wurde im Alter zwischen

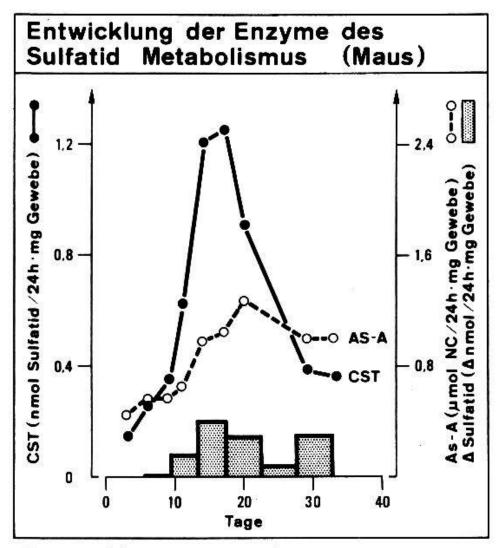


Abb. 3. Entwicklung der Enzyme des Sulfatid-Metabolismus im Kleinhirn der Maus

null und dreissig Tagen postnatal intraperitoneal radioaktives <sup>35</sup>S-Sulfat injiziert und der Einbau von <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> in Gehirnsulfat gemessen. Unter Berücksichtigung der biologischen Halbwertszeit des injizierten <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> im Blut, sowie dessen spezifischen Aktivität, wurde während verschiedenen Entwicklungsstadien des Gehirns die Sulfatidsynthese gemessen. In Versuchen, bei denen nach 24 Stunden Markierung mit <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> kaltes Sulfat im Ueberschuss intraperitoneal nachgespritzt wurde, konnte auch die Abbaurate des markierten Sulfatids <u>in vivo</u> gemessen und mit der entsprechenden Syntheserate verglichen werden (12). Die Ergebnisse beim Kleinhirn sind in Abb. 4 zusammengestellt. Dabei zeigte sich, dass das Entwicklungsmuster der Sulfatidsynthese <u>in vivo</u> gut mit dem Entwicklungsmuster der CST <u>in vitro</u> übereinstimmt. Das gleiche gilt für das Entwicklungsmuster des Sulfatidabbaus <u>in vivo</u> und der Aktivität der AS-A in den Gehirnhomogenaten. Ebenfalls aus Tierversuchen am sich entwickelnden Gehirn ist bekannt, dass das Sulfatid, das überwiegend im Myelin lokalisiert ist, normalerweise nur eine sehr geringe Abbau- und Erneuerungsrate zeigt. Es handelt sich also um "stabiles My-

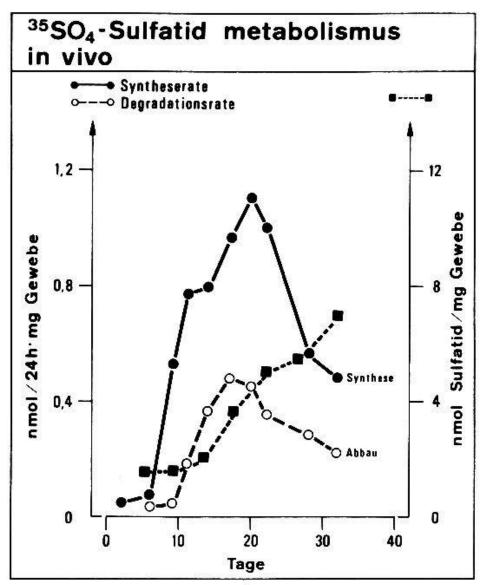


Abb. 4. 35SO<sub>4</sub>-Sulfatid-Metabolismus in vivo im Kleinhirn der Maus

elin" in Zellen, die selbst eine sehr lange Lebensdauer haben. Aus unseren Versuchen geht jedoch hervor, dass während der Hirnentwicklung bis zu 70 % des neugebildeten Sulfatids gleich wieder abgebaut wird, also zunächst einem "labilen" Sulfatid entspricht. Nur ein verhältnismässig geringer Teil des synthetisierten Sulfatids gelangt also ins Myelin. In dieser Hinsicht wird der Einbau von Sulfatid ins Myelin nicht nur von der Syntheserate, sondern ganz wesentlich auch von der Abbaurate des Sulfatids bestimmt (Nettosynthese). Die Bedeutung dieser Befunde für die Pathogenese der metachromatischen Leukodystrophie liegt, sofern man die Ergebnisse aus dem Tierversuch auf den Menschen übertragen kann, auf der Hand. Die Anhäufung von Sulfatid in den Lysosomen des Gehirns der MLD Patienten braucht zunächst nicht aus dem "stabilen" Myelinpool zu stammen, sondern entspricht dem "labilen"

Sulfatid, das noch nicht ins Myelin eingebaut ist. Dies wäre vereinbar mit einer zunächst noch normalen Myelinisierung des sich entwickelnden Gehirns. Da auch Neuronen Sulfatid allerdings nur in sehr labiler Form synthetisieren können (3, 13), wäre auch hier eine primäre Speicherung zu erwarten.

Ultrastrukturelle Untersuchungen am fetalen Gehirn bei einem Kind mit intrauterin diagno-

stizierter spätinfantiler MLD (14) zeigen, dass bereits in der 22. Lebenswoche in dem sich zu dieser Zeit myelinisierenden Rückenmark, sowie in den peripheren Nerven, eine lysosomale Speicherung von Sulfatid zu erkennen ist, ohne dass dadurch die Myelinisierung gestört erscheint. Obwohl zu dieser Zeit noch kein Myelin im Gross- und Kleinhirn gefunden werden kann, könnte auch hier im EM bereits eine Speicherung von Sulfatid morphologisch, sowohl in Axonen als auch in den präsumptiven Oligodendrozyten nachgewiesen werden. Diese Befunde sprechen dafür, dass das in den Lysosomen gespeicherte Sulfatid bei der MLD zunächst aus dem "labilen" Synthese-Pool und nicht aus dem Myelin stammt, und damit eine Speicherung der später einsetzenden Demyelinisierung vorangeht. Was aber ist die Ursache der sekundären Demyelinisierung? Dieser Frage wurde auch an kultivierten Fibroblasten von Patienten mit verschiedenen Formen der MLD nachgegangen (15), in denen sich der genetische Enzymdefekt der Sulfatidsulfatase ebenfalls nachweisen lässt. Die Sulfatidsulfatase hat mehrere Substrate, die von ihr enzymatisch desulfatiert werden können. Das eine ist das künstliche Substrat, das üblicherweise zur Bestimmung verwendet wird (p-nitrocatecholsulfat), dann das Sulfatid sowie dessen deazyliertes Derivat, das Psychosinsulfat oder Lysosulfatid, Das Psychosinsulfat wird dadurch zum Psychosin und nach Abspaltung der Galaktose zum Sphingosin. Sowohl Psychosinsulfat als auch Psychosin sind stark zytotoxisch, da sie ähnlich wie das Lysolezithin durch ihre Detergens-Eigenschaft biologische Membranen labilisieren. Tabelle 2 zeigt die Aktivitäten der Psychosinsulfatase, der Sulfatid-Sulfatase sowie der Arylsulfatase A aus normalen Fibroblasten sowie aus Fibroblasten der spätinfantilen und der adulten Form der metachromatischen Leukodystrophie. Die Identität der Psychosinsulfatase mit der Sulfatidsulfatase/Arylsulfatase A ist erwiesen (15), was sich auch am Fehlen aller drei Enzymaktivitäten bei beiden Formen der MLD bestätigt. Die Restaktivität der Enzyme ist bei beiden Formen der MLD gleich hoch. Psychosinsulfat wie Psychosin konnten bisher noch nie im normalen Gehirn nachgewiesen werden. Mindestens theoretisch könnte Psychosinsulfat aus der Sulfatierung von Psychosin, sowie in den Lysosomen durch Deazylierung von Sulfatid entstehen. Die letztere Entstehungsart würde eine Erklärung der sekundären Demyelinisierung bei allen drei Formen der MLD ermöglichen. Dabei würde zuerst Sulfatid in den Lysosomen gespeichert. Aus diesem Sulfatid könnte allmählich Psychosinsulfat enzymatisch in kleinsten

Tabelle 2. Psychosin-Sulfatase, Sulfatid-Sulfatase und Arylsulfatase A in Fibroblasten von Patienten mit MLD

Herkunft der Fibroblasten	PSYCHOS INSULFAT SULFATASE (Lysosulfatid)	SULFATID SULFATASE	ARYLSULFATASE A	
\$ <del>************************************</del>	nMols / Stunde / mg Protein			
NORMAL (N=6)	248.7 ± 93	133.5 ± 52	842 ± 273	
SPAETIN- FANTILE MLD (N=5)	8.9 ± 5.7	< 0.2	29.7 ± 9.7	
ADULTE MLD (N=2)	7.7 ± 5.2	< 0.2	35.3 ± 9.6	
	Ft. V	Wiesmann II	und Hansahlausta	

Eto. Y. Wiesmann U. und Herschkowitz JBC 1974

Mengen gebildet werden, das dann die Membranen der Speicherlysosomen lysieren könnte, wobei die freigesetzten lysosomalen Enzyme den Untergang der Zelle herbeiführen würden. Dieser Vorgang ist bei der normalen langen Lebensdauer der Oligodendrozyten, die nur einen geringen Zellumsatz kennen, welcher für eine Entfernung der gespeicherten Substanzen sorgen könnte, recht einleuchtend. In der Niere dagegen ist die normale Lebensdauer der Tubuluszellen beschränkt. Bei der MLD könnte die zytotoxische Wirkung des gespeicherten Psychosinsulfats durch einen erhöhten Zellumsatz ausgeglichen werden, wobei allerdings nach langer Dauer der Krankheit auch Zystennieren sowie tubuläre Insuffizienz gefunden wurden. Aufgrund der bisher erwähnten Resultate ist eine Erklärung der verschiedenen klinischen Formen der MLD nicht zu geben. Sowohl bei der früh beginnenden Form wie bei der adulten Form der MLD ist die Restaktivität der Sulfatidsulfatase im Homogenat der Fibroblasten gleich niedrig, ebenso wie die Restaktivität gemessen mit dem künstlichen Substrat (15, 16). Wird jedoch der Abbau von pinocytiertem <sup>35</sup>SO<sub>4</sub>-Sulfatid in den <u>intakten</u> Fibroblasten gemessen, so ergeben sich nach PORTER et al. (16) deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Verlaufsformen der MLD. Bei allen ist zwar die Degradation von Sulfatid deutlich geringer als bei normalen Fibroblasten. Bei der spätinfantilen Form ist die Abbaurate praktisch null, bei der adulten Form fast 50 % der Norm, während sie bei der juvenilen Form der MLD zwi-

- 1. Prognose der Erkrankung muss bekannt sein; Schwerste oder letale Krankheit.
- Der biochemische Defekt muss in den gezüchteten Amnionzellen nachweisbar sein.
- Nach umfassender Orientierung und Beratung der Eltern muss bei den Eltern eine Bereitschaft entstehen, bei positivem Resultat der Untersuchungen eine Interruptio zu erwägen.

schen 20 % und 30 % der Norm liegt. Falls sich dieser Befund an menschlichen Fibroblasten auf die Situation im menschlichen Gehirn bei der MLD übertragen lässt, böte sich hier zusammen mit der Kenntnis des Sulfatidsulfatase-Entwicklungsmusters eine Erklärung für die Pathogenese der drei Verlaufsformen der MLD.

## Untersuchungen zur Prävention der MLD

Wie gezeigt wurde, ist die Kultur von Zellen von Patienten, meist von Fibroblasten, in vielen Fällen stellvertretend für den Patienten geworden. Sie ermöglicht biochemische Untersuchungen, die am Patienten selbst undurchführbar sind und kann Resultate erbringen, die für den Patienten wiederum diagnostische, pathogenetische, ja therapeutische Bedeutung haben können.

Enzymdefekte, die zunächst in den gezüchteten Fibroblasten nachgewiesen wurden, sind bis heute ausnahmslos auch in gezüchteten Amnionzellen nachzuweisen (17). Dies gilt auch für die MLD (14). Nach Punktion von 10 – 20 ml Amnionflüssigkeit in der 14. – 16. Schwangerschaftswoche können aus dem Zellsediment fetale Amnionzellen gezüchtet werden, die genetisch stellvertretend für die Feten sind. Damit ist die Vorqussetzung für eine pränatale Diagnose der MLD möglich. Die wichtigsten Vorbedingungen für das Durchführen einer pränatalen Diagnose sind in der Tabelle 3 zusammengefasst. Ein schwerwiegender Nachteil dieser Art von Prävention ist, dass zum möglichen Zeitpunkt der pränatalen Diagnose bereits ein Geschwister klinisch erkrankt sein muss, damit überhaupt an eine pränatale Untersuchung gedacht werden kann. Dies trifft meist bei der spätinfantilen MLD, nicht aber bei der juvenilen oder gar bei der adulten Form der MLD zu, wo je nach Geburtenfolge andere Geschwister latent erkrankt sein können, bevor die Diagnose überhaupt klinisch gestellt werden kann. Der grösste Vorteil ist, dass gesunde Feten als solche erkannt und ausgetragen werden, die sonst, aus Angst der Eltern vor weiteren kranken Kindern, nicht geboren werden. Die hier erwähnte Problematik sei kurz an einem Beispiel geschildert: Die Eltern hatten zum Zeitpunkt, als sie wegen einer erneuten Schwangerschaft den Arzt aufsuchten, bereits zwei Kinder an einer spätinfantilen Form der MLD verloren. Erst beim zweiten Kind war klinisch und

biochemisch die Diagnose gestellt worden. Die dritte Schwangerschaft wurde nach einer pränatalen Diagnose, die ein gesundes Kind erwarten liess, ausgetragen. Das Kind ist heute sowohl klinisch wie biochemisch gesund. Bei einer vierten Schwangerschaft wurde auf Grund der fehlenden Aktivität der Arylsulfatase A in den kultivierten Amnionzellen eine pränatale MLD diagnostiziert und die Schwangerschaft unterbrochen. Die biochemische Untersuchung der Enzymaktivität in den Organen des Feten bestätigte die pränatal gestellte Diagnose (14). Auf die ultrastrukturellen Befunde im Gehirn und Rückenmark sowie ihre mögliche Interpretation wurde bereits eingegangen.

## Untersuchungen zur Enzymersatztherapie

Versuche, ein in der Zelle fehlendes Enzym von aussen auf natürlichem Weg in eine lebende Zelle hineinzubringen, haben vor allem bei den lysosomalen Enzymdefekten Aussicht auf Erfolg (18). Makromolekulare Stoffe wie Eiweisse, aber auch beispielsweise Makrodextrane, die von aussen Zellen angeboten werden, können durch Pinocytose in intrazelluläre Vacuolen und schliesslich in Lysosomen aufgenommen werden, wo die hydrolytische Degradation zu den nieder-molekularen Bausteinen erfolgt. Diese Produkte der enzymatischen Hydrolyse, wie Aminosäuren, Zucker, usw., können die Lysosomen durch Diffusion verlassen. Lysosomale Enzyme sind gegenüber der Proteolyse durch eigene Proteasen weitgehend resistent. Daher lag es nahe, bei Fibroblasten mit einem bekannten genetischen lysosomalen Enzymdefekt wie der MLD zu versuchen, auf dem Wege der Pinocytose die fehlende Enzymaktivität in den Zellen zu ersetzen (19). Homologe, menschliche Arylsulfatase A wurde aus normalem Urin angereichert und teilweise gereinigt dem Kulturmedium von MLD-Fibroblasten zugesetzt, Dabei bestätigte sich die Annahme, dass die Zellen in der Lage sind, Arylsulfatase A aus dem Medium in ihre Lysosomen aufzunehmen und in aktiver Form über Tage in den Zellen zu behalten. Die Halbwertszeit in den Zellen beträgt zwischen 5 - 8 Tage. Das aufgenommene Enzym erwies sich auch als aktiv gegenüber intrazellulär akkumuliertem Sulfatid, dessen Abbau in den Fibroblasten vollständig normalisiert wurde. Bei diesen Versuchen fiel auf, dass das Enzym bis zu 100-fach besser in die Zellen aufgenommen wurde als unter gleichen Bedingungen ein anderes Makromolekül (14C-Dextran, 80'000 Daltons). Abb. 5 zeigt die Kinetik der gleichzeitigen Aufnahme von Arylsulfatase A und von <sup>14</sup>C-Dextran in MLD-Fibroblasten Über eine Inkubationsdauer von 48 Stunden. Arylsulfatase A wird im Medium bei 37°C und pH 7.4 mit einer Halbwertszeit von etwa 20 Stunden inaktiviert, so dass für die Berechnung der Aufnahmerate nur die ersten 6 Stunden verwendet werden können.

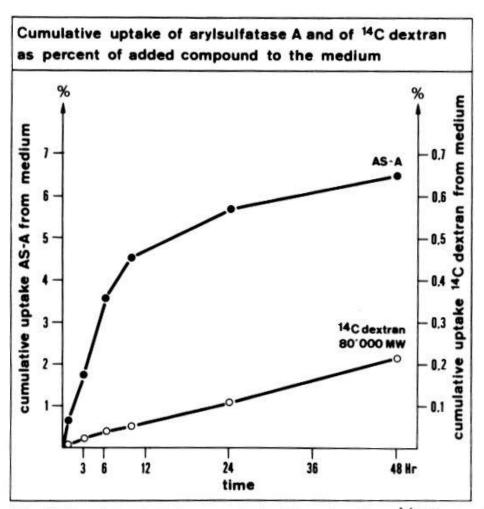


Abb. 5. Kumulative Aufnahme von Arylsulfatase A und von <sup>14</sup>C-Dextran in MLD-Fibroblasten

Mit zunehmenden Enzymmengen im Kulturmedium sowie kurzen Inkubationszeiten von 4 Stunden erhält man eine Aufnahmekinetik (Abb. 6), die einer sättigungsfähigen Bindung durch
spezifische Membranrezeptoren entspricht. Aus den Versuchen, Iysosomale Enzyme in enzymdefiziente Zellen zu bringen, um damit die Grundlagen für eine Behandlung von Patienten
mit Iysosomalen Speicherkrankheiten zu legen, hat sich ein eigener Forschungsbereich ergeben, dessen Aufgabe es ist, den Mechanismus der Aufnahme von Seiten des Enzymmoleküls als
auch von Seiten der Membranrezeptoren zu untersuchen. Darauf einzugehen würde den Rahmen dieses Vortrages sprengen.

Leider haben bisher Versuche mit MLD Patienten, wie sie von GREEN und Mitarbeiter (20) durchgeführt wurden, ergeben, dass das infundierte Enzym zwar rasch aus der Blutbahn verschwindet und teilweise in den Mesenchymzellen der Leber wieder gefunden werden kann, dass aber die Bluthirnschranke für das Enzym völlig undurchlässig ist. Damit war auch keine Besserung des klinischen Bildes der behandelten Patienten zu erwarten. Eine effektive The-

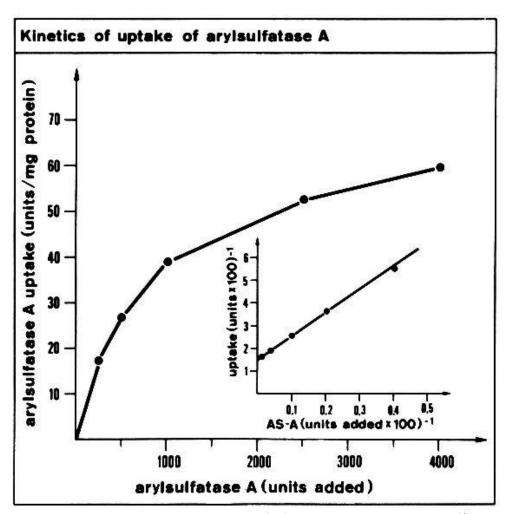


Abb. 6. Kinetik der Aufnahme von Arylsulfatase A. Einschub: Darstellung der Aufnahme nach Lineweaver-Burk

rapie von Patienten setzt voraus: 1. Die Krankheit darf nicht fortgeschritten sein, weil sonst die Schäden vermutlich irreversibel sind. 2. Es muss eine Möglichkeit gefunden werden, gefahrlos die Bluthirnschranke zu durchbrechen und 3. die Enzyme müssten so modifiziert sein, dass sie überwiegend nur von den Hirnzellen aufgenommen werden können, eine Aufgabe, die nur dann gelöst werden kann, wenn wir wesentlich mehr über den Aufnahmemechanismus kennen.

- Eto, Y., Wiesmann, U.N., Carson, J.H. and Herschkowitz, N.: Multiple sulfatase deficiencies in cultured skin fibroblasts. Arch. Neurol. 30: 153-156, 1974.
- Moser, H.: Sulfatide lipidosis, metachromatic leucodystrophy. In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. and Frederickson, D.S., p. 688–729. New York: Mc Graw-Hill Comp. 1972.
- Benjamins, J.A., Guarnieri, M., Miller, K., Sonneborn, M. and McKhan, G.M.: Sulfatide synthesis in isolated oligodendroglia and neuronal cells. J. Neurochem. 23: 751– 757, 1974.

- Burkart, Th., Siegrist, H.P., Herschkowitz, N. and Wiesmann, U.N.: 3'-phosphadenyl-sulfate: Galactosylceramide 3'-sulfotransferase. Biochim. Biophys. Acta 483: 303-311, 1977.
- Banik, N.L. and Davison, A.N.: Lipid and basic protein interaction in myelin. Biochem. J. 143: 39-45, 1974.
- Austin, J., Arinstrong, D., Shearer, L. and Mc Afee, D.: Metachromatic form of diffuse cerebral sclerosis VI. A rapid test for the sulfatase A deficiency in metachromatic leucodystrophy (MLD) in urine. Arch. Neurol. (Chicago) 14: 259-269, 1966.
- Kaback, M.M. and Howell, R.R.: Infantile metachromatic leucodystrophy, heterozygot detection in skin fibroblasts and possible application to intrauterine diagnosis. New Engl. J. Med. 282: 1336–1340, 1970.
- Austin, J.H.: Metachromatic form of diffuse sclerosis. First diagnosis during life by urine sediment examination. Neurology 7: 415–426, 1957.
- Herschkowitz, N.N.: Genetic disorders of brain development. In: Biology of Brain Dysfunction. Vol. 2. Ed.: Gaul, E.G. Plenum Press, New York-London, 1973.
- Burkart, Th., Wiesmann, U.N. and Herschkowitz, N.N.: Arylsulfatase A in developing normal and jimpy mice. Neuroscience 2: 175-180, 1977.
- 11. Burkart, Th., Siegrist, H.P., Herschkowitz, N. and Wiesmann, U.N.: Sulfatide metabolizing enzymes in developing normal and jimpy mouse brain. Manuskript in Vorbereitung.
- Burkart, Th., Hofmann, K., Siegrist, H.P., Herschkowitz, N. and Wiesmann, U.N.: Sulfatide metabolism of mouse cerebrum and cerebellum during development. Experientia 33: 789, 1977.
- 13. Kohlschütter, A. and Herschkowitz, N.: Sulfatide synthesis in neurons. A defect in mice with a hereditary myelination disorder. Brain Res. 50: 379–385, 1973.
- Wiesmann, U.N., Meier, C., Spycher, M.A., Schmid, W., Bischoff, A., Gautier, E. and Herschkowitz, N.: Prenatal metachromatic leucodystrophy. Helv. Paediat. Acta 30: 31– 42, 1975.
- Eto, Y., Wiesmann, U.N. and Herschkowitz, N.N.: Sulfogalactosylsphingosine sulfatase.
   J. Biol. Chem. 249: 4955-4960, 1974.
- Porter, M.T., Fluharthy, A.L., Trammell, J. and Kihara, H.: A correlation of intracellular cerebroside sulfatase activity in fibroblasts with latency in metachromatic leucodystrophy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 660-666, 1971.
- Wiesmann, U.N.: Pränatale Diagnostik angeborener Stoffwechselstörungen. Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. 28: 286–293, 1972.
- Wiesmann, U.N.: Model systems for the uptake of macromolecules by cells. In: Enzyme therapy in lysosomal storage diseases. Eds: Tager, J.M., Hooghwinkel, G.J.M. and Daems, W.Th., p 85-94. North Holland Publ. Amsterdam New York 1974.
- Wiesmann, U.N., Rossi, E.E. and Herschkowitz, N.N.: Correction of the defective sulfatide degradation in cultured fibroblasts from patients with metachromatic leucodystrophy. Acta Paediat. Scand. 61: 296–302, 1972.
- Greene, H.L., Hug, G. and Schubert, W.K.: Metachromatic leucodystrophy: Treatment with arylsulfatase A. Arch. Neurol. 20: 147–153, 1969.

Adresse des Autors: PD Dr. U.N. Wiesmann, Universitäts-Kinderklinik, Leiter der Abteilung für metabolische Krankheiten, Freiburgstrasse 23, CH-3010 Bern

