

Morbus Niemann-Pick Typ C (subakute neuroviscerale Lipidose)

Zur Frage der veränderten Sphingomyelinase-Aktivität im Gehirn

K. Harzer und J. Peiffer

Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen, Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

Niemann-Pick Disease Type C (Subacute Neurovisceral Lipidosis)

Problems of Altered Sphingomyelinase Activity in the Brain

Summary. One fetus (20 weeks old) and two postnatal cases with Niemann-Pick disease type C (a group of unclear neurovisceral lipidoses characterized by foam cells in the bone marrow and sometimes supranuclear ophthalmoplegia) were studied with respect to the pH-dependency of brain sphingomyelinase activity. A distinct reduction of activity in the pH 5 range of the fetus was contrary to an almost normal pH profile in the postnatal cases including the sibling of the fetus. The sphingomyelinase anomaly does not seem to reflect the genetic defect, since it is paralleled by a similar anomaly of glucocerebrosidase activity. A pathologic subcellular localization of more than one lipid hydrolasis is discussed.

Key words: Niemann-Pick disease type C – Ophthalmoplegic lipidosis – Sphingomyelinase – pH-dependency – Glucocerebrosidase

Zusammenfassung. Bei einem pränatalen und zwei postnatalen Fällen von M. Niemann-Pick Typ C (Gruppe unklarer neurovisceraler Lipidosen mit Speicherzellen im Knochenmark; teils mit supranucleärer Ophthalmoplegie) werden pränatal starke (Mangel in der Gegend von pH 5), postnatal auch bei dem Geschwister des pränatalen Falls jedoch nur noch geringe Veränderungen des pH-Profiles der Sphingomyelinase-Aktivität aus Gehirn beschrieben. Die Abweichungen scheinen nicht den primären genetischen Defekt zu spiegeln, denn sie werden zum Teil von der Glucocerebrosidase-Aktivität nachgeahmt. Eine mehrere lysosomale Lipidhydrolasen gleichzeitig betreffende Störung der subcellulären Lokalisation wird diskutiert.

Schlüsselwörter: M. Niemann-Pick Typ C – Ophthalmoplegische Lipidose – Sphingomyelinase – pH-Profil – Glucocerebrosidase

Sonderdruckanforderungen an: Dr. K. Harzer, Institut für Hirnforschung der Universität, Belthlestr. 15, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

Einleitung

Unklare neuroviscerale Lipidosen werden der ätiologisch noch nicht voll aufgeklärten und offensichtlich heterogenen Gruppe des M. Niemann-Pick Typ C (NPC) zugeordnet (Fredrickson and Sloan 1972), wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

1. Klinischer Befund einer subakut fortschreitenden Neurodegeneration (Todesalter meist 4–15 Jahre) bei Visceromegalie stark wechselnden Ausmaßes (manchmal fehlend).

2. Hämatologischer Nachweis von Schaumzellen (Lipidspeicherung) im Knochenmark (in den meisten Fällen).

3. Biochemisch-enzymatischer Ausschluß (z. B. aus Blutleukocyten oder gezüchteten Haut-Fibroblasten) von Lipidosen wie M. Gaucher, M. Niemann-Pick Typen A und B mit primärem Defekt der Sphingomyelinase-Aktivität (SMA), M. Tay-Sachs und anderen GM₂-Gangliosidosen, GM₁-Gangliosidosen sowie Metachromatische Leukodystrophie (Glew and Peters 1977).

4. Neuropathologischer Befund einer generalisierten Thesauriromose mit Nervenzellballonierung in Rinde, Stammganglien, Hirnnerven-Kerngebieten und Vorderhörnern, verbunden mit Zeichen der neuroaxonalen Dystrophie. Intravital ist die Verdachtsdiagnose z. B. an der Rectumbiopsie zu stellen (Harzer et al. 1978).

5. Lipidchemischer Nachweis einer mäßigen Vermehrung der Lipide Sphingomyelin („Niemann-Pick-Lipid“), Glucocerebroside („Gaucher-Lipid“), Lysobisphosphatid-Säure und Cholesterin in der fettspeichernden Milz und anderen Organen.

6. Elektronenmikroskopischer Nachweis von Speicherkörpern wie bei klassischen Lipidosen in Autopsie- oder Biopsie-Gewebe; gleichzeitiger Ausschluß der für die Ceroidlipofuscinosen (z. B. M. Batten-Spielmeyer-Vogt) charakteristischen Lipopigment-Anhäufungen mit typischen Strukturen (Lake 1976).

Die Zuordnung dieser unklaren neurovisceralen Lipidosen zur Gruppe des M. Niemann-Pick („Typ C“) ist problematisch. Im Gegensatz zu den Typen A und B des M. Niemann-Pick ist 1. die Sphingomyelin-Speicherung gering und im wesentlichen auf das retikuloendotheliale System beschränkt (Elleder und Jirásek, persönliche Mitteilung 1980) und 2. ein Defekt der SMA nicht eindeutig gesichert. Verschiedenartige Veränderungen der SMA — offenbar keine primären Defekte — wurden jedoch beschrieben (s. Diskussion) und stehen im Vordergrund des Interesses. Diese Arbeit ergänzt die Liste dieser Veränderungen durch Befunde an 3 Fällen mit NPC. Im Hirngewebe ist die Abhängigkeit der SMA vom pH-Wert des Enzymsatzes teilweise verändert, wobei stärkere Normabweichungen im Pränatal-Stadium sich postnatal verringern.

Untersuchungsgut

Fall 1

A.F., 4½ Jahre altes Mädchen. Hinsichtlich des klinischen Verlaufs und der biochemischen wie neuropathologischen Befunde wird auf die Vorpublikation (Harzer et al. 1978) verwiesen.

Fall 2

Fet F., ein Geschwister von A.F., starb durch Schwangerschaftsabbruch in der 20. Woche nach pränataler positiver Diagnose (Harzer et al. 1978). Als Kontrolle wurde ein Fet aus der 22. Schwangerschaftswoche herangezogen, bei dem keine Stoffwechselkrankheiten vorlagen.

Fall 3

E.R., 8jähriger Junge.

Klinik. Keine Nervenkrankheiten in der Familie einschließlich einer 3 Jahre älteren Schwester bekannt. Mit 8 Monaten wurde eine Milzvergrößerung festgestellt. Im Alter von 3 Jahren begannen Gangstörungen, die sich bis zum Alter von 6 Jahren zu einer ausgeprägten Rumpf- und Gangataxie verstärkten. Dysdiadochokinese, Intentionstremor, Reflexsteigerungen mit Pyramidenbahnzeichen, eine leichte beidseitige Ptosis sowie erschwerte Folgebewegungen der Augen besonders beim Blick nach oben (supranucleäre Ophthalmoplegie) waren zu diesem Zeitpunkt bereits zu verzeichnen. Es bestand eine Dysarthrie. Am Augenhintergrund keine Besonderheiten. Bei der Knochenmarkspunktion („Schaumzellen“) und einer Leberpunktion ergaben sich Hinweise auf eine Speicherkrankheit. Die neurologische Symptomatologie und die intellektuelle Retardierung schritten in den letzten zwei Lebensjahren rasch voran (Prof. Hanefeld, Berlin).

Neuropathologie. Makroskopisch unauffälliges Gehirn. Mikroskopisch ausgeprägte Blähung des Nervenzell-Cytoplasmas im Bereich der gesamten Großhirnrinde, an den großen Nervenzellen des Neostriatums, im Pallidum, Thalamus, Hypothalamus, besonders stark ausgeprägt in der Substantia nigra, den Hirnnervenkerengebieten und den Nervenzellen der Vorderhörner des Rückenmarkes. Geringe Lichtung des Purkinjezellbestandes. Deutlichere Körnerzellatrophy, vor allem im Wurmbereich. Neben den Speichervorgängen fand sich vor allem im Bereich der motorischen Hirnnervenkerengebiete, in der unteren Olive, aber auch in den Tractus spinocerebellares, in den noch von Oligodendroglia versorgten proximalen Anteilen der Hirnnerven sowie in den Kleinhirnschenkeln eine neuroaxonale Dystrophie. Neben Axonspheroiden mit zentraler grob granulärer Struktur (Abb. 1a) fanden sich Torpedobildungen und Axonschollen (Abb. 1b). Wiederholt bestehen derartige Auftreibungen offenbar praesynaptisch in unmittelbarer Nähe von Nervenzellen (Abb. 2). Mit Ausnahme leicht entmarkter Kleinhirnmarkzungen zeigte die weiße Substanz keine Entmarkungsvorgänge. Das Speichermaterial war am paraffin-eingebetteten Gewebe nur sehr schwach PAS-positiv, im Gegensatz zu den etwas stärker positiv reagierenden Makrophagen.

Biochemische Methodik

Aus dem wenige Stunden nach Abruptio graviditatis oder maximal 16 h post mortem auf -30°C gebrachten Hirngewebe wurden wässrige Homogenate hergestellt (fetales Hirn 10%ig, sonst 2%ig, jeweils bezogen auf Feuchtgewicht) und die SMA wie folgt gemessen: Radioaktives Sphingomyelin (Cholin- ^{14}C ; NEN, Dreieich/Frankfurt-Main, Nr. NEC 663) wurde mit nicht markiertem Sphingomyelin auf eine spezifische Radioaktivität von 40000 cpm/nMol gebracht. 10 nMol dieses Substrats waren zusammen mit 450 µg Natriumcholat (Sigma, Taufkirchen/München, Nr. P-1254) in 0,2 ml Chloroform/Methanol (2 + 1 Volumenteile) gelöst und wurden im Reaktionsgefäß eingetrocknet. Sodann Wiederauflösen des Rückstands in 150 µl Hirnhomogenat und 100 µl 0,5 M Natriumacetat-Puffer mit den in Abb. 4 angegebenen pH-Werten; Inkubation bei 37°C für 4 h. Nach Ausfällen mit Trichloressigsäure und Zentrifugieren (Harzer et al. 1977) befand sich das enzymatisch freigesetzte Phosphorylcholin im Überstand, seine Radioaktivität wurde im Scintillationszähler gemessen.

Die Bestimmung der Glucocerebrosidase-Aktivität erfolgte nach Harzer (1980).

Die isoelektrische Fokussierung der Sphingomyelinase sowie die Reinigung der verwendeten Enzymfraktionen aus Gehirn entsprachen früher beschriebenen Methoden (Harzer et al. 1977; Müller und Harzer 1980). Die SMA in Abb. 3 wurde bei pH 5,0 und in Gegenwart von rohem Natriumtaurocholat gemessen und gegen die isoelektrischen pH-Werte der einzelnen Fraktionen aufgetragen. Die unten nur kurz erwähnten Veränderungen des Lipidmusters in der Milz wurden

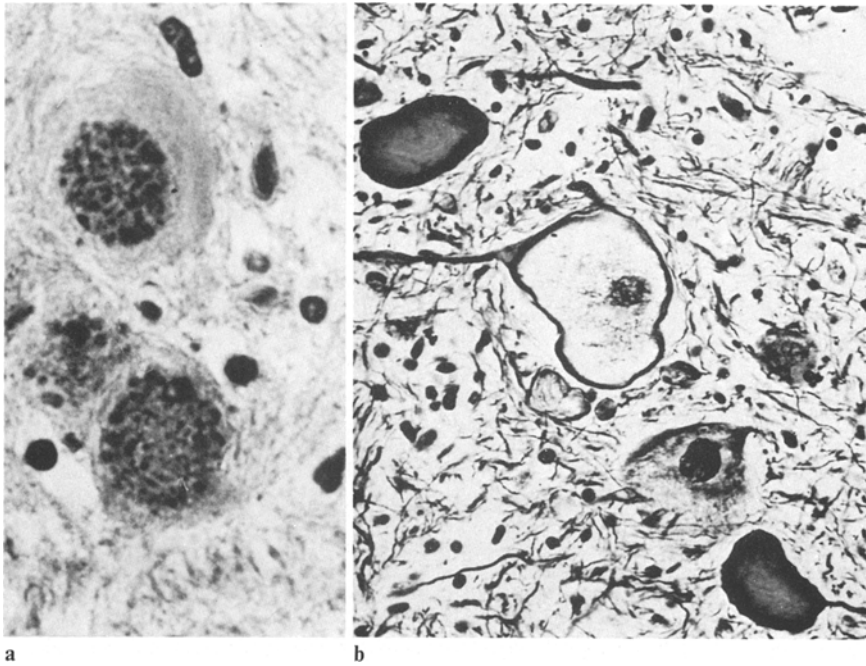


Abb. 1a und b. Neuroaxonale Dystrophien im Tegmentumbereich. **a** Zentral granulär umgewandelte Axonkugeln. Vergrößerung 1:875. HE. **b** Axon-Torpedos und Spheroide. 1:350. Bodian

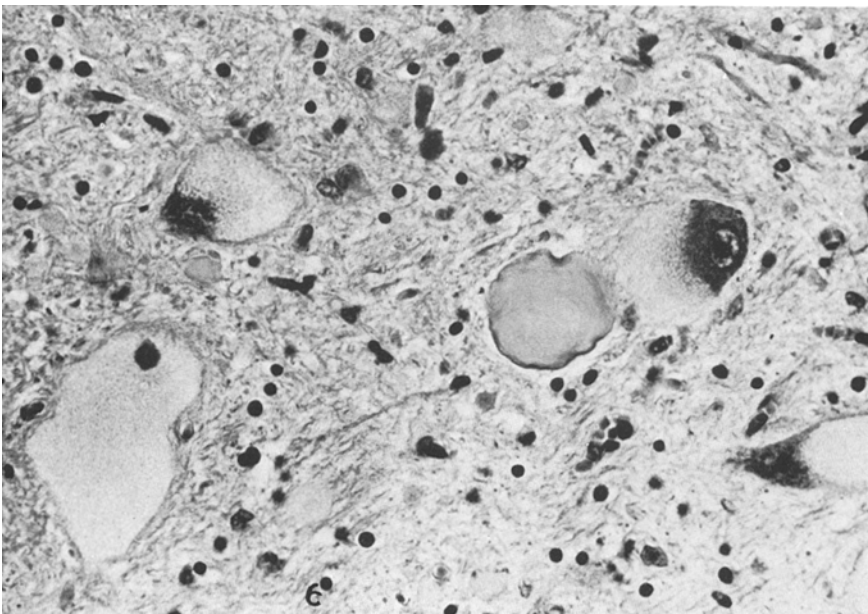


Abb. 2. Lipidspeichernde Nervenzellen mit starker Cytoplasma-Blähung. Präsynaptische Axonschwellung in unmittelbarem Kontakt mit einer Nervenzelle. 1:350. HE

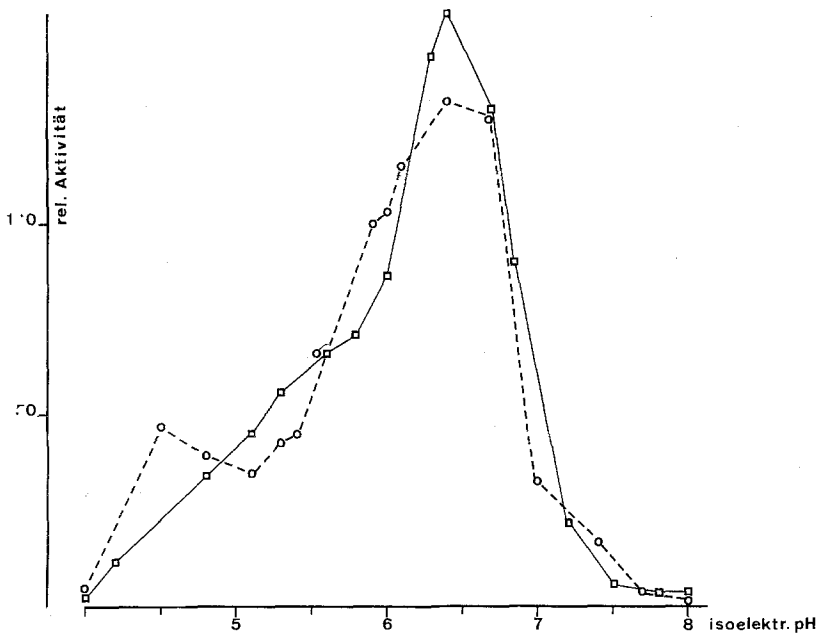


Abb. 3. Profil der Sphingomyelinase-Aktivität nach isoelektrischer Focussierung von aus Hirngewebe teilgereinigtem Enzym eines Kontrollfalles (2 Jahre alt, \square — \square) und eines Falles mit Morbus Niemann-Pick Typ C (A.F., 4½ Jahre alt, \circ ----- \circ); jeweils 1 mg Protein

durch dünnstschichtchromatographisch-densitometrische Lipidanalyse erhalten (Harzer et al. 1968).

Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen

Die teils früher beschriebenen (Harzer et al. 1978), diagnostisch relevanten biochemischen Befunde bei 3 Fällen mit NPC waren im wesentlichen:

a) *Fall 2 (Fet F.)*. Sphingomyelin-Gehalt in der Leber auf das Doppelte erhöht, SMA (pH 5,5) in Leber auf 45% der Norm erniedrigt.

b) *Fälle 1 und 3 (A.F. und E.R.)*. Die Spiegel von Sphingomyelin und Glucocerebrosid waren in der Milz auf das 5- bis 6fache erhöht, auch der Gehalt an Lysobisphosphatid-Säure und freiem Cholesterin war deutlich gesteigert. Die Werte der SMA in Leber- (Methode wie für Hirn) und Hirngewebe lagen im Normbereich.

Die Abb. 3 zeigt das Profil der aus Hirngewebe vorgereinigten SMA, wie es sich nach isoelektrischer Focussierung (Auftrennung im pH-Gradienten) im Fall A.F. darstellte. Es weicht kaum vom Profil des Kontrollfalls ab.

Das Ziel dieser Studie war vor allem, Abweichungen der pH-Abhängigkeit der SMA aus Gehirngewebe bei NPC von den Befunden bei Kontrollfällen zu zeigen (Abb. 4). Bei dem pränatalen Fall, Fet F., traten die Veränderungen besonders hervor. In der Gegend um pH 5 war im Profil des pathologischen Feten eine

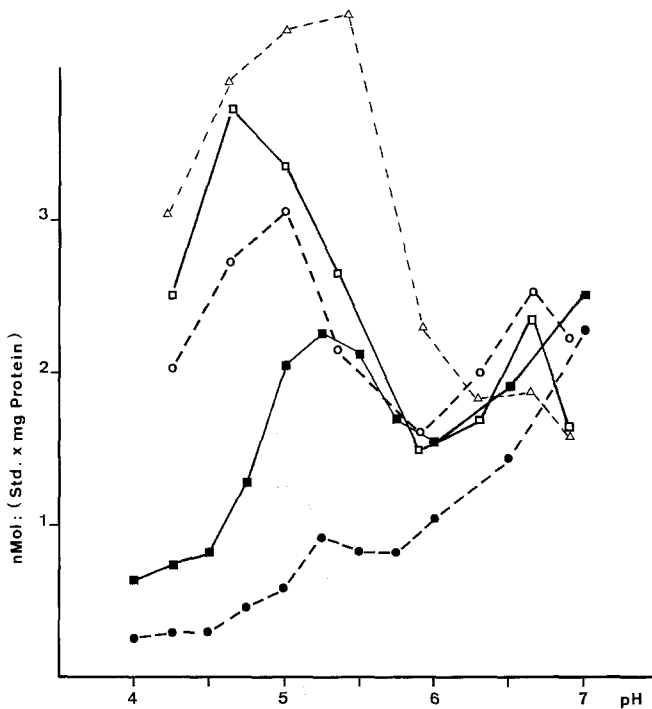


Abb. 4. Profile der pH-Abhängigkeit der Sphingomyelinase-Aktivität in Hirnhomogenaten im prä- und postnatalen Stadium. ■—■, Kontrollfet (22 Wochen alt); ●—●, Fet F. (20 Wochen alt) mit Morbus Niemann-Pick, Typ C. □—□, Kontrollfall (9 Jahre alt); △—△, Fall A.F. (4½ Jahre alt, Schwester vom Fet F.) und ○—○, Fall E.K. (8 Jahre alt), beide mit Morbus Niemann-Pick Typ C

signifikant reduzierte saure SMA, in der Gegend um pH 7 jedoch eine normale Aktivität der neutralen SMA erkennbar. Die postnatalen Fälle A.F. (Schwester von Fet F.) und E.R. zeigten solche Veränderungen des SMA-Profiles nicht bzw. noch andeutungsweise. Man kann also von einer Rückläufigkeit dieser biochemischen Abweichungen bei NPC während der Ontogenese sprechen.

Ähnliche Verminderungen wie bei SMA ließen sich auch bei der Aktivität eines anderen Enzyms, der Glucocerebrosidase („Gaucher-Enzym“), für den NPC im pränatalen Stadium nachweisen. Abbildung 5 zeigt, daß beim Feten F. die Glucocerebrosidase in ihrer Aktivität wesentlich niedriger lag als beim Kontrollfeten.

Diskussion

Besonderheiten der Sphingomyelinase (SMA) wurden bei NPC von mehreren Autoren erwähnt (Callahan et al. 1975; Besley 1977; Harzer et al. 1978). Christomanou (1980) beschrieb den Defekt eines Aktivators der SMA und berücksichtigt damit neben dem Enzym und seinem Substrat noch Kofaktoren des enzymatischen Lipidabbaus bei NPC. Eine Bestätigung dieses Konzepts wäre wichtig.

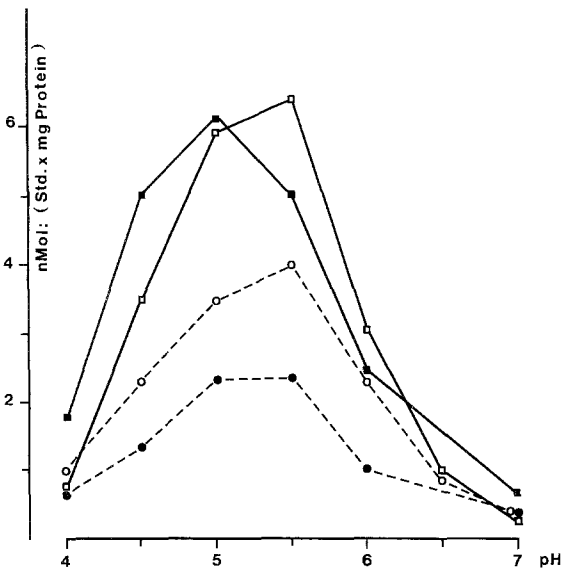


Abb. 5. Profile der pH-Abhängigkeit der Glucocerebrosidase-Aktivität in Hirnhomogenaten im prä- und postnatalen Stadium. Spezifizierung der Kurven wie in Abb. 4. Das pathologische Profil des pränatalen Stadiums von Morbus Niemann-Pick Typ C zeigt einen Aktivitätsmangel über den ganzen Bereich, der in der Gegend von pH 5 besonders deutlich ist. Als Substrat diente 0,05 nM Tritium-Glucocerebrosid; Natriumcholat- und Puffer-Konzentrationen wie bei Sphingomyelinase

Wahrscheinlich entspricht keine dieser Anomalien direkt einem genetischen Defekt. In unserer Studie erweckt der Mangel an SMA bei dem Feten F. (Abb. 4, Gegend von pH 5) am ehesten den Eindruck eines echten Defekts. Da dieses Defizit an Enzymaktivität während der Ontogenese offenbar rückläufig ist (s. Ergebnisse), zumindest soweit es in vitro studierbar ist, dürfte auch dieser Eindruck täuschen.

Bei NPC ist im Gehirn biochemisch keine Speicherung von Sphingomyelin, also dem „Niemann-Pick-Lipid“, jedoch morphologisch eine starke lysosomale Speicherung nachweisbar. Die Veränderungen der SMA scheinen also ein begleitender Effekt bei einer noch unbekannten lysosomalen Störung zu sein. Neben der Sphingomyelinase zeigt die Glucocerebrosidase bei NPC ähnliche Veränderungen (Abb. 5), was ebenfalls für die nicht primäre Natur der SMA-Befunde spricht.

Folgende Erklärungsmöglichkeiten der im pränatalen Stadium des NPC deutlichen Erniedrigung der SMA und Glucocerebrosidase-Aktivität sind zu diskutieren:

1. Die Erniedrigung ist Folge der lysosomalen Lipidspeicherung, welche die Lysosomen so verändert hat, daß in vitro der Zugang zu den Enzymen erschwert ist. In diesem Fall müßte aber die Erniedrigung der Aktivität postnatal und nicht pränatal (Abb. 4, 5) am stärksten sein, weil pränatal erst sehr wenig lysosomale Speicherung vorhanden ist.

2. Die Erniedrigung ist Folge des genetischen Defekts eines Aktivators bzw. Kofaktors der Sphingomyelinase (vgl. oben). In diesem Fall würde sich die Erniedrigung der SMA postnatal kaum weitgehend normalisieren können (Abb. 4;

auch die Erniedrigung der Glucocerebrosidase-Aktivität ist postnatal rückläufig, Abb. 5), da der Defekt ja fortbestünde.

3. Bei der Erkrankung gelangen die betroffenen Enzyme (Sphingomyelinase, Glucocerebrosidase und evtl. weitere) nicht oder unvollständig an den Ort ihrer Bestimmung, das Lysosom. Auf dem Weg dorthin bleiben sie liegen und ihre weitere Biosynthese ist zunächst gestoppt (niedrige Enzymspiegel im pränatalen Stadium, Abb. 4, 5). Nimmt der Enzymbedarf durch wachsende katabolische Aufgaben (postnatales Stadium) zu, so wird trotz gestörten Enzymtransports mehr Enzym gebildet (fast normale, postnatale Enzymwerte in Abb. 4, 5), aber der Mangel am Zielort Lysosom besteht weiter, es kommt zur lysosomalen Substratspeicherung. Die bei NPC beobachtete, deutlich gestörte Extrahierbarkeit der Sphingomyelinase (Harzer et al. 1978) könnte ein Zeichen dafür sein, daß hier das Enzym nicht aus dem im allgemeinen leicht extrahierbaren Lysosom, sondern aus anderen subcellulären Strukturen extrahiert werden muß, könnte also auf falsche Lokalisation hindeuten. Studien zur subcellulären Lokalisation der Sphingomyelinase bei NPC sind geplant.

Insgesamt bleibt die biochemische Ursache bei NPC vorläufig unklar und daher die Beschreibung sämtlicher feststellbarer biochemischer Veränderungen, seien sie auch kausal betrachtet sekundär, aktuell.

Danksagung. Für die Vermittlung des Falls E.R. sei den Kollegen Bierich und Hanefeld (Universitätskliniken Tübingen und Berlin) gedankt. Die technische Assistenz von Frau I. Schuster war sehr sorgfältig.

Literatur

- Besley GTN (1977) Sphingomyelinase defect in Niemann-Pick disease, type C, fibroblasts. *FEBS Lett* 80:71-74
- Callahan JW, Khalil M, Philippart M (1975) Sphingomyelinases in human tissues. II. Absence of a specific enzyme from liver and brain of Niemann-Pick disease, type C. *Pediat Res* 9:908-913
- Christomanou H (1980) Niemann-Pick disease, type C: Evidence for the deficiency of an activating factor stimulating sphingomyelin and glucocerebroside degradation. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 361:1489-1502
- Fredrickson DS, Sloan HR (1972) Sphingomyelin lipidoses: Niemann-Pick disease. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS (eds) *The metabolic basis of inherited disease*, 3rd edn. McGraw-Hill, New York, pp 783-807
- Glew RH, Peters SP (eds) (1977) *Practical enzymology of the sphingolipidoses. Laboratory and research methods in biology and medicine*, vol 1. AR Liss, Inc, New York
- Harzer K, Wässle W, Sandhoff K, Jatzkewitz H (1968) Densitometrische Mikrobestimmung von Lipiden nach Dünnschichtchromatographie des Gesamtlipidextrakts. *Z Anal Chem* 243:527-536
- Harzer K, Anzil AP, Schuster I (1977) Resolution of tissue sphingomyelinase isoelectric profile in multiple components is extraction-dependent: evidence for a component defect in Niemann-Pick disease type C is spurious. *J Neurochem* 29:1155-1157
- Harzer K, Schlote W, Peiffer J, Benz HU, Anzil AP (1978) Neurovisceral lipidosis compatible with Niemann-Pick disease type C: Morphological and biochemical studies of a late infantile case and enzyme and lipid assays in a prenatal case of the same family. *Acta Neuropathol (Berl)* 43:97-104
- Harzer K (1980) Enzymic diagnosis in 27 cases with Gaucher's disease. *Clin Chim Acta* 106:9-15

- Lake BD (1976) The differential diagnosis of the various forms of Batten's disease by rectal biopsy. In: Bergsma D, Bron AG, Cotlier E (eds) The eye and inborn errors of metabolism. Natl Foundation, March of Dimes. AR Liss, Inc, New York
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275
- Müller H, Harzer K (1980) Partial purification of acid sphingomyelinase from normal and pathological (M. Niemann-Pick type C) human brain. J Neurochem 34:446-448

Eingegangen am 6. November 1980