

Ultrastruktur des intracellulären Speichermaterials bei einem Autopsiefall von adulter metachromatischer Leukodystrophie (MLD)

K. Blinzingier¹ und K. Jellinger²

¹ Max-Planck-Institut für Psychiatrie, D-8000 München 40, Bundesrepublik Deutschland

² Ludwig-Boltzmann-Institut für klinische Neurobiologie, A-1130 Wien, Österreich

Ultrastructure of Intracellular Storage Materials in an Autopsy Case of Adult-Onset Metachromatic Leucodystrophy (MLD)

Summary. Formalin-fixed samples from the demyelinated frontal white matter of an autopsy case of adult-onset MLD were studied by electron microscopy. The intracellular storage materials exhibited the following types of structural patterns: (I) ordinary myelin figures; (II) pleated myelin figures; (III) narrow stacks of lamellar discs which were most likely components of formerly compact ‘prismatic’ inclusions; (IV) paired lamellae, either arranged in loose parallel arrays or scattered about in random directions; (V) piles of parallel lamellae with alternating electron-dense and electron-lucent interspaces; and (VI) collections of structures resembling fragments of so-called pentalamellar membranes. Types I to IV have already been described in early-onset as well as in late-onset forms of MLD, but types V and VI have not. Postmortem autolysis had possibly altered the structural organization of some cytoplasmic deposits and given rise to the formation of those lamellar patterns which were hitherto not known to occur in MLD.

Key words: Metachromatic leucodystrophy, adult – Sulfatidosis – Intracellular storage – Lamellar inclusions – Electron microscopy.

Zusammenfassung. Primär formalinfixierte Gewebsproben aus der entmarkten weißen Substanz des Stirnhirns eines Autopsiefalles von adulter MLD wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Das intracelluläre Speichermaterial ließ folgende Strukturmuster-Typen erkennen: (I) Gewöhnliche Myelinfiguren; (II) gefältelte Myelinfiguren; (III) schmale Stapel von scheibchenförmigen Lamellen, die sehr wahrscheinlich Bestandteile von ehemals kompakten „prismatischen“ Einschlüssen waren; (IV) gepaarte Lamellen, entweder in lockerer paralleler Anordnung oder in regelloser Verteilung und Ausrichtung; (V) Schichten von parallel verlaufenden Lamellen mit alternierend dichten

Sonderdruckanforderungen an: Dr. K. Blinzingier (Adresse siehe oben)

und kontrastarmen Zwischenräumen; und (VI) Häufchen von Gebilden, die Bruchstücken von sog. pentalaminären Membranen glichen. Die Typen I bis IV sind sowohl bei Früh- als auch bei Spätformen der MLD schon beschrieben worden, die Typen V und VI dagegen noch nicht. Möglicherweise hatten postmortal-autolytische Vorgänge eine Änderung der strukturellen Organisation von einigen cytoplasmatischen Ablagerungen und die Ausbildung dieser bisher bei der MLD unbekannten Lamellenmuster bewirkt.

Schlüsselwörter: Metachromatische Leukodystrophie, adulte – Sulfatidose – Intracelluläre Speicherung – Lamelläre Einschlüsse – Elektronenmikroskopie.

Einleitung

Die wenigen bisher vorliegenden Mitteilungen über elektronenmikroskopische Befunde bei der Erwachsenenform der MLD, d.h. bei MLD-Fällen mit Krankheitsbeginn jenseits des 20. Lebensjahres, sind z. T. ziemlich dürftig und in mancher Hinsicht auch recht widersprüchlich. Es handelt sich um Beobachtungen, die an Autopsiematerial aus dem Gehirn (Kraus-Ruppert und Sommer, 1972; Guseo et al., 1975; Joosten et al., 1975) und dem Plexus lumbosacralis (Joosten et al., 1975) sowie an zwei Suralisbiopsien (Czmok et al., 1974; Goebel et al., 1977) und an einer Nierenbiopsie (Joosten et al., 1975) bei insgesamt nur fünf Fällen gemacht worden sind. Ausklammern möchten wir hier jene ultrastrukturellen Studien, welche Brion et al. (1970), Quigley und Green (1976), Thomas et al. (1977) sowie Percy et al. (1977) bei angeblich adulter bzw. „late-onset“ MLD durchgeführt haben. Bei den Fällen dieser Autoren wurde nämlich der Prozeß bereits in der zweiten Lebensdekade klinisch manifest, so daß man sie auch der spätyounglichen Varianten der Sulfatidose zuordnen könnte. Man muß natürlich zugeben, daß solche nur auf dem jeweiligen Erkrankungsalter basierende Unterteilungen etwas willkürlich sind. Dies zeigen u. a. die Ergebnisse von licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen an einer Suralisbiopsie bei einem neurologisch und psychisch noch unauffälligen, 13jährigen Homozygoten aus einer Familie mit adulter MLD (Argyarakis et al., 1977).

Gegenstand dieser Arbeit sind ultrastrukturelle Befunde an autoptisch gewonnenem Hirngewebe eines MLD-Falles, bei dem sich die ersten Krankheitsercheinungen (Bild einer schizophrenen Psychose) etwa im 40. Lebensjahr eingestellt hatten und der im 50. Lebensjahr starb. Über den klinischen Verlauf sowie über die Ergebnisse histopathologischer und lipidchemischer Untersuchungen ist bereits in einer vorausgegangenen Publikation ausführlich berichtet worden (Kothbauer et al., 1977).

Material und Methode

Aus den von dem Demyelinisierungsprozeß am stärksten betroffenen frontalen Marklagern des mehrere Monate in gewöhnlichem Formalin aufbewahrten Gehirns wurden kleine Gewebsstücke entnommen, mit Osmiumtetroxyd nachfixiert, über die aufsteigende Äthanolreihe entwässert und in Epon 812 eingebettet. Von allen Blöcken wurden großflächige Semidünn-

schnitte (0,5—1,0 µm) angefertigt und diese dann im Phasenkontrastmikroskop nach speichern den Zellen abgesucht. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der ultradünnen Schnitte von ausgewählten Objektstellen erfolgte nach Doppelkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat an einem Zeiss EM 10A bei einer Strahlspannung von 80 kV und bei Vergrößerungsstufen bis zu 130000×.

Ergebnisse

Wie es wegen der für eine elektronenmikroskopische Studie inadäquaten Bedingungen bei der Entnahme und Vorbehandlung des cerebralen Gewebes nicht anders zu erwarten war, wiesen in den untersuchten Ultradünnenschnitten nahezu sämtliche Strukturkomponenten erhebliche autolytische und/oder artifizielle Veränderungen auf. Myelinisierte Axone waren nur noch spärlich zu beobachten. Relativ häufig trafen wir Zellen an, die in ihrem Plasmaleib Ablagerungen eines abnorm erscheinenden Materials enthielten. Bei manchen dieser speichernden Elemente legten gewisse Kriterien, wie z. B. die innige räumliche Beziehung zu Markscheiden, die Vermutung nahe, daß es sich um Oligodendrocyten handelte. Welcher Zellart die anderen angehörten, konnte nicht ermittelt werden.

Das intracelluläre Speichermaterial selbst stellte sich in Form mehr oder minder umfangreicher Konglomerate von dicht erscheinenden, lamellären Strukturen mit einheitlicher bis stark variierender Anordnung dar. Reste einer begrenzenden Membran waren um solche Deposite nur noch selten zu erkennen. Im einzelnen ließen sich in den Ablagerungen die nachfolgend als Typen angeführten strukturellen Organisationsmuster unterscheiden:

Typ I. Gewöhnliche Myelinfiguren, d.h. konzentrische Lamellenschichten sowie Stapel von parallel verlaufenden Lamellen in mehr geradliniger Ausrichtung mit periodischen Abständen von ca. 5 nm.

Typ II. Gefältelte Myelinfiguren (Abb. 1), wie sie als „pleated lamellar systems“ in einer Suralisbiopsie eines juvenilen MLD-Falles und im epiduralen Gewebe von Kaninchen nach örtlicher Sulfatidapplikation erstmals eingehender geschildert worden sind (Anzil et al., 1973); die Periodizität betrug bei ihnen ebenfalls ca. 5 nm.

Typ III. Schmale Säulchen, die im Längsschnitt transversal angeordnete Lamellen mit einem Periodenabstand von ca. 6 nm aufwiesen und sich im Querschnitt als rundliche oder ovale, homogen erscheinende Profile darstellten (Abb. 2). Im Gegensatz zu den sonst gleich aussehenden Untereinheiten der in Hirn-, Nerven- und Nierenbiopsien von MLD-Patienten sowie in kultivierten und mit Sulfatiden gefütterten MLD-Hautfibroblasten beschriebenen „prismatischen“ Speicherorganellen (Grégoire et al., 1966; Toga et al., 1972; Rutsaert et al., 1973) waren die Säulchen nicht durch eine amorphe Substanz mosaikartig zusammengekittet, sondern bildeten in der Regel lockere Gruppen.

Typ IV. Gepaarte, etwa 3,5 nm voneinander entfernte Lamellen, an deren Außenflächen häufig ein schmaler Saum eines dicht und homogen erscheinenden Materials haftete (cf. Abb. 4 und 5 bei Guseo et al., 1975; Abb. 3 bei Anzil und Blinzinger, 1976). Diese Lamellenpaare lagen teils in Form stapelartiger Aggregate mit ca. 25 nm breiten Zwischenschichten (Abb. 3), teils in völliger regelloser Verteilung und Orientierung vor. Nicht selten bildeten sie auch in sich geschlossene Kreise.

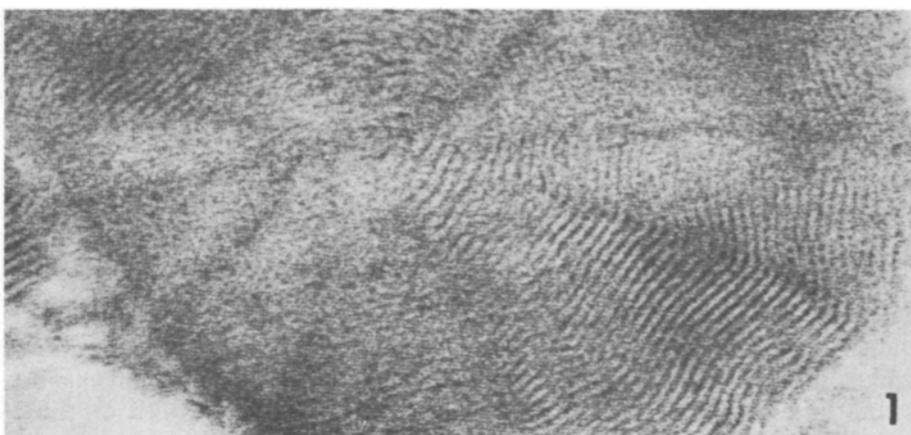


Abb. 1. Detailaufnahme von einer gefältelten Myelinfigur. Im Bereich der radiär verlaufenden Falten verlieren die parallel angeordneten Lamellen an Deutlichkeit und Kontrast. Vergr. $\times 306000$

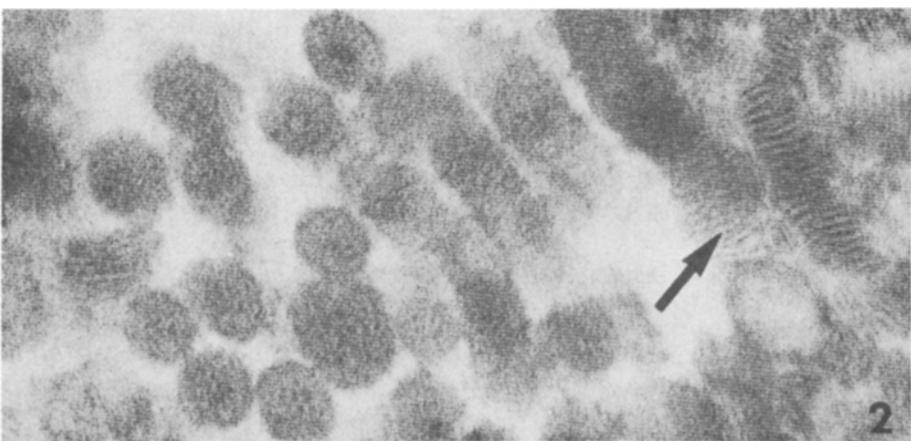


Abb. 2. Ausschnitt aus einer Gruppe von schmalen Säulchen mit transversaler Lamellierung (Pfeil), die im Querschnitt als homogen erscheinende, locker verteilte Scheibchen imponieren. Vergr. $\times 195000$

Typ V. Schichten von gestreckt oder bogenförmig verlaufenden Lamellen mit Zwischenräumen, von denen in regelmäßiger Abfolge jeder zweite eine dichte, amorphe Füllsubstanz enthielt (Abb. 4). Im Bereich der kontrastreichen Fugen war die Distanz zwischen den Lamellen gewöhnlich etwas geringer als im Bereich der kontrastarmen; im Mittel betrug sie etwa 4,5 nm.

Typ VI. Kleine Häufchen leicht geschlängelter oder stärker gekrümmter Gebilde von ca. 12,5 nm Dicke und variabler Länge, die eine Substruktur nach Art der sog. pentalaminären Membranen erkennen ließen (Abb. 5).

Die Organisationsmuster vom Typ IV und V kamen am häufigsten, die vom Typ III und VI am seltensten zur Beobachtung. Einschlüsse, die man schlechterdings als „tuffsteinartige“ Körper (Bischoff und Ulrich, 1967; Czmok et al., 1974; Meier und Bischoff, 1976; Argyrakis et

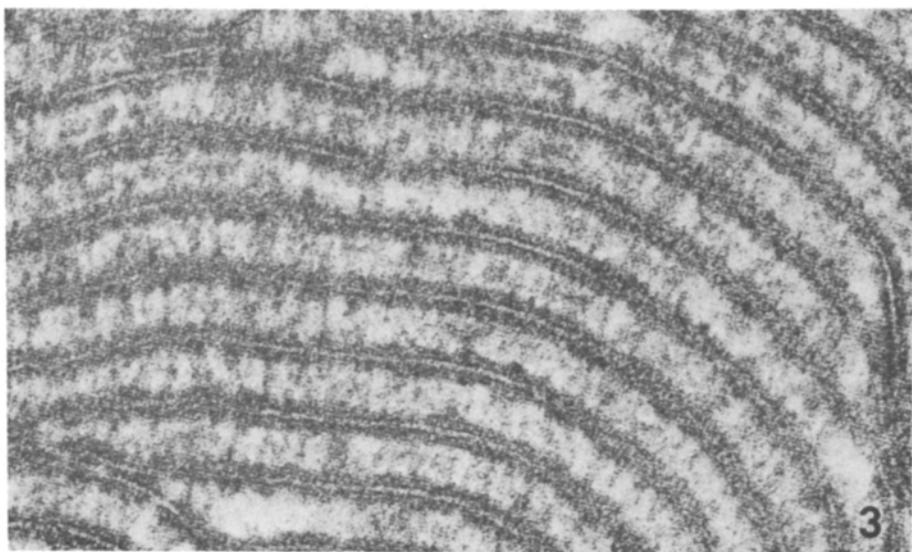


Abb. 3. Stapelartiges Aggregat von gepaarten Lamellen. Ihren Außenflächen ist ein dicht und homogen erscheinendes Material saumförmig angelagert. Vergr. $\times 243000$

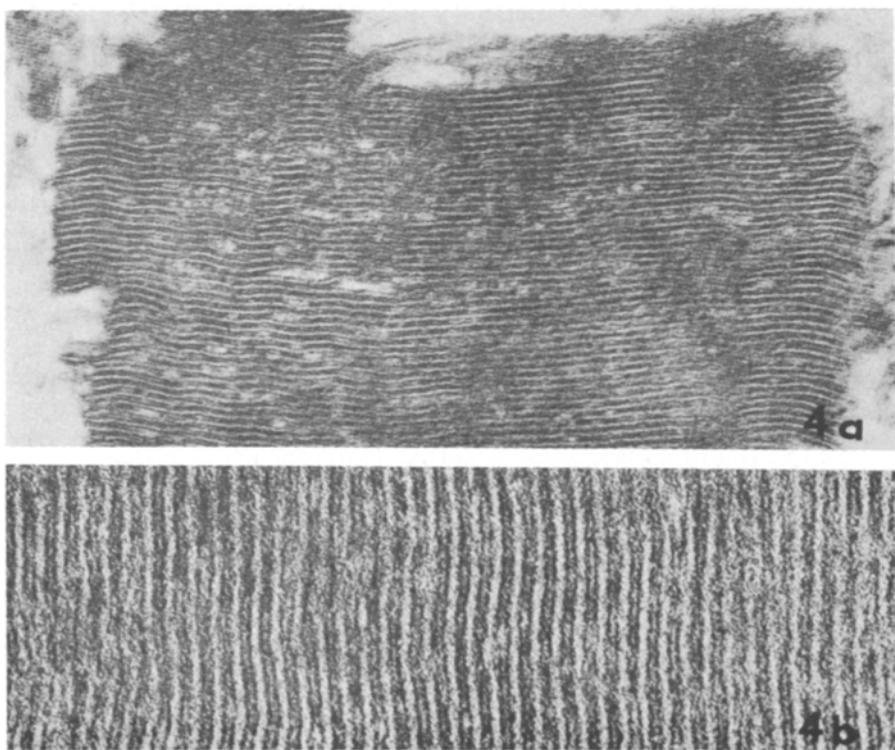


Abb. 4. (a) Stapel von gestreckt verlaufenden Lamellen mit alternierend dichten und kontrastarmen Zwischenräumen. Vergr. $\times 123000$. (b) Bei höherer Auflösung ist die regelmäßig wechselnde Abfolge von dunklen und hellen Fugen zwischen den Lamellen noch augenfälliger. Vergr. $\times 325000$

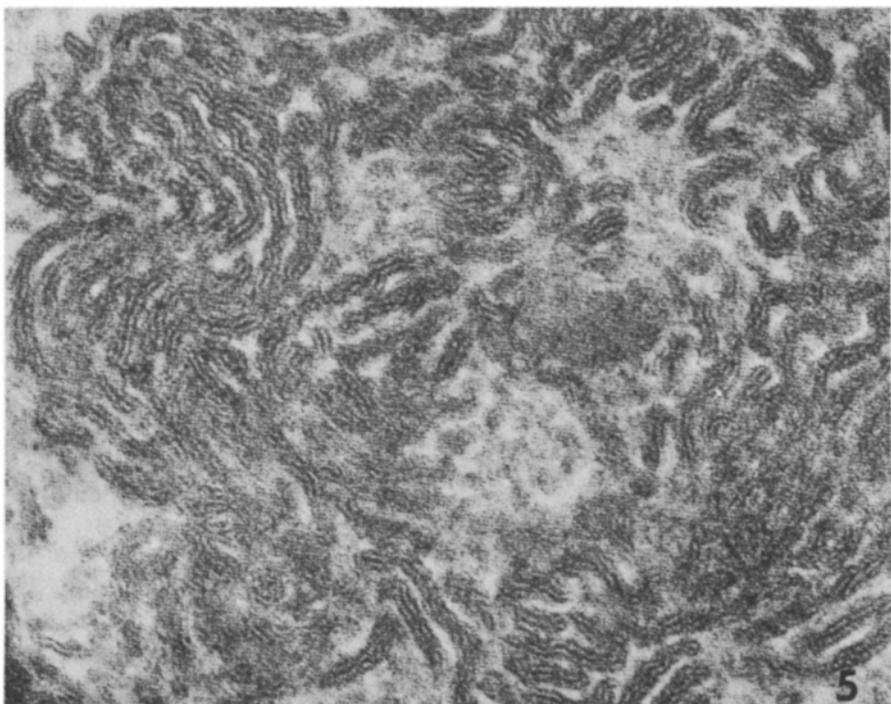


Abb. 5. Ansammlung von würmchenartigen Gebilden mit pentalaminärer Substruktur. Vergr. $\times 164000$

al., 1977) hätte apostrophieren können, fanden wir überhaupt nicht vor. Auch sog. „Zebra-Körper“, wie sie von Joosten et al. (1975), Thomas et al. (1977), Goebel et al. (1977) sowie Argyrakis et al. (1977) bei Fällen von spätjuveniler und adulter MLD beschrieben worden sind, bekamen wir nicht zu Gesicht.

Diskussion

Nachdem unsere Untersuchungen an Autopsiematerial durchgeführt worden sind, stellt sich zunächst die Frage, ob autolytische Vorgänge an der Ausprägung der diversen, in den intracellulären Ablagerungen beobachteten Strukturmuster beteiligt gewesen sein können. Sie läßt sich nicht einfach mit der Feststellung abtun, daß die Sulfatide als die prozeßspezifischen Speichersubstanzen bei der MLD wegen der mangelhaften Aktivität der Cerebrosidsulfatase bzw. Arylsulfatase A (Mehl und Jatzkewitz, 1965) im Rahmen einer postmortalen Autolyse wohl ebensowenig abgebaut werden wie intra vitam. Biochemische Studien an metachromatischen Granula, die aus dem Hirngewebe eines Autopsiefalles von juveniler MLD isoliert worden waren, ergaben einen auf das Trockengewicht bezogenen Lipidgehalt von nur knapp 50% und einen Sulfatidanteil der Lipide von weniger als 40% (Suzuki et al., 1967). Es liegt nahe anzunehmen, daß alle anderen Stoffe, die außer den Sulfatiden noch in den lysosomalen Speicherorganellen bei der MLD enthalten sind, einer autolytischen Zersetzung unterliegen können. Bis zu welchem Ausmaß dabei in den cytoplasmatischen Einschlüssen Strukturumwandlungen erfolgen, läßt sich schwer abschätzen. Es ist

aber durchaus vorstellbar, daß im Gefolge der autolytischen Dekomposition von besonders innig mit den Sulfatiden vergesellschafteten Substanzen auch die ursprüngliche Anordnung der ersteren eine Änderung erfährt. Der Eindruck von Stabilität, den die verschiedenen Lamellenmuster erwecken, könnte trügerisch sein. Der polare Charakter der Sulfatide läßt in einem wässrigen Milieu vermutlich nur das lamelläre Organisationsprinzip zu; es müßte auch bei einer postmortalen Umstrukturierung weitgehend gewahrt bleiben. Die Variationsmöglichkeiten wären dabei allerdings immer noch recht vielfältig.

Bei Ablagerungsformen, wie sie auch in Biopsien von MLD-Patienten schon zur Beobachtung gekommen sind, kann man die Wahrscheinlichkeit einer vorausgegangenen, autolytisch bedingten Strukturumwandlung noch als relativ gering veranschlagen. Dies gilt z. B. für die gewöhnlichen und gefältelten Myelinfiguren (Typ I und II) sowie für die gepaarten Lamellen (Typ IV). Bei den schmalen, transversal lamellierten Säulchen (Typ III) halten wir es für ziemlich sicher, daß sie ursprünglich Bestandteile von kompakten „prismatischen“ Körpern waren, die sich aufgrund der autolytischen Zersetzung ihrer Hüllmembran und ihrer mucopolysaccharidhaltigen Matrix (cf. Holländer, 1965; Résibois-Grégoire, 1967) stark aufgelockert hatten. Auffallend war ihr verhältnismäßig seltes Vorkommen. Den Befunden von Guseo et al. (1975) sowie Goebel et al. (1977) zufolge muß man allerdings annehmen, daß die „prismatischen“ Speicherorganellen bei der adulten Form der MLD kaum wesentlich weniger häufig auftreten als bei den Sulfatidosevarianten mit früherem Krankheitsbeginn. Die von uns sehr oft angetroffenen Lamellenschichten mit alternierend dichten und kontrastarmen Zwischenräumen (Typ V) sind u. W. bei der MLD überhaupt noch nicht beschrieben worden. Somit ist wohl der Verdacht nicht ganz abwegig, daß dieses Strukturmuster durch postmortale Transformation eines anderen Zustandes gekommen ist. Denkbar wäre es hier z. B., daß Stapel gepaarter Lamellen zusammensintern, wenn die Proteine des Grundcytoplasmas, in das sie gewöhnlich ohne membranöse Demarkierung eingebettet sind (cf. Anzil und Blinzing, 1976), der autolytischen Dekomposition unterliegen. Was nun die Konglomerate pentalaminär strukturierter Gebilde anbelangt (Typ VI), so haben wir im einschlägigen Schrifttum ebenfalls keine vergleichbaren Beobachtungen ausfindig machen können. Auch bei ihnen läßt sich eine postmortale Entstehung zumindest nicht ausschließen.

Abgesehen von dem fehlenden Nachweis sog. „tuffsteinartiger“ Körper zeigen die elektronenmikroskopischen Befunde bei unserem durch einen besonders späten Krankheitsbeginn ausgezeichneten MLD-Fall doch eine gewisse Übereinstimmung mit solchen, welche bei Frühformen der Sulfatidose wiederholt erhoben worden sind. Wir möchten deshalb der vor allem von Thomas et al. (1977) vertretenen Auffassung beipflichten, daß im ultrastrukturellen Erscheinungsbild des intracellulären Speichermaterials zwischen den verschiedenen Altersmanifestationen der MLD keine grundsätzlichen Unterschiede bestehen.

Literatur

- Argyракис, А., Pilz, H., Goebel, H. H., Müller, D.: Ultrastructural findings of peripheral nerve in a preclinical case of adult metachromatic leukodystrophy. J. Neuropath. exp. Neurol. **36**, 693—711 (1977)

- Anzil, A. P., Blinzingen, K.: Lysosomen und Leukodystrophien. Verh. dtsch. Ges. Path. **60**, 120—133 (1976)
- Anzil, A. P., Blinzingen, K., Martinius, J.: Ultrastructure of storage materials in metachromatic leucodystrophy peripheral neuropathy and in rabbit tissues after sulfatide application with special reference to pleated lamellar systems. *J. Microscopie (Paris)* **18**, 173—186 (1973)
- Bischoff, A., Ulrich, J.: Amaurotische Idiotie in Verbindung mit metachromatischer Leukodystrophie: Übergangsform oder Kombination? Elektronenmikroskopische und histochemische Befunde. *Acta neuropath. (Berl.)* **8**, 292—308 (1967)
- Brion, S., Mikol, J., Gravéleau, J.: Leucodystrophie métachromatique de l'adulte jeune. Étude clinique, biologique et ultrastructurale. *Rev. Neurol. (Paris)* **122**, 161—176 (1970)
- Czmok, E., Regli, F., Bischoff, A., Harzer, K., Benz, H. U.: Metachromatische Leukodystrophie: Klinik und intravitale Diagnostik einer familiären adulten Form der metachromatischen Leukodystrophie (MLD). *J. Neurol.* **207**, 189—204 (1974)
- Goebel, H. H., Pilz, H., Argyракis, A.: Adult metachromatic leukodystrophy. II. Ultrastructural findings in peripheral nerve and skeletal muscle. *Europ. Neurol.* **15**, 308—317 (1977)
- Grégoire, A., Périer, O., Dustin, P. jr.: Metachromatic leukodystrophy, an electron microscopy study. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **25**, 617—636 (1966)
- Guseo, A., Deák, G., Szirmai, I.: An adult case of metachromatic leukodystrophy. Light, polarization and electron microscopic study. *Acta neuropath. (Berl.)* **32**, 333—339 (1975)
- Holländer, H.: Der histochemische Nachweis von Mucopolysacchariden in Sulfatidgranula bei intrazellulärer Speicherung von Cerebrosidschwefelsäureestern. *J. Neurochem.* **12**, 335—337 (1965)
- Joosten, E., Hoes, M., Gabreëls-Festen, A., Hommes, O., Schuurmans Stekhoven, H., Sloof, J. L.: Electron microscopic investigation of inclusion material in a case of adult metachromatic leukodystrophy; observations on kidney biopsy, peripheral nerve and cerebral white matter. *Acta neuropath. (Berl.)* **33**, 165—171 (1975)
- Kothbauer, P., Jellinger, K., Gross, H., Molzer, B., Bernheimer, H.: Adulte metachromatische Leukodystrophie unter dem Bild einer schizophrenen Psychose. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **224**, 379—387 (1977)
- Kraus-Ruppert, R., Sommer, H.: The late form of metachromatic leukodystrophy. II. Ultrastructural correlations with morphological and neurochemical findings. *J. neurol. Sci.* **17**, 383—387 (1972)
- Mehl, E., Jatzkewitz, H.: Evidence for the genetic block in metachromatic leucodystrophy (ML). *Biochem. biophys. Res. Commun.* **19**, 407—411 (1965)
- Meier, C., Bischoff, A.: Sequence of morphological alterations in the nervous system of metachromatic leucodystrophy. Light- and electronmicroscopic observations in the central and peripheral nervous system in a prenatally diagnosed foetus of 22-weeks. *Acta neuropath. (Berl.)* **36**, 369—379 (1976)
- Percy, A. K., Kaback, M. M., Herndon, R. M.: Metachromatic leukodystrophy: Comparison of early- and late-onset forms. *Neurology (Minneap.)* **27**, 933—941 (1977)
- Quigley, H. A., Green, W. R.: Clinical and ultrastructural ocular histopathologic studies of adult-onset metachromatic leukodystrophy. *Amer. J. Ophthalm.* **82**, 472—479 (1976)
- Résibois-Grégoire, A.: Electron microscopic studies of metachromatic leucodystrophy. II. Compound nature of the inclusions. *Acta neuropath. (Berl.)* **9**, 244—253 (1967)
- Rutsaert, J., Menu, R., Résibois, A.: Ultrastructure of sulfatide storage in normal and sulfatase-deficient fibroblasts in vitro. *Lab. Invest.* **29**, 527—535 (1973)
- Suzuki, K., Suzuki, K., Chen, C. C.: Isolation and chemical characterization of metachromatic granules from a brain with metachromatic leukodystrophy. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **26**, 537—550 (1967)
- Thomas, P. K., King, R. H. M., Kocen, R. S., Brett, E. M.: Comparative ultrastructural observations on peripheral nerve abnormalities in the late infantile, juvenile and late onset forms of metachromatic leucodystrophy. *Acta neuropath. (Berl.)* **39**, 237—245 (1977)
- Toga, M., Berard-Badier, M., Pinsard, N., Gambarelli, D., Hassoun, J., Tripier, M. F.: Étude clinique, histologique et ultrastructurale de quatre cas de leucodystrophie métachromatique infantile et juvénile. *Acta neuropath. (Berl.)* **21**, 23—38 (1972)

Eingegangen am 9. März 1978

Reprinted by Offsetdruckerei Franz Wolf, D-6148 Heppenheim