

Zur Diagnostik der metachromatischen Leukodystrophie durch Arylsulfatase-A-Bestimmung im Blut

Genetische Studie der Normalwerte an 64 Mutter-Kind-Paaren

K. Harzer und K. I. Gußmann*

Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. J. Peiffer), Tübingen,
Bundesrepublik Deutschland

**Problems in the Diagnosis of Metachromatic Leukodystrophy
by Arylsulfatase-A Assay in White Blood Cells**

Genetic Study of Normal Enzyme Values in 64 Mother and Child Pairs

Summary. A determination of the normal genetic variation of arylsulfatase A (ASA) activity is required if this enzyme is to be used in the diagnosis of metachromatic leukodystrophy (MLD). In 64 normal mother and child pairs ASA was determined in lysates of white blood cells to investigate whether normal ASA activity is controlled by multiple alleles (ASA¹, ASA²...). A wide normal range of ASA activity (coefficient of variance 31%) suggested ASA activity polymorphism. The degree to which the experimental method contributes to the variation of ASA activity was tentatively assessed by calculating the correlation coefficient for the mother and child activities and comparing it with the theoretical coefficient $r=0.5$. After eliminating 23 of the 64 mother and child pairs, a value of $r=0.325$ was found for the remaining 41 pairs. This value was not significantly different from $r=0.5$. The elimination of the 23 pairs was performed according to a mean reference enzyme activity determined for each test subject irrespective of ASA activity. The reference parameter was calculated from three lysosomal enzyme activities and showed a coefficient of variance of only 19%. The parameter was found to be strongly correlated with the ASA activity ($r=0.6$) but showed no correlation between mother and child ($r=0.09$). For the 41 selected pairs, two classes of individual ASA activities as well as two classes of mother and child differences of ASA activity were

* Für die Arbeit wurden die von K. I. Gußmann in seiner medizinischen Dissertation (Tübingen 1980) erzielten Ergebnisse verwertet

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

provisionally suggested by the experimental results. The finding was considered as an indication of different phenotypes of ASA activity caused by two alleles, ASA¹ and ASA², and three genotypes ASA¹/ASA¹, ASA¹/ASA², and ASA²/ASA². It was assumed that ASA² controls twice the level of ASA activity as that controlled by ASA¹. Accordingly, the activity phenotypes of mothers and children were tentatively identified. The results were compared with the theoretical distribution of the phenotypes derived from the Hardy-Weinberg law and applied to mother and child pairs. There was a reasonable congruence of both distributions. Gene frequencies of 0.357 for ASA¹ and 0.643 for ASA² were suggested. If two (or more) alleles ASA¹ and ASA² exist, this would have implications for the identification of heterozygous carriers of MLD with its genotype ASA⁰/ASA⁰. The phenotypic activity levels produced by the genotypes ASA¹/ASA¹ (one of the normal genotypes) and ASA⁰/ASA² (one of the heterozygous genotypes) are indistinguishable by quantitative enzyme assays. Some ways are indicated to improve quantitative determination of the suggested polymorphism of ASA activity.

Key words: Metachromatic leukodystrophy – Arylsulfatase A – White blood cells – Mother and child pairs – Activity polymorphism – Heterozygote identification

Zusammenfassung. Die enzymatische Diagnostik der metachromatischen Leukodystrophie (MLD) setzt die Kenntnis der normalen genetischen Variation der Arylsulfatase-A-Aktivität (ASA) voraus. Bei 64 normalen Mutter-Kind-Paaren wurde in den Lysaten von Blutleukocyten die ASA bestimmt, um Anhaltspunkte für eine durch mehrere Allele (ASA¹, ASA², ...) stufenweise gesteuerte Aktivität zu bekommen. Ein solcher Aktivitätspolymorphismus wurde wegen breiter Streuung der ASA (Variationskoeffizient 31%) vermutet. Etwaige methodische Fehler wurden durch Vergleich des Korrelationskoeffizienten r der ASA von Mutter und Kind mit dem Erwartungswert $r=0,5$ abzuschätzen versucht. Bei 41 ausgewählten Paaren ergab sich $r=0,325$ (nicht signifikant von $r=0,5$ verschieden). Die Auswahl richtete sich nach einer für jeden Probanden mitbestimmten, von der ASA unabhängigen Vergleichsgröße V_r , die aus den relativen Aktivitäten dreier lysosomaler Vergleichsenzyme gemittelt wurde. Probanden mit V_r -Werten außerhalb der einfachen Standardabweichung wurden ausgeschieden. Die V_r -Werte zeigten einen Variationskoeffizienten von 19%, eine Korrelation von $r=0,6$ zur ASA, jedoch keine Korrelation zwischen Mutter und Kind ($r=0,09$). Bei den ausgewählten Paaren deuteten sich in der ASA-Verteilung sowie bei Betrachtung der Mutter-Kind-Differenzen der ASA zwei distinkte Klassen an (Aktivitätspolymorphismus). Es wurde der vorsichtige Schluß auf drei Aktivitätsphänotypen gezogen, die ihren Grund in den Genotypen ASA¹/ASA¹, ASA¹/ASA² und ASA²/ASA², also den Allelen ASA¹ und ASA² haben könnten, wenn die letzteren einfache und doppelte Aktivität hervorrufen würden. Nach der Zuordnung der Aktivitätswerte der Paare zu den mit diesen Genotypen möglichen Mutter-Kind-Kombinationen wurden die Genfrequenzen probeweise zu 0,357 für ASA¹ und 0,643 für ASA² ermittelt. Die damit errechneten Erwartungshäufigkeiten der

verschiedenen Kombinationen unterschieden sich offenbar nur zufällig von der nach dem Zuordnungsversuch gefundenen Verteilung. Die sich abzeichnende Existenz zweier normaler ASA-Allele bedeutet, daß den heterozygoten Überträgern der MLD (sie hat den Genotyp ASA⁰/ASA⁰) zwei Genotypen ASA⁰/ASA¹ und ASA⁰/ASA² zuzuordnen wären. Der letztere wäre mittels der hervorgerufenen Aktivität nicht von ASA¹/ASA¹ und nur durch den Faktor 1,5 von ASA¹/ASA² unterscheidbar, was der bekannten Schwierigkeit des Heterozygotentests bei MLD entspricht. Für den Einsatz des Tests bei der genetischen Beratung von MLD-Familien ist die Verbesserung der quantitativen Bestimmung der ASA zum endgültigen Nachweis des Aktivitätspolymorphismus lohnend.

Schlüsselwörter: Metachromatische Leukodystrophie – Arylsulfatase A – Blutleukocyten – Mutter-Kind-Paare – Aktivitätspolymorphismus – Heterozygotenbestimmung

Einleitung

Die Diagnose der metachromatischen Leukodystrophie (MLD) (Übersicht bei Dulaney and Moser 1978) bedarf immer der Absicherung durch den Nachweis des Aktivitätsdefekts der Arylsulfatase A (ASA), denn die klinische Symptomatik besonders der juvenilen und adulten Verlaufsformen ist vieldeutig. Nach Pilz et al. (1979) sei zitiert: „Folgende Diagnosen wurden bei später verifizierten Fällen von metachromatischer Leukodystrophie gestellt: akute, Defekt- oder Propfschizophrenie, Hebephrenie, endogene bzw. klimakterische Depression, präseniler Hirnorganischer Abbau unklarer Ätiologie, diffuse Sklerose, multiple Sklerose, chronischer Alkoholismus, progressive Paralyse, spastische Spinalparalyse, cerebelläre Heredoataxie.“ — Nur die Herabsetzung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit ist ein relativ konstantes Symptom, evtl. sogar Frühzeichen der MLD (Czmok et al. 1974).

Die biochemische Diagnostik durch Nachweis des genetischen Aktivitätsdefekts der ASA setzt voraus, daß der breite Normbereich der ASA-Aktivität möglichst genau in den Anteil der genetischen und in den der methodischen Variation differenziert wird. Dies gilt vor allem dann, wenn heterozygote Überträger der MLD, die klinisch gesund sind, aber im Mittel auf die Hälfte reduzierte ASA-Aktivität besitzen, an ihren erniedrigten Enzymspiegeln erkannt werden sollen, — eine Forderung, die sich bei der genetischen Beratung betroffener Familien zunehmend stellt.

Ein Zugang zum Problem der genetischen Schwankung der normalen ASA-Aktivität war von der Untersuchung einer Reihe normaler Mutter-Kind-Paare (MKP) zu erwarten: Bei diesen bedingt die genetische Verwandschaft eine bestimmte Beziehung der Enzymspiegel von Mutter und Kind.

Ist die benutzte Meßmethode genau genug, diese Beziehung bzw. Korrelation nachzuweisen, so kann die Variation der gemessenen Enzymspiegel im wesentlichen als genetisch angesehen werden, entspricht also dem gesuchten Normbereich.

Die genetische Variation ist jedoch oft nicht stetig, sondern mit noch schärferen Methoden in bestimmte Stufen auflösbar (Phänotypen der Enzymaktivität), die auf verschiedenen Genen beruhen (multiple Allelie). Fügt man zu solchen denkbaren, verschiedenen Normalallelen noch das pathologische Allel, welches zur MLD führt, hinzu, so würde sich z. B. folgende Reihe von ASA-Allelen ergeben: ASA⁰ bedingt die ASA-Aktivität 0 (Aktivitätsmangel bei MLD), ASA¹ ruft die Aktivität 1, ASA² die Aktivität 2 hervor. Die pathologischen Kombinationen ASA⁰/ASA⁰ (homozygot krankhaft), ASA⁰/ASA¹ und ASA⁰/ASA² (beide heterozygot für MLD) würden zu den Aktivitätsstufen 0, 1 und 2, die „normalen“ Genotypen ASA¹/ASA¹, ASA¹/ASA² und ASA²/ASA² zu den Stufen 2, 3 und 4 führen.

Wir untersuchten die ASA-Aktivität in den Blut-Leukocyten von 64 normalen MKP auf Hinweise für solche Aktivitätsstufen (Aktivitätspolymorphismus, Kömpf et al. 1974), die evtl. den Schluß auf verschiedene ASA-Allele zulassen würden, und bedienten uns dazu einer Methode, bei der die erzielten ASA-Aktivitätswerte anhand der gleichzeitig gemessenen Werte von Vergleichsenzymen, die wie die ASA im Lysosom der Zelle lokalisiert sind, so sortiert wurden, daß eine Gruppe von gut miteinander vergleichbaren ASA-Werten übrig blieb.

Material und Methodik

1 Probanden

Die Stichprobe umfaßte 64 Mutter-Kind-Paare (128 Probanden). Davon stammten 38 Paare aus dem Raum Tübingen-Herrenberg, die sich freiwillig zur Blutentnahme bereit erklärten; die Blutproben von 26 Paaren wurden durch das Institut für Anthropolgie und Humangenetik der Universität Tübingen vermittelt. Die Altersverteilung lag bei den Kindern zwischen 4 und 32 Jahren, bei den Müttern zwischen 25 und 63. Bei keinem der Probanden ergaben sich Hinweise auf eine neurologische Erkrankung in der Familie, z. B. im Sinne einer MLD.

2 Gewinnung der Leukocytenfraktion aus Blutproben

Je 5 ml Venenblut wurden mit 1 ml wäßriger Dextran (5%)-Kochsalz (0,7%)-Heparin (0,05%)-Lösung gemischt. Nach 1stündiger Sedimentation bei 20°C, die durch die Dextran-Heparin-Lösung beschleunigt abläuft, wurde der Leukocyten-Plasma-Überstand abpipettiert und die Erythrocyten-Säule verworfen. Durch Zentrifugieren (10 min, 600 g) wurden die Leukocyten vom Plasma-Überstand getrennt. Das zurückbleibende Leukocyten-Sediment wurde mit 5 ml physiologischer Kochsalz-Lösung aufgeschwemmt, erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen. Einfrieren der Leukocyten-Sedimente bei -30°C (maximal 4 Monate) bis zur weiteren Bearbeitung: Auftauen durch Zugabe von 1 ml Aqua bidest., anschließende Ultraschallbehandlung (1 min) zur kompletten Lyse der Leukocyten. Die Lysate wurden für die Enzymbestimmungen verwendet. — In Kontrollproben wurden Enzymbestimmungen vor dem Einfrieren sowie nach 1-, 2- und 4monatigem Einfrieren von Teilen der Proben durchgeführt. Die Enzymaktivitäten blieben über diesen Zeitraum im Rahmen der methodischen Fehlerbreite (10–15%) unverändert.

3 Enzymatische Ansätze

Je 50 µl der Leukocytenlysate (im folgenden als Proben bezeichnet) wurden in Vielloch-Platten aus Plastik verteilt. Die Aliquote dienten zum Ansatz der Aktivitäten der Arylsulfatase A, Total-

β -Hexosaminidase, sauren β -Galaktosidase und β -Glucuronidase (alles lysosomale Enzyme mit saurem pH-Optimum) in Doppelbestimmung und für entsprechende Leerwerte. Für den Umgang mit den chromogenen Substraten und den enzymatisch freigesetzten, gefärbten Produkten nach der Inkubationsphase hat sich die Arbeit auf Schuppeneis und im abgedunkelten Raum bewährt.

3.1 Arylsulfatase A (ASA)

50 μ l Probe wurden mit 150 μ l Substrat-Lösung gemischt. Diese bestand aus 10 mM 1-Hydroxy-5-Nitrophenyl-Sulfat (p-Nitrocatechol-Sulfat) als eigentlichem Substrat, 5 \times 10⁻⁴ M Natriumpyrophosphat als Inhibitor der Arylsulfatase B sowie 10% NaCl als Reaktionsstabilisator in 0,5 M Na-Aacetat-Puffer pH 5,0 (Baum et al. 1959). Die Reaktion wurde für die Leerwerte sofort, für die Reaktionsansätze nach 3 h Inkubation bei 37°C, durch Zugabe von 0,4 ml alkalischem Puffer pH 10,3 gestoppt. (Puffer aus 1 Teil 1 N Natronlauge und 4 Teilen 1,5 M 2-Amino-1-methyl-1-propanol.) Von Leerwert- und Reaktionsansätzen wurde die Extinktion bei 515 nm gemessen. Als Maß für die Enzymaktivität galt die Extinktion nach Abzug des Leerwerts. Eine Extinktionsdifferenz von 0,01 wurde in dieser Studie als Absorptionseinheit (AE) bezeichnet.

3.2 Vergleichsenzyme

3.2.1 Total- β -Hexosaminidase (N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase). 50 μ l Probe wurden mit 150 μ l Wasser verdünnt und in 2 Teile zu 100 μ l geteilt (gleiches Vorgehen beim Leerwert). Die Verdünnung ist wegen der zu erwartenden hohen Extinktion sinnvoll. Danach pro 100 μ l verdünnter Probe Zugabe von 0,5 ml Substrat-Lösung (2 mM p-Nitrophenyl- β -D-N-Acetyl-Glucosaminid in 0,1 M Natriumcitrat-Puffer pH 4,5). Nach 60 min Inkubation (Leerwert 0 min) Stoppen der Reaktion mit 0,4 ml alkalischem Puffer (s. 3.1), Messung der Extinktion bei 405 nm.

3.2.2 Saure β -Galaktosidase. Ausführung wie 3.1; 50 μ l Probe wurden mit 150 μ l Substrat-Lösung (2 mM p-Nitrophenyl- β -D-Galaktozyranosid und 86 mM Kochsalz in 0,5 M Acetatpuffer pH 5,0) vermischt. Inkubationsdauer 90 min, Extinktionsmessung bei 405 nm, Alkalisierung mit 0,5 ml Puffer (s. 3.1), Bildung der Differenz gegen den Leerwert.

3.2.3 β -Glucuronidase. Ausführung wie 3.1 bzw. 3.2.2, jedoch mit der Substrat-Lösung von 2 mM p-Nitrophenyl- β -D-Glucuronid in 0,1 M Natrium-Citrat-Puffer pH 4,2; Inkubationsdauer, Alkalisieren und Extinktionsmessung wie bei 3.2.2.

4 Berechnung der Vergleichsgröße V_r aus den für die drei Vergleichsenzyme erhaltenen Extinktionswerten

Der V_r -Wert wurde aus den relativen Aktivitäten der drei Vergleichsenzyme Total- β -Hexosaminidase, saure β -Galaktosidase und β -Glucuronidase berechnet. Relative Aktivität bezeichnete die für das Vergleichsenzym *A*, *B* oder *C* jedes Probanden *i* (*i* = 1, 2, 3 . . . n) als Extinktion gemessene Aktivität bezogen auf das arithmetische Mittel der Extinktion dieses Einzelenzyms bei allen Probanden. Die relativen Aktivitäten der Einzelenzyme seien A_r , B_r , C_r . Der Wert V_r errechnet sich dann für jeden Probanden *i*:

$$V_{r,i} = 17 (A_{r,i} + B_{r,i} + C_{r,i})$$

Der Faktor 51:3 = 17 diente dazu, bei drei Vergleichsenzymen alle V_r in den Bereich um 51 zu legen (das ist der Mittelwert der ASA-Aktivitäten, s. Tabelle 1), wodurch ASA-Aktivitäten und V_r -Werte leichter verglichen werden konnten.

Ergebnisse und Diskussion

Bei der Bestimmung der ASA-Aktivität aus Blut-Leukocyten hat es sich gezeigt, daß die große Variation (um Faktoren 7–9) relativ unabhängig davon ist, ob die gemessenen Werte in bezug auf gleiche Mengen eingesetzten Leukocytenproteins (Kihara et al. 1973), gleiche Leukocytenzahl (vorläufige Beobachtung) oder

Tabelle 1. Arylsulfatase-A-Aktivität (AE) und mittlere Vergleichsenzym-Aktivität (V_r) in den Blutleukocyten von 64 Mutter-Kind-Paaren

Paar-Nr.	Mutter		Kind	
	ASA-Aktivität (AE) ^a	V_r -Wert ^a	ASA-Aktivität (AE) ^a	V_r -Wert ^a
1	37	53	35	51
2	50	63	21	53
3	62	50	47	49
4	62	57	56	59
5	55	51	54	57
6	75	51	51	43
7	75	51	30	37
8	40	48	43	42
9	66	59	72	57
10	48	55	50	68
11	57	52	41	35
12	51	59	80	57
13	44	49	41	44
14	35	41	35	36
15	58	49	55	49
16	59	49	59	52
17	80	51	59	57
18	42	42	50	50
19	32	48	36	61
20	74	59	36	54
21	63	55	46	47
22	40	74	30	48
23	55	56	57	58
24	24	56	49	56
25	67	55	59	55
26	71	54	53	50
27	51	46	48	55
28	82	69	47	35
29	87	64	67	71
30	70	61	66	73
31	41	49	53	54
32	39	39	61	62
33	52	47	82	69
34	45	51	62	57
35	49	49	40	45
36	64	56	47	46
37	40	45	52	57
38	64	58	87	79
39	48	56	43	50

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Paar-Nr.	Mutter		Kind	
	ASA-Aktivität (AE) ^a	V_r -Wert ^a	ASA-Aktivität (AE) ^a	V_r -Wert ^a
40	58	55	72	58
41	29	44	43	63
42	36	36	59	48
43	44	51	52	49
44	68	63	53	41
45	88	57	62	44
46	44	40	40	44
47	83	55	12	16
48	61	48	49	44
49	23	20	64	51
50	54	53	31	36
51	69	42	31	48
52	26	48	31	48
53	20	36	19	38
54	62	48	62	55
55	40	42	40	54
56	45	40	59	44
57	40	43	44	44
58	46	56	61	52
59	20	38	29	53
60	43	52	36	42
61	49	54	37	55
62	50	47	58	57
63	65	54	42	44
64	69	58	52	43
Mittelwert:	52,9	50,9	49,0	50,8
Standardabweichung:	16,6	8,5	14,8	10,2

^a Siehe Methodik

gleiches Volumen an verarbeitetem Blut angegeben werden. Da die letztgenannte Normierung die einfachste und somit am wenigsten störungsanfällige ist, fand sie für diese Studie Verwendung.

Die ASA-Aktivitäten von den 64 untersuchten Mutter-Kind-Paaren (MKP) sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Zur Abschätzung, in welchem Grad die genetische Variation von dem methodischen Fehler überdeckt war (s. Einleitung), bot sich die Bestimmung der Korrelationskoeffizienten r der ASA-Aktivität von Mutter und Kind an. Dieser beträgt für drei vererbliche quantitative Merkmale und so auch für Enzymaktivitäten theoretisch $r = 0,5$ (vgl. Lenz und Lenz 1968). Je

näher der aus den experimentellen Daten ermittelte Korrelationskoeffizient diesem Wert kommt, desto mehr dürfte die rein genetische Variation der Daten zum Vorschein kommen.

Aus den ASA-Aktivitäten der Tabelle 1 errechnete sich ein Mutter-Kind-Korrelationskoeffizient von nur $r = 0,225$. Nach Eliminierung dreier Paare (Nr. 38, 47 und 49) mit extremen ASA-Werten stieg die Korrelation auf $r = 0,359$ an und war damit hochsignifikant von 0 verschieden. Dieser Korrelationskoeffizient war seinerseits nicht signifikant von dem theoretischen Wert 0,5 verschieden (95%-Vertrauensbereich 0,110–0,558 für r). Für die Paare 38, 47 und 49 war die geringe Vergleichbarkeit mit der übrigen Stichprobe dadurch zu bestätigen, daß die für jeden Paarling mitbestimmte Vergleichsgröße V_r (aus Vergleichsenzym-Aktivitäten, s. Methodik) teils ebenfalls extreme Werte hatte.

Für die bereinigte Stichprobe von 61 MKP war nach dem Korrelationskoeffizienten $r = 0,359$ nun anzunehmen, daß die Variation ihrer Aktivitäten zumindest vorwiegend genetisch bedingt sei. Der genetische Ursprung der positiven Korrelation wurde indirekt durch die Korrelationsanalyse falscher Paare (Mutter aus Paar 1/Kind aus Paar 2, Mutter aus Paar 2/Kind aus Paar 3 usw.) bestätigt, bei der sich keine signifikante Korrelation mehr ergab ($r = 0,104$). Unter der Vorstellung eines Aktivitätspolymorphismus bei multipler Allelie (s. Einleitung) untersuchten wir daher die Häufigkeitsverteilung der ASA-Aktivitäten der 2×61 Probanden der bereinigten Stichprobe, zunächst ohne Rücksicht auf die genetische Beziehung innerhalb der MKP. Wir fanden keinen eindeutigen Hinweis auf distinkte Aktivitätsklassen.

Eine weitere Siebung der Stichprobe sollte nicht von den ASA-Werten selbst ausgehen, weil sonst die Gefahr bestand, Werte auszusondern, die tatsächlich aus genetischen Gründen vom Durchschnittswert abwichen, also gerade für die Frage des Aktivitätspolymorphismus wichtig sein würden. Vielmehr wurde für die Ausscheidung weiterer MKP wiederum der V_r -Wert herangezogen. Es wurden alle MKP ausgeschieden, bei denen auch nur ein Paarling einen V_r -Wert besaß, der außerhalb der einfachen Standardabweichung aller V_r -Werte lag (Tabelle 1). Auf diese Weise eliminierten wir weitere 20 Paare. (Korrelationskoeffizient der ASA-Aktivität bei Mutter und Kind anschließend $r = 0,325$.)

Die Häufigkeitsprofile der Aktivitätswerte der doppelt bereinigten Stichprobe (41 MKP, Abb. 1) ließen nun Andeutungen einer nicht mehr monomodalen Verteilung erkennen. Es zeigten sich Häufigkeitsakzentuierungen in der Gegend um 45 und 60 AE (= Absorptionseinheiten, Aktivitätsmaß der ASA, s. Methodik). Wegen der starken Überlappung zu Nachbarklassen konnte allerdings nicht von distinkten Aktivitätsklassen gesprochen werden. Die Intrapaardifferenzen (kurz: IPD) der 41 Paare verteilten sich indessen in der Weise, daß eine Klasse der Differenzen zwischen 11 und 17 AE nahezu distinkt hervortrat (Tabelle 2), neben einer Häufung von IPD unterhalb 8 AE. Tabelle 2 wurde versuchweise folgendermaßen interpretiert: Die IPD zwischen 0 und 8 AE entsprechen der theoretischen Differenz von 0 (gleicher Phäno- und Genotyp bei Mutter und Kind) und variieren nur infolge der immer noch beträchtlichen methodischen Fehler. Die zwischen 11 und 17 AE gehäuften IPD mit ihrem errechneten Mittelwert 15 AE entsprechen jedoch eher der Differenz verschiedener Phänotypen, deren Genotypen sich in einem Allel unterscheiden. Die IPD von 15 AE gibt also den

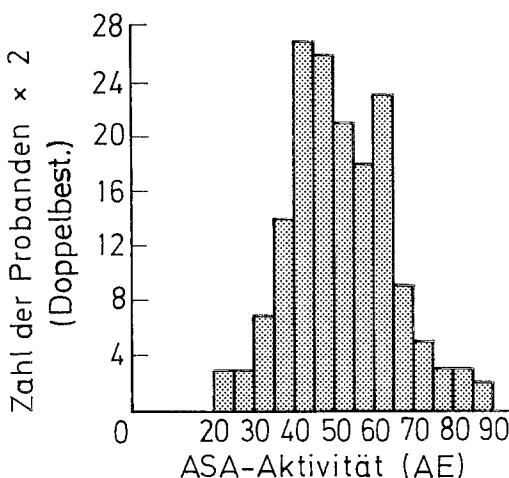


Abb. 1. ASA-Aktivitäten (beide Werte der Doppelbestimmung) bei 41 Mutter-Kind-Paaren (s. Text)

Tabelle 2. Intra paar-Differenzen (IPD) der ASA-Aktivitäten (Einheit AE, s. Text) von 41 Mutter-Kind-Paaren

Klassen der IPD als AE	0-5	5-8	8-11	11-14	14-17	17-20	20-23	23 und höhere IPD
Zahl der Paare	13	7	1	5	6	1	2	6

Klassen mit Häufigkeitsakzentuierungen (s. Text) sind eingeraumt

Unterschied defi nierter Aktivitätsbeträge an, die von zwei Allelen ASA¹ und ASA² hervorgerufen werden. Die sporadischen hohen IPD (größer als 20 AE) in Tabelle 2 können als zufällig gleichsinnige Addition von großen methodischen Fehlern bei der Aktivitätsbestimmung von Mutter und Kind angeschenen werden, aber auch mit einem dritten, zu noch höherer Aktivität führenden ASA-Allel zusammenhängen. (Dessen mögliche Existenz soll der Übersichtlichkeit halber hier nicht weiter diskutiert werden.)

Die bei Abb. 1 genannten Häufigkeitsakzentuierungen der ASA-Aktivitätswerte in der Gegend um 45 und 60 AE unterschieden sich gerade um den Betrag von 15 AE, der bei Tabelle 2 hervorgehoben wurde. Ging man von der einfachen Hypothese eines multipel-allelen Systems mit zwei Allelen aus, von denen z. B. das eine einen bestimmten Aktivitätsbetrug, das andere den doppelten Betrag hervorruft, die aber beide mit ähnlicher Frequenz auftreten, so war nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz die heterozygote Kombination der beiden Allele als häufigster Genotyp zu erwarten. Von den genannten Aktivitätsstufen 45 und 60 AE, die wir als präsumptive Phänotypen bezeichnen wollen, erschien die Stufe 45 AE etwas häufiger besetzt (Abb. 1). Dieser Phänotyp konnte also seinen Grund in einem heterozygoten Genotyp ASA¹/ASA² haben, dessen Allele ASA¹ den Aktivitätsbetrug 15 AE und ASA² 30 AE hervorrufen. Der präsumptive Phänotyp 60 AE war nun zwangslässig dem Genotyp ASA²/ASA² zuzuordnen. Es blieb noch der Phänotyp

30 AE für den Genotyp ASA^1/ASA^1 zu fordern. In der Stichprobe von 41 MKP befanden sich einige entsprechende ASA-Werte. Wegen des gemeinsamen Allels innerhalb der MKP waren bei den angenommenen Genotypen ASA^1/ASA^1 , ASA^1/ASA^2 und ASA^2/ASA^2 , abgesehen von dem methodischen Fehler, aktivitätsphänotypisch nur IPD mit 0 oder 15 AE zu erwarten.

Zur weiteren Prüfung der Hypothese zweier Allele ASA^1 und ASA^2 ging unser Bestreben dahin, die gemessenen Aktivitätswerte der doppelt bereinigten Stichprobe von 41 MKP einer der bei zwei Allelen (3 Genotypen) möglichen Genotyp-Kombination von Mutter und Kind zuzuordnen. Die Kombinationen lauten (präsumptive Phänotyp-Kombinationen in Klammern, Aktivitäten als AE):

Mutter	— Kind
ASA^1/ASA^1	ASA^1/ASA^1 (30 — 30)
ASA^1/ASA^1	ASA^1/ASA^2 (30 — 45)
ASA^2/ASA^1	ASA^1/ASA^1 (45 — 30)
ASA^1/ASA^2	ASA^1/ASA^2 (45 — 45)
ASA^1/ASA^2	ASA^2/ASA^2 (45 — 60)
ASA^2/ASA^2	ASA^1/ASA^2 (60 — 45)
ASA^2/ASA^2	ASA^2/ASA^2 (60 — 60)

In Tabelle 3 ist das Ergebnis des Zuordnungsversuchs dargestellt. Die gemessenen ASA-Aktivitäten sind im Gegensatz zu Tabelle 1 (Mittelwerte) als Doppelbestimmungen aufgeführt, um einen Überblick über die Fehlerbreiten zu geben, die bei der Zuordnung zu den präsumptiven Phänotypen zu berücksichtigen waren. Die Variation der Doppelbestimmungen dürfte *innerhalb* eines jeden MKP den gesamten methodischen Fehler einigermaßen beschreiben, da die Proben der Paarlinge immer zusammen bearbeitet wurden. Der Fehler *zwischen* den MKP unterlag aber sicher bisweilen wechselnden äußeren Einflüssen, da nicht alle MKP simultan bearbeitet werden konnten. Bei einzelnen MKP (Nr. 4, 6, 26, 52, 61 und 64) variierten die Doppelbestimmungen erheblich (Pipettierfehler?). Nicht nur aufgrund solcher Fehler, die durch Mittelwertbildung der Doppelbestimmungen gemildert wurden, war die Zuordnung einer Reihe von Paaren (Nr. 6, 9, 26, 31, 37, 40, 61 und 64) zu den präsumptiven Phänotyp-Kombinationen problematisch. Die Paare 12, 17, 40, 45 und 51 mit meist hohen Werten konnten überhaupt nicht sinnvoll zugeordnet werden; wir berücksichtigen sie daher nicht weiter, waren uns aber im klaren, daß wir dadurch evtl. eine für die angestrebte Aussage unzulässige Auslese getroffen haben.

Formal verfahren wir im einzelnen folgendermaßen: Aktivitätswerte unter 37,5 AE wurden dem Phänotyp 30 AE, Werte zwischen 37,5 und 52,5 dem Phänotyp 45 AE und Werte zwischen 52,5 und 67,5 dem Phänotyp 60 AE zugeordnet. Für Werte, die bei den Grenzen 37,5 und 52,5 AE lagen, konnte keine Entscheidung getroffen werden, sie wurden abwechselnd den benachbarten Phänotypen zugeschlagen.

Für die Zuordnung einiger Paare mußten schließlich noch zwei weitere Annahmen gemacht werden: 1) Wenn die Werte der Doppelbestimmungen stark differierten, wurde nicht der Mittelwert, sondern nur der Wert berücksichtigt, der näher bei einem präsumptiven Phänotyp lag, in der Annahme, der andere Wert würde durch einen methodischen Fehler von diesem Phänotyp abweichen (Paare Nr. 6, 9, 26, 64). — 2) Wenn die IPD bei einem Paar in der Nähe von 15 AE lag, die

Tabelle 3. Arylsulfatase-A-Aktivität (AE) und deren phänotypische Zuordnung zu den angenommenen Allelen ASA¹ und ASA² bei 41 ausgewählten Mutter-Kind-Paaren

Paar-Nr.	Mutter		Kind	
	ASA-Aktivität Doppelbest. (AE)	präsumptive Phänotypen 15 oder 30 AE, Allele ASA ¹ und ASA ²	ASA-Aktivität Doppelbest. (AE)	präsumptive Phänotypen 15 oder 30 AE, Allele ASA ¹ u. ASA ²
1	35/39	15 + 15	33/36	15 + 15
3	58/67	30 + 30	46/48	15 + 30
4	61/63	30 + 30	51/61	30 + 30
5	52/57	30 + 30	50/57	30 + 30
6	66/84	30 + 30	50/51	15 + 30
8	38/42	15 + 30	42/44	15 + 30
9	66/66	30 + 30	67/76	30 + 30
12	50/52	15 + 30	74/86	? ?
13	43/45	15 + 30	41/41	15 + 30
15	56/59	30 + 30	54/56	30 + 30
16	57/61	30 + 30	55/62	30 + 30
17	76/83	? ?	57/60	30 + 30
18	41/43	15 + 30	50/50	15 + 30
20	72/75	? ?	35/37	15 + 15
21	62/64	30 + 30	45/47	15 + 30
23	55/55	30 + 30	56/58	30 + 30
24	24/24	15 + 15	48/50	15 + 30
25	65/68	30 + 30	59/59	30 + 30
26	62/79	30 + 30	50/55	15 + 30
27	50/52	15 + 30	47/49	15 + 30
31	38/44	15 + 30	51/54	15 + 30
34	44/46	15 + 30	59/64	30 + 30
35	45/53	15 + 30	38/41	15 + 30
36	62/65	30 + 30	41/52	15 + 30
37	37/42	15 + 30	50/53	15 + 30
39	47/49	15 + 30	40/46	15 + 30
40	55/61	30 + 30	69/75	? ?
43	42/45	15 + 30	50/53	15 + 30
45	85/90	? ?	62/62	30 + 30
48	60/62	30 + 30	47/50	15 + 30
51	67/70	30 + 30	30/32	30 + 0?? ^a
52	23/28	15 + 15	29/33	15 + 15
54	61/63	30 + 30	62/62	30 + 30
55	38/42	15 + 30	39/41	15 + 30
57	40/40	15 + 30	43/45	15 + 30
58	44/47	15 + 30	58/64	30 + 30
60	42/44	15 + 30	33/38	15 + 15

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Paar-Nr.	Mutter		Kind	
	ASA-Aktivität Doppelbest. (AE)	präsumptive Phänotypen 15 oder 30 AE, Allele ASA ¹ und ASA ²	ASA-Aktivität Doppelbest. (AE)	präsumptive Phänotypen 15 oder 30 AE, Allele ASA ¹ u. ASA ²
61	46/52	15 + 30	31/42	15 + 15
62	49/51	15 + 30	58/58	30 + 30
63	48/52	15 + 30	40/43	15 + 30
64	62/75	30 + 30	48/56	15 + 30

^a Paar 51 kann formal z. B. so gedeutet werden, daß das Kind heterozygot für MLD ist, also ein Allel ASA⁰ besitzt

Paare, in denen ?? vermerkt sind, wurden für die weitere Auswertung *nicht* berücksichtigt (s. Text)

Werte beider Paarlinge aber noch innerhalb der oben angesetzten Aktivitätsgrenzen für die Zuordnung zu ein und demselben Phänotyp lagen, wurden dennoch zwei Phänotypen angenommen (Paar 37), also die IPD berücksichtigt, weil innerhalb des Paares ein geringerer Fehler zu vermuten war als zwischen den Paaren (s. oben).

In Tabelle 3 ist das Ergebnis des Zuordnungsversuchs zu den präsumptiven Phänotypen 30, 45 und 60 AE so dargelegt, daß die durch die hypothetischen Allele ASA¹ und ASA² hervorgerufenen Aktivitätsbeträge 15 und 30 AE direkt zu erkennen sind. Somit konnten auch die präsumptiven Häufigkeiten der beiden Allele direkt ausgezählt und zu der Gesamtzahl von 4×35 Allelen (35 ausgewertete Paare) in Beziehung gesetzt werden. Es ergaben sich die Frequenzen $p = 0,357$ für ASA¹ und $q = 0,643$ für ASA².

Mit diesen Frequenzen berechneten wir nach der theoretischen, aus dem Hardy-Weinberg-Gesetz abgeleiteten Verteilung der Frequenzen zweier Allele auf MKP die Erwartungshäufigkeiten der 7 möglichen Genotyp-Kombinationen bei Mutter und Kind. Sie sind in der folgenden, üblichen Matrizen-Darstellung (Tabelle 4) bereits in die Anzahl der MKP aus 35 ausgewerteten Paaren umgerechnet und in Klammern aufgeführt. Den Erwartungshäufigkeiten ist die gemäß der obigen Zuordnung gefundene Anzahl von Paaren gegenübergestellt.

Die gefundene Verteilung scheint nur zufällig von der erwarteten abzuweichen. Die Symmetrie in den p^2q -bzw. pq^2 -Feldern sowie überhaupt in den beiden durch ASA¹/ASA² bezeichneten Achsen der Heterozygoten ist gut angenähert. Auf eine statistische Behandlung wurde verzichtet, denn sie erhöhte bei der geringen Anzahl von 35 Paaren und bei dem sicher noch beträchtlichen methodischen Fehler die Sicherheit der angestrebten Aussage nicht.

Wir möchten das Ergebnis der Matrize (Tabelle 4) äußerst vorsichtig als Argument für die Existenz zweier ASA-Allele bewerten. Die Zuordnung der experimentellen Werte in Tabelle 3 zu den präsumptiven Phänotypen 30, 45 und 60

Tabelle 4

Kind		Mutter			
Genotyp	Phänotyp (AE)	Genotyp	ASA ¹ /ASA ¹	ASA ¹ /ASA ²	ASA ² /ASA ²
		Phänotyp (AE)	15 + 15	15 + 30	30 + 30
ASA ¹ /ASA ¹ ; 15 + 15			2 ($p^3 \times 35$ = 1,58)	2 ($p^2q \times 35$ = 2,87)	
ASA ¹ /ASA ² ; 15 + 30			2 ($p^2q \times 35$ = 2,87)	10 ($pq \times 35$ = 8,05)	6 ($pq^2 \times 35$ = 5,18)
ASA ² /ASA ² ; 30 + 30				4 ($pq^2 \times 35$ = 5,18)	9 ($q^3 \times 35$ = 9,31)

AE beruhte auf einer Reihe zwar plausibler, aber unbewiesener Annahmen, erfolgte also nicht immer zwingend. Die meist hohe ASA-Aktivität der 6, in Tabelle 3 nicht zugeordneten Paare kann zwar methodischen Fehlern zugeschrieben werden (die allerdings gerade bei höheren Aktivitäten geringer sein sollten), läßt aber auch die Möglichkeit eines dritten ASA-Allels — von der wir zunächst nicht ausgegangen waren — offen.

Dem erzielten, vorläufigen Ergebnis, daß die normale ASA-Aktivität von mehr als einem Allel gesteuert wird, muß noch der hinreichende Beweis dieses Aktivitätspolymorphismus folgen. Schon jetzt ist es wahrscheinlich, daß (mindestens) zwei für das MLD-Allel (ASA⁰) heterozygote Genotypen ASA⁰/ASA¹ und ASA⁰/ASA² existieren. Weil der zweite aktivitätsphänotypisch dem nicht pathologischen Genotyp ASA¹/ASA¹ entsprechen würde, müßte er von diesem mit geeigneter Methodik und durch gleichzeitige Familien-Untersuchung abgegrenzt werden, was bisher nicht gelingt.

Geeignete Methoden sind nicht nur quantitative, noch präziser zu gestaltende Aktivitätsbestimmungen der ASA, sondern können auch in einer qualitativen Differenzierung der Produkte der Allele ASA¹ und ASA² zu suchen sein. Die Annahme, daß die beiden Genprodukte z. B. verschiedene elektrophoretische oder enzymkinetische Eigenschaften haben, ist nicht fernliegend. Hier müssen weitere Arbeiten ansetzen und sind von uns geplant. Vordringlich erscheint aber die Verbesserung der quantitativen Aktivitätsbestimmung. Durch Automatisierung der Labortechnik ist sicher gegenüber der von uns ausgeführten Handarbeit mehr Präzision zu erzielen. Aber auch Blutentnahme, Leukocyten-Präparation, Einfriervorgang und -dauer vor der Analyse sowie Herstellung der Leukocyten-Lysate könnten sicher noch mehr standardisiert werden.

Für die Richtigkeit der Aktivitätsbestimmung bedarf es einer von der ASA-Aktivität unabhängigen Vergleichsgröße, die geeignet ist, mit Fehlern behaftete Proben zu erkennen, um diese ausscheiden bzw. wiederholen zu können. Der in dieser Studie benützte, aus Vergleichsenzym-Aktivitäten gebildete V_r -Wert scheint solche Eigenschaften zu haben. Wir konnten zeigen, daß der V_r -Wert stark mit der ASA-Aktivität korreliert ist ($r = 0,565$ für die Mütter und $r = 0,619$ für die Kinder; $n = 64$).

Die Korrelationswerte entkräften den denkbaren Einwand, der V_r -Wert würde als Aktivitätsparameter ebenso wie die ASA-Aktivität frei variieren, hätte also

keinen Bezug zu dieser. Trotzdem wird der V_r -Wert sicher dann unzuverlässig sein, wenn eine besondere Variation einer der drei Vergleichsenzymaktivitäten, aus denen er gemittelt ist, einmal „durchschlägt“. Der V_r -Wert ist andererseits dadurch charakterisiert, daß er im Gegensatz zu einzelnen Enzymaktivitäten keine Korrelation zwischen Mutter und Kind zeigt ($r = 0,091$; $n = 64$) und mit einem Variationskoeffizient von 16% in unserer Stichprobe deutlich weniger streut als die einzelnen Enzymaktivitäten.

Andere Parameter wie z. B. der Leukocyten-Proteingehalt und die Leukocytenzahl lassen nach unseren vorläufigen Erfahrungen eine etwas geringere Korrelation zur ASA-Aktivität erkennen (r beträgt ca. 0,5) als der V_r -Wert.

Die dringender werdende Forderung der genetischen Berater nach enzymatischer Heterozygoten-Identifizierung und pränataler Diagnostik in Familien mit genetischen Stoffwechseldefekten wie MLD und andere nicht therapierbare, der enzymatischen Diagnostik zugängliche, neurodegenerative Krankheitsbilder rechtfertigen jeden Versuch, die Treffsicherheit der Methoden zu erhöhen. Eine zuverlässige Abgrenzung pathologischer enzymatischer Phänotypen ist nur möglich, wenn auch die häufigeren, klinisch nicht relevanten Phänotypen bekannt sind. Deren Erfassung setzt jedoch oft eine wesentlich höhere methodische Genauigkeit voraus, als sie für die meisten Aussagen in der klinischen Chemie notwendig ist.

Danksagungen. Den Herren Dr. Bissbort, Dr. Kömpf und Professor Dr. Ritter vom Institut für Humangenetik der Universität Tübingen sei für die Vermittlung der Blutproben von Mutter-Kind-Paaren besonders Dank gesagt. Herrn Professor Dr. Ritter danken wir für den Hinweis auf die Untersuchung von Mutter-Kind-Paaren sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit. Herrn Professor Dr. Dietz vom Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen gilt unser Dank für Beratung und Berechnung der Korrelationskoeffizienten. Den freiwilligen Blutspendern aus der Bekanntschaft von K. I. G. sei an dieser Stelle noch einmal Dank gesagt.

Literatur

Baum H, Dodgson K, Spencer R (1959) The assay of arylsulfatase A and B in human urine. *Clin Chim Acta* 4:453-455

Czmok E, Regli F, Harzer K, Benz HU (1974) Metachromatische Leukodystrophie. Genetische Studie einer familiären adulten Form der metachromatischen Leukodystrophie (MLD). *Arch Psychiat Nervenkr* 219:369-375

Dulaney JT, Moser HW (1978) Sulfatide lipidosis: metachromatic leukodystrophy. In: *The metabolic basis of inherited disease*, 4th edn. Mc Graw-Hill Blakiston Div., New York, pp 770-809

Kihara H, Porter MT, Fluharty AL, Scott ML, De la Flor SD, Trammell JL, Nakamura RN (1973) Metachromatic leukodystrophy: ambiguity of heterozygote identification. *Am J Ment Defic* 77:389-394

Kömpf J, Bissbort S, Ritter H, Wendt GG (1974) The polymorphism of alanine aminotransferase (EC: 2.6.1.2.): Densitometrical assay. *Humangenetik* 22:247-249

Lenz W, Lenz F (1968) Grundlinien der Humangenetik. Zu Definition, Terminologie und Methoden. In: Becker PE (Hrsg) *Humangenetik*, Bd I/1. Thieme, Stuttgart, pp 1-76

Pilz H, Heipertz R, Seidel D (1979) Diagnostisches Vorgehen bei Patienten mit Verdacht auf Vorliegen einer spätaufigen Sphingolipidose oder verwandten Krankheit und neurologisch-psychiatrischer Symptomatik. *Nervenarzt* 50:749-761