

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. S. Zierz)**

**Mitochondriale Veränderungen in Muskelbiopsien bei  
amyotropher Lateralsklerose**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)**

**vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**von Anna Krasnianski  
geboren am 27. 4. 1978 in Riga**

**Gutachter:  
1. Prof.Dr. S.Zierz  
2. Prof.Dr. H. Reichmann  
3. Prof.Dr. A. Ludolph**

**verteidigt am 23.05.2005**

## Referat

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, welchen Stellenwert mitochondriale Veränderungen in Muskelbiopsien in der Pathogenese der ALS haben. Es wurde untersucht, ob die mitochondrialen Veränderungen in den Muskelproben von 21 ALS-Patienten im Vergleich zu 21 gesunden Kontrollpersonen und 23 Kontrollen mit anderen neurogenen Erkrankungen nachzuweisen sind und ob diese Veränderungen, falls vorhanden, als ALS-spezifisch zu werten sind. Histologisch nachweisbare Veränderungen der oxidativen Enzymaktivität im Muskel der ALS-Patienten und neurogenen Kontrollen in Form von Cores und Targets sowie mitochondriale DNA für jede Muskelprobe in Bezug auf Kern-DNA sollten quantifiziert werden. Die Aktivität der Citratsynthase als intramitochondriales Enzym, das gut mit dem Mitochondriengehalt einer Muskelprobe korreliert, sollte eine Aussage zur Mitochondrienmenge der jeweiligen Muskelprobe ermöglichen.

Targets (jeweils pro 500 Muskelfasern) waren nur selten zu finden (je 1 bei 2 von 21 ALS-Patienten, 1 bei 1 von 23 neurogenen Kontrollen). Dagegen waren Cores häufiger anzutreffen (1-7 Cores bei 7 von 20 ALS-Patienten, 59 Cores bei 1 ALS-Patienten mit stärkeren Atrophien; 1-8 Cores bei 8 von 23 neurogenen Kontrollen).

Der Mittelwert für mtDNA/Kern-DNA-Quotienten der ALS-Patienten lag bei  $5,07 \pm 2,08$ , für neurogene Kontrollen bei  $4,95 \pm 1,93$ , für Gesunde bei  $5,38 \pm 1,75$ , der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen war statistisch nicht signifikant.

Die Citratsynthase-Werte (U/g NCP) waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (100 %) bei den ALS-Patienten auf 117,5 %, bei den neurogenen Kontrollen auf 140,5 % erhöht (statistisch signifikanter Unterschied verglichen mit Gesunden), die Differenz zwischen beiden letztgenannten Gruppen war statistisch minimal signifikant ( $p=0,046$ ). Die Citratsynthase-Werte in U/g Probe waren nur für die neurogenen Kontrollen signifikant erhöht, dies war jedoch bedingt durch den signifikant niedrigeren Proteingehalt der ALS-Muskelproben im Vergleich zu Gesunden.

Somit kommen histologisch nachweisbare Veränderungen der oxidativen Enzymaktivität ähnlich häufig bei den ALS-Patienten und anderen neurogenen Erkrankungen vor und sind als lokale Verminderung der Mitochondrienzahl in einzelnen Muskelfasern, bedingt durch chronische Denervation, bei insgesamt eher erhöhtem Mitochondriengehalt anzusehen. Die Gesamtmenge der mtDNA sowohl bei ALS-Patienten als auch bei anderen neurogenen Erkrankungen bleibt in ähnlicher Weise durch eine weitgehend unspezifische sekundäre kompensatorische Erhöhung der Mitochondrienzahl bei erniedrigtem mtDNA-Gehalt pro Mitochondrium erhalten.

Krasnianski, Anna: Mitochondriale Veränderungen in Muskelbiopsien bei amyotropher Lateralsklerose. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 55 Seiten, 2004

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Klinische Grundlagen der ALS	4
1.2. Histologische Muskelveränderungen bei ALS	4
1.3. Ätiologie und Pathogenese	6
1.3.1. Genetische Faktoren und oxidativer Stress	7
1.3.2. Exzitotoxizität	8
1.3.3. Aberrante Proteinaggregation	8
1.3.4. Mitochondriale Beteiligung bei ALS	9
1.3.5. Ziel der vorliegenden Arbeit	14
2. Patienten und Kontrollen	15
3. Methoden	16
3.1. Histologische Untersuchung zur Quantifizierung der Veränderungen der NADH- Aktivität in myohistologischen Präparaten	16
3.2. Molekulargenetische Untersuchung	16
3.2.1. DNA-Extraktion aus Muskelgewebe	16
3.2.2. Southern-Blot-Analyse zur Quantifizierung nukleärer/mitochondrialer DNA	16
3.3. Biochemische Untersuchung zur Bestimmung der Citratsynthaseaktivität in Muskelproben	23
4. Ergebnisse	24
4.1. Histologische Untersuchung	24
4.2. Molekulargenetische Untersuchung	26
4.3. Biochemische Untersuchung	32

5. Diskussion	36
5.1. Histologische Untersuchung	36
5.2. Molekulargenetische und biochemische Untersuchung	36
6. Schlussfolgerung	40
7. Zusammenfassung	41
8. Literaturverzeichnis	44
9. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	52
10. Liste der verwendeten Abkürzungen	53
11. Thesen	55

# 1. Einleitung

## 1.1. Klinische Grundlagen der ALS

Amyotrophe Lateralsklerose ist eine Motoneuronenerkrankung, die zur progressiven Degeneration der Vorderhornzellen des Rückenmarks (zweites Motoneuron) und der kortikalen Motoneurone (erstes Neuron) führt. Dies erklärt die klinische Symptomatik, die durch eine Kombination aus Muskelatrophie, Faszikulationen, Spastizität und Pyramidenbahnzeichen charakterisiert ist. Die Erstbeschreibung der ALS erfolgte durch Charcot im Jahr 1873.

Der Krankheitsverlauf ist unaufhaltsam progredient und die Prognose in der Regel bei einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von 2 bis 4 Jahren infaust, wobei die respiratorische Insuffizienz die häufigste Todesursache darstellt. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen 50 und 70 Jahren, der Häufigkeitsgipfel bei 60 Jahren, Männer sind ca. 1,6 mal häufiger betroffen als Frauen (Kurland et al., 1969). Die Inzidenz der Erkrankung liegt zwischen 0,6 bis 2,4 pro 100.000 Einwohner/Jahr, die Prävalenz beträgt ca. 3 - 8 pro 100.000 Einwohner (Yoshida et al., 1986; Emery, 1991).

Bei weniger als 10 % der Patienten tritt die ALS in Form einer familiären Erkrankung auf, die vorwiegend autosomal dominant vererbt wird (Mulder et al., 1986; Armon u. Kurland, 1990; Strong et al., 1991; Rabin et al. 1999), selten auch autosomal rezessiv (Ben Hamida et al., 1990). Über 90 % der ALS-Erkrankungen zeigen jedoch ein sporadisches Auftreten.

## 1.2. Histologische Muskelveränderungen bei ALS

Aufgrund des Fehlens spezifischer Befunde liefert die Muskelbiopsie keinen Beweis für die Verdachtsdiagnose ALS. Sie kann aber eine klinisch und elektrophysiologisch nicht nachweisbare Schädigung des zweiten motorischen Neurons beweisen und so zur Diagnosestellung beitragen.

Die histologische Untersuchung der Skelettmuskulatur zeigt einen chronisch-neurogenen Umbau mit Verlust der physiologischen schachbrettartigen Verteilung

der beiden histologischen Fasertypen durch Verminderung der Zahl der motorischen Einheiten. Betroffene Fasern erscheinen im Querschnitt angulär oder abgeflacht und weisen in einigen Fällen histochemisch sichtbare erhöhte oxidative Aktivität auf. Erhaltene Fasern sind häufig kompensatorisch hypertrophiert. Eine Vergrößerung der einzelnen motorischen Einheiten durch kollaterale Reinnervation der Muskelfasern wird enzymhistochemisch als Fasertypengruppierung und im weiteren Verlauf als gruppierte Faseratrophien sichtbar.

Manchmal kommen auch strukturelle Veränderungen wie Target-, Targetoid-, Core- und Core-like-Muskelfasern vor. Typische Cores (s. Abb. 1) sind rundliche Regionen im Zentrum von Typ I-Fasern, die deutlich reduzierte Aktivität der oxidativen Enzyme und somit verminderte Anzahl der Mitochondrien aufweisen. Sie kommen insbesondere bei Central Core Myopathie, aber auch bei anderen Erkrankungen, die mit Verminderung der Mitochondrienanzahl einhergehen, vor. Im NADH-Präparat erscheinen sie hell mit dunklem Rand, der einer Zone mit erhöhtem Gehalt an oxidativen Enzymen entspricht. Findet man nur eine fleckförmige Aufhellung ohne typischen Rand, so spricht man von „Core-like Lesions“ (Carpenter und Karpati, 1984).

Targets (s. Abb.2) sind Regionen mit irregulärem fokalem Fehlen der oxidativen Enzymaktivität. Sie kommen relativ häufig bei chronischen neurogenen Erkrankungen vor, bei der klassischen ALS sind sie dagegen eher selten. Klassische Targets erscheinen dreischichtig mit zentraler Aufhellung, intermediärer Zone der erhöhten oxidativen Enzymaktivität und hellem Rand. Fehlt die typische Dreischichtigkeit, so spricht man von „Target-like Lesions“ (Carpenter und Karpati, 1984). Sie sind bei seltenen strukturellen Myopathien ebenfalls anzutreffen und können experimentell durch Muskeldeneration hervorgerufen werden. Insbesondere bei Krankheitsverläufen von über 2 Jahren kommt es zu solchen sekundären myopathischen Veränderungen wie dem Entstehen von rundlichen atrophischen Muskelfasern, Vermehrung zentraler Kerne, Degeneration und Regeneration der Muskelfasern (Neudecker et al., 2000).

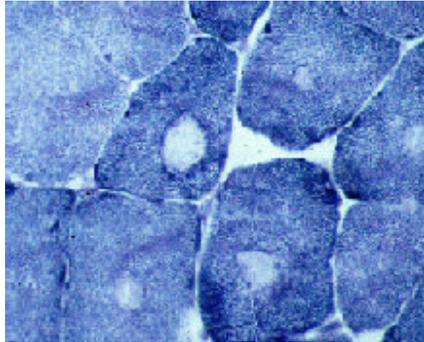


Abb.1: Core-Formationen in einer Gruppe von Muskelfasern. Man erkennt das helle Zentrum mit dunklem Rand (NADH-Färbung).

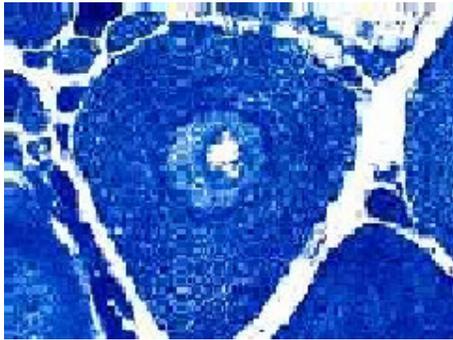


Abb.2: Target-Formation in einer Muskelfaser. Man erkennt die typische Dreischichtung mit hellem Zentrum, intermediärer Zone der erhöhten oxidativen Enzymaktivität und dunklem Rand (NADH-Färbung).

### 1.3. Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese der ALS sind immer noch weitgehend ungeklärt. Eine multifaktorielle Genese ist wahrscheinlich. Als Ursache wird das komplexe Zusammenspiel zwischen genetischen Faktoren, oxidativem Stress, Exzitotoxizität, aberranter Proteinaggregation und Organellschädigung (v.a. Mitochondrienschädigung) diskutiert.

### *1.3.1. Genetische Faktoren und oxidativer Stress*

Als ätiologischer Ansatz wurden bei ca. 20 % der Patienten mit autosomal dominanter familiärer ALS Punktmutationen im Gen der Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD 1) nachgewiesen (Rosen et al., 1993). Das SOD 1-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 21 lokalisiert. 2002 waren bereits über 90 Mutationen bekannt (Okado-Matsumoto und Fridovich, 2002). Diese Mutationen gelten als sichere Ursache der Erkrankung bei etwa 2 % aller ALS-Patienten (Radunovic und Leigh, 1996; Cudkowicz et al., 1997). Die Cu-Zn-SOD 1 ist ein Enzym, das zytotoxische freie Radikale entgiftet. Die Quantifizierung von freien Radikalen zeigte eine regionspezifisch gesteigerte Produktion von Sauerstoffradikalen im Rückenmark des Tiermodells, die mit der Expressionsrate der SOD 1-Mutation und der Progression des klinischen Phänotyps korrelierte (Liu et al., 1998).

Transgene Mäuse, deren Genom zusätzlich zu ihrem eigenen Cu-Zn-SOD-Gen mehrere Kopien des mutierten menschlichen SOD 1-Gens enthielten, entwickelten umso schneller eine schwere Motoneuronenerkrankung, je mehr Kopien des mutierten Gens inseriert wurden (Wong et al., 1995). Andererseits zeigten die sogenannten „Knock-out-Tiere“, bei denen das normale SOD 1-Gen entfernt wurde, keine Degeneration der Motoneurone. Daraus folgt, dass eher ein toxischer Funktionszuwachs als ein Funktionsverlust des mutierten Cu-Zn-SOD-Gens zur Degeneration der Motoneurone führt. Das Problem stellt somit die geringe Toleranz der Motoneurone gegenüber dem oxidativen Stress dar. Dies resultiert aus der Länge der Axone und dem langsamen axonalen Transport, der eine schnelle Elimination der beschädigten Makromoleküle verhindert.

Die vorliegenden Daten machen eine pathogenetische Beteiligung von freien Radikalen bei der fALS mit vorhandener SOD1-Mutation wahrscheinlich. Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass diese Veränderungen primär für die Ätiologie der Erkrankung verantwortlich sind.

Es bleibt allerdings unklar, ob die erwähnten Faktoren auch eine Rolle bei der sALS spielen und zu entsprechenden Veränderungen führen.

### 1.3.2. Exzitotoxizität

Der Begriff Exzitotoxizität bedeutet, dass neuronaler Zelltod durch eine prolongierte Aktivierung postsynaptischer Rezeptoren für exzitatorische Aminosäuren vom Typ des Glutamats verursacht sein kann.

Bei der sporadischen Form der ALS gibt es verschiedene Hinweise auf eine Störung der glutamatergen Neurotransmission (Rothstein et al., 1992, 1995; Beal et al., 1997). Die glutamatvermittelte Neuronenschädigung ist jedoch nicht nur ein Bestandteil der pathogenetischen Endstrecke bei der sporadischen und familiären ALS, sondern auch bei weiteren neurodegenerativen Erkrankungen. Das Gluamattransportprotein GLT 1 scheint aber bei ALS selektiv und spezifisch vermindert zu sein, so dass extrazellulär erhöhte Glutamatkonzentrationen aufgrund mangelnder Glutamataufnahme durch die Zellen resultieren und vermutlich zur Zellschädigung führen. Es wird angenommen, dass die metabolisch vorgeschädigten Neurone nicht mehr in der Lage sind, das Membranpotential aufrecht zu erhalten. Es kommt dadurch zum Öffnen der spannungsabhängigen Glutamatrezeptoren vom Typ NMDA und Kalziuminflux. Möglicherweise reicht bei diesen Neuronen somit eine viel geringere extrazelluläre Glutamatkonzentration aus, um die Mechanismen, die zum Zelltod führen, in Gang zu setzen (Ludolph et al., 2000).

Der Glutamatreisetzungsblocker Riluzol ist zur Zeit das einzige Medikament, das in zwei großen klinischen plazebokontrollierten und randomisierten Doppelblindstudien (Bensimon et al., 1994; Lacomblez et al., 1996) den Krankheitsverlauf verzögerte. Die mittlere Lebenszeitverlängerung betrug dabei jedoch nur etwa 3 Monate.

### 1.3.3. Aberrante Proteinaggregation

Sowohl bei fALS als auch bei sALS findet man zytoplasmatische Einschlüsse im Zellkörper sowie im proximalen Axon der Motoneurone, unter anderem in Form von disorganisierten Aggregaten von Neurofilamentproteinen (Wong et al., 1998). Es ist allerdings unklar, wie diese Aggregate entstehen und ob sie als Ursache oder eher als Folge der neuronalen Dysfunktion zu werten sind. Eine ätiologische Bedeutung der Mutationen in Neurofilament-Untereinheiten ist bei einer geringen Zahl der ALS-Patienten möglich (Julien et al., 2000). In über 90% der Motoneuroneinschlüsse bei ALS findet man Peripherin, das Intermediärfilament, das normalerweise in

autonomen Nerven und peripheren sensiblen Neuronen exprimiert wird und nur in niedrigen Konzentrationen in spinalen Motoneuronen vorkommt. In Abwesenheit der NF-L-Untereinheit, einer von 3 Einheiten der Neurofilamentproteine, führt die Interaktion zwischen Peripherin und einer der beiden anderen Untereinheiten (NF-H oder NF-M) zur Desorganisation des Zytoskelets und Proteinaggregation. Überexpression von Peripherin im transgenen Mausmodell bei relativem NF-L-Mangel, der auch in den Motoneuronen von ALS-Patienten beobachtet wurde (ca. 60%-ige Reduktion, Bergeron et al., 1994), führte zum selektiven Untergang der Motoneurone mit spätem Erkrankungsbeginn (Beaulieu et al., 1999).

#### *1.3.4. Mitochondriale Beteiligung bei ALS*

Mitochondrien sind Zellorganellen, die für die Energieversorgung der Zellen durch oxidative Phosphorylierung verantwortlich sind. Diese findet in Eukaryontenzellen ausschließlich in den Mitochondrien statt.

Die Mitochondrien haben eine eigene Erbsubstanz. Das mitochondriale Genom des Menschen wurde 1981 charakterisiert und sequenziert (Anderson et al., 1981). Die mtDNA ist ein ringförmiger Doppelstrang aus 16569 Basenpaaren (s. Abb. 3). Dieser kodiert 13 Peptiduntereinheiten, die Bestandteile der Atmungskettenkomplexe sind, 22 tRNAs und 2rRNAs. In kernhaltigen und aeroben kernlosen Zellen gibt es Tausende von Kopien der mtDNA mit etwa 5 mtDNAs pro Organelle (Schon und Manfredi, 2003). Bei einem gesunden Individuum sind alle Kopien der mtDNA identisch, was als Homoplasmie bezeichnet wird (Monnat u. Loeb, 1985). Bei einem Patienten mit mitochondrialer Myopathie findet man neben der Wildtyp-DNA mutierte mtDNA, deren Anteil in verschiedenen Geweben und Individuen unterschiedlich sein kann, was als Heteroplasmie bezeichnet wird.

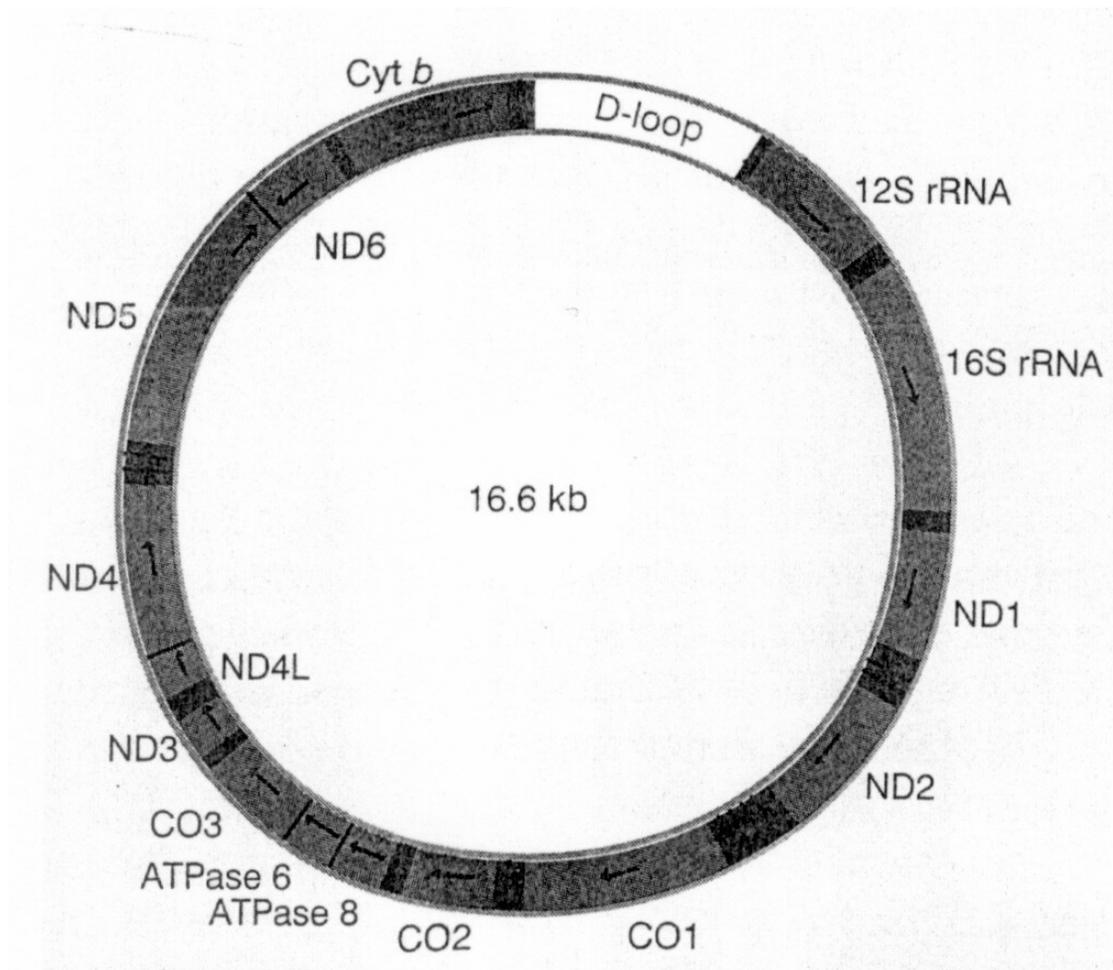


Abb. 3: Mitochondriale DNA des Menschen

CO: Cytochrom-Oxidase  
 ND: NADH-Dehydrogenase  
 ->: Richtung der Gene, von 5' nach 3'  
 Schwarz: tRNA-Gene  
 Grau: kodierende Regionen

Die mtDNA wird maternal vererbt, so dass mitochondriale Erkrankungen durch Veränderungen der mtDNA einen maternalen Vererbungsmodus zeigen. Da einige Komponenten der Atmungskette sowie gewisse mitochondriale Strukturproteine im Zellkern kodiert sind, können Mutationen dieser Gene auch zu autosomal vererbten Mitochondrialerkrankungen führen. Die Erkrankungen, die mit Mutationen der mtDNA assoziiert sind, sind typischerweise klinisch heterogen und nicht selten multisystemisch. Da Gehirn und Skelettmuskel stark energieabhängige Gewebe sind,

ist es nicht verwunderlich, dass viele mitochondriale Erkrankungen Enzephalomyopathien sind.

Mitochondriale Erkrankungen können durch Punktmutationen, aber auch durch Deletionen (Holt et al., 1988; Moraes et al., 1989) oder Depletion (Mangel an mtDNA, Moraes et al., 1991) der mtDNA bedingt sein. Bei den Deletionen muß man zwischen singulären und multiplen Deletionen unterscheiden. Singuläre Deletionen treten meist sporadisch auf, während multiple Deletionen autosomal vererbt werden und durch verschiedene Defekte in nukleären Genen bedingt sind (Deschauer et al., 2001; Deschauer und Zierz, 2003).

Eine mitochondriale Erkrankung aufgrund von mtDNA-Depletion ist eine Mitochondriopathie, die nicht durch qualitative, sondern durch quantitative DNA-Veränderung bedingt ist. Erstmals wurde dieses Depletionssyndrom bei vier Säuglingen beschrieben, die Muskelschwäche, Hypotonie, Herzinsuffizienz, progressive externe Ophthalmoplegie, Laktatazidose, Leberinsuffizienz und epileptische Anfälle in variablen Kombinationen aufwiesen und früh verstarben (Moraes et al. 1991). Die Depletion wurde mit variabler Expression nur in klinisch betroffenen Geweben wie Muskel, Niere, Leber, Gehirn und Fibroblasten nachgewiesen, die mit nachweisbarem Atmungskettendefekt und Mangel an mitochondrial kodierten Proteinen korrelierte.

Diese Art der mitochondrialen Erkrankungen ist jedoch sehr selten. So wurden zwischen 1991 und 2001 lediglich 46 Fälle beschrieben, wobei es sich vorwiegend um Kinder im ersten Lebensjahr handelte. Die Menge an noch vorhandener mtDNA variierte bei diesen Patienten zwischen 1 % und 61 % (Barthélémy et al., 2001). Aufgrund von fehlendem Nachweis der mtDNA-Mutationen bei betroffenen Personen und nachgewiesenem autosomal rezessivem Erbgang bei einigen Familien wurde vermutet, dass das Gen bzw. die Gene, die für diese Erkrankung verantwortlich sind, im Zellkern kodiert sind (Campos et al., 1998).

So konnte als Ursache des autosomal rezessiv vererbaren MNGIE-Syndroms (mitochondriale neurogastrointestinale Enzephalomyopathie), bei dem nicht nur multiple Deletionen, sondern auch eine Depletion der mtDNA nachgewiesen wurde, Mutationen im Thymidin-Phosphorylase-Gen gefunden werden (Nishino et al., 1999).

Mutationen der mtDNA sollen eine Rolle bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen spielen. Als Beispiele sind M. Parkinson (Schapira et al., 1990), Huntington- und Alzheimer-Erkrankung (Parker, 1991), Rett-Syndrom und sogar Alterungsprozesse (Trounce et al., 1989) zu nennen.

Auch bei dem Tiermodell für die familiäre ALS (transgene Mäuse mit eingebautem mutiertem SOD 1-Gen) wurden vielfältige strukturelle mitochondriale Veränderungen wie dilatierte und dysorganisierte Cristae, Schädigungen der mitochondrialen Außenmembran, Schwellung und vakuoläre Degeneration der Mitochondrien beschrieben, die vermutlich zur mitochondrialen Energiedepression und langsamen Membrandepolarisation der Vorderhornzelle führen (Kong et al., 1998), welche im engen Zusammenhang mit Zellapoptose steht (Ankarcrona et al., 1995). Die vakuoläre Degeneration der Mitochondrien wurde auch von anderen Autoren beschrieben (DalCanto und Gurney, 1994; Wong et al., 1995). Diese Vakuolen wurden jedoch bei humaner ALS nicht gefunden, was Kong et al. dadurch erklären, dass diese Veränderungen lediglich in einem sehr frühen Erkrankungsstadium vorkommen, das beim Menschen aufgrund fehlender klinischer Symptomatik noch nicht erfasst wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Vorderhornneurone der Patienten mit sporadischer ALS Konglomerate aus abnormen Mitochondrien enthalten (Sasaki et al., 1996).

Die obengenannten Arbeiten bezogen sich auf deskriptive ultrastrukturelle Beobachtungen. Über die Kausalität der beobachteten Phänomene ließ sich daraus keine Aussage machen. Da in diesen Arbeiten keine Untersuchungen der mitochondrialen Enzyme bzw. der mtDNA durchgeführt wurden, blieb leider unklar, ob diese Veränderungen mit bestimmten Abnormalitäten des mitochondrialen Genoms assoziiert waren oder eher exogenen sekundären Schädigungen entsprachen.

Es wurden mitochondriale Abnormalitäten auch in anderen Geweben der ALS-Patienten gefunden, z.B. in den Leberbiopsien der Patienten mit sporadischer ALS (Masui et al., 1985; Nakano et al., 1987). Die Blutlymphozyten der ALS-Patienten zeigten eine erhöhte Calciumkonzentration im Zytosol und erniedrigte Sensibilität gegenüber den Hemmern der oxidativen Phosphorylierung (Curti et al., 1996).

Die Daten hinsichtlich der mitochondrialen Dysfunktion im Skelettmuskel der Patienten mit sporadischer ALS sind eher rar und kontrovers. Ein schweres COX-Defizit im Skelettmuskel des Patienten mit sporadischer ALS als Folge einer Mikrodeletion in der Untereinheit I der Cytochromoxidase wurde beobachtet (Comi et al., 1998). Es wurde von einem schweren Defizit der NADH-CoQ-Oxidoreductase in Muskelbiopsien von 14 Patienten mit sporadischer ALS berichtet (Wiedemann et al., 1998). Dagegen wurden in einer weiteren Arbeit (Echaniz-Laguna et al., 2002) keine signifikanten Abnormalitäten der mitochondrialen Enzyme bei Patienten im frühen ALS-Stadium im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen mit vergleichbarem Niveau der physischen Aktivität gefunden. Es wurde außerdem über dosisabhängige Lebenszeitverlängerung der transgenen Tiermodelle durch Kreatinphosphat, eine Speicherform der energiereichen Phosphatverbindungen, die möglicherweise die Energieversorgung der Neurone verbessert und dadurch neuroprotektiv wirken könnte, berichtet (Klivenyi et al., 1999).

Vielhaber et al. (2000) fanden spezifisch verminderten mtDNA-Gehalt (13 von 17 Patienten) bzw. multiple Deletionen der mtDNA (1 von 17 Patienten) im Skelettmuskel der Patienten mit sporadischer ALS.

Veränderungen der oxidativen Enzymaktivität durch lokale Verminderung der Mitochondrienzahl in myohistologischen Präparaten in Form von Cores und Targets wurden bereits unter 1.2. beschrieben.

All diese Befunde suggerierten zumindest eine sekundäre Beteiligung der Mitochondrien bei ALS.

Okado-Matsumoto und Fridovich (2002) versuchten, die zur Zeit bestehenden Hinweise für die pathogenetische Rolle von toxischen Proteinaggregaten, mitochondrialen Defekten, Apoptose, Exzitotoxizität und oxidativem Stress in einer einheitlichen Hypothese zusammenzufassen. Sie hatten mittels einer Zellkultur nachgewiesen, dass mutierte SOD 1 an Hitzeschockproteine bindet und zur Bildung von Aggregaten führt, während dieser Effekt bei Wildtyp-SOD 1 nicht vorhanden ist. Es kommt zur Hemmung der Aufnahme der mutierten SOD1 in die Mitochondrien, wobei die Hitzeschockproteine durch Aggregatbildung mit mutierter SOD 1 aus dem Zytosol titriert werden. Exzitotoxizität führt zum oxidativen Stress, der proapoptotisch

wirkt. Die antiapoptotischen Effekte bestimmter Hitzeschockproteine (Hsp 27, Hsp 70 und Hsp 90) wurden nachgewiesen (Garrido et al., 2001). Apoptoseinduzierender Faktor (AIF) und Hsp 70 existieren im intramembranösen Raum der Mitochondrien und ihre Bindung aneinander soll antiapoptotisch wirken (Ravagnan et al., 2001). Mutierte SOD 1, die auch im intramembranösen Raum der Mitochondrien existiert, konkurriert somit mit AIF um die Bindung an Hsp 70, was zur Erhöhung des freien AIF führt und die Konzentration an antiapoptotisch wirkendem freien Hsp erniedrigt. Die Autoren vermuten, dass auch mutierte Formen anderer neuronaler Proteine ähnlichen Effekt haben könnten und als Ursache für die zahlenmäßig überwiegenden fALS-Fälle ohne SOD 1-Mutation in Frage kämen. Auf diese Weise könnte die sporadische ALS durch neu aufgetretene Mutationen von praktisch jedem Protein verursacht werden, das intraneuronal in hoher Konzentration vorhanden ist. Dies korreliert gut mit dem Auftreten von neuronalen Proteinaggregaten, die sowohl bei fALS als auch bei sALS auftreten und nur bei fALS SOD 1 enthalten.

#### *1.3.5. Ziel der vorliegenden Arbeit.*

Zur Frage der Spezifität und Bedeutung der mitochondrialen Beteiligung bei ALS ist immer noch relativ wenig bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war nachzuweisen, ob die mtDNA bei einem Kollektiv der ALS-Patienten quantitativ vermindert war und ob diese Veränderungen, falls vorhanden, als ALS-spezifisch zu sehen sind oder auch bei anderen neurogenen Muskelerkrankungen zu finden sind. Die Aktivität der Citratsynthase als eines nukleär kodierten Enzyms, das in allen mitochondrienhaltigen Zellen ausschließlich intramitochondrial vorkommt und als mitochondriales Marker-Enzym geeignet ist, da dessen Aktivität proportional zum Mitochondriengehalt einer Muskelprobe ist und bis jetzt keine Mutationen dieses Enzyms bekannt sind, sollte die durch Southern Blot gewonnenen Ergebnisse vervollständigen. Die histologischen Muskelveränderungen in Form von Cores und Targets als Hinweise auf veränderte Aktivität der oxidativen Enzyme sollten quantifiziert werden. Die Arbeit kann zum besseren Verständnis der Ätiologie und Pathogenese der ALS beitragen.

## 2. Patienten und Kontrollen

Es wurde die DNA aus Muskelproben von 21 Patienten mit einer ALS-charakteristischen Kombination von Symptomatik seitens des ersten und zweiten Motoneurons, progredientem Verlauf, typischen elektrophysiologischen Befunden sowie neurogenen Veränderungen in der Muskelbiopsie untersucht. Das Alter betrug 43-80 Jahre (mittleres Alter 59,7 Jahre; 14 männliche, 8 weibliche Patienten, s. Tab. 4). Als Vergleichsproben wurde die DNA aus dem Muskelgewebe von 23 Patienten mit anderen neurogenen Muskelerkrankungen (s. Tab. 5) im Alter von 36-76 Jahren (mittleres Alter 56,1 Jahre, 17 männliche, 6 weibliche Patienten) benutzt. Die Diagnosen umfassten 5 Patienten mit spinaler Muskelatrophie, 8 Patienten mit Polyneuropathie, welche bei 6 Patienten unklarer Genese und jeweils bei 1 Patienten äthyloxisch bzw. vaskulitisch bedingt war, 2 Patienten mit hereditärer motorischer und sensibler Neuropathie (Typ I und II), 2 Patienten mit multifokaler motorischer Neuropathie, 3 Patienten mit chronisch-inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie, 2 Patienten mit zervikaler bzw. thorakolumbaler Myelopathie und 1 Patienten mit engem lumbalem Spinalkanal.

Als weitere Kontrollen dienten 21 gesunde Personen (mittleres Alter 47,6 Jahre, 12 männliche, 9 weibliche Patienten, s. Tabelle 7) mit Myalgien in der Anamnese oder Paresen von wechselndem Grad und Lokalisation, die sowohl klinisch-neurologisch als auch elektrophysiologisch, histologisch und laborchemisch keine Muskelerkrankung aufwiesen. Außerdem wurde die DNA von 5 Patienten mit verschiedenen mitochondrialen Myopathien im Alter von 36, 45, 60 und 61 Jahren, 4 FSHD-Patienten mit molekulargenetisch bestätigter Diagnose im Alter von 16, 34, 40 und 51 Jahren sowie 4 Patienten mit klinisch und histologisch typischer Polymyositis im Alter von 15, 51, 75 und 77 Jahren untersucht (s. Tab. 6). Die Muskelproben (M. deltoideus, M. biceps brachii, M. tibialis anterior oder M. vastus lateralis) stammten vorwiegend aus dem Muskellabor der Neurologischen Klinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie aus dem Muskellabor der Neurologischen Klinik der Universität Hamburg. Kurz nach der Entnahme durch eine Muskelbiopsie wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3. Methoden

#### **3.1. Histologische Untersuchung zur Quantifizierung der Veränderungen der NADH-Aktivität in myohistologischen Präparaten**

Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 8 µm angefertigt, 1-3 Tage luftgetrocknet und danach 45 min in NADH-Lösung (0,2 M Trispuffer; pH 7,5; 1,22mM Nitroblau-Tetrazoliumchlorid; 1,13 mM NADH) bei 37°C inkubiert. Die Präparate wurden dann in Aqua dest. gewaschen und mit KAISERS Glyceringelatine (Fa. Merck) eingedeckt.

In jeweils 500 Muskelfasern pro histologisches Präparat wurden lichtmikroskopisch bei fünfundzwanzigfacher Vergrößerung Cores, Targets, „Core-like“ und „Target-like Lesions“ ausgezählt.

#### **3.2. Molekulargenetische Untersuchung**

##### *3.2.1. DNA-Extraktion aus Muskelgewebe*

Die DNA wurde aus 25 mg Muskel mit Qiamp DNA Minikit (Fa. Qiagen) extrahiert und die DNA-Konzentration bei einer Verdünnung von 1:25 (20 µl DNA : 480 µl Aqua dest) mit einem DU 650 Spektrophotometer (Fa. Beckmann, USA) bei 260 nm im UV-Licht gemessen.

##### *3.2.2. Southern-Blot-Analyse zur Quantifizierung mitochondrialer/ nukleärer DNA*

Es wurde eine Bestimmung des Verhältnisses der mitochondrialen DNA zur Kern-DNA mittels Markierung des 18S rRNA-Gens der Kern-DNA und des 16S rRNA-Gens der mtDNA durchgeführt. Die Detektion der spezifischen DNA-Fragmente erfolgte in Anlehnung an die Methode von Southern (1975).

Zuerst wurde die DNA gereinigt und konzentriert. Dazu wurde zu 3,5 µg Patienten-DNA äquivalentes Volumen an eiskaltem Isopropanol und 1/5 des DNA- bzw. Isopropanol-Volumens an eiskaltem 3 M Natriumacetat zugegeben (z.B. 70 µl DNA, c= 50 ng/µl, 70 µl Äthanol und 14 µl Natriumacetat). Diese Mischung wurde für 30 min bei -20°C gelagert und 20 min bei 4°C bei 14000 rpm zentrifugiert. Dadurch

wurde die DNA präzipitiert. Der Überstand wurde abgezogen und die DNA in 200 µl eiskaltem 70% Äthanol gereinigt. Nach erneutem Zentrifugieren (10 min bei 4°C) wurde der Überstand wieder abgezogen, die so gereinigten DNA-Proben ca. 30 min an der Luft getrocknet und in 20,5 µl Aqua dest. gelöst. Jede Probe wurde eine Stunde bei 37°C mit 2,5 µl Restriktionspuffer B und 2 µl Restriktionsenzym BamH I (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) inkubiert und dadurch gespalten. BamH I spaltet mtDNA an Position 14258 bp (Anderson et al, 1981) und linearisiert die ringförmige DNA in ein 16,5 kb-Fragment. Aus dem 18S rRNA-Gen wird durch Spaltung mit BamH I an Position 4244 und 9346 bp ein Fragment von 5102 bp herausgeschnitten.

Die erhaltenen 25 µl-Proben wurden mit 5µl Auftragspuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau; 50 % Saccharose; 50 mM EDTA) gemischt und in einem horizontalen 0,8 % Agarose-Gel elektrophoretisch bei 30 V für ca. 20 Stunden aufgetrennt. Als Längenstandards dienten Marker X und Marker II (Fa. Roche). Als Laufpuffer wurde TAE (40 mM Tris/Acetat; 1 mM EDTA; pH 8,5) verwendet.

Das Gel wurde 15 min mit 0,25 M HCl gewaschen. Dadurch wurde die DNA partiell hydrolysiert und eine Dehydratation des Gels, die den Transfer der DNA behindert hätte, verhindert (Wahl et al. 1979). Anschließend wurde das Gel 2 X 15 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) und 30 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,5) gewaschen.

Eine Wanne wurde mit 20 X SSC-Transferpuffer (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0) gefüllt, eine Glasplatte auf der Wanne platziert und ein langes Stück Whatman-Papier so auf die Glasplatte gelegt, dass die beiden Enden des Papiers sich in dem Transferpuffer befanden. Das Gel wurde mit den Taschenöffnungen nach unten aufgelegt, mit einer 80°C heißen Glasrolle festgedrückt und luftblasenfrei mit einem genauso großen Stück einer Nylon-Membran (Hybond TM-N-Membran, Fa. Amersham Life Science Inc.) sowie 3 Schichten Whatman-Papier bedeckt. 10 cm Zellstofftücher, die mit einem 500 g-Gewicht beschwert wurden, dienten durch ihre Sogwirkung als Vehikel für den ca. 18 Stunden dauernden Kapillärtransfer der DNA (s. Abb. 4) Am nächsten Tag wurde die Membran 2 Stunden bei 80°C getrocknet.

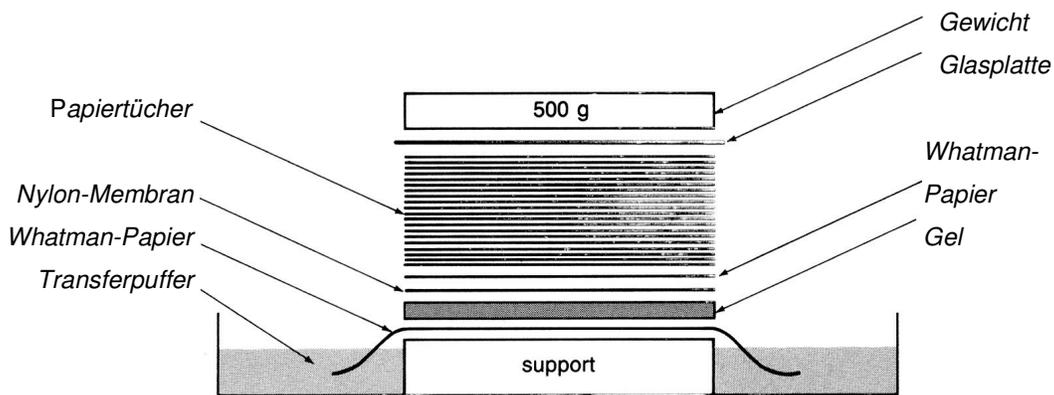


Abb. 4: Kapillärtransfer der DNA von Agarosegel auf Nylon-Membran (nach Sambrook et al., 1989). Support: Glasplatte

Als Hybridisierungssonden werden mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente bezeichnet, die sich nach dem Komplementaritätsprinzip an eine bestimmte Region der Ziel-DNA binden.

Beide Sonden wurden bereits während der PCR mit Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridin-5'-triphosphat (DIG) entsprechend der Beschreibung im PCR DIG Probe Synthesis Kit (Fa. Roche) markiert, um sie später mittels Chemolumineszenz sichtbar machen zu können.

Die 18S rRNA-Sonde war ein Amplifikationsprodukt von 348 bp (Nukleotidposition 5002 bis 5349). Die 16S rRNA-Sonde war ein Amplifikationsprodukt von 398 bp (Nukleotidposition 2199 bis 2596). Es ist zu beachten, dass die PCR-Produkte durch DIG-Markierung bei der Elektrophorese um etwa 100 bp länger erscheinen. Zur Kontrolle der PCR-Reaktion wurden jeweils 5 µl der Amplifikatprodukte mit 1 µl Auftragspuffer gemischt und in einem horizontalen 2 % Agarosegel elektrophoretisch bei 120 V für eine Stunde aufgetrennt (s. Abb. 5). Als Längenstandard diente der 100 bp Marker (Fa. Roche). Um die DNA im UV-Licht sichtbar machen zu können, wurde das Gel für 15 min in eine Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) gelegt. Unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm wurde das Gel mit einer Polaroidkamera photographiert.

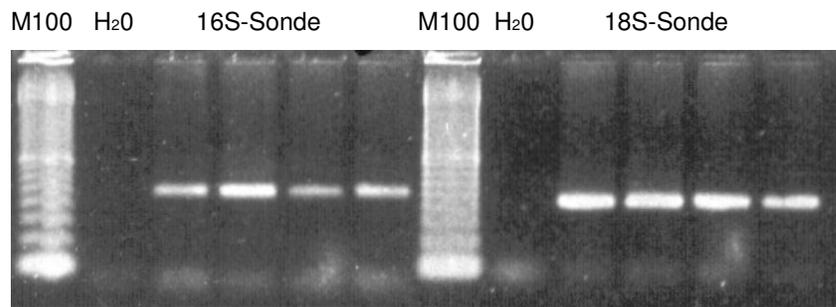


Abb. 5: 2% Agarosegel mit Amplifikaten der 16S rRNA- und 18S rRNA-Sonde  
M 100: 100 bp-Marker

Die Primersequenzen und PCR-Bedingungen wurden freundlicherweise von Dr. R. Scheubel (Klinik für Herz–Thorax-Chirurgie der Martin–Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. Die Primer wurden durch Fa. MWG-Biotech AG hergestellt.

Tab. 1: Primer

Primer	Nukleotidsequenz	Nukleotidposition
18S rRNA-F	3´ TTGGTGGAGCGATTTGTCTGG 5´	5002-5023
18S rRNA-R	5´ AGGGCAGGGACTTAATCAACGC 3´	5349-5328
16S rRNA-F	3´ AAGCGTTCAAGCTCAACACC 5´	2199-2218
16S rRNA-R	5´ CTACCTTTGCACGGTTAGGG 3´	2596-2577

PCR-Ansatz:

- 1 µl DNA (von gesunden Kontrollen)
- 2 µl Primer 18S rRNA-F bzw. 16S rRNA-R
- 2 µl Primer 18S rRNA-R bzw. 16S rRNA-R
- 5 µl 10 X PCR-Puffer mit Magnesiumchlorid (15 mM)
- 5 µl PCR DIG Labeling Mix
- 0,75 µl Enzymmix
- Aqua dest. ad 50 µl

In einem Thermocycler (Geneamp PCR System 2400, Perkin Elmer Corporation, Norwalk, USA) wurden 30 Zyklen bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung: 95 °C für 30 Sekunden  
Annealing: 60 °C für 30 Sekunden  
Elongation: 72 °C für 40 Sekunden

Auch die Marker II und X wurden vor der Elektrophorese über 20 Stunden mit einem DIG DNA Labeling Kit (Fa. Roche) laut Gebrauchsanweisung DIG-gelabelt.

Die Membran wurde bei 50 °C im Ofen für ca. 45 min in 25 ml vorgewärmter Prähybridisierungslösung bewegt, dann wurde die Prähybridisierungslösung entfernt. Die Mischung aus beiden Hybridisierungssonden, Marker II und Marker X wurde vor Zugabe zur Hybridisierungslösung 5 min bei 98 °C denaturiert und 3 min auf Eis abgekühlt. Als Prähybridierungs- und Hybridisierungslösung diente Dig Easy Hyb (Fa. Roche). Die Membran wurde bei 50 °C mit 70 µl des 18S rRNA-Amplifikats, 60 µl des 16S rRNA-Amplifikats, 1,5 µl Marker X und 2,5 µl Marker II (Fa. Roche) für 16 Stunden hybridisiert.

Die Detektion beruhte auf dem Prinzip der Chemolumineszenz unter Ausnutzung der Antigen-Antikörper-Reaktion. Dies bedeutet, dass spezifische Antikörper (hier Anti-DIG-POD-Antikörper), die mit einem Farbstoff gekoppelt sind, nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an bestimmte Antigene (hier DIG-gelabelte RNA-Sonden und Marker) binden und diese mittels Schwärzung des Röntgenfilms durch Lumineszenz des Farbstoffs sichtbar machen.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran 2 X 5 min mit 150 ml Waschlösung α (2 X SSC; 0,1% SDS) bei Raumtemperatur und 2 X 15 min mit vorgewärmter Waschlösung γ (0,1 SSC; 0,1 % SDS) bei 68 °C im Ofen geschüttelt (nachfolgende Schritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt). Dann wurde die Membran 2 min in 150 ml 1 X Waschpuffer und 30 min in 150 ml 1 X Blockpuffer (beide aus dem DIG Wasch und Block Puffer Set, Fa. Roche; Arbeitslösungen wurden entsprechend der Gebrauchsanweisung hergestellt) gewaschen. Als nächstes wurde die Membran mit 150 ml Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-POD, Fab-Fragmente, Fa. Roche; 1:1000 mit 1 X Blockpuffer verdünnt) inkubiert und 2 X 15 min mit 1 X Waschpuffer gewaschen. Dann wurde die Membran kurz mit Kleenex-Papiertüchern abgetupft und sofort ECL-Lösung (Amersham Pharmacia Biotech; Lösung 1 u Lösung 2 1:2 gemischt, jeweils ca. 4ml/100 cm<sup>2</sup> Membran) mit einer Pipette aufgetragen und nach

1 min mit Kleenex-Tüchern entfernt. Die Membran wurde in eine Frischhaltefolie eingewickelt, in eine Kodak-Röntgenkassette gelegt und ein Röntgenfilm (Hyperfilm, Fa. Amersham Pharmacia Biotech) ca. 10 min belichtet.

Auf dem resultierenden Röntgenbild (s. Abb. 6) wurde dann eine Hybridisierungsbande in Höhe von ca. 16,5 kb sichtbar, die der gesamten Menge an mtDNA entsprach. Die nukleäre DNA war bei ca. 5 kb zu sehen.

Je nach Verfügbarkeit des Materials wurden einige DNA-Proben 2- bis 3-fach auf verschiedenen Blots aufgetragen und die entsprechenden mtDNA/Kern-DNA-Quotienten bestimmt.

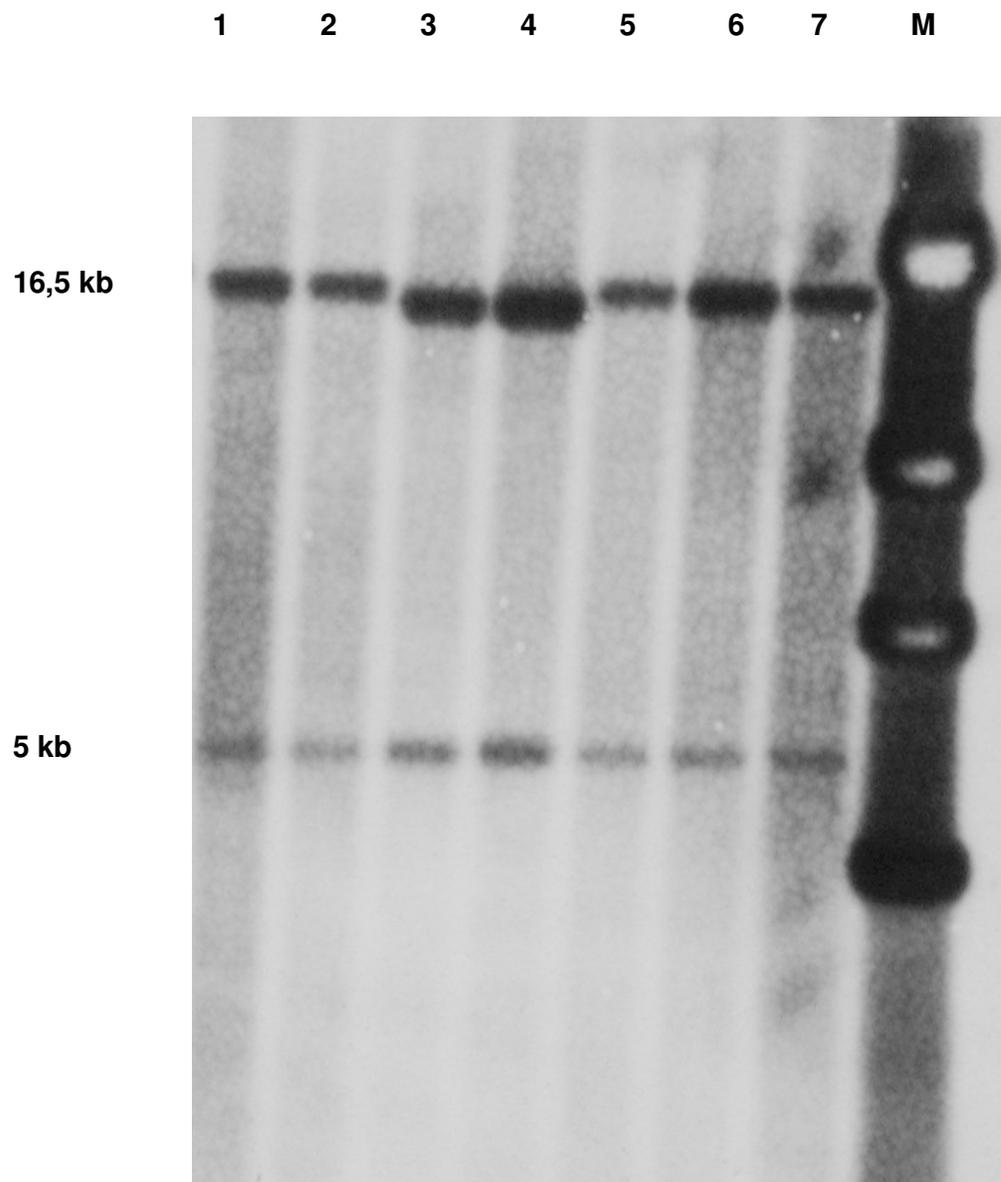


Abb. 6: Southern Blot mit mtDNA (16,5 kb) und Kern-DNA (5 kb) nach Detektion

- 1. Nr. 3 G: gesunde Kontrolle
- 2. Nr. 11 N: SMA
- 3. Nr. 12 N: HSMN II
- 4. Nr. 19 A: ALS
- 5. Nr. 8 A: ALS
- 6. Nr. 3 A: ALS
- 7. Nr. 7 A: ALS
- M: Marker X

Quantitative Analyse der Intensität der Hybridisierungsbanden wurde mit Image Quant Software (Fa. Molecular Dynamics) durchgeführt. Für jede untersuchte Patientenprobe wurde ein Quotient aus der Intensität der oberen Hybridisierungsbande, die der mtDNA entspricht, und der unteren Hybridisierungsbande, welche die nukleäre DNA darstellt, gebildet.

### **3.3. Biochemische Untersuchung zur Bestimmung der Citratsynthaseaktivität in Muskelproben**

Jeweils ein kleines Stück des gefrorenen Muskels (1/30 Gewicht pro Volumen) wurde in der Homogenisierungslösung (50 mM Trispuffer; pH 7,5; 100 mMol KCl; 5 mM Magnesiumchlorid; 1mM EDTA) mittels einem Glas/Glas Homogenisierer (Kontes Glass Co., Vineland, New Jersey, 2 ml, 0,025 mm Clearance) behandelt. Die Citratsynthaseaktivität des Homogenats wurde bei 30°C in Anlehnung an die Methode von Sheperd und Garland (1969) spektrophotometrisch mit einem DU 650-Photometer (Fa. Beckman, USA) gemessen.

#### ***Reaktionsprinzip: Acetyl-CoA + Oxalacetat → Citrat + CoA → CoA + DTNB***

Der Reaktionsansatz enthielt bei 20 µl Homogenat 890 µl Tris-HCl-Puffer/Mannitol, pH 7,4 (50 mM Tris-HCl, pH 7,4 (Fa. Sigma); 200 mM Mannitol), 20 µl 5 % Tritonlösung (Fa. Ferak), 10 µl DTNB (10 mM in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, Fa. Sigma) und 50 µl 2 mM Acetyl-CoA (Fa. Calbiochem). Die Reaktion wurde nach 10 min Inkubation durch Zugabe von 10 µl Oxalacetat (50 mM, Fa. Sigma) gestartet.

Das lineare Verhältnis der Citratsynthaseaktivität zu dem im Southern Blot bestimmten Quotienten aus mtDNA und Kern-DNA wurde mit SigmaPlot 2000 Software (Fa. SPSS Inc.) ermittelt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Histologische Untersuchung

Die Targets waren sowohl in Muskelpräparaten der ALS-Patienten (jeweils 1 Target pro 500 Muskelfasern bei nur 2 von 21 ALS-Patienten) als auch der neurogenen Kontrollen (1 Target pro 500 Muskelfasern bei 1 von 23 Patienten; PNP als Diagnose) nur selten zu finden. Jeweils 1 „Target-like Lesion“ pro 500 Muskelfasern war bei 3 Kontrollpatienten mit neurogenen Erkrankungen vorhanden (2 Patienten mit PNP und 1 Patient mit thorakolumbaler Myelopathie). Unter ALS-Patienten zeigten 2 Patienten jeweils 2 solcher Läsionen pro 500 Fasern.

Dagegen waren Cores und „Core-like Lesions“ bei beiden Patientengruppen häufiger anzutreffen. Cores fanden sich bei 8 von 21 ALS-Patienten, wobei die Anzahl der Veränderungen zwischen 1 und 8 pro 500 Fasern bei 7 von 8 dieser Patienten schwankte. Ein Patient mit deutlich stärker ausgeprägten Atrophien hatte 59 Cores pro 500 Fasern. Der Mittelwert für ALS-Patienten lag bei 3,81 unter Einbeziehung von allen 21 Patienten bzw. bei 1,05 ohne den obengenannten Patienten. Für 7 betroffene Patienten lag der Mittelwert bei 3, unter Berücksichtigung des bereits erwähnten Patienten mit stärkeren Atrophien bei 10. Die Muskelpräparate von 7 der 23 neurogenen Kontrollen zeigten 1 bis 8 Cores pro 500 Fasern, der Mittelwert betrug 0,96 bei allen 23 Patienten bzw. 2,75 bei 8 betroffenen Patienten. 1 bis 26 „Core-like Lesions“ waren bei 14 der ALS-Patienten zu finden, der Patient mit stärkeren Atrophien hatte 43 dieser Veränderungen pro 500 Fasern. Der Mittelwert bei 20 von 21 ALS-Patienten lag bei 5,05, für alle 21 bei 6,86. Für 14 bzw. 15 Patienten, die entsprechende histologische Veränderungen aufwiesen, lag der Mittelwert bei 7,14 bzw. 9,53. 14 der 23 Kontrollpersonen mit anderen neurogenen Erkrankungen zeigten jeweils 1 bis 29 „Core-like Lesions“, der Mittelwert für die gesamte Gruppe lag bei 4,83. Betroffene Patienten zeigten durchschnittlich 7,93 dieser Veränderungen (s. Tab. 2).

Tab. 2: Quantitativer Vergleich der histologischen Veränderungen bei ALS-Patienten und Patienten mit anderen neurogenen Muskelerkrankungen

Patienten	Anzahl pro 500 Fasern (Mittellw.±SD)			
	Cores	Targets	Core-like Lesions	Target-like Lesions
ALS-Patienten 20/21	1,05±2,14	0,1±0,3	5,05±7,63	0,19±1,20
21/21*	3,81*±12,82*		6,86*±22,26*	
ALS-Patienten (mit Cores, Targets, Core- like o. Target-like Le- sions )	3±2,77 (n=7) 0* ±19,96* (n=8)	1±0 (n=2)	7,21±8,26 (n=14) 9,6*±12,19* (n=15)	2±0 (n=2)
Range	1-7 1-59*	-	1-26 1-43*	1-2
Neurogene Kontrollen 23/23	0,96±1,94	0,04±0,21	4,83±8,15	0,13±0,34
Neurogene Kontrollen (mit Cores, Targets, Core-Like o. Target-like Lesions)	2,75±2,49 (n=8)	1 (n=1)	7,93±9,27 (n=14)	1±0 (n=3)
Range	1-8	-	1-29	-

\* Einschließlich des Pat. mit 59 Cores und 43 Core-like Lesions/500 Fasern

## 4.2. Molekulargenetische Untersuchung

Die mtDNA/Kern-DNA-Quotienten lagen bei den 21 ALS-Patienten zwischen 2,66 und 10,12, im Durchschnitt bei  $5,07 \pm 2,08$  (s. Tab. 4). In der Gruppe aus 23 Patienten mit anderen neurogenen Erkrankungen lagen die einzelnen Quotienten zwischen 2,05 und 8,61, der Mittelwert bei  $4,95 \pm 1,93$  (s. Tab. 5). Für 21 gesunde Kontrollpersonen betrug der mtDNA/Kern-DNA-Quotient 2,48 bis 8,58, der Mittelwert war  $5,38 \pm 1,75$  (s. Tab. 7).

5 Patienten mit mitochondrialen Myopathien zeigten Werte von 3,41 bis 6,68. Für 4 FSHD-Patienten lagen die Werte bei 2,68 bis 7,75, für 4 Polymyositis-Patienten bei 2,60 bis 9,00 (s. Tab. 6).

Der statistische Unterschied zwischen den mtDNA/Kern-DNA-Quotienten der 3 Gruppen (ALS-Patienten, neurogene Kontrollen, gesunde Kontrollen) wurde mittels Student t-Test bestimmt. Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt. Der Wert für ALS-Patienten versus neurogene Kontrollen war  $p=0,843$ , für ALS-Patienten versus gesunde Kontrollpersonen  $p=0,602$ . Somit lag der p-Wert deutlich oberhalb der statistisch signifikanten Differenz von  $p < 0,05$ .

Die mehrfachen Messungen ( $n=24$ ) auf verschiedenen Blots ergaben eine unsystematische Schwankung der mtDNA-Kern-DNA-Quotienten von  $19,8 \pm 8,3\%$  (s. Tabelle 3), wobei die einzelnen Werte für 23 Messungen zwischen 5,4 und 29,6% schwankten und nur eine Messung den Wert von  $> 30\%$  (39,4%) ergab.

Tab.3: Variabilität der mtDNA/Kern-DNA-Quotienten bei wiederholten Messungen in unselektierten Biopsien von ALS-Patienten, neurogenen Kontrollen und gesunden Kontrollpersonen

Patient	Messung1	Messung2	Messung3	Diff.1(%)	Diff.2(%)	Mittelwert± SD
Nr. 1 G	9,77	7,38	-	24,5 (↓)	-	-
Nr. 2 G	3,87	4,78	-	23,7 (↑)	-	-
Nr. 3 G	5,19	4,76	-	8,4 (↓)	-	-
Nr. 4 G	4,27	5,09	-	19,2 (↑)	-	-
Nr. 5 G	5,37	5,92	-	10,2 (↑)	-	-
Nr. 6 G	3,61	3,06	-	15,3 (↓)	-	-
Nr. 7 G	6,91	8,27	-	19,7 (↑)	-	-
Nr. 8 G	6,28	7,43	-	18,5 (↑)	-	-
Nr. 9 G	6,29	4,80	-	23,7 (↓)	-	-
Nr. 10 G	6,83	5,80	-	15,2 (↓)	-	-
Nr. 11 N	5,75	5,25	6,72	8,7 (↓)	16,9 (↑)	5,91±1,08
Nr. 13 N	7,18	5,05	-	29,6 (↓)	-	-
Nr. 15 N	3,44	4,35	-	26,6 (↑)	-	-
Nr. 21 N	6,83	5,34	7,40	21,7 (↓)	8,3 (↑)	6,52±1,06
Nr. 3 A	4,04	5,10	-	26,2 (↑)	-	-
Nr. 6 A	10,76	8,26	11,34	23,2 (↓)	5,4 (↑)	10,12±1,64
Nr. 7 A	6,56	4,74	-	27,8 (↓)	-	-
Nr. 8 A	3,255	3,64	-	11,9 (↑)	-	-
Nr. 17 A	5,534	3,35	6,86	39,4 (↓)	23,9 (↑)	5,25±1,77
Nr. 19 A	7,152	5,15	-	27,9 (↓)	-	-
Mittelwert±	5,95±1,98	5,38±1,46	-	21,1±1,5	-	-
SD	-	-	-	19,8 ± 8,3*	-	-

Diff. 1: Differenz zwischen Messung 1 und Messung 2 (in %)

Diff. 2: Differenz zwischen Messung 1 und Messung 3 (in %)

(↑): Zunahme

(↓): Abnahme

A: ALS

N: neurogene Kontrolle

G: Gesunde

\*: Mittelwert und SD für Diff. 1 und Diff. 2 zusammen

Tab. 4: Histologische Veränderungen und mtDNA/Kern-DNA-Quotient bei ALS-Patienten

Patient	Alter	Sex	Core	Target	Core-like Lesion	Target-like Lesion	mtDNA/Kern-DNA
Nr. 1 A	72	m.	-	-	6	-	3,05
Nr. 2 A	66	m.	-	-	1	-	2,70
Nr. 3 A	46	w.	7	-	4	2	4,57
Nr. 4 A	58	m.	-	-	4	-	3,68
Nr. 5 A	63	w.	2	-	9	-	2,96
Nr. 6 A	66	m.	-	1	4	-	8,26
Nr. 7 A	64	m.	59	-	43	-	5,65
Nr. 8 A	52	m.	-	-	-	-	3,45
Nr. 9 A	53	m.	1	1	7	-	5,09
Nr. 10 A	61	m.	-	-	-	-	3,91
Nr. 11 A	57	m.	2	-	1	-	4,72
Nr. 12 A	59	w.	1	-	26	-	3,32
Nr. 13 A	53	m.	-	-	-	-	5,47
Nr. 14 A	69	w.	-	-	-	-	8,33
Nr. 15 A	80	w.	1	-	12	2	2,66
Nr. 16 A	62	m.	-	-	1	-	6,51
Nr. 17 A	57	w.	-	-	1	-	5,25
Nr. 18 A	45	m.	7	-	24	-	7,08
Nr. 19 A	43	m.	-	-	-	-	5,54
Nr. 20 A	62	m.	-	-	1	-	3,44
Nr. 21 A	66	w.	-	-	-	-	8,29
Mittelwert± SD	59,71±9,11						5,07±2,08

A: ALS

Tab. 5: Kontrollgruppe mit anderen neurogenen Erkrankungen

Patient	Alter	Sex	Diagnose	Core	Target	Core-like Lesion	Target-like Lesion	mtDNA/Kern-DNA
Nr. 1 N	39	w.	SMA	-	-	-	-	5,25
Nr. 2 N	55	w.	SMA	-	-	-	-	2,05
Nr. 3 N	64	w.	PNP(u)	-	-	1	-	4,41
Nr. 4 N	50	m.	PNP(u)	1	-	-	-	6,36
Nr. 5 N	48	m.	PNP(u)	-	-	-	-	6,23
Nr. 6 N	42	w.	SMA	-	-	1	-	8,61
Nr. 7 N	58	m.	PNP(u)	-	-	-	-	3,38
Nr. 8 N	57	m.	ELSPK	-	-	-	-	2,79
Nr. 9 N	64	m.	ThLMLP	5	-	8	1	6,98
Nr. 10 N	36	m.	PNP(ä)	8	-	18	1	2,54
Nr. 11 N	69	m.	ZMLP	1	-	29	-	5,90
Nr. 12 N	61	m.	PNP(v)	2	-	25	-	2,21
Nr. 13 N	48	m.	SMA	-	-	3	-	6,12
Nr. 14 N	42	m.	SMA	-	-	2	-	6,66
Nr. 15 N	62	m.	MMN	-	-	-	-	3,90
Nr. 16 N	70	m.	HMSN I	2	1	-	-	6,90
Nr. 17 N	76	w.	CIDP	-	-	-	1	4,50
Nr. 18 N	58	m.	CIDP	-	-	3	-	3,74
Nr. 19 N	47	m.	MMN	1	-	7	-	8,12
Nr. 20 N	72	m.	CIDP	-	-	1	-	3,72
Nr. 21 N	42	m.	HMSN II	-	-	7	-	6,52
Nr. 22 N	55	m.	PNP	-	-	2	-	2,62
Nr. 23 N	75	w.	PNP	2	-	4	-	4,30
Mittelwert± SD	56,09±11,88							4,95±1,93

CIDP : Chronisch-inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie  
 ELSPK: Enger lumbaler Spinalkanal  
 HMSN : Hereditäre motorische und sensible Neuropathie  
 MMN : Multifokale motorische Neuropathie  
 PNP(u) : Polyneuropathie unklarer Genese  
 PNP(ä) : Polyneuropathie äthyltoxischer Genese  
 PNP(v) : Polyneuropathie bei Vaskulitis  
 ThLMLP: Thorakolumbale Myelopathie  
 ZMLP: Zervikale Myelopathie  
 N: neurogene Kontrolle

Tab. 6: Myopathische Kontrollen

Patient	Alter	Sex	Diagnose	mtDNA/ Kern- DNA	CS U/g NCP	CS U/g Gewebe
Nr. 1 M	36	w.	CPEO	4,56	79,00	9,30
Nr. 2 M	45	m.	MELAS	5,51	-	-
Nr. 3 M	60	w.	CPEO	6,23	67,50	6,50
Nr. 4 M	61	m.	MELAS	6,68	60,00	10,70
Nr. 5 M	49	m.	LHON	3,41	45,11	7,10
Nr. 6 M	51	m.	FSHD	2,68	-	-
Nr. 7 M	16	m.	FSHD	7,75	74,70	4,34
Nr. 8 M	34	w.	FSHD	5,19	52,67	7,10
Nr. 9 M	40	m.	FSHD	4,84	69,50	6,90
Nr. 10 M	15	w.	Polymyositis	2,60	102,50	10,18
Nr. 11 M	77	m.	Polymyositis	7,25	97,60	10,60
Nr. 13 M	51	w.	Polymyositis	8,54	-	-
Mittelwert± SD	46,92±19,18			5,63±1,99	72,06±19,07*	8,08±2,21*

M: Myopathie

\*: für 9 Patienten

Tab. 7: Gesunde Kontrollpersonen

Patient	Alter	Sex	mtDNA/ Kern-DNA
Nr. 1 G	40	w.	3,87
Nr. 2 G	43	m.	4,68
Nr. 3 G	41	m.	6,32
Nr. 4 G	53	m.	3,34
Nr. 5 G	44	m.	5,64
Nr. 6 G	44	w.	4,98
Nr. 7 G	65	m.	8,58
Nr. 8 G	43	m.	6,74
Nr. 9 G	45	w.	8,20
Nr. 10 G	45	m.	6,50
Nr. 11 G	59	m.	6,24
Nr. 12 G	48	w.	6,21
Nr. 13 G	43	m.	3,69
Nr. 14 G	40	w.	3,51
Nr. 15 G	72	m.	3,41
Nr. 16 G	66	w.	5,35
Nr. 17 G	52	m.	3,27
Nr. 18 G	48	w.	2,48
Nr. 19 G	37	w.	5,54
Nr. 20 G	37	m.	6,85
Nr. 21 G	35	w.	7,59
Mittelwert± SD	47,62±10,15		5,38±1,75

G: gesunde Kontrolle

### 4.3. Biochemische Untersuchung

Citratsynthaseaktivität wurde in allen untersuchten Biopsaten von ALS-Patienten, neurogenen Kontrollen, gesunden Kontrollpersonen, 3 FSHD- und 2 Polymyositis-Patienten sowie bei 4 von 5 Patienten mit bekannten mitochondrialen Myopathien bestimmt (s. Tab. 6, 8, 9, 10).

Tab. 8: Citratsynthaseaktivität bei ALS-Patienten

ALS-Patienten			
DNA-Nr.	MitDNA/ Kern-DNA	CS U/g NCP	CS U/g Gewebe
Nr. 1 A	3,05	74,02	8,45
Nr. 2 A	2,70	71,26	8,93
Nr. 3 A	4,57	97,20	11,20
Nr. 4 A	3,68	110,34	12,80
Nr. 5 A	2,96	69,65	5,99
Nr. 6 A	10,12	99,22	9,70
Nr. 7 A	5,65	90,57	9,85
Nr. 8 A	3,45	70,99	7,87
Nr. 9 A	5,09	82,85	8,82
Nr. 10 A	3,91	81,99	9,03
Nr. 11 A	4,72	71,20	6,80
Nr. 12 A	3,32	70,19	6,37
Nr. 13 A	5,47	82,50	9,08
Nr. 14 A	8,33	112,86	14,30
Nr. 15 A	2,66	73,76	7,59
Nr. 16 A	6,51	85,53	12,00
Nr. 17 A	5,25	85,15	9,98
Nr. 18 A	7,08	113,04	14,30
Nr. 19 A	6,15	77,30	10,50
Nr. 20 A	3,44	60,97	6,50
Nr. 21 A	8,29	64,50	7,60
Mittelwert± SD	5,07±2,08	83,10±15,60	9,41±2,43

Tab. 9: Citratsynthaseaktivität bei neurogenen Kontrollen

DNA-Nr.	Neurogene		Kontrollen	
	mtDNA/Kern-DNA	CS U/g NCP	CS U/g Gewebe	
Nr. 1 N	5,25	89,30	11,00	
Nr. 2 N	2,05	45,16	3,85	
Nr. 3 N	4,41	84,05	10,30	
Nr. 4 N	6,36	216,00	20,36	
Nr. 5 N	6,23	96,88	13,05	
Nr. 6 N	8,61	87,50	9,45	
Nr. 7 N	3,38	88,96	11,28	
Nr. 8 N	2,79	124,08	12,75	
Nr. 9 N	6,98	107,19	13,30	
Nr. 10 N	2,54	96,30	9,90	
Nr. 11 N	5,90	49,24	5,20	
Nr. 12 N	2,21	98,64	8,17	
Nr. 13 N	6,12	75,31	9,67	
Nr. 14 N	6,66	117,70	12,46	
Nr. 15 N	3,90	67,93	6,46	
Nr. 16 N	6,90	132,10	10,03	
Nr. 17 N	4,50	106,40	10,50	
Nr. 18 N	3,74	112,90	11,40	
Nr. 19 N	8,12	91,75	11,05	
Nr. 20 N	3,72	98,63	8,63	
Nr. 21 N	6,52	115,28	12,75	
Nr. 22 N	2,62	93,66	9,90	
Nr. 23 N	4,30	90,03	10,43	
Mittelwert± SD	4,95±1,93	99,35±33,02	10,52±3,22	

Tab. 10: Citratsynthaseaktivität bei gesunden Kontrollpersonen

	Gesunde	Kontrollen	
DNA-Nr.	mtDNA/ Kern-DNA	CS U/g NCP	CS U/g Gewebe
Nr. 1 G	3,87	90,37	7,06
Nr. 2 G	4,68	42,88	6,90
Nr. 3 G	6,32	95,80	11,40
Nr. 4 G	3,34	102,25	12,50
Nr. 5 G	5,64	46,59	5,60
Nr. 6 G	4,98	55,24	8,70
Nr. 7 G	8,58	79,23	7,90
Nr. 8 G	6,74	86,61	10,35
Nr. 9 G	8,20	82,90	11,35
Nr. 10 G	6,50	52,90	7,30
Nr. 11 G	6,24	87,55	10,20
Nr. 12 G	6,21	86,10	11,50
Nr. 13 G	3,69	54,91	7,10
Nr. 14 G	3,51	90,72	9,00
Nr. 15 G	3,41	95,97	9,00
Nr. 16 G	5,35	46,96	6,60
Nr. 17 G	3,27	54,70	7,40
Nr. 18 G	2,48	67,71	9,20
Nr. 19 G	5,54	52,44	7,10
Nr. 20 G	6,85	50,15	8,40
Nr. 21 G	7,59	63,17	8,90
Mittelwert± SD	5,38±1,75	70,72±19,81	8,69±1,94

Die Werte lagen in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen bei  $8,689 \pm 1,938$  U/g Probe bzw.  $70,721 \pm 19,810$  U/g NCP, für die ALS-Patienten bei  $9,412 \pm 2,429$  U/g Probe bzw.  $83,099 \pm 15,597$  U/g NCP, für die Kontrollen mit anderen neurogenen Erkrankungen bei  $10,517 \pm 3,218$  U/g Probe bzw.  $99,352 \pm 33,022$  U/g NCP. Für 9 myopathische Kontrollen betrug der Wert  $72,06 \pm 19,07$  U/g NCP bzw.  $8,08 \pm 2,21$  U/g Probe, wobei es auf eine weitere statistische Analyse aufgrund von Unvollständigkeit der biochemischen Daten, starker Heterogenität der Altersverteilung und primär mitochondrialer Affektion bei 5 der 13 Patienten verzichtet wurde.

Das Verhältnis aus mtDNA/Kern-DNA-Quotient und Citratsynthaseaktivität (in U/g NCP) lag für gesunde Kontrollen bei  $0,082 \pm 0,033$ , für ALS-Patienten bei  $0,061 \pm 0,023$ , für neurogene Kontrollen bei  $0,053 \pm 0,025$ . Der mtDNA/Kern-DNA/Citratsynthase-Quotient (in U/g Probe) war für Gesunde  $0,641 \pm 0,223$ , für ALS-Patienten  $0,545 \pm 0,203$ , für neurogene Kontrollen  $0,497 \pm 0,221$ . Sowohl die

Citratsynthaseaktivität (in U/g NCP) als auch die entsprechenden mtDNA/Kern-DNA/Citratsynthase-Quotienten von ALS-Patienten und neurogenen Kontrollen unterschieden sich signifikant von den gesunden Kontrollpersonen. Der Unterschied bezüglich Citratsynthaseaktivität (in U/g NCP) zwischen ALS-Patienten und neurogenen Kontrollen erwies sich als statistisch minimal signifikant ( $p=0,046$ ). Die Citratsynthaseaktivität (in U/g Probe) sowie die mtDNA/Kern-DNA/Citratsynthase-Quotienten (in U/g Probe) unterschieden sich signifikant von den gesunden Kontrollen jedoch nur in der Gruppe von neurogenen Kontrollen und nicht in der von ALS-Patienten (s. Tab. 11).

Tab. 11: Gesunde versus neurogene Kontrollen ( $p^*$ ) bzw. ALS-Patienten ( $p^{**}$ ) und ALS-Patienten versus neurogene Kontrollen ( $p^{***}$ )

	Neurogene Kontrollen (n=23)	$p^*$	Gesunde Kontrollen (n=21)	$p^{**}$	ALS- Patienten (n=21)	$p^{***}$
mtDNA/ Kern-DNA	4,95±1,93 (92 %)	0,442	5,38±1,75 (100 %)	0,602	5,07±2,08 (94 %)	0,843
CS (U/g Probe)	10,52±3,22 (121 %)	0,029	8,69±1,94 (100 %)	0,292	9,41±2,43 (108 %)	0,209
CS (U/g NCP)	99,35±33,0 2 (140,5 %)	0,001	70,72±19,81 (100 %)	0,030	83,10±15,60 (117,5 %)	0,046
mtDNA/Kern- DNA/CS (U/g Probe)	0,50±0,22 (78%)	0,038	0,64±0,22 (100%)	0,153	0,55±0,20 (86%)	0,285 <sup>a</sup>
mtDNA/Kern- DNA/CS (U/g NCP)	0,05±0,03 (63%)	0,002	0,08±0,03 (100 %)	0,020	0,06±0,02 (75%)	0,313

$p$  bestimmt durch Student t-Test, <sup>a</sup> =Mann-Whitney-Rangsummentest (Medianvergleich)

$p^*$ : Gesunde versus neurogene Kontrollen

$p^{**}$ : Gesunde versus ALS-Patienten

$p^{***}$ : ALS-Patienten versus neurogene Kontrollen

## **5. Diskussion**

### **5.1. Histologische Untersuchung**

Die quantitative Analyse der histologischen Veränderungen im Sinne von Cores sowie „Core-like Lesions“ in der Arbeit von Vielhaber et al. (2000) zeigte, dass diese Veränderungen bei 7 von 17 untersuchten ALS - Patienten (ca. 41 %) in 1 % bis 10 % der Muskelfasern vorhanden waren. Ähnlich zeigten 8 von 21 unserer ALS - Patienten (ca. 38 %) diese Läsionen in 0,2 % bis 11,8 % der Fasern. Im Gegensatz zu Ergebnissen von Vielhaber et al. (2000) haben wir in unseren Muskelbiopsien auch vereinzelte Targets (je 1 pro 500 Fasern bei 2 von 21 ALS-Patienten und 1 pro 500 Fasern bei 1 von 23 neurogenen Kontrollen).

Es war also bei einigen Patienten auch eine histologisch nachweisbare Verminderung der oxidativen Enzymaktivität in Form von Targets und Cores sowie „Target-like-“ und „Core-like Lesions“ in NADH-Färbung vorhanden, die für eine lokal verminderte Mitochondrienzahl in einzelnen Muskelfasern spricht. Dies kann aber ebenfalls als eine unspezifische Veränderung bei chronischer Denervation gewertet werden, da kein quantitativer Unterschied bezüglich dieser Veränderungen zwischen den ALS-Patienten und Patienten mit anderen neurogenen Erkrankungen besteht.

### **5.2. Molekulargenetische und biochemische Untersuchung**

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass die quantitativen Unterschiede in dem Gehalt an mtDNA zwischen Patienten mit sporadischer ALS, Patienten mit anderen neurogenen Erkrankungen und gesunden Kontrollpersonen nicht signifikant sind. Es wurden bei unseren ALS-Patienten auch keine multiplen Deletionen gefunden. Die Citratsynthaseaktivität (in U/g NCP), die sowohl in ALS-Patienten als auch in Patienten mit anderen neurogenen Erkrankungen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöht war (117,5 % bei ALS, 140,5 % bei anderen neurogenen Erkrankungen), spricht für eine eher unspezifische Erhöhung der Mitochondrienanzahl in beiden Patientengruppen im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen, welche wahrscheinlich durch chronische Denervation hervorgerufen wurde. Für die neurogenen Kontrollen war der Citratsynthase-Wert gemessen in U/g Gewebe im Vergleich zu gesunden Kontrollen ebenfalls signifikant

erhöht ( $p=0,029$ ), die Erhöhung der Citratsynthaseaktivität bei ALS-Patienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen war bezogen auf das Feuchtgewicht der Probe (in U/g Gewebe) nicht signifikant ( $p=0,292$ ), dies ist jedoch durch den statistisch signifikant niedrigeren Proteingehalt der ALS-Muskelproben gegenüber den gesunden Kontrollpersonen (ca. 85,5%) erklärbar. Bezieht man die mtDNA/Kern-DNA-Quotienten auf die Citratsynthase-Werte (in U/g NCP) als Marker der Mitochondrienmenge, so zeigt sich, dass bei den ALS-Patienten und neurogenen Kontrollen im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen dieser Wert signifikant niedriger ist ( $p=0,002$  bzw.  $p=0,020$ ). Für die Quotienten aus mtDNA/Kern-DNA und Citratsynthase-Werten in U/g Probe war der Wert für die neurogenen Kontrollen ebenfalls signifikant erhöht ( $p=0,038$ ), für die ALS-Patienten jedoch nicht ( $p=0,153$ ), was aber, wie oben bereits diskutiert, ebenfalls durch einen statistisch signifikant niedrigeren Proteingehalt der Muskelproben der ALS-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen bedingt ist. Es wurde außerdem ein geringfügiger statistisch signifikanter Unterschied für Citratsynthaseaktivität (in U/g NCP) zwischen ALS-Patienten und neurogenen Kontrollen festgestellt ( $p=0,046$ ), nicht jedoch für U/g Gewebe.

Die Menge der mtDNA pro Mitochondrium bei den ALS-Patienten und neurogenen Kontrollen ist also erniedrigt bei kompensatorischer Zunahme der Mitochondrienmenge. Da dieser Effekt in ähnlicher Weise sowohl bei ALS-Patienten als auch bei neurogenen Kontrollen besteht, ist davon auszugehen, dass es sich wahrscheinlich um einen unspezifischen (nicht ALS-spezifischen) Prozeß der kompensatorischen Mitochondrienproliferation handelt, der durch die Denervierung bedingt sein dürfte.

Vergleicht man die Ergebnisse mit einer anderen größeren Studie, die mtDNA-Veränderungen bei ALS in Muskelbiopsien untersucht hat (Vielhaber et al., 2000), so zeigen sich Unterschiede.

Diese fand schwere Depletion der mtDNA in den Muskelbiopsien der 13 von 17 untersuchten Patienten und multiple Deletionen bei einem Patienten. Es ist aber zu bemerken, dass die Gruppe der „gesunden“ Kontrollpersonen aus Individuen mit fraglich myopathischem EMG-Muster bestand. Dagegen haben wir uns als Kontrollen nur Personen ausgesucht, die klinisch, elektrophysiologisch, histologisch und

laborchemisch keine Muskelerkrankung hatten. Als neurogene Kontrollen in der Arbeit von Vielhaber et al. (2000) dienten lediglich 2 SMA-Patienten, was keine statistisch signifikante Aussage hinsichtlich des quantitativen Unterschieds des mtDNA-Gehalts zwischen ALS-Patienten und diesen neurogenen Kontrollen erlaubt. Außerdem ist zu beachten, dass die beiden SMA-Patienten 6 bzw. 18 Jahre alt waren und damit im Vergleich zu den ALS-Patienten viel jünger waren. Vielhaber et al. fanden bei den ALS-Patienten im Vergleich zu diesen zwei Patienten mit spinaler Muskelatrophie einen erniedrigten mtDNA-Gehalt, jedoch zeigten Berger et al. (2003) dass bei Kindern mit spinaler Muskelatrophie ein deutlich erniedrigter mtDNA-Gehalt gemessen werden kann, der ausgeprägter war als die Erniedrigung bei den ALS-Patienten in der Untersuchung von Vielhaber et al. (2000).

Vielhaber et al. (2000) fanden eine weitgehend normale Citratsynthaseaktivität in einem Kollektiv der ALS-Patienten trotz signifikant verminderten mtDNA-Gehalts bei 13 von 17 untersuchten Patienten, was zur Schlussfolgerung geführt hat, dass die Mitochondrienanzahl in diesem Kollektiv normal geblieben war und nicht etwa, wie es für bestimmte Erkrankungen, z.B. mitochondriale Myopathien, charakteristisch ist, kompensatorisch erhöht war. 2003 wurden jedoch von Vielhaber et al. signifikant erhöhte Citratsynthase-Werte in einem Kollektiv aus 11 Patienten mit sporadischer ALS im Frühstadium im Vergleich zu 12 gesunden Kontrollpersonen gefunden. Für die beiden SMA-Patienten wurden keine Citratsynthase-Werte publiziert, in einer weiteren Arbeit von Vielhaber et al. aus dem Jahr 1999 wurde allerdings in einer Gruppe aus 6 SMA-Patienten im Alter von 6 bis 62 Jahren keine signifikante Änderung der Citratsynthaseaktivität im Vergleich zu 28 gesunden erwachsenen Kontrollpersonen beobachtet, wobei bei dieser Gruppengröße und offensichtlich sehr heterogener Altersverteilung eine statistische Aussage nur bedingt möglich ist.

Somit konnte durch die Studie von Vielhaber et al. (2000) nicht in vollem Maß die Frage beantwortet werden, ob die gefundenen mitochondrialen Veränderungen ALS-spezifisch oder lediglich sekundär durch Denervation hervorgerufen waren und auch bei anderen neurogenen Erkrankungen in gleicher Weise vorkommen, wie es die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen.

Die Arbeit von Berger et al. (2003) berichtet von schwerer sekundärer muskelatrophiebedingter Depletion der mtDNA bei 20 SMA-Patienten mit SMN1-

Mutationen im Alter von 2 Monaten bis 16 Jahren ( $90,3 \pm 7,8\%$  bzw. mtDNA/Kern-DNA-Quotient  $0,24 \pm 0,20$ ) und von signifikant erniedrigter Citratsynthaseaktivität, die jedoch nur bei 7 von 20 SMA-Patienten und 6 gesunden Kontrollen bestimmt werden konnte. Unter unseren neurogenen Kontrollen fanden sich 5 SMA-Patienten im Alter von 39, 42, 42, 48 und 55 Jahren, die Quotienten von entsprechend 5,25, 6,66, 8,61, 6,12 und 2,05 zeigten, also keine schwere mtDNA-Depletion aufwiesen. Dies könnte damit erklärt werden, dass bei später Manifestation einer SMA (SMA IV), bei der sich in der Regel keine SMN1-Mutationen finden lassen (Zerres et al., 2003), ein wesentlich milderer Verlauf besteht als bei SMA-Formen mit frühem Manifestationsalter.

Unsere Ergebnisse der quantitativen Analyse des mtDNA-Gehalts bei gesunden Kontrollen können mit den Mittelwerten für gesunde Kontrollpersonen aus anderen Studien, die mit analogen Methoden (Southern Blot, Quotient mtDNA/Kern-DNA) durchgeführt wurden, verglichen werden. So liegt der Mittelwert für die von uns untersuchten gesunden Kontrollpersonen bei  $5,38 \pm 1,75$ , in der Arbeit von Tritschler et al. (1992) bei  $5,9 \pm 2,6$ , bei Macmillan et al. (1996) bei 5,57, bei Campos et al. (1998) bei  $6,82 \pm 2,9$ . Die Kontrollpersonen in der Arbeit von Vielhaber et al. (2000) zeigten dagegen den Wert von  $2,6 \pm 1,2$ , wobei, wie bereits erwähnt, im EMG dieser Patienten fragliche myopathische Muster gesehen wurden, so dass diese Kontrollen möglicherweise nicht als völlig gesund zu betrachten sind. In der Arbeit von Berger et al. (2003) lag der Wert für Kontrollpersonen bei  $2,46 \pm 0,63$ , wobei diese ebenfalls nur bedingt als gesund zu bezeichnen sind, denn es handelte sich dabei um Patienten, bei denen eine maligne Hyperthermie ausgeschlossen werden musste, ohne Hinweis auf die Genese dieser schwerwiegenden Verdachtsdiagnose, die unter anderem auch mit bestimmten Myopathien assoziiert sein kann, bzw. um Personen, die eine Hüftgelenkendoprothese erhalten haben, was zur Vermutung führt, dass bei diesen aufgrund der bereits präoperativ eingeschränkten Mobilität bei bestehender Hüftgelenkerkrankung z.B. eine inaktivitätsbedingte Muskelatrophie mit entsprechender sekundärer mtDNA-Verminderung vorhanden sein könnte.

Beide neurogenen Kontrollen in der Arbeit von Berger et al. (2003) (1 Patient mit schwerer neurogener Muskelatrophie bei diabetischer Polyneuropathie und ein Patient mit Polyradikulitis) zeigten ebenfalls niedrige mtDNA/Kern-DNA-Quotienten

von 0,3 und 0,5, die aber durchaus durch eine wesentlich schwerer ausgeprägte Atrophie als bei unseren neurogenen Kontrollen bedingt sein könnten.

Die interindividuellen Unterschiede hinsichtlich der mtDNA/Kern-DNA-Quotienten sind auch bei gesunden Personen und bei Patienten mit derselben Diagnose sehr groß. Der Mittelwert für ALS-Patienten lag in unserer Arbeit bei  $5,07 \pm 2,08$ . Das Ergebnis von Vielhaber et al. zeigte jedoch mit  $1,4 \pm 1,0$  eine Streubreite der einzelnen Patientendaten, die deutlich größer ist als in der vorliegenden Studie.

Für 4 FSHD-Patienten, 4 Polymyositis-Patienten und 5 Patienten mit verschiedenen mitochondrialen Myopathien lag der mtDNA/Kern-DNA-Quotient insgesamt in der gleichen Größenordnung wie bei den anderen Patienten und gesunden Kontrollen, eine statistische Aussage erscheint allerdings wenig sinnvoll aufgrund von geringer Gruppengröße, sehr heterogener Altersverteilung, Unvollständigkeit der biochemischen Daten sowie nachgewiesener primär mitochondrialer Affektion bei 5 von 13 Patienten, wobei die letzte eine Interpretation der Ergebnisse für die gesamte Gruppe der myopathischen Kontrollen zusätzlich erschwert.

## **6. Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Arbeit konnten durch histochemische, molekulargenetische und biochemische Untersuchungen mitochondriale Veränderungen in der Skelettmuskulatur von ALS-Patienten nachgewiesen werden.

Eine Verminderung der oxidativen Enzymaktivität in Form von Cores und Targets spricht für eine lokale Umverteilung der Mitochondrien innerhalb der Muskelfasern. Die molekulargenetisch bestimmten mtDNA/Kern-DNA-Quotienten sind im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen bzw. neurogenen Kontrollen nicht signifikant verändert. Dies spricht in Kombination mit einer erhöhten Citratsynthaseaktivität, welche gut mit dem Mitochondriengehalt einer Muskelprobe korreliert, für eine generelle Erhöhung der Mitochondrienzahl bei gleichzeitiger Verminderung des mtDNA-Gehalts pro Mitochondrium im Skelettmuskel von ALS-Patienten. Diese gegensinnigen Veränderungen bewirken einen normalen mtDNA-Gesamtgehalt im Muskel.

Mitochondriale Veränderungen sind zwar auch in der Skelettmuskulatur von ALS-Patienten vorhanden, treten jedoch am ehesten als Folge der chronischen Denervation auf. Sie sind somit nicht ALS-spezifisch, sondern kommen auch bei anderen neurogenen Erkrankungen etwa gleich häufig vor, was die Untersuchung der entsprechenden Kontrollgruppe beweist.

Bisher haben sich lediglich drei Untersuchungen mit quantitativen Veränderungen der mtDNA bei ALS (Vielhaber et al., 1999 und 2000) bzw. anderen neurogenen Erkrankungen (SMA, Berger et al., 2003) auseinandergesetzt. Unsere Studie kann die Interpretation der Ergebnisse von Vielhaber et al. (1999 und 2000) nicht reproduzieren. Dies liegt unter anderem daran, dass im Unterschied zu Vielhaber et al. hier erstmalig zusätzlich ein sorgfältig ausgewähltes, umfangreiches Kontrollkollektiv mit anderen neurogenen Erkrankungen untersucht wurde, was die These spezifischer mtDNA-Veränderungen bei der ALS widerlegt.

Unsere Ergebnisse unterstreichen somit die Vorstellung, dass die ALS primär eine Erkrankung des ersten und zweiten Motoneurons im Sinne einer systemischen Motoneuronenerkrankung und nicht des Skelettmuskels ist.

## **7. Zusammenfassung**

Die amyotrophe Lateralsklerose ist eine Erkrankung, die zu einer progressiven Degeneration der Vorderhornzellen des Rückenmarks und der kortikalen Motoneurone führt. Die Ätiologie und Pathogenese der ALS sind immer noch weitgehend ungeklärt. Eine multifaktorielle Genese ist wahrscheinlich. Als Ursache werden komplexe Wechselwirkungen zwischen genetischen Faktoren, oxidativem Stress, Exzitotoxizität, aberranter Proteinaggregation und Organellschädigung (v.a. Mitochondrienschädigung) diskutiert. Es gibt widersprüchliche Untersuchungsergebnisse hinsichtlich mitochondrialer Veränderungen im Muskel bei ALS-Patienten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welchen Stellenwert mitochondriale Veränderungen in der Pathogenese der ALS im Skelettmuskel haben.

Es wurde analysiert, ob in den Muskelproben von 21 ALS-Patienten im Vergleich zu 21 gesunden Kontrollpersonen und 23 Kontrollen mit anderen neurogenen Erkrankungen mitochondriale Veränderungen nachzuweisen sind und ob diese Veränderungen, falls vorhanden, als ALS-spezifisch zu interpretieren sind. Die Häufigkeit histologischer Veränderungen der oxidativen Enzymaktivität im Muskel von ALS-Patienten und neurogenen Kontrollen in Form von Cores und Targets wurde für jede Muskelprobe bestimmt. Für jede Muskelprobe wurde die mitochondriale DNA in Relation zur Kern-DNA mittels Southern Blot quantifiziert. Die Aktivität der Citratsynthase als intramitochondriales Enzym, das gut mit dem Mitochondriengehalt einer Muskelprobe korreliert, ermöglichte eine Aussage zur Mitochondrienmenge der jeweiligen Muskelprobe.

Targets fanden sich nur selten (je 1 Target bei 2 von 21 ALS-Patienten, ein Target bei 1 von 23 neurogenen Kontrollen). Dagegen waren Cores häufiger anzutreffen (1-7 Cores bei 7 von 20 ALS-Patienten, 59 Cores bei einem ALS-Patienten mit stärkeren Atrophien, 1-8 Cores bei 8 von 23 neurogenen Kontrollen).

Der Mittelwert des mtDNA/Kern-DNA-Quotienten der ALS-Patienten lag bei  $5,07 \pm 2,08$ , für neurogene Kontrollen bei  $4,95 \pm 1,93$ , für Gesunde bei  $5,38 \pm 1,75$ . Der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen war statistisch nicht signifikant.

Die Citratsynthase-Werte (U/g NCP) waren im Vergleich zu gesunden Kontrollen (100 %) bei den ALS-Patienten auf 117,5 %, bei den neurogenen Kontrollen auf 140,5 % erhöht (statistisch signifikanter Unterschied verglichen mit Gesunden), die Differenz zwischen den beiden letztgenannten Gruppen war statistisch minimal signifikant ( $p=0,046$ ). Die in U/g Probe angegebenen Citratsynthase-Werte waren nur für die neurogenen Kontrollen signifikant erhöht, was jedoch durch einen signifikant niedrigeren Proteingehalt der ALS-Muskelproben im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zu erklären ist.

Demnach kommen histologisch nachweisbare Veränderungen der oxidativen Enzymaktivität ähnlich häufig bei ALS-Patienten vor wie bei anderen neurogenen Erkrankungen und sind als eine lokale, durch chronische Denervation bedingte Verminderung der Mitochondrienzahl in einzelnen Muskelfasern bei insgesamt eher erhöhtem Mitochondriengehalt anzusehen. Die Gesamtmenge der mtDNA bleibt

nicht nur bei ALS-Patienten, sondern auch bei anderen neurogenen Erkrankungen in ähnlicher Weise durch eine unspezifische sekundäre kompensatorische Erhöhung der Mitochondrienzahl bei erniedrigtem mtDNA-Gehalt pro Mitochondrium erhalten.

Somit konnten in der vorliegenden Arbeit durch histochemische, molekulargenetische und biochemische Untersuchungen mitochondriale Veränderungen in der Skelettmuskulatur von ALS-Patienten nachgewiesen werden, jedoch ließ sich die Hypothese einer ALS-spezifischen Alteration der mitochondrialen Funktion im Muskel nicht bestätigen. Dies steht im Einklang mit der klassischen Vorstellung, dass die ALS primär eine neurogene Erkrankung im Sinne einer systemischen Degeneration beider Motoneurone und keine Erkrankung des Skelettmuskels ist.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Armon C, Kurland LT: Classic and Western Pacific Lateral Sclerosis: Epidemiologic Comparisons. In: Hudson AJ (Hrsg.): Amyotrophic Lateral Sclerosis Concepts in Pathogenesis and Etiology. University Press, Toronto, 1990, S. 144-165
2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG: Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 (1981) 457-465
3. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P: Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15 (1995) 961-973
4. Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, Brown Jr. RH: Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic sclerosis. *Ann Neurol* 42 (1997) 646-654
5. Beaulieu J.-M, Nguyen MD, Julien JP: Late onset death of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin. *J Cell Biol* 147 (1999) 531-544
6. Ben Hamida M, Hentati F, Ben Hamida C: Hereditary motor system disease (chronic juvenile amyotrophic lateral sclerosis). Conditions combining a bilateral pyramidal syndrome with limb and bulbar amyotrophy. *Brain* 113 (1990) 347-363
7. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V, The ALS/Riluzole Study Group: A controlled Trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 330 (1994) 585-591
8. Berger A, Mayr JA, Meierhofer D, Fötschl U, Bittner R, Budka H, Grethen C, Huemer M, Kofler B, Sperl W: Severe depletion of mitochondrial DNA in spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathol* 105 (2003) 245-251

9. Bergeron C, Beric-Maskarel K, Muntasser S, Weyer L, Somerville MJ, Percy ME: Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motoneurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 53 (1994) 221-230
10. Brooks BR: El Escorial World Federation of Neurology Criteria for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci (Suppl)* 124 (1994) 96-107
11. Campos Y, Martín MA, García - Silva T, del Hoyo P, Rubio JC, Castro-Gago M, Garcia - Peñas J, Casas J, Cabello A, Ricoy JR, Arenas J: Clinical heterogeneity associated with mitochondrial DNA depletion in muscle. *Neuromuscul Disord* 8 (1998) 568-573
12. Carpenter S, Karpati G: *Pathology of Skeletal Muscle*. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London (usw.), 1984
13. Charcot JM: *Lecons sur les maladies du système nerveux*. Delahaye, Paris, 1873
14. Cluskey S, Ramsden DB: Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Pathol* 54 (2001) 386-392
15. Comi GP, Bordoni A, Salani S, Franceschina L, Sciacco M, Prella A, Fortunato F, Zeviani M, Napoli L, Bresolin N, Moggio M, Ausenda CD, Taanman J-W, Scarlato G: Cytochrome c Oxidase Subunit I Microdeletion in a Patient with Motor Neuron Disease. *Ann Neurol* 43 (1998) 110-116
16. Cudkowicz ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE, Chin W, Geller B, Hayden DL, Schoenfeld DA, Hosler BA, Horwitz HR, Brown RH: Epidemiology of mutations in Superoxide Dismutase in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* 41 (1997) 210-221
17. Curti D, Malaspina A, Facchetti G, Camana C, Mazzini L, Tosca P, Zerbi F, Ceroni M: Amyotrophic lateral sclerosis: oxidative energy metabolism and calcium homeostasis in peripheral blood lymphocytes. *Neurology* 47 (1996) 1060-1064

18. DalCanto MC, Gurney ME: Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 145 (1994) 1271-1279
19. Deschauer M, Müller T, Dreha S, Zierz S: Familiäre mitochondriale chronisch progressive externe Ophthalmoplegie-Fünf Familien mit unterschiedlicher Genetik. *Nervenarzt* 72 (2001) 122-129
20. Deschauer M, Zierz S: Defekte der intergenomischen Kommunikation: Mutationen der Kern- DNA und multiple Deletionen der mitochondrialen DNA bei chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie. *Akt Neurol* 30 (2003) 103-106
21. Emery AEH: Population frequencies of neuromuscular diseases-II. Amyotrophic lateral sclerosis (motor neuron disease). *Neuromuscul Disord* 1 (1991) 323-325
22. Echaniz-Laguna A, Zoll J, Ribera F, Tranchant C, Warter J-M, Lonsdorfer J, Lampert E: Mitochondrial Respiratory Chain Function in Skeletal Muscle of ALS Patients. *Ann Neurol* 52 (2002) 623-627
23. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G: Heat Shock Proteins: Endogenous Modulators of Apoptotic Cell Death. *Biochem Biophys Res Comm* 286 (2001) 433-442
24. Güldenbergl V, Zierz S, Dengler R, Jerusalem F: Klinik und Differenzialdiagnose. In: Dengler, R., Zierz, S., Jerusalem, F. (Hrsg.): *Amyotrophe Lateralsklerose*. G. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1994, S. 34-44
25. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331 (1988) 717-719
26. Julien J - P, Beauilieu J-M: Cytoskeletal abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: beneficial or detrimental effects ? *J Neurol Sci* 180 (2000) 7-14
27. Klivenyi P, Ferrante RT, Matthews RT, Bogdanow MB, Klein AM, Andreassen OA, Mueller G, Wermer M, Kaddurah-Daouk R, Beal MF: Neuroprotective effects of

creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 5 (1999) 347-350

28. Kong J, Xu Z: Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD 1. *J Neurosci* 18 (1998) 3241-3250

29. Kurland LT, Choi NW, Sayre GP: Implications of incidence and geographic patterns in the classification of Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: Norris Jr. FH, Kurland LT (Hrsg.): *Motor Neuron Diseases*. Grune and Stratton, New York, 1969, S. 28-50

30. Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V: Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 347 (1996) 1425-1431

31. Lewin B: *Genes VII*. Oxford University Press, Oxford, New York, Athen (usw.), 2000, S. 94

32. Liu R, Althaus JS, Ellerbrock BR, Becker DA, Gurney ME: Enhanced oxygen radical production in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 44 (1998) 763-770

33. Ludolph AC, Meyer T, Riepe MW: The Role of excitotoxicity in ALS-what is the Evidence ? *J Neurol* 247 (Suppl. 1) (2000) I/7-16

34. Macmillan CJ, Shoubridge EA: Mitochondrial DNA Depletion: Prevalence in a Pediatric Population Referred for Neurologic Evaluation. *Pediatr Neurol* 14 (1996) 203-210

35. Mancuso M, Filosto M, Hirano M, DiMauro S: Spinal muscular atrophy and mitochondrial DNA depletion. Response to Berger et al. (2003) *Acta Neuropathol* 105: 245-251. *Acta Neuropathol* 105 (2003) 621-622

36. Mancuso M, Salviati L, Sacconi S, Otaegui D, Camano P, Marina A, Bacman S, Moraes CT, Carlo JR, Garcia M, Garcia-Alvarez M, Monzon L, Naini AB, Hirano M,

Bonilla E, Taratuto AL, DiMauro S, Vu TH: Mitochondrial DNA depletion: mutations in thymidine kinase gene with myopathy and SMA. *Neurology* 59 (2002) 1197–1202

37. Masui Y, Mozai T, Kakeshi K: Functional and morphometric study of the liver in motor neuron disease. *J Neurol* 232 (1985) 15-19

38. Monnat R, Loeb L: Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci* 82 (1985) 2895-2899

39. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S, Nonaka I, Koga Y, Spiro AJ, Browneli KW, Schmidt B, Schotland DL, Zupanc M, De Vivo DC, Schon EA, Rowland LP: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320 (1989) 1293-1299

40. Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprille JR, Andreetta F, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S: mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet* 48 (1991) 492-501

41. Mulder DW, Kurland LT, Offord KP, Beard CM: Familiar adult motor neuron disease: Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology* 36 (1986) 511-517

42. Nakano K, Hirayama K, Terao K: Hepatic ultrastructural changes and liver dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 44 (1987) 103-106

43. Neudecker S, Zierz S, Malessa S: Neuropathologie und Neurochemie. In: Dengler R, Ludolph A, Zierz S (Hrsg.): *Amyotrophe Lateralsklerose*. 2. Auflage, G. Thieme, Stuttgart, New York, 2000, S. 44-58

44. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M: Thymine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283 (1999) 689-692

45. Parker Jr. W: Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 640 (1991) 59-64

46. Okado-Matsumoto A, Fridovich I: Amyotrophic lateral sclerosis: A proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 13 (2002) 9010-9014
47. Rabin AB, Griffin JF, Crain BJ, Scavina M, Chance PF, Cornblath DR: Autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 122 (1999) 1539-1550
48. Pons R, Andretta F, Wang CH, Vu TH, Bonilla E, DiMauro S, De Vivo DC: Mitochondrial myopathy simulating spinal muscular atrophy. *Pediatr Neurol* 15 (1996) 153-158
49. Radunovic A, Leigh PN: Cu/Zn superoxide dismutase gene mutations in amyotrophic lateral sclerosis: correlation between genotype and clinical features. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 61 (1996) 565-572
50. Ravagnan L, Surbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G: *Nat Cell Biol* 3 (2001) 839-843
51. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Reagan JP, Deng H-X, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Jasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi ER, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung W-Y, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horwitz HR, Brown Jr. RH: Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362 (1993) 59-62
52. Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW: Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *New Engl J Med* 326 (1992) 1464-1468
53. Rothstein, JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin IJ, Kuncl RW: Selective loss of glial glutamate transporter GLT - 1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38 (1995) 73-84
54. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2. Auflage. Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA, 1989

55. Sasaki S, Iwata M: Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47(1996) 535-540
56. Schapira AH, Cooper JM, Morgan-Hughes JA, Landon DN, Clark JB: Mitochondrial myopathy with a defect of mitochondrial-protein transport. *N Engl J Med* 323 (1990) 37-42
57. Schon EA, Manfredi G: Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest* 111 (2003) 303-312
58. Sheperd D, Garland P: Citrate Synthase from Rat Liver. *Meth Enzymol* 13 (1969) 11-16
59. Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 (1975) 503-517
60. Strong MJ, Hudson AJ, Alvord WG: Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis, 1850-1989: A Statistical Analysis of the World Literature. *Canad J Neurol Sci* 18 (1991) 45-58
61. Tritschler H-J, Andreetta F, Moraes FT, Bonilla E, Arnaudo E, Danon MJ, Glass S, Zelaya BM, Vamos E, Telerman-Toppet N, Shanske S, Kadenbach B, DiMauro S, Schon EA: Mitochondrial myopathy of childhood associated with depletion of mitochondrial DNA. *Neurology* 42 (1992) 209-217
62. Trounce I, Byrne E, Marzuki S: Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet*, i (1989) 637 - 639
63. Tysnes O - B, Vollset SE, Larsen JA, Aarli JA: Prognostic factors and survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology* 13 (1994) 226-235
64. Vielhaber S, Winkler K, Kirches E, Kunz D, Buchner M, Feistner H, Elger CE, Ludolph AC, Riepe MW, Kunz WS: Visualisation of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 169 (1999) 133–139

65. Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, Wiedemann FR, Kirches E, Feistner H, Heinze H-J, Elger CE, Schubert W, Kunz WS: Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 123 (2000) 1339-1348
66. Vielhaber S, Kudin A, Winkler K, Wiedemann F, Schröder R, Feistner H, Heinze H-J, Elger CE, Kunz WS: Is There Evidence for Mitochondrial Dysfunction in Skeletal Muscle of Patients with Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis? *Ann Neurol* 5 (2003) 686-687
67. Wahl GM, Stern M, Stark GR: Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridisation by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci* 76 (1979) 3683-3687
68. Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL: An adverse property of a familial ALS-linked SOD 1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 14 (1995) 1105-1116
69. Yoshida S, Mulder DW, Kurland LT, Chu C-P, Okazaki H: Follow-Up Study on Amyotrophic Lateral Sclerosis in Rochester, Minn., 1925 through 1984. *Neuroepidemiology* 5 (1986) 61-70
70. Zerres K, Korinthenberg R, Rudnik S: Spinale Muskelatrophien. In: Pongratz D, Zierz S (Hrsg.): *Neuromuskuläre Erkrankungen. Diagnostik, interdisziplinäre Therapie und Selbsthilfe*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 2003, S. 211-239

## 9. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

1. *Abbildung 1*: Cores (NADH-Färbung)
2. *Abbildung 2*: Target (NADH-Färbung)
3. *Abbildung 3*: Mitochondriale DNA des Menschen
4. *Abbildung 4*: Kapillärtransfer der DNA von Agarosegel auf Nylon-Membran
5. *Abbildung 5*: 2% Agarosegel mit Amplifikaten der 16S rRNA- und 18S rRNA-Sonde
6. *Abbildung 6*: Southern Blot nach Detektion
7. *Tabelle 1*: Primer
8. *Tabelle 2*: Quantitativer Vergleich der histologischen Veränderungen bei ALS-Patienten und Patienten mit anderen neurogenen Muskelerkrankungen
9. *Tabelle 3*: Variabilität der mtDNA/Kern-DNA-Quotienten bei wiederholten Messungen
10. *Tabelle 4*: ALS-Patienten
11. *Tabelle 5*: Kontrollgruppe mit anderen neurogenen Erkrankungen
12. *Tabelle 6*: Myopathische Kontrollen
13. *Tabelle 7*: Gesunde Kontrollpersonen
14. *Tabelle 8*: Citratsynthaseaktivität bei ALS-Patienten
15. *Tabelle 9*: Citratsynthaseaktivität bei neurogenen Kontrollen
16. *Tabelle 10*: Citratsynthaseaktivität bei gesunden Kontrollpersonen
17. *Tabelle 11*: Gesunde versus neurogene Kontrollen bzw. ALS-Patienten und ALS-Patienten versus neurogene Kontrollen

## 10. Liste der verwendeten Abkürzungen

AIF	Apoptoseinduzierender Faktor
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaar(e)
c	Konzentration
CS	Citratsynthase
CK	Kreatinkinase
CoA	Coenzym A
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CPEO	Chronische progressive externe Ophthalmoplegie
CS	Citratsynthase
Diff.	Differenz
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTNB	5, 5`-Dithiobis-2-Nitrobenzolsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fALS	Familiäre amyotrophe Lateralsklerose
FSHD	Fazio-skapulo-humerale Muskeldystrophie
GLT	Glutamatttransportprotein
HSMN	Hereditäre motorische und sensible Neuropathie
Hsp	Hitzeschockprotein
kb	Kilobase(n)
LHON	Lebersche hereditäre Optikusatrophie
MELAS	Mitochondriale Myopathie, Enzephalopathie, Laktat-Azidose und schlaganfallähnliche Episoden
MMN	Multifokale mototische Neuropathie
mRNA	Messenger RNA
mtDNA	Mitochondriale DNA
NADH	Nikotinamidadenindinucleotid-Dehydrogenase
NCP	Nichtkollagen-Protein
NF	Neurofilamentprotein
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

PCR	Polymerase Chain Reaction
PNP	Polyneuropathie
RNA	Ribonucleinsäure
sALS	Sporadische amyotrophe Lateralsklerose
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMN 1	Survival Motor Neuron gene
SOD	Superoxid-Dismutase
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA

## 11. Thesen

1. Amyotrophe Lateralsklerose ist eine Motoneuronerkrankung mit weitgehend unklarer Pathogenese, die zur progressiven Degeneration beider Motoneurone führt und in der Regel letal endet. 10 % aller ALS-Fälle sind familiär vererbt. Ca. 10-20 % der fALS-Fälle sind durch verschiedene Punktmutationen im SOD 1-Gen bedingt.

2. Die quantitative Analyse von Targets und Cores als Ausdruck einer verminderten oxidativen Enzymaktivität im histologischen Muskelpräparat zeigte, dass Cores deutlich häufiger als Targets anzutreffen waren und bei ALS-Patienten und neurogenen Kontrollen etwa gleich häufig vorkamen.

3. Mittels Southern Blot wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den mtDNA/Kern-DNA-Quotienten von 21 Patienten mit sporadischer ALS, 23 Personen mit anderen neurogenen Erkrankungen und 21 Gesunden gefunden.

4. Citratsynthase-Werte (in U/g NCP) als Hinweis auf Mitochondrienanzahl einer Muskelprobe waren bei ALS - Patienten mit 117,5 % und bei neurogenen Kontrollen mit 140,5 % signifikant erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war geringfügig signifikant ( $p=0,046$ ). Für die neurogenen Kontrollen war der Citratsynthase-Wert in U/g Gewebe im Vergleich zu Gesunden ebenfalls signifikant erhöht ( $p=0,029$ ), bei ALS-Patienten aber nicht signifikant ( $p=0,292$ ), dies ist jedoch durch den statistisch signifikant niedrigeren Proteingehalt der ALS-Muskelproben im Vergleich zu Gesunden erklärbar.

5. Histologisch ist in beiden Gruppen eine variable Verminderung der oxidativen Enzymaktivität im Muskel nachweisbar, die für eine lokale Verminderung der Mitochondrienzahl in einzelnen Muskelfasern spricht. Eine ähnlich ausgeprägte kompensatorische Erhöhung der Mitochondrienzahl führt zur Erhaltung der normalen Gesamtmenge an mtDNA bei erniedrigtem DNA-Gehalt pro Mitochondrium in ALS-Patienten und Personen mit anderen chronischen neurogenen Erkrankungen. Da alle obengenannten Veränderungen sowohl bei den ALS-Patienten als auch bei anderen neurogenen Erkrankungen etwa gleich ausgeprägt sind (kein signifikanter Unterschied), sind diese am wahrscheinlichsten als sekundär durch chronische Denervation bedingt anzusehen.

## Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. S. Zierz möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für die kritische Diskussion dieser Arbeit danken.

Besonders möchte ich mich bei Dr. M. Deschauer und Dr. T. Müller für die engagierte Betreuung dieser Arbeit herzlich bedanken. Dr. Deschauer beriet mich jederzeit mit viel Geduld bei allen Problemen, die im Laufe dieser Arbeit auftraten. Dr. S. Neudecker danke ich für die wertvollen Hinweise bezüglich Beurteilung histologischer Präparate.

Ich danke allen Mitarbeitern des neurologischen Muskellabors für das gute Arbeitsklima und für die gewährte Unterstützung. Dabei denke ich besonders an Frau S. Heinz, die mir die Grundlagen der praktischen Laborarbeit beigebracht hatte und meine zahlreichen Fragen beantwortete, und an Herrn PD Dr. F. N. Gellerich, der mir komplizierte biochemische Zusammenhänge erklärte.

Gesondert möchte ich mich bei Prof. Dr. Holtz, dem Direktor des Instituts für Pathophysiologie dafür danken, dass ich in seinem molekulargenetischen Labor hospitieren durfte. Dabei danke ich Herrn Dr. R. Scheubel und Frau S. Karstedt für die Hilfestellung bei der Southern-Blot-Analyse.

Herrn Dr. Schoser aus dem Universitätsklinikum Hamburg danke ich für Überlassung von Muskelbiopsaten sowie wertvollen Informationen bezüglich biopsierter Patienten.

Anna Krasnianski

Halle/Saale, den 7. September 2004

## Lebenslauf

Name: Krasnianski

Vorname: Anna

geboren am: 27.04.78

geboren in: Riga/Lettland

Familienstand: ledig

Eltern: Dr. Jouri Krasnianski , Neurologe  
Alla Krasnianski , Diplom-Ingenieurin

Geschwister: Dr. Michael Krasnianski , Neurologe

Schulbildung: 1985-1988 Grundschule in Riga  
1988-1995 Lomonosow-Gymnasium in Riga  
1995-1997 Christian-Wolff-Gymnasium in Halle/Saale  
1997 Abitur

Studium: 1997-2003 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
September 1999 Ärztliche Vorprüfung  
August 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
September 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
Oktober 2002-September 2003 Praktisches Jahr mit Wahlfach Neurologie  
November 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang: Seit Januar 2004 Ärztin im Praktikum an der Klinik für Neurologie der Georg-August-Universität Göttingen (Prof. Dr. M. Bähr)

## **Erklärung**

Ich erkläre, dass frühere Promotionsversuche nicht stattfanden, dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist und dass die Promotionsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmitteln benutzt wurden.

A. Krasnianski

Halle/Saale, den 7. September 2004