

AUSGABE SEPTEMBER 2002

Forschungspreis 2002 für Neuromuskuläre Erkrankungen der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V. verliehen

Dieses Sonderheft dient der Vorstellung der Preisträger, welche den von der Firma Aventis Pharma Deutschland GmbH gestifteten und mit einer Gesamtsumme von DM 50.000 (EUR 25.560) dotierten

Forschungspreis 2002 für Neuromuskuläre Erkrankungen der Deutschen Gesellschaft für Muskelkranke e.V.

erhalten haben. Der Preis dient der Förderung der Forschung auf dem Gebiet der neuromuskulären Erkrankungen, insbesondere der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) im deutschsprachigen Raum. Mit ihm werden jüngere Forscher für Verdienste bei der Erforschung von Pathomechanismen und für objektiv nachvollziehbare Therapieerfolge bei allen Formen von neuromuskulären Erkrankungen, insbesondere aber der ALS ausgezeichnet.

- Der 1. Preis in Höhe von DM 25.000 (EUR 12.780) ging im Jahr 2001 an Herrn Dr. med. Stefan Vielhaber, Klinik für Neurologie II, der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Die preisgekrönte Arbeit erbrachte wichtige Erkenntnisse zur Rolle der Mitochondrien bei der sporadischen Amyotrophen Lateralsklerose, auf denen zukünftige neuroprotektive Therapiestrategien aufbauen könnten.
- Der 2. Preis in Höhe von DM 15.000 (EUR 7.670) ging an Frau Dr. med. Michaela Jaksch, Stoffwechsellabor München-Schwabing, Institut für Klinische Chemie, Molekulare Diag-

nostik und Mitochondriale Genetik, und Herrn PD Dr. med. Hanns Lochmüller, Friedrich-Baur-Institut und Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München, für ihre Untersuchungen zu den molekularen Grundlagen und therapeutischen Perspektiven bei einer Form des infantilen Cytochrom-c-Oxidase-Mangels.

- Den 3. Preis in Höhe von DM 10.000 (EUR 5.110) erhielt Herr PD Dr. med. Thomas Klopstock, Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München, für seine Arbeit zur Klinik, Genetik und Therapie mitochondrialer Erkrankungen, u. a. mitochondriale Myopathie, chronisch progressive externe Ophthalmoplegie und Kearns-Sayre-Syndrom.

Die Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V. dankt den Repräsentanten der Firma Aventis Pharma Deutschland GmbH für die Stiftung des Preises auf das Herzlichste und leitet darin die Hoffnung ab, dass er einen weiteren Anreiz für die in den letzten Jahren erfreulich belebte Forschung auf dem Gebiet der neuromuskulären Erkrankungen, insbesondere der ALS, im deutschsprachigen Raum darstellt.

In dieser Sonderausgabe berichten alle Preisträger in kurz zusammengefasster Form über die wichtigsten Resultate ihrer Forschungsarbeit.

Prof. Dr. D. Pongratz – München
2. Vorsitzender der DGM

Die Rolle der Mitochondrien bei der sporadischen Amyotrophen Lateralsklerose

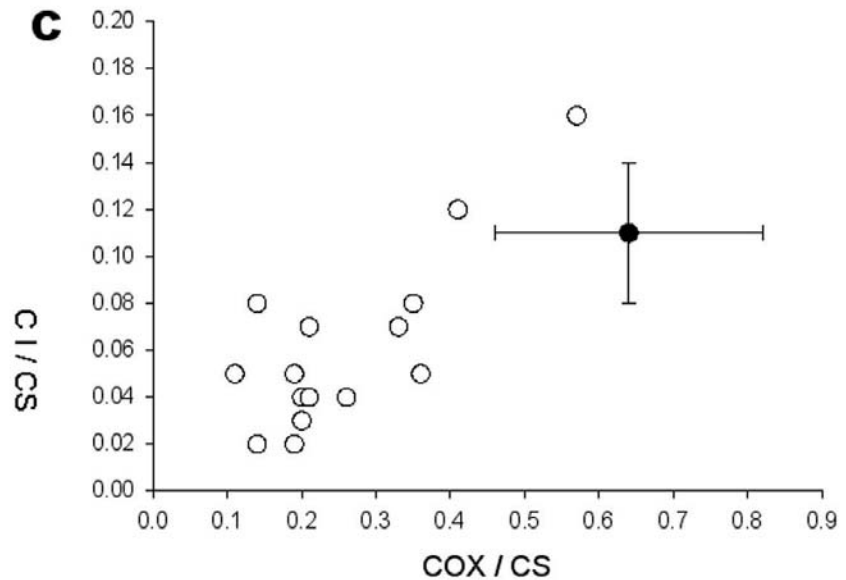
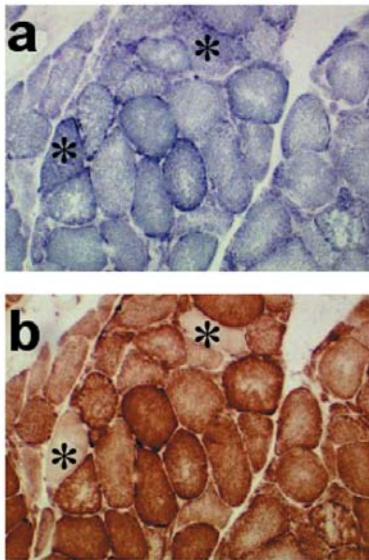


Dr. med. Stefan Vielhaber
Klinik für Neurologie II
Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
Leipziger Str. 44
39120 Magdeburg
stefan.vielhaber@medizin.uni-magdeburg.de

Die sporadische Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine nicht seltene progrediente degenerative motorische Systemerkrankung des höheren Lebensalters. Charakteristisch für diese Erkrankungsform ist das Nebeneinander von atrophischen Paresen und spastischen Zeichen. Die Ursachen dieser relativ selektiven Vulnerabilität von Motoneuronen sind weitgehend unbekannt. In jüngerer Zeit mehren sich jedoch die Hinweise auf eine sauerstoffradikalvermittelte mitochondriale Schädigung. Atmungskettengehemmte Mitochondrien sind eine bedeutsame Quelle für die Generierung von Sauerstoffradikalen. Ultrastrukturelle Untersuchungen an spinalen Motoneuronen belegen einen frühen Mitochondriendefekt im Krankheitsprozess (1). Als mögliche Ursachen der Veränderungen der Mitochondrienfunktion kommen funktionelle Schädigungen der Mitochondrien und/oder Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA) in Betracht. Mit verbesserten biochemischen Untersuchungstechniken der oxidativen Phosphorylierung im Mikromaßstab gelang uns der Nachweis bereits geringfügiger Aktivitätsänderungen mitochondrialer Enzyme im Skelettmuskel von ALS-Patienten (2). Mit molekularbiologischen Methoden konnte dann dieser funktionelle Defekt der Atmungskette verifiziert werden (3). Die lokali-

sierte Protonen-MR-Spektroskopie ermöglichte darüber hinaus nichtinvasive Einblicke in den Hirnstoffwechsel, die einen Mitochondriendefekt auch im motorischen Kortex bei diesen Erkrankungsformen nahe legt (4).

Im Skelettmuskel der ALS-Patienten fand sich spektralphotometrisch eine signifikante Defizienz der NADH: Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex I + III) bzw. NADH:CoQ1 Oxidoreduktase (Komplex I) (2,4). Darüber hinaus war eine Defizienz der Cytochrom-c-Oxidase nachweisbar (3). Diese Befunde ließen sich polarographisch durch Inhibitorbindungsstudien mit einem spezifischen Hemmstoff des Komplexes I (Amytal) der mitochondrialen Atmungskette verifizieren und drückten sich auch in einem erhöhten Flusskontrollkoeffizienten und verminderten Maximalatmungsraten für Komplex I-Substrate aus (2). Diese mitochondrialen Funktionsstörungen sind nicht durch unspezifische neurogene Umbauprozesse erklärbar, weil sie nicht bei Patienten mit einer SMA- oder Tay-Sachs-Erkrankung nachweisbar waren (5). Interessanterweise ließ sich auch in kultivierten Fibroblasten der Haut eine verminderte Cytochrom-c-Oxidase-Aktivität nachweisen. Dieser Befund deutet auf einen systemischen mitochondrialen Defekt hin (5). Als histologisches Korrelat der funktionellen mitochondrialen Defekte fanden sich im Muskel bis zu 2 % COX-negative Fasern (bei Kontrollen nur 0,1 %) und sporadisch auf "ragged red fibers" (3). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten insbesondere subsarkolemmal gelegene Akkumulationen von pathologischen Mitochondrien, und heterogen verteilte Mitochondriendefekte fanden sich auch in den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Saponin-permeabilisierten Muskelfasern auf Einzelfaserniveau (5). In den molekularbiologischen Untersuchungen konnten wir in einem Fall multiple Deletionen mitochondrialer DNA im Muskel nachweisen. In der Mehrzahl der Fälle fand sich jedoch eine Depletion an mitochondrialer DNA im Southern-Blot (3). Die beobachteten multiplen mitochondrialen DNA-Defekte lassen sich wahr-



Mitochondriendefekte im Skelettmuskel von ALS-Patienten: Die Biopsie aus dem M. quadriceps zeigte einzelne COX-negative Muskelfasern (b), die sich in der SDH-Färbung (a) stark positiv darstellen (Sternchen). (c) Bei der Mehrzahl der ALS-Patienten (offene Kreise) waren im Skelettmuskelhomogenat die auf die Citratsynthase normierten Enzymaktivitäten der Komplexe I und IV der mitochondrialen Atmungskette vermindert (Kontrollen – gefüllte Kreise mit Fehlerbalken).

scheinlich auf den gemessenen Mangel an membrangebundener Mn-SOD zurückführen (3).

Erst kürzlich gelang es bei transgenen ALS-Mäusen einen neuroprotektiven Effekt von Kreatin auf Vorderhornzellen nachzuweisen (6). Mit Hilfe der lokalisierten Protonen-MR-Spektroskopie (^1H -MRS) konnten wir im motorischen Kortex von ALS-Patienten nach oraler Einnahme von Kreatin einen Anstieg des zuvor erniedrigten neuronalen Metaboliten N-Acetylaspartat (NAA) messen (4). Die Mehrzahl der ALS-Patienten wies gleichzeitig auch eine mitochondriale Funktionsstörung im Skelettmuskel auf, die mit dem NAA/Cholin Quotienten korrelierte.

Die Aufklärung der Mitochondrienfunktion bei der sporadischen Amyotrophen Lateralsklerose eröffnet einen neuen Zugang zur Pathogenese dieser Erkrankungsform und könnte für zukünftige neuroprotektive Therapiestrategien von Bedeutung sein.

1. Sasaki S, et al. (1996) *Neurosci Lett* 204:53-56
2. Wiedemann FR, et al. (1998) *J Neurol Sci* 156:65-72
3. Vielhaber S, et al. (2000) *Brain* 123:1339-1348
4. Vielhaber S, et al. (2001) *Exp Neurol* 172:377-382
5. Vielhaber S, et al. (1999) *J Neurol Sci* 169:133-139
6. Klivenyi P, et al. (1999) *Nature Medicine* 5:347-350

Molekulare Grundlagen und therapeutische Perspektiven bei einer Form des infantilen Cytochrom-c-Oxidase-Mangels



Dr. med. Michaela Jaksch
Stoffwechselzentrum München-Schwabing
Kölner Platz 1
80804 München



PD Dr. med. Hanns Lochmüller
Friedrich-Baur-Institut und
Genzentrum München
Feodor-Lynen-Straße 25
81377 München

Das Mitochondrium spielt eine zentrale Rolle in der Energieversorgung fast aller Zellen, v. a. des Herzmuskels, der Skelettmuskulatur und des ZNS. Mitochondriale Erkrankungen nehmen einen wachsenden Stellenwert in Klinik und Forschung ein. Defekte der terminalen Energieversorgung, sog. Atmungskettendefekte bilden eine wichtige Subgruppe, wobei der Cytochrom-c-Oxidase (COX)-Mangel am häufigsten vorkommt. Die genetischen Ursachen sind erst teilweise bekannt (zur Übersicht s. Abb. 1). Eine Form des autosomal rezessiven COX-Mangels ist durch einen fulminanten Krankheitsverlauf in den ersten Lebenswochen bis -monaten gekennzeichnet. Als Ursache dieser frühkindlichen Form des isolierten COX-Mangels mit Kardiomyopathie und Leigh-like-Symptomatik konnte ein Assemblierungsgen auf Chromosom 22 identifiziert werden, namentlich *SCO2* (2). Mithilfe eines Chromosomentransfers (Chromosom 22) in Fibroblasten eines Patienten mit *SCO2*-Mutationen gelang es, den COX-Defekt dieser Zellen zu beheben (3). Eine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation wurde daraufhin bei insgesamt 6 Kindern mit *SCO2*-Mutationen erstellt (3,4).

Die Cu_A- und Cu_B-Bindungsstellen der COX sind in den mitochondrial kodierten Untereinheiten I und II lokalisiert und stellen die sog. Kernbereiche dar, die für die Aufrechterhaltung der katalytischen Funktion essentiell sind. Hierfür benötigen die Bindungsstellen Kupfer (Cu) (siehe auch Abbildung 1). Es wurde von anderen Arbeitsgruppen anhand von Hefestudien vermutet, dass *SCO2* für ein Cu-bindendes Protein kodiert (*Sco2p*).

Um Fragen zur Funktion und Struktur von humanem *Sco2* (*hSco2*) sowie dessen pathogenetischer Relevanz beantworten zu können, haben wir eine Studie mithilfe von Patientenzellen (Hautfibroblasten und Myoblasten) sowie mit rekombinant hergestelltem *hSco2* durchgeführt (5).

Zunächst konnten wir anhand eines rekombinant hergestellten Fragmentes, welches das CxxxC Metallbindungsmotif enthält, zeigen, dass eine Cu-Bindung mit einer Stöchiometrie von 1:1 stattfindet. Diese findet nicht statt, wenn die Cysteine des Metallbindungsmotifs (CxxxC) durch Alanine (AxxxA) ersetzt wurden. Wir konnten weiterhin zeigen, dass *hSco2* homomere Komplexe bildet, und zwar unabhängig vom Vorhandensein der Metallbindungsstelle. Mithilfe von polyklonalen Antikörpern, die gegen einzelne Untereinheiten der COX gerichtet sind, konnten wir zeigen, dass Patienten mit *SCO2*-Mutationen eine unterschiedliche und gewebespezifische Verteilung der COX-Untereinheiten aufweisen. Um die Konzentration von intaktem *Sco2*-Protein in verschiedenen Patientenzellen zu ermitteln, führten wir Western-Blot-Analysen mithilfe eines polyklonalen *hSco2*-Antikörpers durch. Die Western-Blot-Analysen erbrachten eine signifikante Reduktion des *Sco2*-Proteins in Hautfibroblasten und Myoblasten von Patienten mit *SCO2*-Mutationen. Um zu erforschen, ob sich die Cu-Aufnahme- bzw. Retentionszeiten in Hautfibroblasten von Patienten mit verschiedenen *SCO2*-Mutationen von Kontrollen unterscheiden, haben wir Fibroblasten mit radioaktivem Cu (⁶⁴Cu) inkubiert. Wir konnten zeigen, dass die Cu-Aufnahme signifikant erhöht, die

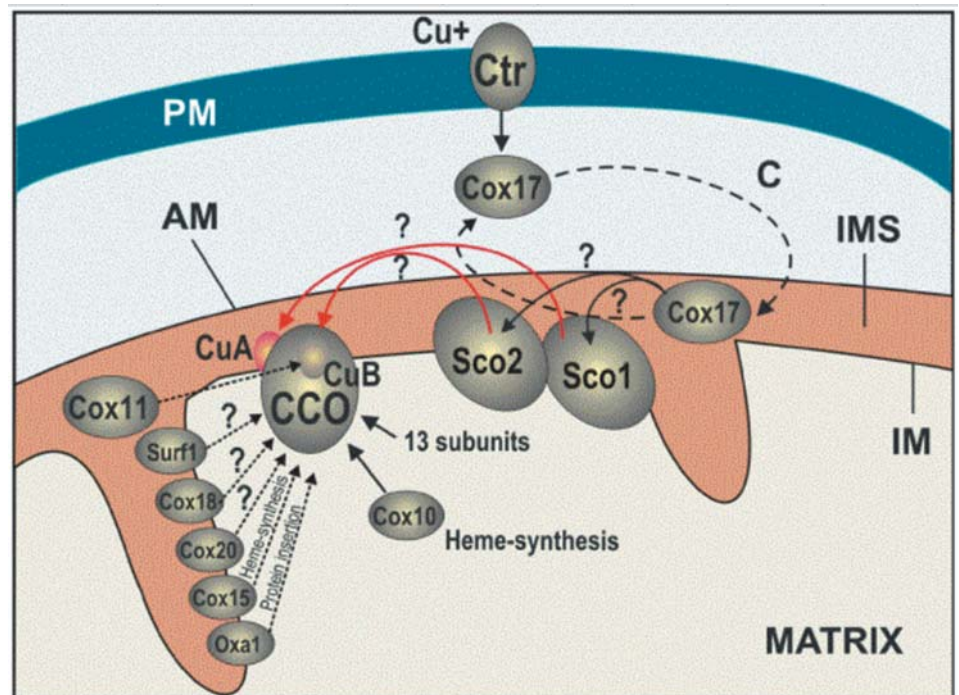


Abbildung 1: Assemblierung der Cytochrom-c-Oxidase.

Abkürzungen: PM, Plasmamembran; C, Cytoplasma; Cu, Kupfer; Ctr, Kupfertransporter; AM, mitochondriale Außenmembran; IMS, Intermembranraum; IM, mitochondriale Innenmembran; CCO, Cytochrom-c-Oxidase

Retentionszeit dagegen normal ist. Dieses Ergebnis stand in Einklang mit einem weiteren Ergebnis, nämlich einer bereits basal 4fach erhöhten Cu-Konzentration in kultivierten Myoblasten eines Patienten mit *SCO2*-Mutationen. Um darüber hinaus den direkten Beweis zu führen, dass es sich bei Patienten mit *SCO2*-Mutationen tatsächlich ursächlich um das *SCO2*-Gen handelt, haben wir *Sco2* defiziente Myoblasten mithilfe des retroviralen Gentransfers (enthielt *SCO2*-cDNA Wildtyp-Sequenz) transfiziert und konnten damit die COX-Aktivität wiederherstellen. Die Aktivität der COX konnte auch mithilfe von Cu-Histidinat, einem Salz, welches bereits bei Patienten mit Menkes-Syndrom (einer anderen Erkrankung aus dem Bereich der Cu-Stoffwechselstörungen) erfolgreich eingesetzt wird, komplett wiederhergestellt werden. Mit steigender Cu-Histidinat-Konzentration im Kulturmedium der wachsenden Myoblasten fand sich eine steigende COX-Aktivität. Damit steht möglicherweise in Zukunft ein Therapieansatz bei dieser bislang letalen Form des COX-Mangels zur Verfügung.

1. Shoubridge EA (2001) Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet* 106:46-52
2. Papadopoulou LC, et al. (1999) Fatal infantile cardioencephalomyopathy with cytochrome c oxidase (COX) deficiency and mutations in *SCO2*, a human COX assembly gene. *Nat Genet* 23:333-337
3. Jaksch M, et al. (2000) Mutations in *SCO2* are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* 9:795-801
4. Jaksch M, et al. (2001) Homozygosity (E140K) in *SCO2* causes delayed infantile onset of cardiomyopathy and neuropathy. *Neurology* 57:1440-1446
5. Jaksch M, et al. (2001) Cytochrome c oxidase deficiency due to mutations in *SCO2*, encoding a mitochondrial copper-binding protein, is rescued by copper in human myoblasts. *Hum Mol Genet* 26:3025-3035

Diese Arbeit wurde von der Ernst und Berta Grimmke-Stiftung sowie von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Klinik, Genetik und Therapie mitochondrialer Erkrankungen: mitochondriale Myopathie, chronisch progressive externe Ophthalmoplegie und Kearns-Sayre-Syndrom



PD Dr. med. Thomas Klopstock
Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München
81377 München

Der mitochondriale Energiestoffwechsel steht unter der Kontrolle zweier Genome. Während die meisten mitochondrialen Proteine im Zellkern codiert und dann in das Mitochondrium importiert werden, werden 13 Polypeptide von der eigenen mitochondrialen DNA (mtDNA) hergestellt. Im Gegensatz dazu sind nur wenige nukleäre mitochondriale Erkrankungen

bekannt, jedoch zahlreiche Syndrome mit Mutationen der mtDNA. Wir beschäftigten uns vor allem mit der mitochondrialen Myopathie (MiMy), der chronisch progressiven externen Ophthalmoplegie (CPEO) und dem Kearns-Sayre-Syndrom (KSS).

Klinik

Während die MiMy durch eine reine Gliedergürtelschwäche gekennzeichnet ist, steht bei den anderen genannten Syndromen die Beteiligung der äußeren Augenmuskeln im Vordergrund. Dabei bleibt die CPEO auf den Muskel beschränkt, bei der CPEO plus können nicht-muskuläre Symptome hinzukommen. Das KSS schließlich ist definiert durch die Kombination aus externer Ophthalmoplegie, Retinitis pigmentosa und frühem Beginn plus Ataxie oder kardiale Reizleitungsstörung oder erhöhtes Liquoreiweiß. Wir haben 102 Patienten mit diesen Krankheitsbildern gesehen. Die CPEO mit 34 und die CPEO plus mit 52 Fällen waren dabei wesentlich häufiger als die reine MiMy und das KSS. Es zeigte sich, dass es fließende Übergän-

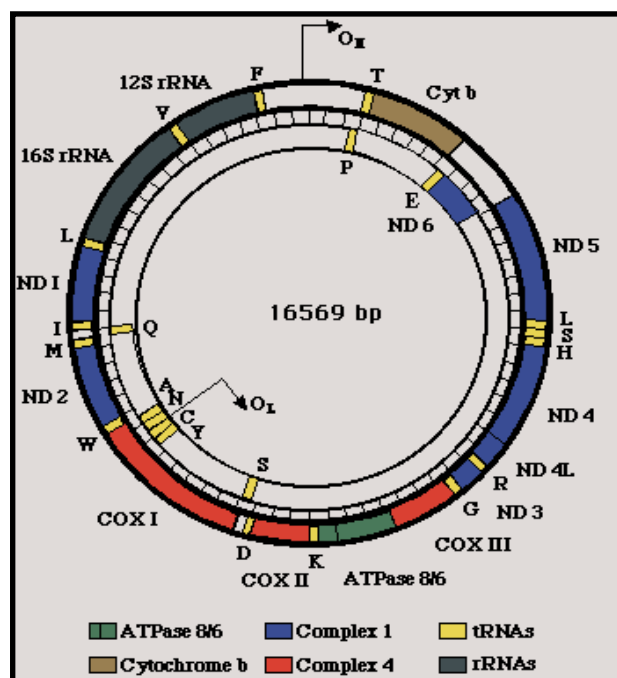


Abb. 1: Die mtDNA ist eine zirkuläre doppelsträngige DNA aus 16569 bp und codiert für 13 Polypeptid-Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe.

ge sowohl zwischen CPEO und CPEO plus als auch zwischen CPEO plus und KSS gibt. Die in der Literatur diskutierte Hypothese eines Kontinuums zwischen diesen Syndromen kann daher unterstützt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Erkrankung umso früher beginnt, je komplexer das Syndrom ist.

Genetik

Es ist bekannt, dass große Deletionen der mtDNA die häufigsten Mutationen bei CPEO und KSS sind. Wir fanden bei 57 untersuchten Patienten solche Deletionen in ca. 70 % der Fälle, und zwar im Gegensatz zur Literatur unabhängig davon, ob eine CPEO oder ein KSS vorlag. An weiteren genetischen Veränderungen fanden sich multiple Deletionen sowie die Punktmutation an Position 3243. Insgesamt konnten durch zwei einfache molekulargenetische Verfahren, Southern-Blot und PCR, bei 86 % aller Patienten Mutationen festgestellt werden. Das ist wichtig für die Routinediagnostik, weil man vor aufwändigeren Untersuchungen zunächst die Ergebnisse dieser Verfahren abwarten kann. Wir konnten außerdem zeigen, dass der Phänotyp unabhängig von Größe und Lage der Deletion ist, aber signifikant mit dem

Anteil deletierter mitochondrialer Genome korreliert. Je höher der Grad der Heteroplasmie, desto komplexer also der Phänotyp.

Therapie

Neben der Gentherapie, die noch in ihren Anfängen steckt, und symptomatischen Maßnahmen besteht theoretisch die Möglichkeit, die Biochemie des Energiestoffwechsels zu beeinflussen. Eine Substanz, die hierfür in Frage kommt, ist Kreatin, das energiereiche Phosphate für die Resynthese von ATP bereitstellen kann und das in zahlreichen Studien zu einer Verbesserung der muskulären Leistungsfähigkeit Gesunder geführt hat. Wir haben daher eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, plazebokontrollierte Cross-over-Studie zur Wirkung von Kreatin bei 16 Patienten mit CPEO oder MiMy durchgeführt. Leider führte die Behandlung bei sehr guter Verträglichkeit nicht zu einer signifikanten Besserung von Kraft, Ausdauer, Augenbewegungen oder Aktivitäten des täglichen Lebens. Aufgrund der kleinen Fallzahl ist die Aussagekraft der Studie jedoch beschränkt. Eine größere Studie über einen längeren Zeitraum wäre sicherlich gerechtfertigt.



Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V.
DGM Bundesgeschäftsstelle
Im Moos 4 · 79112 Freiburg

Telefon: 07665/9447-0

E-Mail: DGM-FR@t-online.de

Telefax: 07665/9447-20

Internet: <http://www.dgm.org>



Aventis Pharma Deutschland GmbH
Königsteiner Straße 10
65812 Bad Soden am Taunus
Telefon 069/30522044

© Arcis Verlag GmbH, München 2002

ISSN 0949-1503

7. Jahrgang

Management of Neuromuscular Diseases

Info Forschungspreis 2002

Herausgeber der Schriftenreihe:

Prof. Dr. med. R. Dengler, Hannover

Prof. Dr. med. D. Pongratz, München

AUSSCHREIBUNG FORSCHUNGSPREIS 2003 FÜR NEUROMUSKULÄRE ERKRANKUNGEN

DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR MUSKELKRANKE E.V.

Die Aventis Pharma Deutschland GmbH, Bad Soden, stellt jährlich einmal der DGM ein Preisgeld für die Verleihung des Forschungspreises für neuromuskuläre Erkrankungen in Höhe von EUR 15.000 zur Verfügung.

Der Preis soll der Förderung der Forschung auf dem Gebiet der neuromuskulären Erkrankungen, insbesondere der Amyotrophen Lateralsklerose im deutschsprachigen Raum dienen. Mit ihm sollen jüngere Forscher für Verdienste bei der Erforschung von Pathomechanismen und für objektiv nachvollziehbare Therapieerfolge bei allen Formen von neuromuskulären Erkrankungen ausgezeichnet werden. Besonders sollen dabei Arbeiten zur Untersuchung der Ätiologie und Pathogenese der Amyotrophen Lateralsklerose sowie neuer diagnostischer Methoden bei dieser Erkrankung gewürdigt werden, die sich mit der interdisziplinären Betreuung von ALS-Patienten befassen.

Der Preis soll in der Regel in drei Teilen (1. Preis EUR 7.500/2. Preis EUR 5.000/3. Preis EUR 2.500) vergeben werden. Die Teilpreise können nach der jeweiligen Krankheit, die beforscht wurde, benannt werden.

Mögliche Kandidaten können sich selbst um den Preis bewerben. Daneben kann auch Fremdnennung erfolgen. Eine bereits zuvor oder gleichzeitig an anderer Stelle eingereichte Arbeit darf nicht mehr für die Verleihung des Preises benannt werden.

Die Begutachtung benannter Leistungen erfolgt durch zwei wissenschaftlich ausgewiesene Experten, die vom Vorstand der DGM für diese Aufgabe bestellt werden. Die Entscheidung über die Preisvergabe trifft der Vorstand der DGM aufgrund der wissenschaftlichen Begutachtung.

Bewerbungen richten Sie bitte in dreifacher Ausfertigung bis zum 31.03.2003 an:

DGM – Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V.
Im Moos 4 – 79112 Freiburg
Telefon: 07665/9447-0
Telefax: 07665/9447-20

E-Mail: DGM-FR@t-online.de

