

## Über die Feinstruktur und Topochemie von Riesenmitochondrien und deren Einlagerungen bei Myopathien\*

E. SLUGA und A. MONNERON

Neurologisches Institut der Universität Wien  
und Institut de Recherches scientifiques sur le cancer, Villejuif

Eingegangen am 15. Mai 1970

### Ultrastructure and Topochemistry of Giant Mitochondria and their Inclusions in Myopathies

*Summary.* Electron microscopic and topochemical examinations of giant mitochondria with inclusions were performed. The mitochondria were those of muscle tissue from myopathies. The ultrastructural changes consisted of enlargement of mitochondria with an increase of cristae, paracrystalline inclusions in the space between the cristae, as well as between the outer and inner surface membranes, and large, round, double-membrane-bound bodies, that contained fragmented cristae with inclusions and concentric membranous bodies. The different structural changes of mitochondria were thought to represent steps of development corresponding to an reaction of adaptation. The formation of giant mitochondria with inclusions is interpreted as a reactive phenomenon and not as primary structural abnormality. The topochemical examinations were performed with enzyme-digestions on ultrathin sections. A digestion-effect was obtained with proteolytic enzymes only, especially with pronase (0.1%/15 minutes). The paracrystalline inclusions could be identified as proteins. They did differ from proteo-lipid complexes of cell membranes. The nature of the inclusion-protein as enzyme-protein is discussed.

*Zusammenfassung.* Elektronenmikroskopische und topochemische Untersuchungen wurden an Riesenmitochondrien mit pathologischen Einlagerungen durchgeführt. Es handelte sich um Mitochondrien aus Muskelgewebe von Myopathien. Die feinstrukturellen Veränderungen waren Vergrößerung der Mitochondrien mit Vermehrung der Cristae, komplexe paracrystalline Einlagerungen vorwiegend im Intracristae-Raum aber auch zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran, und große, doppelmembran-begrenzte Gebilde, die fragmentierte Cristae mit Einlagerungen und konzentrische Membrankörperchen enthielten. Die verschiedenen Strukturveränderungen der Mitochondrien werden als Phasen einer Entwicklung aufgefaßt, die einer Anpassungsreaktion zu entsprechen scheint. Die Bildung von Riesenmitochondrien mit pathologischen Einschlüssen wird als reaktives Phänomen und nicht als primäre Strukturveränderung erklärt. Die topochemischen Untersuchungen wurden mit enzymatischen Verdauungen an ultradünnen Schnitten durchgeführt. Ein positiver Effekt wurde mit proteolytischen Fermenten, besonders Pronase (0,1%/15 min) erzielt. Die komplexen paracrystallinen Einlagerungen konnten als Eiweißsubstanzen identifiziert werden. Sie unterscheiden sich von den strukturbildenden Proteid-Lipidkomplexen der Zellmembranen. Die Natur der eingelagerten Eiweißsubstanzen als Enzymeiweiß wird diskutiert.

Gemeinsam mit Seitelberger und Moser wurden 1967 2 Fälle von Myopathie mit abnormen Mitochondrien beschrieben. In der Folge kamen 3 weitere Fälle zur Beobachtung. Von diesen 5 Fällen waren 4 Erwachsene mit oculärer Myopathie

\* Nach einer Mitteilung an der gemeinsamen Tagung der Österr. Arbeitsgemeinschaft für Ultrastrukturforschung und der Deutschen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie, Wien, September 1969.

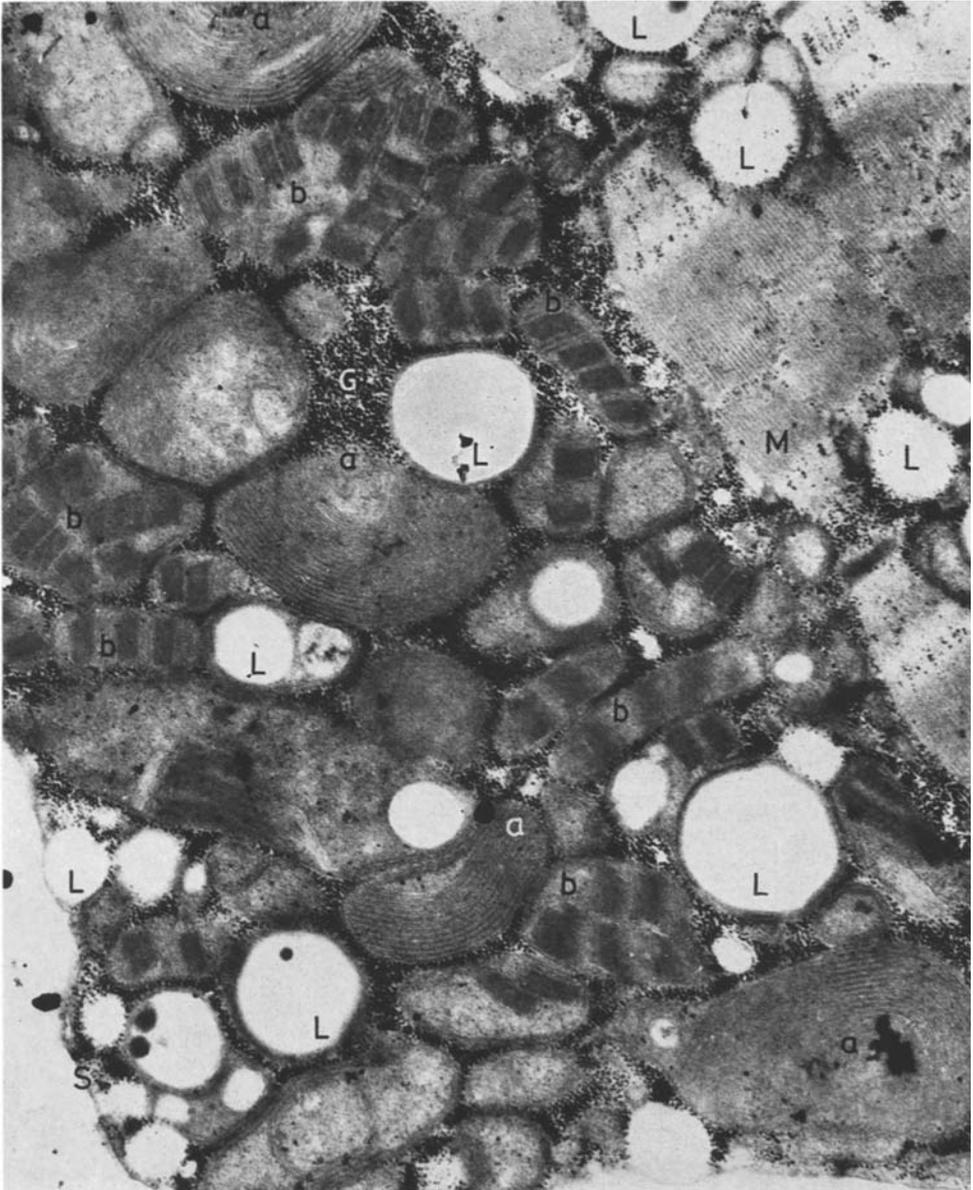


Abb. 1. Muskelfaser längs. Subsarkolemmale Anhäufung von abnormen Mitochondrien. *a* Vergrößerte Mitochondrien mit vermehrten, zirkulär angeordneten Cristae. *b* Mitochondrien mit Einlagerungen im Intracristae-Raum. *L* Lipidtröpfchen, *G* Glykogen, *M* Myofibrille, *S* Sarkolemm. Vergr. 20000×

und ein Kind mit der Schulter- und Beckengürtelform einer progressiven Muskeldystrophie.

Muskelbiopsien aus den betroffenen Skelettmuskeln wurden histologisch und elektronenmikroskopisch (Glutaraldehyd-Palade Fixierung, Epon-Einbettung)

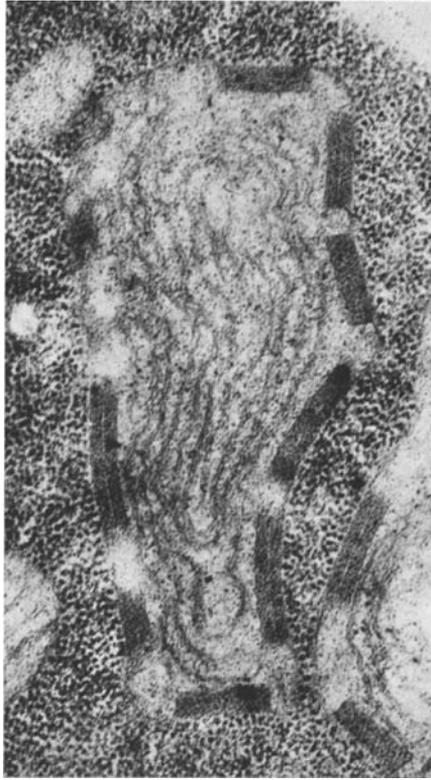


Abb. 2. Muskelmitochondrien längs. Lamelläre Einlagerungen im Raum zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran. Vergr. 46800×

untersucht. Sie enthielten in allen Fällen in einzelnen, disseminiert verteilten Muskelfasern zahlreiche abnorme Mitochondrien. Diese Fasern ließen durchwegs auch reichlich Lipidtröpfchen erkennen (Abb. 1). Die abnormen Mitochondrien waren in der Muskelzelle verschieden lokalisiert anzutreffen, besonders zahlreich subsarkolemmal (Abb. 1), interfibrillär waren sie vereinzelt oder in kleinen Gruppen vorhanden (Abb. 3).

Die *Feinstruktur* der pathologischen Veränderungen dieser Mitochondrien zeigte eine Vergrößerung mit Vermehrung und cirkulärem Arrangement meist tubulärer Cristae (Abb. 1, a), sowie abnormen Einlagerungen (Abb. 1, b), die im Raum zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran (Abb. 2) und im Raum innerhalb der Cristae mitochondriales lokalisiert waren (Abb. 1, b/3). Vereinzelt waren Cristae mit Einlagerungen in einer rechtwinkeligen Anordnung anzutreffen (Abb. 4). Die Einlagerungen bestanden aus lamellär erscheinenden Strukturen. Diese waren im Längsschnitt parallel geordnet; innerhalb einer Cristae meist 4 im aequidistanten Abstand von 50 bis 60 Å (Abb. 3). Mehrfach waren auch Gruppen von je 4 Doppellamellen anzutreffen (Abb. 3). An Querschnitten zeigten diese Einlagerungen einen komplexen Aufbau aus quadratischen Strukturen. Die jeweils in einer Cristae gelegenen 4 Membranen waren im Abstand

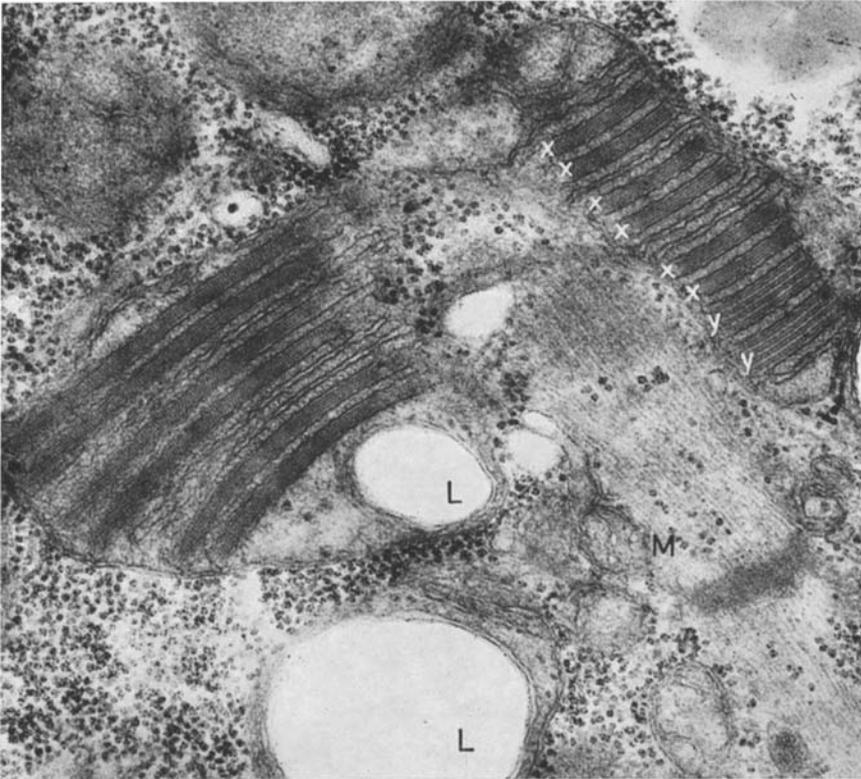


Abb. 3. Muskelfaser längs. Interfibrilläre Mitochondrien mit lamellären Einlagerungen im Intracristae-Raum. Innerhalb der Cristae (*x*) 4 parallel geordnete Membranen. Innerhalb der Cristae (*y*) 4 parallel geordnete Doppelmembranen. *M* Myofibrille, *L* Lipid. Vergr. 54000 ×

von 150—200 Å durch dünne Septen miteinander verbunden; alternierend, jedoch nur zwischen 2 Membranen, traten jeweils stark osmiophile, quadratische Strukturen auf (Abb. 5). Zellorganellen mit diesen Einlagerungen waren nach Form, begrenzender Doppelmembran und Cristaeordnung eindeutig immer als Mitochondrien zu identifizieren. Daneben fanden sich aber auch abnorme Gebilde, die mehrfache Mitochondriengröße hatten, keine typische Cristaeordnung zeigten und wie doppelmembranbegrenzte Säcke erschienen (Abb. 6). Sie waren überwiegend von rechteckigen Gebilden erfüllt, die nach Struktur und Größe fragmentierten Cristae mit Einlagerungen entsprachen. An besonders großen Gebilden traten randständig Doppelmembranbildungen auf, die als konzentrisch angeordnete Cristaebildungen imponierten (Abb. 7) und tubuläre Strukturen besaßen. Weiters waren im Inneren solcher Gebilde mehrere geschichtete Membrankörper vorhanden, die aus konzentrisch angeordneten Doppelmembranen aufgebaut waren (Abb. 7).

Die verschiedenen Formen der Riesenmitochondrien mit Einlagerungen scheinen verschiedenen Entwicklungsstufen zu entsprechen. Zuerst tritt eine Mitochondrienhyperplasie mit Vermehrung und tubulärer Konfiguration der

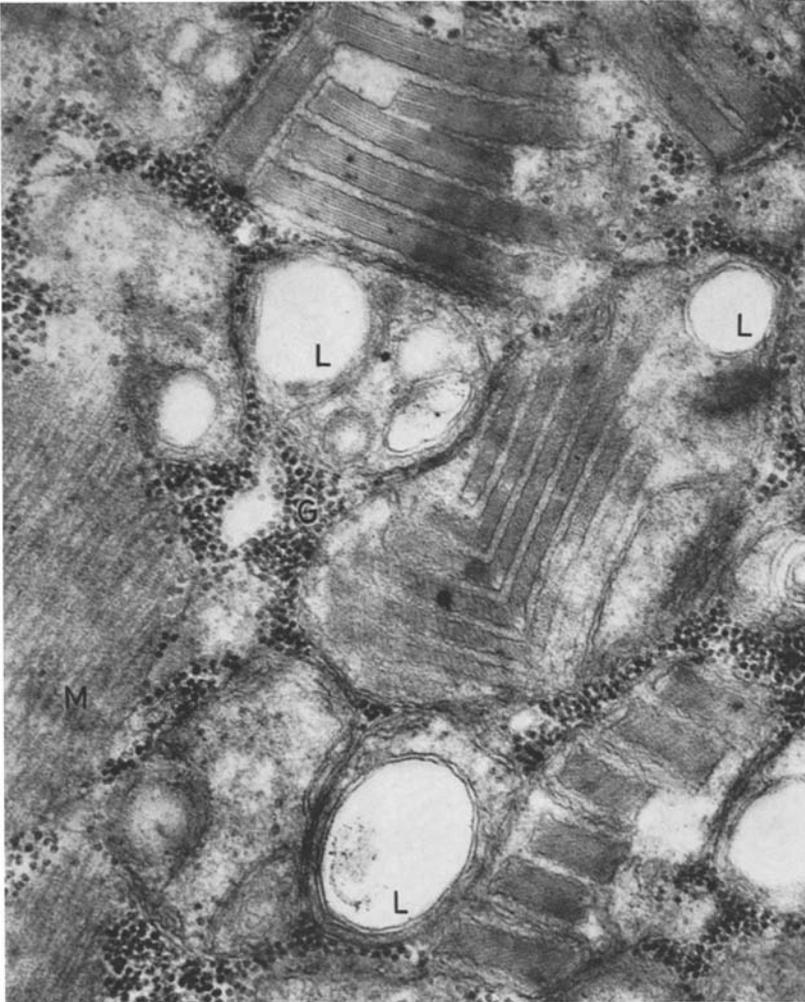


Abb. 4. Muskelfaser längs. Subsarkolemmale Anhäufung von abnormen Mitochondrien. Rechtwinkelige Anordnung der mit Einlagerungen erfüllten Cristae mitochondriales. *M* Myofibrillen, *L* Lipid, *G* Glykogen. Vergr. 54000 $\times$

Cristae auf. Dann kommt es zur Bildung und zunehmender Einlagerung komplexer membranöser Strukturen im Intra-Cristae-Raum. Sobald diese Einlagerungen große Anteile der Mitochondrien einnehmen, setzt eine Fragmentierung der mit Einlagerungen erfüllten Cristae ein und es entstehen große sackförmige Gebilde, die das Endstadium der Riesenmitochondrienbildung darzustellen scheinen. Die verschiedenen Stadien der Strukturentwicklung weisen auf verschiedene Funktionsstadien hin. Über die Phase einer, vielleicht anpassungsbedingten, Funktionssteigerung kommt es zu einer Phase der Überproduktion des die eingelagerten Membranen bildenden Materials. Diese scheint überzugehen in eine Phase der Ineffektivität, auf die schließlich die Organellendestruktion folgt.

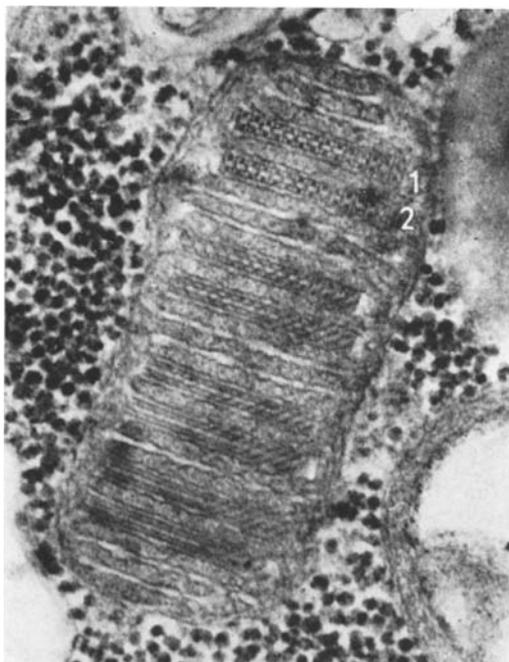


Abb. 5. Muskelmitochondrium: die lamellären Einlagerungen der Cristae 1 und 2 sind quer getroffen: Quadratische Gliederung durch regelmäßig aufeinanderfolgende septale Verbindungen zwischen 4 Membranen, alternierend mit Verbindungsstrukturen zwischen je 2 Membranen. Vergr. 78000 $\times$

Zur weiteren Identifizierung der beobachteten Veränderungen der Mitochondrien erschienen *Funktionsuntersuchungen* dieser Organellen wichtig. *Quantitative biochemische* Untersuchungen, von Doz. Schatz (Institut für Biochemie Wien) durchgeführt, ergaben keinen eindeutig pathologischen Befund. Die Untersuchungen wurden an einer mittels Differentialzentrifugation gewonnenen Mitochondrienfraktion durchgeführt, in der oxydative Phosphorylierung, Atmungskontrolle, Succinat-Oxydase- und ATPase-Aktivität bestimmt wurden.

Der nächste Schritt war, an den veränderten Mitochondrien selbst chemische Untersuchungen vorzunehmen. Dies wurde durch die von Monneron und Bernhard ausgearbeitete Methode der enzymatischen Verdauung am ultradünnen Schnitt ermöglicht. Das von den Autoren entwickelte Verfahren macht es möglich, Osmium + Aldehyd-vorfixiertes und in Epon eingebettetes Material zur Untersuchung zu verwenden. Die Exaktheit und Spezifität dieser Untersuchungstechnik ließ sie als *topochemisches Nachweisverfahren* auch am pathologischen Material als geeignet erscheinen. In dieser Studie wurde sie an Ultradünnschnitten von Muskelgewebe mit Riesenmitochondrien angewendet.

#### *Methode*

1. Voroxydation mit 10% Perjodsäure, optimale Zeit 30 min.
2. Angeschlossen wurde eine Digestion mit folgenden Enzymen: a)  $\alpha$ -Amylase: 0,5% Lösung in Sörensen-Puffer, pH 7,0, 15/30 min. b) Hyaluronidase: 0,5% Lösung in Phosphat-

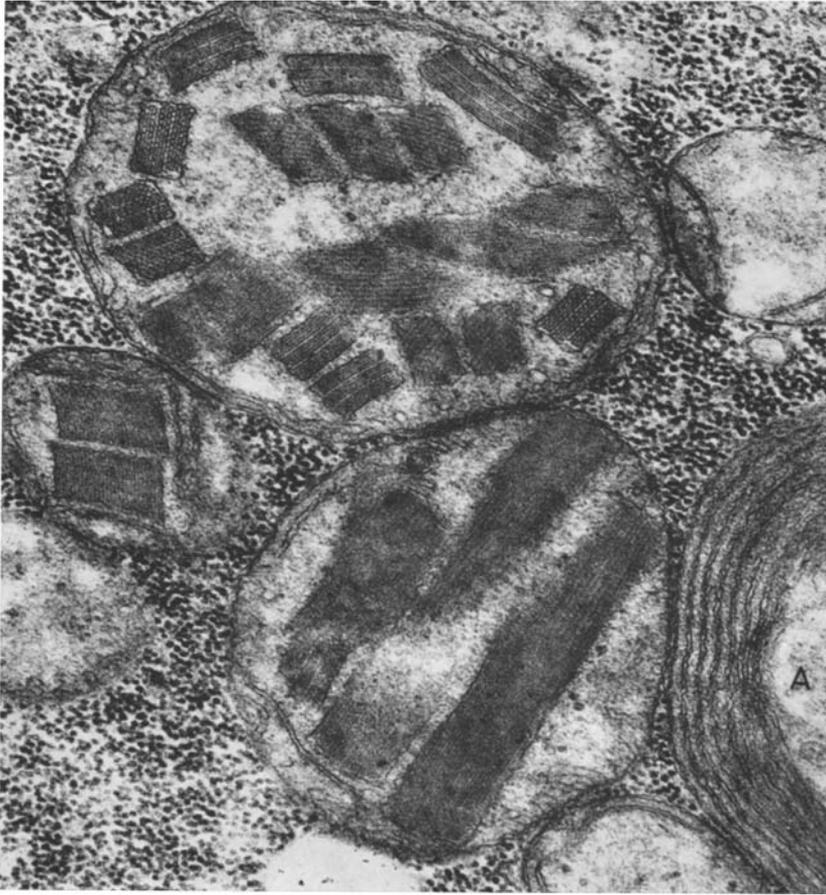


Abb. 6

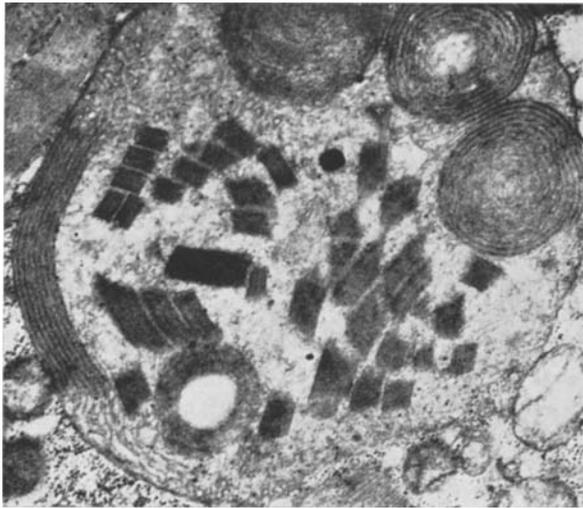


Abb. 7

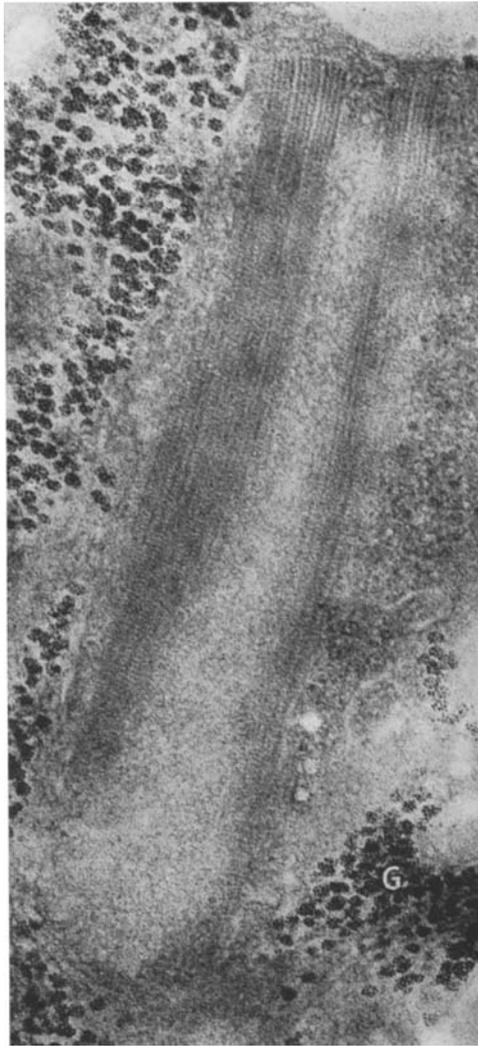


Abb. 8. Muskelmitochondrium längs: Perjodsäure-Oxydation (10%/30 min) am ultradünnen Schnitt: Kontrastverminderung, gute Strukturhaltung besonders der lamellären Einlagerungen. *G* Glykogen. Vergr. 60000×

Abb. 6. Doppelmembranbegrenzte Gebilde mit zahlreichen rechtwinkligen Strukturen, die fragmentierten Cristae mit ihren Einlagerungen entsprechen. *A* großes Gebilde mit randständig konzentrisch, geschichteten Doppelmembranen. Vergr. 54000×

Abb. 7. Großes doppelmembranbegrenztes Gebilde mit fragmentierten Cristae mit Einlagerungen. Randständig konzentrische Doppelmembranbildungen, im Inneren mehrere geschichtete Membrankörper aus Doppelmembranen. Vergr. 21000×

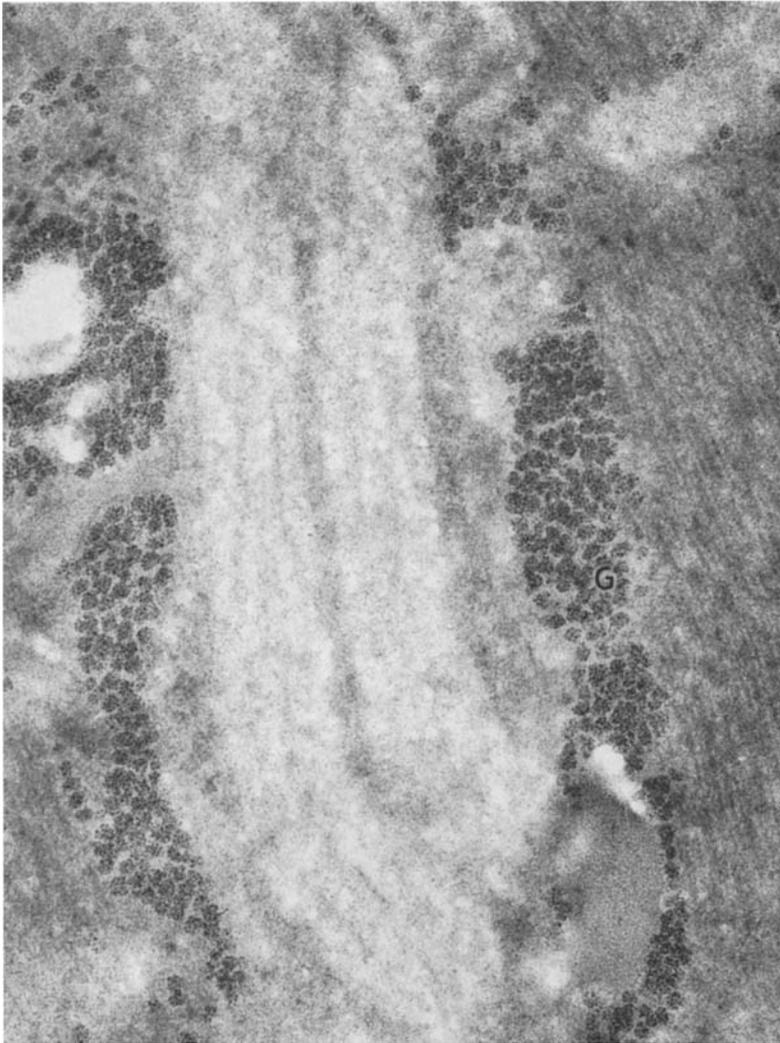


Abb. 9. Muskelmitochondrium längs: Pronaseverdauung (0,1%/15 min) am ultradünnen Schnitt, nach Voroxydation. Komplette Digestion der lamellären Einlagerungen. Noch erhaltene Cristaemembranen. G Glykogen. Vergr. 60000×

Puffer, pH 7,0, 15/30/60 min. c) Ribonuklease: 0,5% Lösung in Aqua dest., pH 6,8, 60 min  
 d) Proteolytische Enzyme: Pronase: 0,1% Lösung in Aqua dest., pH 7,4, 15/30 min; Pepsin: 0,1% Lösung in 0,5% HCl, 15/30/60 min.

Alle Inkubationen erfolgten bei 37° C. Bei allen Versuchen wurden Kontrollen mit dem enzymfreien Lösungsmittel vorgenommen.

Die *Ergebnisse* dieser Untersuchungsreihe waren eindeutig:

Die Voroxydation führte im angewendeten Zeitbereich ausschließlich zu einer allgemeinen Herabsetzung des Kontrastes; es traten jedoch keine Strukturveränderungen, insbesondere keine an den pathologischen Einlagerungen auf

(Abb. 8). Die enzymatischen Verdauungen ließen ausschließlich mit proteolytischen Fermenten einen positiven Effekt erkennen. Im besonderen kam es bei Anwendung von Pronase zu einer prompten und spezifisch erscheinenden Wirkung. Bei Verwendung einer nur 0,1% Lösung trat bereits nach 15 min eine komplette Verdauung der eingelagerten Lamellen ein, während die Membranen der Cristae mitochondriales erhalten blieben (Abb. 9). Der mit Pepsin erzielte Effekt war wesentlich geringer und erst nach längerer Verdauung (30 min) zu beobachten, erreichte aber auch nach 60 min nicht die Wirkung der 15 min-Pronaseverdauung. Amylase, Ribonuklease und Hyaluronidase blieben ohne Effekt.

Diese Ergebnisse der topochemischen Bestimmungsverfahren erlauben, die eingelagerten, komplex geordneten Lamellen als Eiweißsubstanzen zu identifizieren. Sie unterscheiden sich von den Cristaemembranen durch ihr andersartiges Digestionsverhalten. Die komplette Verdauung der pathologischen Substanzen durch Pronase legt nahe, daß sie vorwiegend aus Proteinen bestehen und nicht komplexe Proteid-Lipidverbindungen sind. Solche liegen in den originären Membranen von Zellstrukturen vor und bleiben bei den verwendeten Zeiten und Konzentrationen der proteolytischen Digestion erhalten.

### Diskussion

Abnorme Mitochondrien mit parakristallinen Einlagerungen wurden bei Myopathien bereits mehrfach beobachtet. Von Luft et al., Shy et al., Gruner, Norris und Panner, Zintz und Villiger sowie Price et al. wurden feinstrukturelle Details dieser pathologischen Veränderungen beschrieben.

Die Entstehung dieser Mitochondrien, ebenso wie Natur und funktionelle Bedeutung dieser Einlagerungen stellen ein offenes Problem dar. Luft u. Mitarb. konnten an den untersuchten Muskelmitochondrien ihres Falles ein "loose coupling" der Atmungskontrolle feststellen. Price et al. weisen auf die Möglichkeit des Zusammenhanges mit Veränderungen der in den Mitochondrien ablaufenden Fettsäureoxydation hin und diskutieren die Natur der Einlagerungen in Hinblick auf geordnete Enzymeiweiß-Subunits. Ob es sich dabei um eine genetische Strukturstörung oder um eine kompensatorische Reaktion handelt, blieb unentschieden.

In den eigenen Untersuchungen zeigten die Strukturanalysen, daß Riesenmitochondrien mit Einlagerungen nicht primäre strukturelle Abnormitäten sind, sondern sich aus hyperplastischen Organellen entwickeln, durch zunehmende Einlagerungen ihre volle Ausbildung erfahren und in der Folge wieder zu Grunde gehen. Diese strukturelle Entwicklung scheint, wie ausgeführt, das morphologische Pendant einer funktionellen Entwicklung zu sein, die eine frustrane Anpassungsreaktion der Mitochondrien nahelegt.

Die topochemischen Untersuchungen zeigten, daß das im Verlauf der Phase der Funktionssteigerung überproduzierte, abgelagerte und komplex angeordnete Material als Proteine identifizierbar ist. Über seine Herkunft lassen sich entsprechend dem topochemischen Verhalten gewisse Rückschlüsse ziehen. Das unterschiedliche Verhalten von Einschlüssen und Cristaemembranen schließt aus, daß die eingelagerten Proteine vervielfachte Mitochondrienmembranen und damit

Strukturproteine sind. Offen bleibt die Frage, ob das abgelagerte Eiweiß Metabolit- oder Enzymeiweiß entspricht, eine Frage, die aber angesichts der ausschließlichen Lokalisation der Einlagerungen im intracrystallinen Raum wohl eher zugunsten des Enzymeiweißes beantwortet werden darf.

### Literatur

- Gruner, J. E.: Sur quelques anomalies mitochondriales observées au cours d'affections musculaires variées. *Soc. Biol. (Paris)* **157**, 181 (1963).
- Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., Afzelius, B.: A case of severe hypermetabolisme of non-thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondria respiratory control: a correlated clinical, biochemical and morphological study. *J. clin. Invest.* **41**, 1776 (1962).
- Monneron, A., Bernhard, W.: Action de certaines enzymes sur des tissus inclus en epon. *J. Microsc.* **5**, 697 (1966).
- Price, H. M., Gordon, G. B., Munsat, T. L., Pearson, C. M.: Myopathy with atypical mitochondria in the (type I) skeletal muscle fibers. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **26**, 475 (1967).
- Shy, G. M., Gonatas, N. K., Perez, M.: Two childhood myopathies with abnormal mitochondria. I. Megaconial myopathy. II. Pleoconial myopathy. *Brain* **89**, 133 (1966).
- Sluga, E., Seitelberger, F., Moser, K.: Über eine progressive Myopathie mit Muskelphosphorylasemangel und Riesenmitochondrien. *Wien. klin. Wschr.* **79**, 917 (1967).
- Zintz, R., Villiger, W.: Electron microscopic findings in 3 cases of chronic progressive ocular muscle dystrophy. *Ophthalmologica (Basel)* **183**, 439 (1967).

E. Sluga  
Neurologisches Institut  
der Universität Wien  
A-1090 Wien, Schwarzspanierstr. 17  
Österreich

A. Monneron  
Institut de Recherches Scientifiques  
sur le Cancer  
Boite Postale Nr. 8  
F-94 Villejuif, France  
z.Z. The Rockefeller University  
New York 10021