

Aus dem Friedrich-Baur Institut  
Leitender Arzt: Prof. Dr. D. E. Pongratz  
An der Neurologischen Klinik, Vorstand Prof. Dr. Th. Brandt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Immunhistologische Untersuchung zur Bedeutung von TGF- $\beta$ 1 und Tenascin  
bei der Bindegewebsproliferation in pathologisch verändertem Skelettmuskel

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Torsten Gerald Müller  
aus Bietigheim

2003

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Müller-Felber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Machleidt  
Prof. Dr. H. Bartels

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. P. Fischer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2003

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1	EINFÜHRUNG	5
1.2	<b>KLINISCHE UND MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA DER MUSKELDYSTROPHIE DUCHENNE, ENTZÜNDLICHER MYOPATHIEN UND DER ALS</b>	<b>7</b>
1.2.1	MUSKELDYSTROPHIE DUCHENNE (DMD)	7
1.2.2	DERMATOMYOSITIS UND POLYMYOSITIS (DM / PM)	8
1.2.3	AMYOTROPHE LATERALSCLEROSE (ALS)	9
1.3	<b>WACHSTUMS- UND DIFFERENZIERUNGSFAKTOREN DER EXTRAZELLULÄRMATRIX DES SKELETTMUSKELS</b>	<b>10</b>
1.3.1	DIE EXTRAZELLULÄRMATRIX DES SKELETTMUSKELS	10
1.3.2	TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA 1: EIN WACHSTUMSHEMMER UND MATRIXINDUKTOR	11
1.3.2.1	<i>Molekularbiologische Grundlagen</i>	11
1.3.2.2	<i>Aufgaben und Vorkommen von TGF-<math>\beta</math>1</i>	13
1.3.3	TENASCIN: MATRIXPROTEIN, MITOGEN UND DIFFERENZIERUNGSFAKTOR	14
1.3.3.1	<i>Molekularbiologische Grundlagen</i>	14
1.3.3.2	<i>Aufgaben und Vorkommen von Tenascin</i>	14
1.3.4	VIMENTIN: INTERMEDIÄRFILAMENT UND REGENERATIONSMARKER	15
1.3.5	NERVE CELL ADHESION MOLECULES	16
1.3.6	KOLLAGEN TYP IV: WICHTIGER BESTANDTEIL DER BASALMEMBRAN	16
<b>2</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
3.1	PATIENTEN	18
3.2	MUSKELBIOPSIEN	18
3.3	ANTIKÖRPER	19
3.3.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	19
3.3.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	19
3.3.2.1	<i>Sekundärantikörper bei konventionellem Färbeverfahren mit indirekter Peroxidasetechnik</i>	19
3.3.2.2	<i>Sekundärantikörper bei Färbung mittels Vectastain® Elite ABC Kit</i>	19
3.4	IMMUNHISTOCHEMIE	19
3.4.1	PRINZIP DER INDIREKTEN PEROXIDASETECHNIK	19
3.4.1.1	<i>Indirekte Peroxidasetechnik mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper</i>	19
3.4.1.2	<i>Indirekte Peroxidasetechnik mit biotinyliertem Sekundärantikörper und Avidin</i>	20
3.4.2	CHROMOGENE SUBSTRATE	20
3.4.2.1	<i>Diaminobenzidin</i>	20

3.4.2.2	<i>Aminoethylcarbazol</i>	21
3.4.3	OBJEKTTRÄGER	21
3.4.4	KRYOSTATSCHNITTE	21
3.4.5	PROBENVORBEREITUNG	21
3.4.6	KONVENTIONELLE FÄRBEVERFAHREN	22
3.4.6.1	<i>Doppelfärbung mit Hämaun-Eosin (HE)</i>	22
3.4.6.2	<i>Van-Gieson-Färbung</i>	22
3.4.7	ENZYMISTOCHEMISCHE FÄRBEVERFAHREN	22
3.4.7.1	<i>Myofibrilläre ATPase-Reaktion bei pH 9,4</i>	22
3.4.7.2	<i>NADH-Reduktase-Reaktion</i>	23
3.4.8	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBEVERFAHREN	23
3.4.8.1	<i>Verdünnungsreihen und Ausschluss unspezifischer Befunde</i>	23
3.4.8.2	<i>Konventionelles Vorgehen mittels indirekter Peroxidasetechnik</i>	24
3.4.8.3	<i>Färbung mit Avidin-Biotin-Methode</i>	24
<b>3.5</b>	<b>MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>BEFUNDE UND LOKALISATIONEN</b>	<b>29</b>
4.1.1	KONVENTIONELLE HISTOLOGIE	29
4.1.1.1	<i>Normalkollektiv</i>	29
4.1.1.2	<i>Duchenne Muskeldystrophie</i>	29
4.1.1.3	<i>Dermatomyositis / Polymyositis</i>	32
4.1.1.4	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>	33
4.1.1.5	<i>Leberzirrhose</i>	34
4.1.2	FIBROBLASTEN/FIBROZYTEN-FÄRBUNG	34
4.1.2.1	<i>Normalkollektiv</i>	34
4.1.2.2	<i>Duchenne Muskeldystrophie</i>	34
4.1.2.3	<i>Dermatomyositis / Polymyositis</i>	35
4.1.2.4	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>	35
4.1.2.5	<i>Leberzirrhose</i>	35
4.1.3	TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1	36
4.1.3.1	<i>Normalkollektiv</i>	36
4.1.3.2	<i>Duchenne Muskeldystrophie</i>	36
4.1.3.3	<i>Dermatomyositis / Polymyositis</i>	36
4.1.3.4	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>	37
4.1.3.5	<i>Leberzirrhose</i>	37
4.1.4	TENASCIN	37
4.1.4.1	<i>Normalkollektiv</i>	37

4.1.4.2	<i>Duchenne Muskeldystrophie</i>	37
4.1.4.3	<i>Dermatomyositis / Polymyositis</i>	40
4.1.4.4	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>	40
4.1.4.5	<i>Leberzirrhose</i>	40
4.1.5	VIMENTIN	41
4.1.5.1	<i>Normalkollektiv</i>	41
4.1.5.2	<i>Duchenne Muskeldystrophie</i>	41
4.1.5.3	<i>Dermatomyositis / Polymyositis</i>	41
4.1.5.4	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>	42
4.1.5.5	<i>Leberzirrhose</i>	42
4.1.6	N-CAM	42
4.1.6.1	<i>Normalkollektiv</i>	42
4.1.6.2	<i>Duchenne Muskeldystrophie</i>	42
4.1.6.3	<i>Dermatomyositis / Polymyositis</i>	43
4.1.6.4	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>	43
4.1.6.5	<i>Leberzirrhose</i>	43
<b>4.2</b>	<b>CO- LOKALISATIONEN IM SERIENSCHNITT</b>	<b>44</b>
4.2.1	FIBROBLASTEN/FIBROZYTEN-FÄRBUNG	44
4.2.1.1	<i>Duchenne Muskeldystrophie</i>	44
4.2.1.2	<i>Dermatomyositis / Polymyositis</i>	45
4.2.1.3	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>	46
4.2.2	TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1	47
4.2.2.1	<i>Duchenne Muskeldystrophie</i>	47
4.2.2.2	<i>Dermatomyositis / Polymyositis</i>	48
4.2.2.3	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>	50
4.2.3	TENASCIN	50
4.2.3.1	<i>Duchenne Muskeldystrophie</i>	50
4.2.3.2	<i>Dermatomyositis / Polymyositis</i>	51
4.2.3.3	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>	52
4.2.4	VIMENTIN	53
4.2.4.1	<i>Duchenne Muskeldystrophie</i>	53
4.2.4.2	<i>Dermatomyositis / Polymyositis</i>	54
4.2.4.3	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>	55
4.2.5	N-CAM	55
4.2.5.1	<i>Duchenne Muskeldystrophie</i>	55
4.2.5.2	<i>Dermatomyositis / Polymyositis</i>	56
4.2.5.3	<i>Amyotrophe Lateralsklerose</i>	57

<b>4.3</b>	<b>ÜBERSICHT ÜBER VORKOMMEN UND AUSPRÄGUNG DER UNTERSUCHTEN PROTEINE UND DEREN CO-LOKALISATION</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>61</b>
<b>5.1</b>	<b>BINDEGEWEBSPROLIFERATION BEI ERKRANKUNGEN DES SKELETTMUSKELS</b>	<b>61</b>
<b>5.2</b>	<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	<b>62</b>
5.2.1	DIE BEDEUTUNG VON TGF- $\beta$ 1 BEI DER BINDEGEWEBSPROLIFERATION	62
5.2.2	TGF- $\beta$ 1 IM ZUSAMMENSPIEL MIT ANDEREN WACHSTUMSFAKTOREN UND STRUKTURPROTEINEN	66
<b>5.3</b>	<b>TENASCIN</b>	<b>68</b>
5.3.1	DAS AUFTRETEN UND DIE ROLLE VON TENASCIN IN PATHOLOGISCH VERÄNDERTER SKELETTMUSKULATUR	68
5.3.2	UNTER WELCHEN BEDINGUNGEN KOMMT ES ZUM AUFTRETEN VON TENASCIN?	69
5.3.3	DIE BEDEUTUNG VON TENASCIN BEI DER REGENERATION DES SKELETTMUSKELS	71
<b>5.4</b>	<b>VIMENTIN</b>	<b>73</b>
<b>5.5</b>	<b>N-CAM</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>81</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>82</b>
<b>A.1</b>	<b>TABELLEN</b>	<b>82</b>
<b>A.2</b>	<b>ABBILDUNGEN</b>	<b>86</b>
<b>A.3</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>99</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>114</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>115</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 EINFÜHRUNG

Der Skelettmuskel ist das größte Organ des Menschen und besteht überwiegend aus parallel angeordneten Muskelfasern. Der Anteil des Bindegewebes in normaler Muskulatur beträgt weniger als 10% [Confalonieri et al. 1997; Iannaccone et al. 1994]. Muskelfasern und Bindegewebe sind funktionell eng miteinander verknüpft: Jede einzelne Muskelfaser ist von Extrazellulärmatrix (EZM) umgeben, die aus verschiedenen Eiweißmolekülen - Kollagenen, Proteoglycanen und Glycoproteinen - aufgebaut ist. Diese sind über einen Komplex aus Rezeptoren und Membranmolekülen mit der muskulären Basalmembran und dem intrazellulären Cytoskelett verbunden [Leonhardt 1990; Timpl 1993]. Eines der wichtigsten Moleküle in diesem Zusammenhang ist das Dystrophin, welches zum einen dazu dient, Sarkolemm und Cytoskelett der Muskelfasern zu stabilisieren, zum anderen am Aufbau eines Membrankomplexes beteiligt ist, der die Verbindung zur EZM herstellt [Matsumura et al. 1994]. Das normalerweise bestehende funktionelle und quantitative Gleichgewicht zwischen Bindegewebe und Muskelfasern kann bei Erkrankungen der Skelettmuskulatur - insbesondere bei degenerativen hereditären Myopathien - gestört sein, wobei es zur Proliferation des Bindegewebes und zum Ersatz des Muskels durch fibrotisches Gewebe kommt. Die Muskeldystrophie Duchenne (DMD) ist eine derartige Erkrankung und wird durch einen Mangel an Dystrophin verursacht [Hoffman et al. 1987]. Am Anfang steht eine nekrotische Schädigung der Muskelfasern, auf die ein fibrotisch-fettiger Umbau des Skelettmuskels folgt. Dieser Umbau ist einerseits durch eine zunehmende Abnahme der Regeneration der nekrotischen Muskelfasern und zum anderen durch eine stetige Zunahme des bindegewebigen Anteils gekennzeichnet [Duchenne 1868; Dubowitz 1985]. Als klinisches Korrelat entwickeln sich im fortgeschrittenen Krankheitsstadium Beuge- und Spitzfußkontrakturen sowie fast immer eine fixierte Kyphoskoliose [Pongratz et al. 1990].

Untersuchungen, die sich mit dem Verlauf der DMD beim Menschen und mit artifiziell Dystrophin-defizienten Tiermodellen befassten, zeigten, dass sich die Genmutation bei unterschiedlichen biologischen Arten jeweils verschieden auswirken kann [Iannaccone et al. 1994]. Die Erkrankung verläuft zwar bei allen Spezies zweiphasig, wobei einer ersten nekrotisch-regenerativen eine zweite fibrotisch-degenerative Phase folgt; es gibt jedoch erhebliche Unterschiede in der Dauer und Ausprägung der beiden Phasen [Patridge 1991]:

Beim Menschen und beim Dystrophin-defizienten Hund dominiert die zweite Erkrankungsphase und es zeichnet sich von Beginn an die zuvor beschriebene Progredienz hin zum fibrotischen Endzustand ab. MDX-Mäuse (Dystrophin-defiziente Maus-Mutanten) leiden zwar in fortgeschrittenem Alter ebenfalls an Muskelschwäche und haben insgesamt eine geringere Lebenserwartung; es kommt jedoch im Vergleich zum Menschen viel später zu einem

der DMD entsprechenden fibrotischen Umbau [Pastoret et al. 1995]. Die akute Krankheitsphase beginnt bei MDX-Mäusen zwar subklinisch schon im juvenilen Alter von 5 bis 9 Wochen; die eigentliche Dystrophie mit Bindegewebsproliferation und Muskelschwäche setzt aber erst in einer späten adulten Lebensphase im Alter von ca. 20 Monaten ein [Morin et al. 1995; Lefaucher et al. 1995]. Im Gegensatz zu Knaben, denen das Dystrophin-Gen fehlt, kommt es bei juvenilen MDX-Mäusen nach einer abgelaufenen Fasernekrose zu aktiver Regeneration und nur zu einer gering ausgeprägten Fibrosierung des Gewebes. Somit können die regenerativen Prozesse der ersten Krankheitsphase hier die zweite Phase kompensieren oder zumindest hinauszögern [Patridge 1991; Pastoret et al. 1995].

Man nimmt an, dass das Fehlen von Dystrophin für das nekrotische Stadium der Erkrankung direkt verantwortlich ist [Monaco et al. 1986]. Die Gründe für die ineffektive Regeneration und den frühen fibrös-fettigen Umbau beim Menschen werden jedoch bisher nur wenig verstanden. In den letzten Jahren richtete sich das wissenschaftliche Interesse daher zunehmend auf Wachstumsfaktoren, in denen man die Urheber der Bindegewebsproliferation vermutet [DiMario et al. 1989].

Die beschriebenen Vorgänge bei der MDX-Maus führten zu der Hypothese, dass die zweite Phase der Erkrankung nicht zwangsläufig auf die Dystrophin-abhängige erste Phase folgen muss [Iannacone et al. 1994]. Vielmehr deutet einiges darauf hin, dass ein komplexes Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und Strukturproteinen den Krankheitsverlauf jener zweiten Phase beeinflusst. Diese entstammen teilweise der Familie der Zytokine, zum Teil handelt es sich dabei um Matrix- und Zellmembranproteine. Bei einigen Vertretern (z.B. Nerv Cell Adhesion Molecules = N-CAMs) konnte ein eindeutiger Zusammenhang mit regenerativen Vorgängen im Skelettmuskel belegt werden; von anderen wie Transforming Growth Factor beta-1 (TGF- $\beta$ 1) und dem Matrixprotein Tenascin nimmt man an, dass sie sowohl die De- als auch die Regeneration der Muskelfasern sowie die Bindegewebsproliferation beeinflussen.

Bei anderen Formen hereditärer dystrophischer Muskelerkrankungen, den so genannten congenitalen Muskeldystrophien, findet sich ebenfalls eine deutliche Bindegewebsproliferation [Sanes 1994; Bernasconi et al. 1999]. Es handelt sich hierbei um klinisch und genetisch heterogene autosomal-rezessive Erkrankungen [Banker 1994]. Das fehlende oder schadhafte Genprodukt ist bei diesen Krankheiten zumeist selbst Bestandteil der extrazellulären Matrix. Als Ursachen der Bindegewebsproliferation werden bei diesen Erkrankungen eine unmittelbare Antwort oder ein Zusammenhang mit apoptotischen Vorgängen als Folge eines frühen Kontaktverlustes sich entwickelnder Fasern mit der EZM diskutiert [Ruoslahti et al. 1994; Bernasconi et al. 1999]. Bei der DMD hingegen kann die Ursache für den fibrotischen Umbau nicht alleine auf das fehlende Genprodukt Dystrophin zurückgeführt werden, da dieses nur indirekt in Verbindung mit der EZM steht - es müssen folglich noch weitere Faktoren hinzukommen.

Daher ist die DMD besonders dafür geeignet, das Vorkommen von Wachstumsfaktoren und Strukturproteinen zu analysieren, die mit der fibrotisch-degenerativen Phase der Erkrankung im Zusammenhang stehen. Wie zahlreiche Untersuchungen in der Vergangenheit zeigten, wirkt sich der Einfluss von Wachstumsfaktoren nicht nur bei der DMD und den congenitalen Muskeldystrophien aus, sondern auch bei anderen Erkrankungen des Skelettmuskels, die mit bindegewebigem Umbau einhergehen. Hierzu zählen die entzündlichen Myopathien Dermatomyositis und Polymyositis. Bei neurogen degenerativen Erkrankungen wie der amyotrophen Lateralsklerose hingegen unterbleibt die Bindegewebsproliferation weitgehend [Engel 1994].

## **1.2 KLINISCHE UND MORPHOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA DER MUSKELDYSTROPHIE DUCHENNE, ENTZÜNDLICHER MYOPATHIEN UND DER ALS**

### **1.2.1 MUSKELDYSTROPHIE DUCHENNE (DMD)**

Die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (DMD) wurde 1868 von *G. B. A. Duchenne* erstmals beschrieben [Duchenne 1868]. Sie folgt einem x-chromosomal rezessiven Erbgang und ist mit einer Inzidenz von 1:3300 bis 1:4500 Knabengeburt die häufigste hereditäre Myopathie [Pongratz et al. 1990]. Im Alter von 3-5 Jahren beklagen die betroffenen Knaben erste Symptome einer progredienten Muskelschwäche, die sie um das 11. Lebensjahr vom Rollstuhl abhängig macht. Die mittlere Lebenserwartung liegt bei etwa drei Lebensjahrzehnten, wobei typischerweise eine zunehmende respiratorische und/oder kardiale Insuffizienz zum Tode führen. Im Jahre 1984 wurde das defekte Gen auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xp 21) lokalisiert und isoliert [Worton et al. 1984; Ray et al. 1985; Kunkel et al. 1985]. Kurz darauf wurde das Dystrophin-Protein als Genprodukt identifiziert, welches sich an der Innenseite der Muskelfasermembran befindet [Arahata et al. 1988; Watkins et al. 1988; Cullen et al. 1990]. Bei den betroffenen Knaben wird kein Dystrophin gebildet; es liegt somit ein vollständiges Dystrophin-Defizit vor [Bonnilla et al. 1988]. Immunhistochemisch lässt sich die Diagnose einer DMD aufgrund des vollständigen Fehlens von Dystrophin sicher beweisen. In der konventionellen Histologie stellen sich frühe Erkrankungsstadien durch nur gering ausgeprägte Veränderungen dar, welche sich überwiegend in vermehrten Kalibervariationen und fokalen Arealen mit de- oder regenerierenden Fasern äußern. Häufig findet man in diesen Arealen zudem eine entzündliche Abräum-Reaktion, die durch eine Invasion lymphohistiozytärer Zellen gekennzeichnet ist. Im fortgeschrittenen Stadium finden sich eine ausgeprägte Proliferation endo- und perimysialen Bindegewebes sowie Fettgewebswucherungen, Kalibervariationen und das Nebeneinander von Regeneration und Degeneration. Es kommen abgerundete, opake Fasern vor; daneben im HE-Präparat basophile Fasern sowie ausgereifere Fasern mit zentral gelegenen Kernen und Faserspaltungen. Die starken fibrotischen Veränderungen im Gewebe zerstören

allmählich die muskuläre Gewebearchitektur. Die Fähigkeit des Muskels zur Regeneration tritt mit der weiteren Progression zunehmend in den Hintergrund und es kommt zu einem fortschreitenden Verlust an Muskelfasern und zum Ersatz durch Binde- und Fettgewebe. In den Endstadien der Erkrankung ist das ursprünglich vorhandene Gewebe weitgehend durch Fettgewebe ersetzt, worin sich vereinzelte Inseln von Muskelgewebe befinden [Schröder et al. 1982; Dubowitz 1985].

### 1.2.2 DERMATOMYOSITIS UND POLYMYOSITIS (DM / PM)

Das Krankheitsbild der Dermatomyositis wurde erstmals von Ernst Leberecht Wagner, Leipzig, publiziert [Wagner 1863, 1887].

Polymyositis und Dermatomyositis werden zum Formenkreis der Kollagenosen gezählt, eine familiäre Häufung liegt nicht vor. Beiden Erkrankungen gemeinsam ist das Auftreten einer Muskelschwäche und –atrophie, die sich bei der DM typischerweise akut und bei der PM eher subakut entwickelt und meist auf proximale Muskelgruppen beschränkt ist. Muskelschmerzen, insbesondere in Form eines überstarken oder inadäquaten Muskelkaters (bevorzugt in der Tiefe großer Extremitätenmuskeln), finden sich am häufigsten bei der akuten DM, bei der PM fakultativ [Pongratz 1995]. Die Erkrankungen können einen schweren, tödlich endenden Verlauf nehmen oder sich schubweise über Monate bis Jahre hinziehen (subakute bis chronische Verlaufsform), wobei es zum spontanen Stillstand kommen kann. Die für die DM typischen Hautveränderungen bestehen aus einem symmetrischen, flächenhaften, “heliotrop”-farbenen Erythem im Gesicht (v.a. periorbital), an der oberen Thoraxapertur oder an den Extremitätenstreckseiten [Pongratz et al. 1990, 1995]. Sie kommt gehäuft im Rahmen eines paraneoplastischen Syndroms vor [Hargis et al. 1985].

Histologisch findet man bei der DM vorwiegend perimysiale lymphohistiozytäre Infiltrate und perivaskuläre entzündliche Veränderungen. An degenerativen Veränderungen beobachtet man unregelmäßige Kalibervariationen und perifaszikuläre Atrophien der Muskelfasern, Fasernekrosen, regenerierende Fasern sowie – abhängig von der Erkrankungsdauer – einen bindegewebig-lipomatösen Umbau des Muskelgewebes [Jerusalem 1983, 199; Schlote et al. 1993; Pongratz 1995]. Folgende Mechanismen und Zusammenhänge werden diskutiert: Durch verschiedene Auslöse-Mechanismen kommt es zur lokalen Biosynthese von HLA-Klasse-II-Molekülen, Zelladhäsionsmolekülen und muskulären Autoantigenen durch Makrophagen, spezifische B-Lymphozyten und aktivierte Myoblasten. Diese Antigen präsentierenden Zellen stimulieren CD4-positive autoreaktive T-Lymphozyten. Die aktivierten T-Lymphozyten sezernieren Zytokine und stimulieren weitere autoreaktive B-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten produzieren Autoantikörper z. B. gegen Endothelzellantigene, wie sie für die Pathogenese der DM postuliert werden. Außerdem aktivieren die Helfer-T-Lymphozyten CD8-

positive autoantigenspezifische zytotoxische T-Lymphozyten, welche in die Muskelfasern eindringen und diese zerstören [Engel 1992; Hohlfeld 1992, 1996]. Die Beteiligung eines Autoaggressions-Prozesses bei der DM wird durch die Tatsache gestützt, dass im Serum dieser Patienten manchmal Antimyoglobin-Antikörper und häufig antinukleäre Antikörper (gegen Non-Histone PM-1) auftreten [Riede 1993].

Bei der PM findet man vorwiegend ein endomysiales Infiltrat, eine endomysiale diffuse Schädigung und Atrophie des Parenchyms und keine entzündlichen Veränderungen im Bereich kleiner Gefäße [Pongratz 1995]. Bei der PM wird ebenfalls ein durch zelluläre Immunmechanismen vermittelter Pathomechanismus angenommen. Das Infiltrat besteht hier überwiegend aus CD8-positiven, zum Teil klonal expandierten T-Lymphozyten, die in die Muskelfasern eindringen und letztlich zu deren Untergang führen [Bender et al. 1995]. Die invadierten, anfangs nicht nekrotischen Muskelfasern präsentieren vermehrt HLA-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, was als Hinweis auf eine Antigen-spezifische Interaktion zwischen den CD8-positiven T-Lymphozyten und Muskelfasern angesehen wird [Emslie-Smith et al. 1989].

### 1.2.3 AMYOTROPHE LATERALSKLEROSE (ALS)

Die Amyotrophe Lateralsklerose (Synonym: Myatrophe Lateralsklerose) wurde möglicherweise zuerst von dem Schotten Sir Charles Bell beschrieben [Bell 1830]. Es handelt sich dabei um eine meist sporadische, in 5-10% der Fälle familiär auftretende Erkrankung [Brown 1986].

Sie macht etwa 80% der erworbenen motorischen Systemerkrankungen aus; etwa 0,1% aller Todesfälle im Erwachsenenalter gehen zu ihren Lasten. Die Ätiologie der "typischen" Erkrankung ist unbekannt. Bei "atypischem" Verlauf finden sich selten symptomatische Formen bei Paraproteinämie, Lymphomen, Hexosaminidase-A-Mangel, Blei- oder Quecksilbervergiftung [Pongratz et al. 1990].

Neben dem Untergang von  $\alpha$ -Motoneuronen kommt es bei der ALS zur Degeneration des zentralen motorischen Neurons; die kortikospinalen Bahnen sind degeneriert und atrophisch. Die Erkrankung beginnt schleichend meist nach dem 35. Lebensjahr, wobei zu Beginn spinale, bulbärparalytische und spastische Symptome auftreten können. Subjektiv bestehen Muskelkrämpfe, Muskelschwäche, Rücken- oder Nackenschmerzen und Leistungsabfall. Fast alle quergestreiften Muskeln können betroffen sein. Die Erkrankung führt innerhalb von 1-5 Jahren zu Paresen und bei meist chronisch progredientem Verlauf im Mittel nach drei Jahren zum Tode [Mitsumoto et al. 1988].

Morphologisch richtungsweisender Befund ist eine netzförmig das gesamte Parenchym durchziehende Atrophie von Muskelfasern mit zahlreichen so genannten small angular fibers.

Intakte Muskelfasern finden sich nur noch in inselförmiger Anordnung; nicht denervierte Fasern zeigen oft eine Anpassungshypertrophie [Pongratz 1990].

### **1.3 WACHSTUMS- UND DIFFERENZIERUNGSFAKTOREN DER EXTRAZELLULÄRMATRIX DES SKELETTMUSKELS**

#### 1.3.1 DIE EXTRAZELLULÄRMATRIX DES SKELETTMUSKELS

Die extrazelluläre Matrix kommt ubiquitär im Organismus vor und besteht aus Bindegewebsfasern und Grundsubstanz. Die Bindegewebsfasern werden aus verschiedenen Kombinationen von Kollagenproteinen und aus Elastin aufgebaut. Die Grundsubstanz besteht aus *Proteoglycanen* sowie aus *Glycoproteinen*, u.a. Fibronektin und Laminin [Leonhardt 1990]. Proteoglycane bestehen aus einem Kernprotein, das kovalent mit Polysacchariden, den *Glycosaminoclycanen*, verbunden ist, und können an andere Matrixproteine und Wachstumsfaktoren binden wie z.B. an Laminin, Kollagen Typ IV, TGF- $\beta$ 1 oder basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) [Battaglia et al. 1992; Yanagishita 1993; Woodley et al. 1983; Timpl 1993].

Multiadhäsive Proteine wie Laminin sind wichtige Matrixbestandteile, die sowohl an Oberflächenrezeptoren der Zellen (Integrine) als auch an andere Matrixkomponenten binden und damit deren Festigkeit mitbestimmen. Im Skelettmuskel haften die Fasern mittels spezifischer oberflächlicher Rezeptorproteine an ihrer Basallamina. Diese ist wiederum fest an Faserkollagen und andere Matrixproteine im darunter liegenden Bindegewebe gebunden [Paulsson 1992; Timpl 1993].

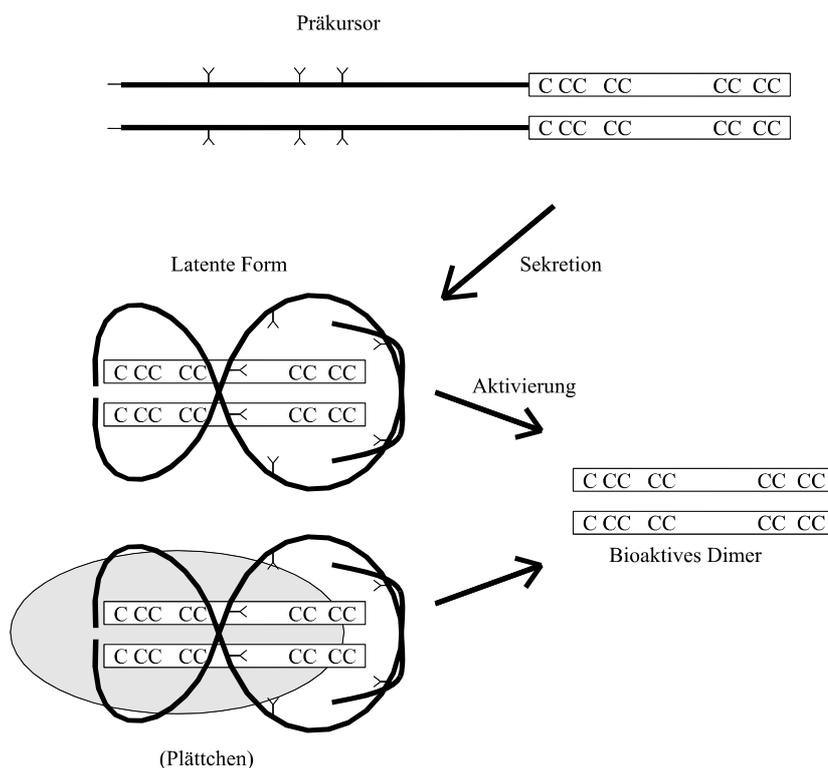
Zelluläre Bestandteile des Bindegewebsraums sind *Fibrozyten* und *Fibroblasten*; sie produzieren Grundsubstanz und Bindegewebsfasern. Fibrozyten sind in ihrer Aktivität reduzierte Bindegewebszellen, die man in ausdifferenzierten Geweben als Fibrozytenverband findet. Fibroblasten sind hochaktive Zellen, die im wachsenden Bindegewebe auftreten. Weiterhin – und dies in besonderem Maße bei entzündlichen und degenerativen Vorgängen – findet man hier *freie Zellen*, die aus Blutgefäßen austreten und den Abwehrsystemen angehören [Leonhardt 1990].

Im Folgenden werden einige Wachstums-, Differenzierungsfaktoren und Matrixproteine, die eine wichtige Rolle für die Bildung von EZM spielen und deren Nachweis entscheidend für das Zustandekommen dieser Arbeit war, einzeln vorgestellt:

## 1.3.2 TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA 1: EIN WACHSTUMSHEMMER UND MATRIXINDUKTOR

### 1.3.2.1 Molekularbiologische Grundlagen

TGF- $\beta$ 1 ist struktureller Prototyp einer Superfamilie, die aus zahlreichen weiteren Wachstums-, Differenzierungs- und Morphogenesefaktoren besteht [Eickelberg et al. 1999; Sporn et al. 1987]. Es handelt sich dabei um ein lösliches Dimer zweier identischer Peptide, die aus je 112 Aminosäuren bestehen und über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Jede dieser Ketten wird zunächst als C-terminale Domäne eines Präkursors aus 390 Aminosäuren synthetisiert. Die Domänen weisen Eigenschaften von sekretorischen Peptiden auf (Abb. 1.1) [Derynck et al. 1985; Purchio et al. 1988].



**Abb. 1.1:** schematische Struktur von TGF- $\beta$ 1 vor und nach Sekretion sowie nach Aktivierung.

TGF- $\beta$ 1 wird als ein latenter Komplex in die EZM sezerniert, der aus drei Untereinheiten besteht: (1) LTBP (latent TGF- $\beta$ 1 binding protein), (2) Latenz-assoziiertes Peptid und (3) reifes TGF- $\beta$ 1-Dimer [Bonewald 1999; Kanzaki et al. 1990; Sporn et al. 1987]. Bei LTBP handelt es sich um ein 125-205kDa-Protein, an welches der TGF- $\beta$ 1-Präkursor N-terminal gebunden ist [Miyazono et al. 1991; Olofsson et al. 1992]. Latenz-assoziiertes Peptid und LTBP sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden, wohingegen das TGF- $\beta$ 1-Dimer non-kovalent an den Rest des Komplexes gebunden ist.

Bei der Aktivierung wird das eigentliche TGF- $\beta$ 1 aus diesem Komplex gelöst. Der latente Komplex kann durch Hitze, verschiedene Agenzien wie z.B. Säure oder Harnstoff und durch Endothelzellen aktiviert werden [Brown et al. 1990; Antonelli et al. 1989; Sato et al. 1989]. Die aktivierte Form von TGF- $\beta$ 1 kann durch zahlreiche Komponenten der EZM und durch Serumproteine gebunden werden und in der interstitiellen Matrix akkumulieren [Thompson et al. 1989].

An der Erfolgswelle bindet das Protein an die Oberflächenrezeptoren I und II sowie an Betaglycan. Die beiden erstgenannten Rezeptoren haben eine höhere Affinität zu TGF- $\beta$ , die Signaltransduktion erfolgt durch eine Serin/ Threonin-Kinase-Aktivität und weiter zum Zellkern über so genannte Smad-Proteine. Betaglycan hat vorwiegend Speicher- bzw. Transportfunktionen [Padgett et al. 1998; Massagué et al. 1996].

Nach Stimulation eines Rezeptors durch TGF- $\beta$ 1 kann die Antwort im Zellkern bei verschiedenen Zelltypen oder auch beim selben Zelltyp unter verschiedenen Bedingungen sehr unterschiedlich ausfallen. Häufig kontrolliert der Wachstumsfaktor die Genexpression auf der Ebene der Transkription [Watanobe et al. 1999; Ignatz et al. 1987; Kim et al. 1990]. Hierbei reguliert TGF- $\beta$ 1 verschiedene Transkriptions-Kontrollelemente, wobei unterschiedliche Elemente im selben Gen-Promoter gleichzeitig vorkommen können [Kim et al. 1990; Massagué 1998]. Weiterhin bestimmen zellspezifische Determinanten den Antworttyp einzelner Gene auf TGF- $\beta$ 1 [Pertovaara et al. 1989; Kim et al. 1990]. Einige Gene, deren Expression durch TGF- $\beta$ 1 reguliert wird, codieren Transkriptions- oder Wachstumsfaktoren, die ihrerseits eine nukleäre Antwort hervorrufen können [Massagué 1998; Bonewald 1999]. Die Aktivität und Expression von TGF- $\beta$ 1 werden durch (1) Regulation der Gentranskription, (2) die Produktion von TGF- $\beta$ 1 als latentem Faktor und (3) die Sequestration von aktiviertem TGF- $\beta$ 1 durch EZM und zirkulierende Proteine kontrolliert [Massagué 1990].

### 1.3.2.2 Aufgaben und Vorkommen von TGF- $\beta$ 1

Die drei wichtigsten biologischen Aufgaben von TGF- $\beta$ 1 liegen in der Wachstumsinhibition, der stimulierenden Wirkung auf die Bildung extrazellulärer Matrix und der Immunsuppression [Bonewald 1999].

TGF- $\beta$ 1 kann von nahezu allen Körperzellen synthetisiert und sezerniert werden. Nach seiner Freisetzung induziert der Wachstumsfaktor seine eigene Produktion durch ortsständige Zellen [Assoian et al. 1986]. In inaktiver Form kann er von der EZM (gebunden an Decorin) gespeichert werden. Zahlreiche histochemische Untersuchungen dokumentieren das Vorkommen von TGF- $\beta$ 1 auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen adulten Gewebetypen und bei der embryonalen Entwicklung [Lehnert et al. 1988; Wilcox et al. 1988; Thompson et al. 1989]. Während der Myogenese hemmt TGF- $\beta$ 1 die Fusion von Myoblasten und die Aktivität der Kreatinkinase. Die Gesamtmenge an muskelspezifischen Proteinen und Acetylcholinrezeptoren wird reduziert [Salzberg et al. 1995].

In reifer muriner Skelettmuskulatur wurde das Vorkommen des Wachstumsfaktors in den ersten Tagen nach Trauma, Denervierung und Ischämie nachgewiesen. Bei der DMD ist eine erhöhte Expression im Skelettmuskel im zweiten und sechsten Lebensjahr der Patienten belegt [Bernasconi et al. 1995]. Hier liegt die Bedeutung von TGF- $\beta$ 1 vermutlich in erster Linie in der Fibroseinduktion durch Stimulation der Produktion von EZM-Komponenten wie Fibronectin, Tenascin, Kollagenen und Proteoglycanen. Zudem wird die Synthese von Protease-Inhibitoren wie Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) angeregt, wodurch es zu einer verminderten perizellulären Proteolyse kommt [Roberts et al. 1990]. TGF- $\beta$ 1 scheint für die Rekonstruktion der Basalmembranen beschädigter Muskelfasern und aktivierter Satellitenzellen sowie der sie umgebenden EZM verantwortlich zu sein. Die Zelladhäsion wird unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors hochreguliert [Massagué 1990].

TGF- $\beta$ 1 dient weiterhin als Zytokin und Chemoattraktant für Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten, die ihrerseits angeregt werden, andere Zytokine und Wachstumsfaktoren zu produzieren. Die Lymphokin-Produktion durch die von Lymphozyten aktivierten natürlichen Killerzellen hingegen wird vermindert [Wahl et al. 1987; Husmann et al. 1996].

In vitro verändert TGF- $\beta$ 1 das Proliferations- und Differenzierungspotential verschiedenster Zell-Linien. So wird die Fibroblastenproliferation verstärkt, während das Wachstum epithelialer, endothelialer, lymphoider und myeloider Zellen supprimiert wird [Mizoi 1993; Bascom 1989]. Auch die Differenzierung von Skelettmuskelmyoblasten und Satellitenzellen wird stark gehemmt und deren Proliferation - allerdings nur in geringem Grade - unterdrückt [Husmann et al. 1996].

Zudem wird ein pro-apoptotischer Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf Endothelzellen diskutiert [Schulick et al. 1998; Matthew et al. 1999].

Bei chronischer Hepatitis und bei Leberzirrhose (Vergleichspräparat in der vorliegenden Arbeit) tritt TGF- $\beta$ 1 in portalen und periportal fibrotischen Bereichen auf, wohingegen es im normalen Lebergewebe nur in Gallengängen zur Darstellung kommt [Nagy et al. 1991].

### 1.3.3 TENASCIN: MATRIXPROTEIN, MITOGEN UND DIFFERENZIERUNGSFAKTOR

#### 1.3.3.1 Molekularbiologische Grundlagen

Bei dem extrazellulären Matrixprotein Tenascin handelt es sich um ein hexamerer Molekül. Seine sechs Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 190-230 kDa sind über Disulfid-Brücken miteinander verbunden und zu einem Komplex mit einer ungefähren molekularen Masse von 1200 kDa zusammengefasst. Dieser Komplex besteht aus zwei je dreiarmligen Anordnungen, die über eine zentrale Domäne miteinander verbunden sind [Chiquet-Ehrismann 1990; Chiquet et al. 1991]. Er enthält zahlreiche mit Epidermal Growth Factor (EGF), Fibronectin und Fibrinogen homologe Domänen [Jones et al. 1988; Taylor et al. 1989]. In Fibroblasten aus Hühner-Embryonen und bei der Chondrogenese (Maus) konnte die Induktion der Synthese von Tenascin durch TGF- $\beta$  in vitro nachgewiesen werden [Pearson et al. 1993; Mackie 1998; Chimal-Monroy 1999]. Tenascin stimuliert in Erfolgzellen den Umsatz von Phosphatidylinositol, wobei bisher keine eindeutige Korrelation dieses Signaltransduktionsweges mit der mitogenen Aktivität des Proteins belegt werden konnte. Möglicherweise spielt die Internalisation in intrazelluläre Vesikel eine Rolle bei der Signaltransduktion [End et al. 1992].

#### 1.3.3.2 Aufgaben und Vorkommen von Tenascin

Tenascin kommt in nur wenigen Gewebsarten vor und tritt oft nur vorübergehend in Erscheinung. Das Protein kommt hauptsächlich im Zusammenhang mit Gewebsregeneration und zu Beginn proliferativer Phasen vor. Man findet es in malignen Tumoren, im Endometrium bei der proliferativen Phase des Menstruationszyklus, zu Beginn der dermalen Wundheilung und in embryonalem Gewebe [Erickson et al. 1989; Martini et al. 1991]. Darüber hinaus kommt Tenascin im Nerven- und Gefäßsystem sowie in den Bindegewebs-Komponenten zahlreicher Organe vor; dies insbesondere während Entwicklungs- und pathologischen Vorgängen [Mackie 1997]. In denerviertem Skelettmuskel stimmt die Tenascin-Synthese zeitlich mit einer zunehmenden Fibroblastenproliferation an neuromuskulären Endplatten überein [Gatchalian et al. 1989]. Im gesunden Körper des Erwachsenen lässt sich das Protein lediglich in Sehnen,

myotendinösen Junctionen und im glatten Muskel, so z.B. in Arterienwänden, nachweisen [Chiquet et al. 1984].

Tenascin beeinflusst das Zellwachstum verschiedener Zelltypen, wobei das Spektrum seiner Auswirkungen von der Inhibition des Zellwachstums bis zur starken Stimulation der DNS-Synthese reicht. Dabei wirkt Tenascin *in vitro* sowohl als Mitogen als auch als Differenzierungsfaktor, der das Zellwachstum hemmt. Zusätzlich verstärkt es die mitogenen Aktionen anderer Wachstumsfaktoren wie EGF [End et al. 1992]. Tenascin tritt im Skelettmuskel in besonderem Ausmaß nach Nervenläsionen sowie nach Neurotmesis oder nach Inaktivierung eines Nerven im Endomysium auf [Sanes et al. 1986; Tews et al. 1997]. Zunächst ist es dabei diffus über den gesamten Muskel und 1-2 Monate später focussiert auf Synapsen verteilt. Dieses fokale Vorkommen von Tenascin verschwindet wieder nach vollendeter Reinnervation [Daniloff et al. 1989; Weis et al. 1991]. Bei der DMD konnte Tenascin in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung sowohl peri- als auch endomysial nachgewiesen werden [Settles et al. 1996]. Auch bei der DM und der PM wurde das Vorkommen des Wachstumsfaktors beschrieben, wobei die Immunlokalisationen bei den beiden Erkrankungen variieren [Müller-Felber et al. 1998].

#### 1.3.4 VIMENTIN: INTERMEDIÄRFILAMENT UND REGENERATIONSMARKER

Bei Vimentin handelt es sich um ein intrazelluläres Intermediärfilament. Als Strukturprotein kommt es typischerweise im Endothel von Blutgefäßen, in einigen epithelialen Zellen und in Zellen mesenchymaler Herkunft (z.B. Fibroblasten) vor. Vimentinfilamente ziehen oft zur Zellkernmembran und zu (Hemi-) Desmosomen an der Zelloberfläche und halten vermutlich den Zellkern und andere Zellorganellen an ihren Plätzen innerhalb der Zelle [Gerogatos et al. 1987; Steward 1993].

Im reifen Skelettmuskel kommt Vimentin praktisch nicht vor, lässt sich aber in der Frühphase eines Regenerationszyklus in regenerierenden und teilweise beschädigten Muskelzellen nachweisen [Young et al. 1994; Vater et al. 1994]. Bei der DMD und bei verschiedenen Formen der Myositis lässt es sich spezifisch in myopathischen regenerierenden Fasern und in Fibroblasten nachweisen [Sjöberg et al. 1994]. Die immunhistochemische Färbung mit Anti-Vimentin-Antikörpern ist somit ein nützlicher Indikator für die Muskelfaserregeneration [Bornemann et al. 1993].

### 1.3.5 NERVE CELL ADHESION MOLECULES

Nerve Cell Adhesion Molecules (N-CAMs), eine Gruppe  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger membranständiger Zelladhäsionsmoleküle, gehören zur Immunglobulin-Superfamilie [Williams et al. 1988; Hynes et al. 1992]. N-CAMs verbinden in erster Linie Zellen, die ähnliche N-CAM-Moleküle besitzen, was als homophile Interaktion bezeichnet wird. Sie werden durch nur ein Gen kodiert; ihre Vielfalt kommt durch alternatives mRNA-Splicing und unterschiedliche Glycosylierung zustande [Cunningham et al, 1987]. N-CAMs spielen eine wichtige Rolle bei der embryonalen Neuralrohrentwicklung und Ganglienbildung. Sie werden von differenzierenden Muskelzellen, Glia- und Nervenzellen exprimiert [Rutishauser et al. 1988, 1993; Müller-Felber et al. 1993].

### 1.3.6 KOLLAGEN TYP IV: WICHTIGER BESTANDTEIL DER BASALMEMBRAN

Bei Kollagen Typ IV handelt es sich zwar nicht um einen Wachstums- oder Differenzierungsfaktor, der Übersicht halber wird es aber hier mit aufgeführt.

Kollagen Typ IV ist ein bedeutender Bestandteil der Basallamina des Skelettmuskels und anderer Gewebe. Es formt ein zweidimensionales Netzwerk, das der Basallamina ihre Form und Festigkeit gibt. Je drei Kollagen-Typ-IV-Ketten bilden eine 400 nm lange Tripelhelix, die ca. 24mal durch Segmente unterbrochen wird, die keine Tripelhelix bilden können und dem Molekül dadurch Flexibilität geben. Je vier Kollagen-Typ-IV-Moleküle bilden eine charakteristische tetramere Einheit [Yurchenco et al. 1987, 1990].

In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen Kollagen Typ IV zur Darstellung der muskulären Basalmembranen verwendet.

## 2 ZIEL DER ARBEIT

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Rolle der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren TGF- $\beta$ 1 und Tenascin bei der Bindegewebsproliferation im Skelettmuskel genauer zu erfassen. Ein übergeordneter Zusammenhang ist in der Lösung der Frage zu sehen, weshalb die Bindegewebsproliferation in der fibrotisch-degenerativen Phase der Muskeldystrophie Duchenne gegenüber regenerativen Vorgängen überwiegt.

Die Zielsetzung dieser Arbeit wurde darauf eingegrenzt, Antworten auf folgende Fragen zu finden:

### 1. In welchen Stadien der DMD tritt TGF- $\beta$ 1 und in welchen tritt Tenascin auf?

Zur Beantwortung dieser Frage werden die beiden Proteine mittels immunhistochemischer Färbemethoden in Skelettmuskelpräparaten von DMD-Patienten dargestellt. Zusammenhänge mit nachweisbaren morphologischen Veränderungen im Skelettmuskel werden im Vergleich mit einem Normalkollektiv und mehreren "disease controls" ausgewertet und beurteilt.

### 2. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der beiden Proteine und der Regeneration von Muskelfasern?

Regenerierende Muskelfasern sind einerseits durch rein morphologische Kriterien und andererseits durch die spezifischen Regenerationsmarker Vimentin und N-CAM im Gewebe nachweisbar. In Serienschnitten lassen sich durch Vergleich übereinstimmender Areale eventuell vorhandene Co-Lokalisationen (Nachweis mehrerer Proteine, z.B. Tenascin, Vimentin und N-CAM an identischer Stelle) ermitteln und durch diese gemeinsamen Vorkommen Rückschlüsse auf den Stellenwert von TGF- $\beta$ 1 und Tenascin im Zusammenhang mit regenerativen Vorgängen ziehen.

### 3. Gibt es Zusammenhänge zwischen Denervierung und dem Vorkommen von TGF- $\beta$ 1 bzw. von Tenascin?

Hierzu soll besonderes Augenmerk auf die Co-Lokalisation der beiden Proteine mit dem Regenerationsmarker N-CAM gerichtet werden, zudem werden Präparate aus einem ALS-Patientenkollektiv ("disease-controls") auf das Vorkommen der Wachstumsfaktoren hin untersucht.

### 4. Welche Unterschiede bestehen zwischen entzündlichen und degenerativen Myopathien bezüglich der Fibrose bzw. dem Vorkommen der Proteine TGF- $\beta$ 1 und Tenascin?

Antworten auf diese Frage lassen sich durch Vergleich und Beurteilung der Präparate aus verschiedenen Patientenkollektiven ermitteln.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 PATIENTEN

Insgesamt wurden Muskelbiopsien von 39 Patienten sowie das Präparat einer zirrhotischen Leber untersucht, die im Rahmen einer Autopsie entnommen wurde. Die Diagnosen wurden sowohl nach klinischen als auch nach biopsischen Kriterien gesichert. Das Normalkollektiv bestand aus Patienten mit Biopsien, die nach konventionellen histologischen und histochemischen Kriterien unauffällig waren. Tabelle 1.1 listet die genannten Patienten auf:

**Tabelle 1.1:** Untersuchte Muskelbiopsien. Neben der absoluten Anzahl der untersuchten Patienten werden das durchschnittliche Biopsialter (in Klammern jeweils der jüngste bzw. älteste Patient) sowie die Entnahmestelle angegeben. DMD = Duchenne Muskeldystrophie, ALS = amyotrophe Lateralsklerose, DM / PM = Dermato-/ Polymyositis

<i>Patienten</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Alter / J.</i>	<i>M. tib. ant.</i>	<i>M. quadr.</i>	<i>Andere</i>	<i>unbekannt</i>
Normalkollektiv	16	(1) - 40,2 - (67)	1	7	4	4
DMD	17	(1) - 5,5 - (13)	5	1	2	9
DM / PM	4	(4) - 37,0 - (57)	1	2	-	1
ALS	3	(54) - 59,7 - (70)	3	-	-	-
Leberzirrhose	1	unbekannt	-	-	1	-

#### 3.2 MUSKELBIOPSIEN

Das Muskelgewebe wurde durch eine offene Biopsie entnommen und sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Das Leberpräparat wurde post mortem entnommen und analog behandelt.

### 3.3 ANTIKÖRPER

#### 3.3.1 PRIMÄRANTI-KÖRPER

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden monoklonale und (bei TGF- $\beta$ 1) polyklonale Primärantikörper verwendet. Die Verdünnung erfolgte beim Antikörper gegen TGF- $\beta$ 1 mit 1,5% Ziegen-Normalserum in Tris-HCl-Puffer (0,05-molar, pH 7,4) und in den anderen Fällen mit 2% bovinem Serumalbumin (BSA) in 10mM Natriumphosphat, pH 7,5, 0.9% NaCl (PBS)-Lösung. Die geeignete Verdünnung wurde für jeden Antikörper separat mittels Verdünnungsreihen an Duchenne-Serienschnitten und Normalbefunden ermittelt. Die Tabellen A.1 bis A.6 im Anhang A.1 geben Auskunft über die verwendeten Antikörper.

#### 3.3.2 SEKUNDÄRANTI-KÖRPER

##### *3.3.2.1 Sekundärantikörper bei konventionellem Färbeverfahren mit indirekter Peroxidasetechnik*

Die Verdünnung erfolgte mit 2% bovinem Serumalbumin (BSA) in 10mM Natriumphosphat, pH 7,5; 0.9% NaCl (PBS)-Lösung. Tabelle A.7 im Anhang A.1 informiert über die Daten zum polyklonalen Sekundärantikörper.

##### *3.3.2.2 Sekundärantikörper bei Färbung mittels Vectastain® Elite ABC Kit*

Die Verdünnung erfolgte in 1,5% Ziegen-Normalserum in isotonem Tris-HCl-Puffer (0,05-molar, pH 7,4). Daten zum Sekundärantikörper des Vectastain® Elite ABC Kits finden sich in Tabelle A.8 im Anhang A.1.

### 3.4 IMMUNHISTOCHEMIE

#### 3.4.1 PRINZIP DER INDIREKTEN PEROXIDASETECHNIK

##### *3.4.1.1 Indirekte Peroxidasetechnik mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper*

In einem ersten Schritt wird ein monoklonaler Primärantikörper spezifisch an ein menschliches Gewebsantigen gebunden. An den Primärantikörper bindet in einem zweiten Schritt ein sekundärer Antikörper, der mit einem Peroxidaseenzym konjugiert ist (Bildtafel 3.1). Das Peroxidaseenzym wird anschließend mit einem chromogenen Substrat (s.u.) sichtbar gemacht.

### 3.4.1.2 Indirekte Peroxidasetechnik mit biotinyliertem Sekundärantikörper und Avidin

Auch hier erfolgt in einem ersten Schritt die spezifische Bindung eines monoklonalen Primärantikörpers an ein menschliches Gewebsantigen. An diesen Primärantikörper bindet in einem zweiten Schritt ein biotinylierter Sekundärantikörper. In einem dritten Schritt wird Avidin und biotinyliertes freies Peroxidaseenzym hinzugefügt.

*Avidin* (Molekulargewicht 68.000) ist ein Glycoprotein mit sehr starker Affinität ( $10^{15}\text{M}^{-1}$ ) zum Vitamin Biotin. Zudem besitzt Avidin vier Bindungsstellen für Biotin, weshalb das Biotin-Avidin-System mit hoher Effektivität ausgenutzt werden kann:

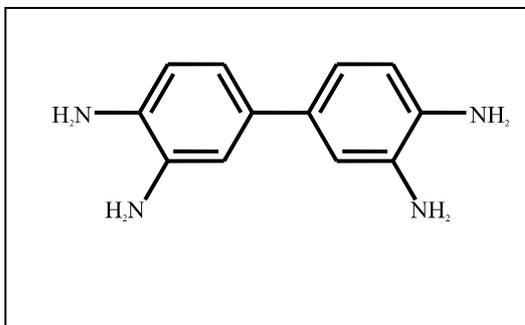
- Avidin dient als Brücke zwischen freien biotinylierten Peroxidaseenzymen und bildet somit makromolekulare Komplexe, die noch freie Bindungsstellen für Biotin enthalten.
- Avidin bindet kovalent an die biotinylierten Sekundärantikörper und mit seinen freien Bindungsstellen wiederum freies biotinyliertes Peroxidase-Enzym bzw. die oben genannten Komplexe.

Das Peroxidaseenzym wird anschließend mit einem chromogenen Substrat sichtbar gemacht.

### 3.4.2 CHROMOGENE SUBSTRATE

#### 3.4.2.1 Diaminobenzidin

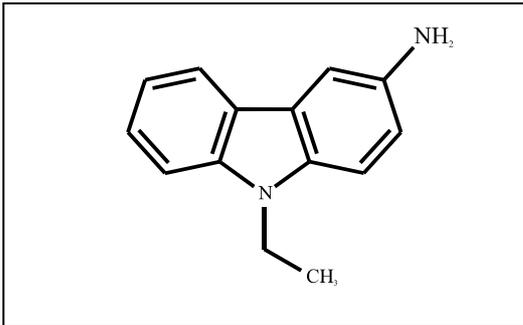
Das Peroxidaseenzym wird durch ein chromogenes Substrat, hier Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Strukturformel s. Abb. 3.1), sichtbar gemacht. DAB erzeugt ein braun-schwarzes alkoholunlösliches Reaktionsprodukt und wurde in wasserunlöslichem Medium eingedeckt (Eukitt®; O. Kindler, Freiburg).



**Abb. 3.1:** Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid [nach Fluka Chemie AG - Katalog Deutschland 1997/98].

### 3.4.2.2 Aminoethylcarbazol

Als chromogenes Substrat der Peroxidase wurde bei diesem Verfahren 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC, Strukturformel s. Abb. 3.2) verwendet (AEC Substrate Kit for Horseradish Peroxidase, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA). AEC erzeugt ein rötliches Reaktionsprodukt und wurde in wässrigem Medium (Permafluor®) eingedeckt.



**Abb. 3.2:** Aminoethylcarbazol  
[nach Fluka Chemie AG –  
Katalog Deutschland 1997/98].

### 3.4.3 OBJEKTTRÄGER

Gereinigte Objektträger wurden mit Chromalaun-Gelatine beschichtet, um eine bessere Haftung der Präparate während des Färbeporganges zu gewährleisten.

### 3.4.4 KRYOSTATSCHNITTE

Von jeder der vorgenannten Gewebebiopsien wurde im Kryostat T017726 der Firma SLEE Technik, Mainz, eine größere Anzahl von Serienschnitten mit je 7 µm Dicke angefertigt (Skelettmuskel-Serienschnitte bei -24°C und Leber-Serienschnitte bei -18°C Kryostat-Temperatur). Diese wurden anschließend ca. 24 Stunden auf den beschichteten Objektträgern luftgetrocknet und bei -80°C erneut tiefgefroren. Es wurden ausschließlich Querschnittspräparate angefertigt.

### 3.4.5 PROBENVORBEREITUNG

Die Kryostatschnitte wurden in der oben dargestellten Weise hergestellt. Die eingefrorenen Schnitte wurden langsam auf Raumtemperatur erwärmt, um eine Schädigung des Gewebes während des Auftauens zu vermeiden.

Vor jedem der in den folgenden Kapiteln aufgeführten Färbeverfahren wurden die Gewebsschnitte vollständig luftgetrocknet.

### 3.4.6 KONVENTIONELLE FÄRBEVERFAHREN

#### 3.4.6.1 Doppelfärbung mit Hämalan-Eosin (HE)

Die Schnitte wurden zunächst kurz in Aqua dest. eingebracht. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung in saurem Hämalan (nach Harris) für ca. 3 Minuten. Die Präparate wurden in Aqua dest. gespült und unter fließendem Wasser für ca. 10 min. gebläut. Daraufhin wurden die Objektträger in Eosin-Lösung (0,1% in Aqua dest.), die mit einigen Tropfen Eisessig versetzt wurde, für ca. 2 min. überfärbt und kurz in Wasser gestellt. Hierauf folgte eine Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe (angefangen bei 70%) und anschließender Aufhellung mittels Xylol für ca. 3 min. Zum Schluss erfolgte das Eindecken der Schnittpräparate mittels Eukitt®-Einschlussmittel (O. Kindler GmbH, Freiburg).

#### 3.4.6.2 Van-Gieson-Färbung

Zu Beginn wurden die Schnitte in Aqua dest. eingebracht. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin für ca. 2 min., dann wurden die Präparate für 10 min. in fließendem Wasser gebläut und nochmals kurz in Aqua dest. eingebracht. Daraufhin wurde über 2 min. eine Gegenfärbung mit Pikrofuchsinlösung durchgeführt. Die Lösung wurde abgeschleudert und die Präparate 3x in Wasser gespült, anschließend wurden die Schnitte – angefangen mit 96%-igem Alkohol – in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, in Xylol aufgehellt und wie zuvor beschrieben eingedeckt.

### 3.4.7 ENZYMISTOCHEMISCHE FÄRBEVERFAHREN

#### 3.4.7.1 Myofibrilläre ATPase-Reaktion bei pH 9,4

Nach Lufttrocknung der Gefrierschnitte erfolgte eine 15-minütige Präinkubation in Barbitallösung bei pH 10,4 und Raumtemperatur. Die Präinkubations-Lösung setzte sich zusammen aus 294mg CaCl<sub>2</sub>, 206mg Diethylbarbitursäure sowie 50ml Aqua dest. und wurde mit NaOH 0,1-molar auf den Standard-pH von 10,4 gebracht. Nach der Präinkubation erfolgte das Abtropfen der Objektträger, bis die Schnitte nahezu trocken waren.

Die Hauptinkubation wurde bei pH 9,4 bei 37°C über eine Stunde durchgeführt. Die hierfür verwendete Lösung bestand aus 206,2mg Diethylbarbitursäure, 76mg Adenosintriphosphat, 5ml CaCl<sub>2</sub> 0,18-molar (2,65g/ 100ml Aqua dest.) und 25ml Aqua dest. und wurde wie zuvor mittels NaOH 0,1-molar auf einen pH-Wert von 9,4 eingestellt.

Anschließend wurden die Schnittpräparate in 1%-iger CaCl<sub>2</sub>-Lösung ausgewaschen und es erfolgte ein erneutes Abtropfen. Hierauf wurden die Objektträger für 3 min. in Kobaltchlorid

(2g / 100ml) eingebracht und 3x gründlich mit Aqua dest. ausgewaschen. Nach Abtropfen der Präparate wurde mit Ammoniumsulfid für 1 sec. geschwärzt und darauf 8-10x gründlich mit Aqua dest. gespült. Dann erfolgte eine Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe, angefangen bei 96%-igem Alkohol, anschließend Xylol und Eindecken wie bei den zuvor beschriebenen Färbeverfahren.

#### 3.4.7.2 *NADH-Reduktase-Reaktion*

Die Gefrierschnitte wurden zunächst für ca. 10-15min. luftgetrocknet und dann bei 37°C für ca. 30min. in NADH-Lösung inkubiert, bis die Schnitte kräftig blau angefärbt waren. Die Lösung setzte sich zusammen aus 40ml 0,2-molarem Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) und 2 Tropfen Aceton, 40mg NBT (4-Nitroblautetrazoliumchlorid, Serva 30550) und 32mg NADH ( $\beta$ -Nicotinamid-adeninucleotid, Boehringer 15142). Anschließend wurde die Objektträger 3x in Aqua dest. gespült und mit Glyceringelatine eingedeckt.

#### 3.4.8 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBEVERFAHREN

##### 3.4.8.1 *Verdünnungsreihen und Ausschluss unspezifischer Befunde*

Im Vorfeld der für diese Arbeit relevanten Färbeexperimente war es notwendig, diejenigen Verdünnungen herauszufinden, die jeweils eine optimale Darstellung der verwendeten Antikörper im Muskelgewebe gewährleisten. Für die dafür benötigten Verdünnungsreihen wurden Proben aus dem Normalkollektiv, dem Kollektiv der DMD-Patienten und der Myositis-Patienten entnommen, 3-5 Proben aus jedem Kollektiv jeweils mit Primärantikörper-Lösung einer Konzentration überschichtet und diese durch eines der unten beschriebenen Verfahren dargestellt. Die dabei gewählten Konzentrationen waren 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 und 1:200. Zudem wurden verschiedene Präinkubationsverfahren erprobt. Bei jedem dieser Vorversuche und bei den endgültigen Versuchsreihen wurde pro Kollektiv eine Probe mitgeführt, die nicht mit Primärantikörper überschichtet wurde, um eventuell auftretende unspezifische Befunde in der Auswertung ausschließen zu können. Diese traten vor allem bei Immunfluoreszenz-Verfahren auf, die aus diesem Grunde verlassen wurden. Auch bei den lichtmikroskopischen Nachweisverfahren kam es insbesondere bei Primärantikörpern gegen TGF- $\beta$ 1 unterschiedlichster Bezugsquellen immer wieder zu unspezifischen Färbeergebnissen, bis mit dem unten beschriebenen Vorgehen in der entsprechenden Verdünnung eine geeignete Methode gefunden und etabliert werden konnte.

#### 3.4.8.2 Konventionelles Vorgehen mittels indirekter Peroxidasetechnik

Das Vorgehen wird in Bildtafel 3.1 bildhaft veranschaulicht. Zunächst wurden die Präparate 10 min. in reinem Aceton fixiert und dann nochmals ca. 10 min. luftgetrocknet. Mittels boviner Serumalbumin-Lösung (BSA) 2% in 10mM Natriumphosphat, pH 7,5; 0.9% NaCl (PBS)-Lösung wurden die Schnitte anschließend rehydriert und für 15 min. präinkubiert. Der entsprechend verdünnte Primärantikörper wurde aufgebracht, nachdem das verdünnte BSA abgegossen, aber nicht abgespült worden war. Die Inkubation erfolgte für 60 min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

Die Antikörperlösung wurde dann mit reichlich Tris-Puffer abgespült und die Objektträger wurden anschließend abgetrocknet, um eine weitere Verdünnung des Sekundärantikörpers zu vermeiden. Dabei war darauf zu achten, dass die Präparate nicht eintrockneten oder mechanisch beschädigt wurden.

Der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper wurde aufgebracht und die Präparate wurden wieder 60 min. in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurden die Proben gespült und abgetrocknet.

Das frisch hergestellte Substrat (1mg Diaminobenzidin + 1 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% pro ml Puffer) wurde nun aufgetragen und für ca. 2 – 5 min. auf den Präparaten belassen. Der Verlauf der Färbung wurde lichtmikroskopisch kontrolliert, um eine Überfärbung der Präparate zu vermeiden.

Zuletzt wurden die Präparate wieder gespült, mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Eukitt®-Einschlussmittel eingedeckt.

#### 3.4.8.3 Färbung mit Avidin-Biotin-Methode

Dieser Färbeprozess wird in Bildtafel 3.2 dargestellt. Verwendet wurde das Vectastain® Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA). Vor Beginn des Färbens wurden die Proben 15 min. in reinem Methanol + 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fixiert und anschließend in isotonem Tris-HCl-Puffer (0,05molar, pH 7,4) rehydriert. Darauf folgte eine 20-minütige Präinkubation in 1,5% Ziegen-Normalserum in Tris-HCl-Puffer (= Blockserum).

Das Blockserum wurde abgegossen, der in demselben Blockserum entsprechend verdünnte Primärantikörper aufgebracht und für 30 min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperlösung wurde dann wie beim vorgenannten Färbeverfahren mit reichlich Tris-Puffer abgespült, die Objektträger wurden abgetrocknet.

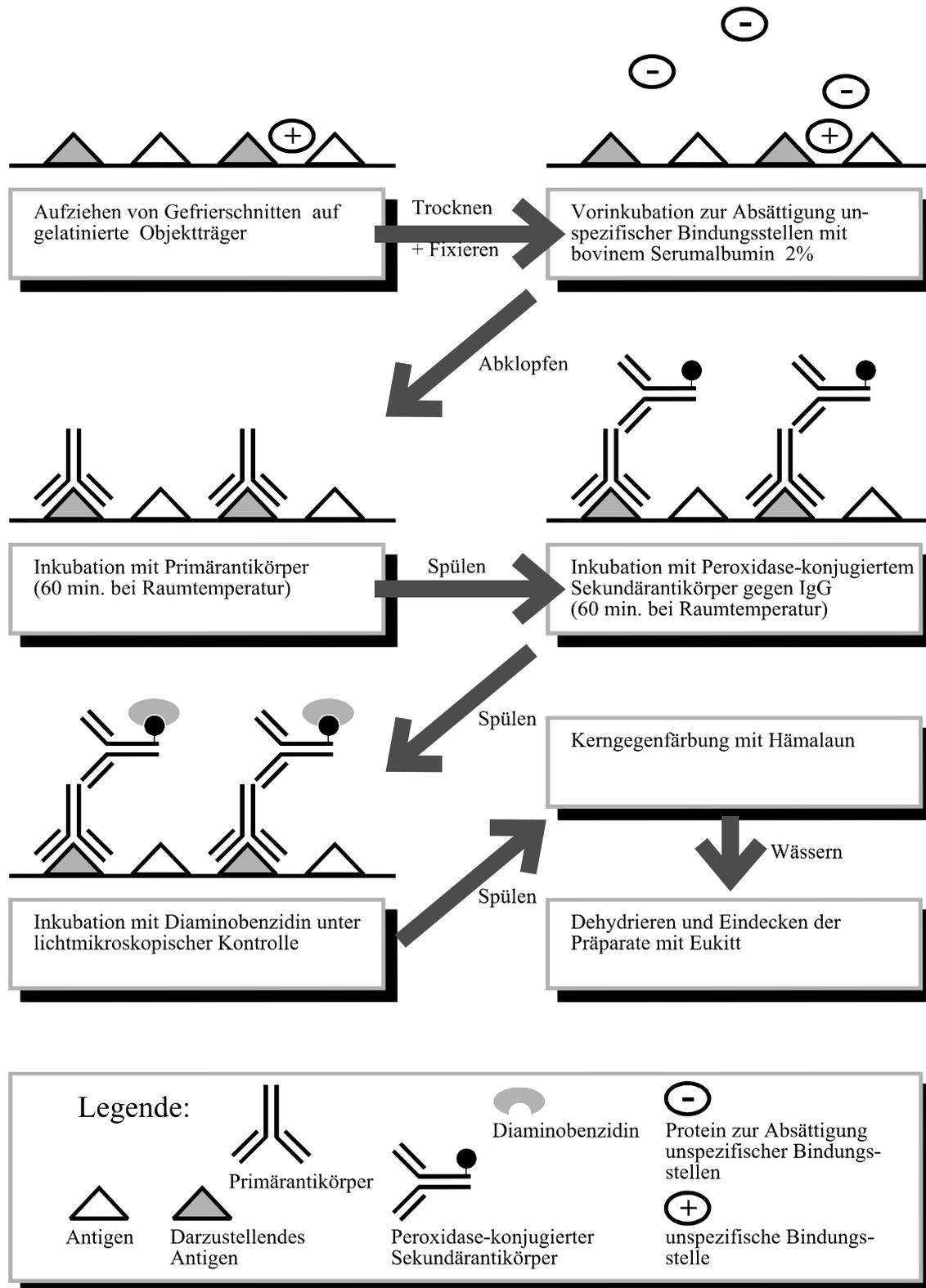
Der biotinylierte Sekundärantikörper wurde aufgebracht, die Präparate wurden wiederum 30 min. inkubiert. Erneut wurden diese gespült und abgetrocknet.

Anschließend erfolgte die halbstündige Inkubation der Präparate mit einem Reagenz aus Avidin (Reagent A / Vectastain® Elite ABC Reagent) und biotinyliertem Peroxidaseenzym (Reagent B / Vectastain® Elite ABC Reagent), wobei Reagent A und Reagent B je im Verhältnis 1:50 zuvor gemeinsam in Tris-HCl-Puffer verdünnt wurden und ca. eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gestanden hatten, damit genügend Reaktionszeit zur Ausbildung makromolekularer Komplexe zur Verfügung stand.

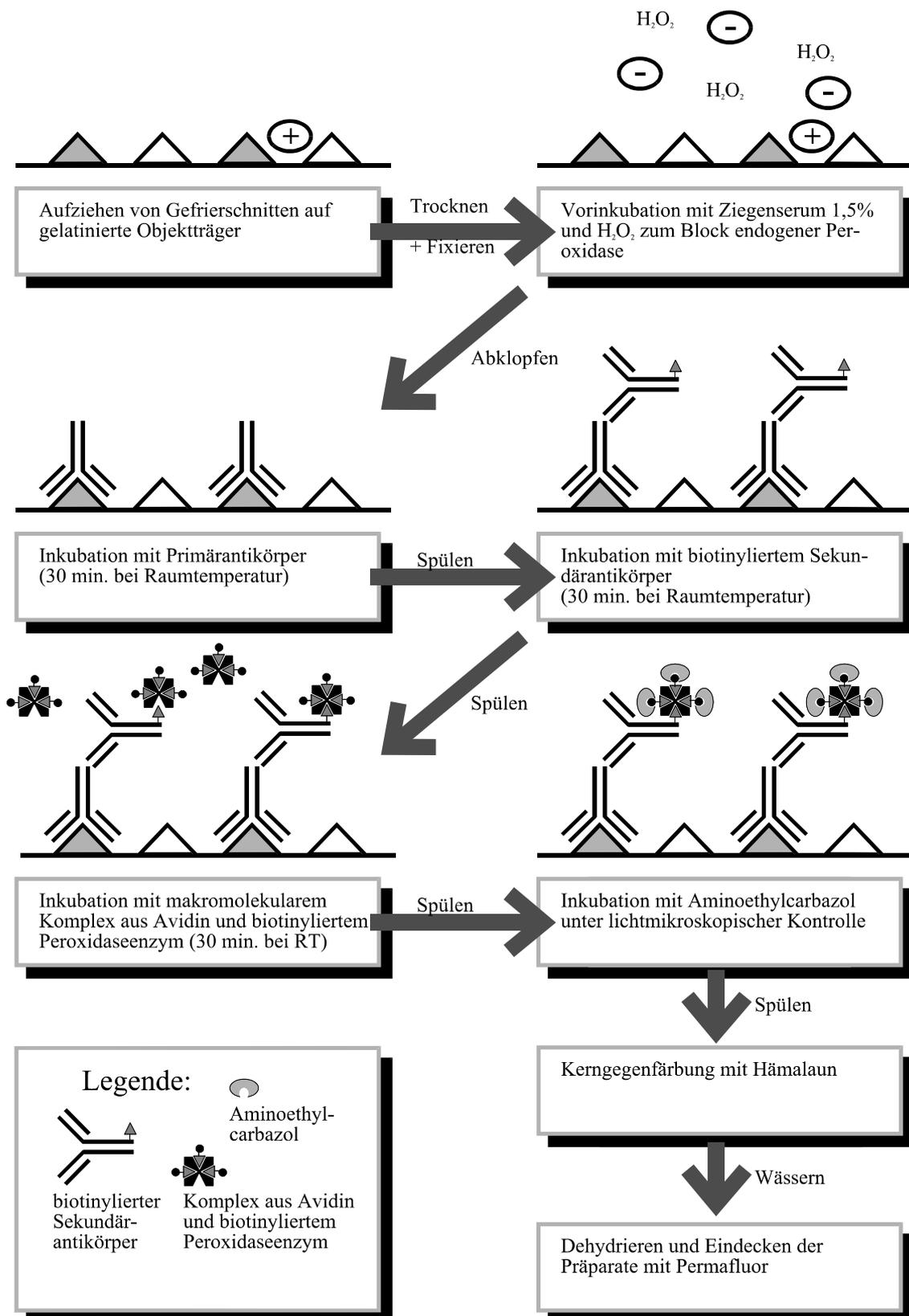
Die Präparate wurden ein weiteres Mal gespült und abgetrocknet; daraufhin wurde als chromogenes Substrat frisch hergestellte Aminoethylcarbazol-Lösung (Vector® AEC Substrate Kit for Horseradish Peroxidase) aufgetragen und der Verlauf der Färbung mikroskopisch kontrolliert.

Zuletzt wurden die Objektträger gespült, mit Hämatoxilin gegengefärbt und mit Permafluor® eingedeckt.

Bei der Gegenfärbung wurde das Hämatoxilin lediglich mit reichlich Wasser abgespült, da eine aufsteigende Alkoholreihe das Färbeprodukt auflöst.



**Bildtafel 3.1:** Färbevorgang mittels indirekter Peroxidasetechnik mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper.



**Bildtafel 3.2:** Färbevorgang mittels indirekter Peroxidasetechnik mit biotinyliertem Sekundärantikörper und Avidin.

### 3.5 MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG

Die histologischen Schnitte wurden mit einem Durchlichtmikroskop befundet und die Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst.

Die bei jedem Färbvorgang mitbearbeiteten Kontrollen, die bei allen Färbeverfahren zum Ausschluss unspezifischer Befunde nicht mit Primäantikörper beschichtet wurden, zeigten in keinem Fall eine Anfärbung und bewiesen dadurch die Spezifität der Färbeverfahren. Sie werden im Folgenden nicht mehr erwähnt.

Bei der Auswertung der Serienschnitte wurde pro Patient und Färbeverfahren jeweils ein vollständiger repräsentativer Objektträger ausgewertet. Bei der Auszählung von Fasern und beim Vergleich von Co-Lokalisationen innerhalb eines Präparates wurde für die jeweiligen Objektträger ein Gesichtsfeld bei der Gesamtvergrößerung 20:1 ausgewählt, bei dem sich die korrespondierenden Stellen des jeweiligen Präparates genau entsprachen. Die Befunde wurden bei verschiedenen Gesamtvergrößerungen (20:1, 200:1, 400:1) fotografisch dokumentiert.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 BEFUNDE UND LOKALISATIONEN

#### 4.1.1 KONVENTIONELLE HISTOLOGIE

##### 4.1.1.1 Normalkollektiv

Bei der Hämalaun-Eosin-Färbung (*HE-Färbung*) stellten sich in allen Präparaten die Muskelfasern rot, das Bindegewebe rosarot und alle getroffenen Kerne blau dar (Abb. A.1a). In der *van Gieson Färbung* waren die Kerne schwarzbraun, das Zytoplasma gelbbraun und das Bindegewebe rot dargestellt (Abb. A.1b). Im Querschnitt waren die einzelnen Muskelfasern polygonal begrenzt. Der mittlere Durchmesser der Fasern lag beim Erwachsenen, in Abhängigkeit von Biopsieort, Alter, Geschlecht und Trainingszustand, zwischen 30 und 80 µm. Die Kerne waren randständig; es wurden keine zentral gelegenen Kerne, keine Infiltrationen durch lymphohistiozytäre Zellen, kein interfaszikuläres Fettgewebe, keine Kalibervariationen, Faserabrundungen, hypertrophe Fasern oder Faseratrophien beobachtet. In der HE-Färbung ließen sich weder eine vom regulären homogenen roten Anfärbemuster der Muskelfasern abweichende stärkere oder schwächere Anfärbung noch eine verstärkte Eosinophilie oder Basophilie einzelner Fasern feststellen. Die myofibrilläre ATPase-Reaktion und die NADH-Reduktase-Reaktion zeigte bei allen Patienten eine Verteilung der Typ-I bzw. Typ-II-Fasern zu etwa gleichen Teilen im Schachbrettmuster ohne Gruppierungsphänomene. In der Kollagen-Typ-IV-Immunreaktion stellten sich die Basalmembranen der Muskelfasern sowie Gefäßwände und Nervenfasern dar. Es zeigte sich ein netzartiges Bild ohne Unterbrechungen im Verlauf der Membranen (Abb. A.1h).

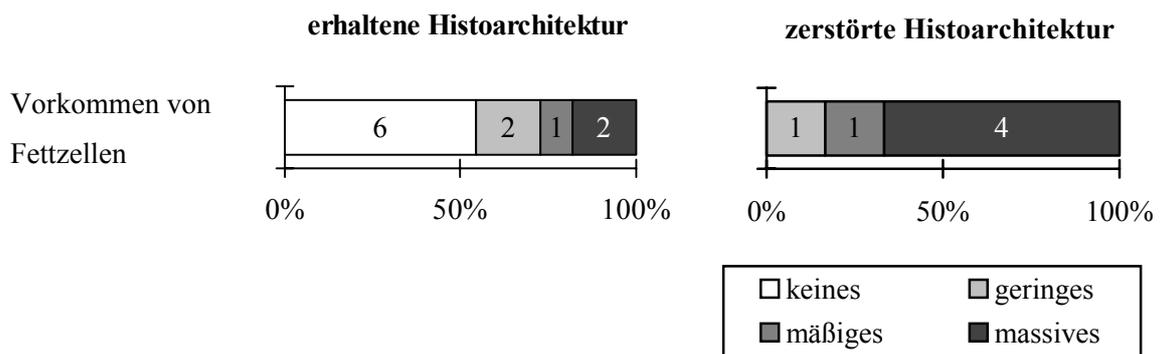
##### 4.1.1.2 Duchenne Muskeldystrophie

Bei 11 von insgesamt 17 DMD-Präparaten war die Gewebearchitektur noch weitgehend erhalten, sodass die einzelnen Faszikel und somit peri- und endomysiale Strukturen voneinander unterscheidbar waren. Die übrigen sechs Präparate befanden sich in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und zeigten eine ausgeprägte Zerstörung des normalen histologischen Aufbaus der Skelettmuskulatur. Eine Unterscheidung peri- und endomysialer Strukturen war hier nicht möglich.

**Fibrose:** Bei der Hämalaun-Eosin (*HE-*) Färbung (Abb. A.2a/3a) sowie der *van-Gieson-Färbung* (Abb. A.2b/3b) fanden sich in allen Präparaten diffuse und interstitielle Umbauvorgänge in Form einer ausgeprägten Fibrose. Bei den 11 Präparaten mit erhaltener Gewebearchitektur war diese in 8 Fällen deutlich und in 3 Fällen mäßig ausgeprägt. Von

endomysialer Fibrose waren abhängig vom Präparat zwischen 2 und 33 Faszikel (Median: 8) pro Objektträger und Patient betroffen. Der prozentuale Anteil betroffener Faszikel bei diesen Präparaten schwankte zwischen 14% und 100% aller Faszikel bei einem Median von 33% (vgl. Abb. 4.4, Kap. 4.2.2.1). Die übrigen sechs Präparate mit weitgehend zerstörter Gewebearchitektur zeigten alle eine massive endomysiale Fibrose.

**Fettzellen:** Bei den 11 gut erhaltenen Präparaten war das Auftreten von Fettzellen in 2 Fällen gering, in einem Fall mäßig und in 2 Fällen massiv ausgeprägt. 6 Fälle (55%) zeigten keinerlei Fettzellen. Bei den Präparaten mit weitgehend zerstörter Gewebearchitektur und deutlicher endomysialer Fibrose zeigte sich bei 4 von 6 ein massives perimysiales und endomysiales Vorkommen von Fettzellen. Zwei Fälle wiesen eine geringe bzw. mäßige Ausprägung auf. Abb. 4.1 zeigt die absolute und prozentuale (Prozentwerte nicht angegeben) Anzahl der Präparate mit jeweils unterschiedlich ausgeprägtem Vorkommen von Fettzellen bei erhaltener und zerstörter Gewebearchitektur.



**Abb. 4.1:** Vorkommen von Fettzellen in verschiedenen Ausprägungsgraden bei 17 DMD-Präparaten. Links Präparate mit erhaltener (11 Präparate), rechts mit zerstörter Gewebearchitektur (6 Präparate).

**Faserabrundungen:** Der Anteil abgerundeter Fasern an der Gesamtzahl der Fasern eines jeweils repräsentativen Gesichtsfelds bei einer Gesamtvergrößerung von 20:1 lag bei den gut erhaltenen Präparaten in 3 von 11 Fällen zwischen 5% und 50% und in 8 Fällen über 50% (davon in einem Fall über 95%), s. auch Abb. A.2a/b und A.3a/b. Bei allen Präparaten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium waren über die Hälfte der Muskelfasern abgerundet, in zwei Dritteln dieser Fälle war der Anteil abgerundeter Fasern größer als 95%.

**Kalibervariationen** waren in allen DMD-Präparaten zu sehen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Schätzwerte, da nicht die Größe jeder einzelnen Faser nachgemessen wurde: Demnach lag der Anteil betroffener Fasern bei den Präparaten mit gut erhaltener Gewebearchitektur in 5 Fällen unter 50% (davon in einem Fall unter 5%) und in 6 Fällen darüber, jedoch nie über 95%. Bei den Präparaten mit zerstörter Gewebearchitektur betrug der Anteil im Kaliber veränderter Fasern stets mehr als die Hälfte, in 5 der 6 Fälle waren mehr als 95% aller Fasern innerhalb eines Gesichtsfeldes betroffen.

**Einzelfaseratrophien**. Der Anteil atropher Fasern lag bei den gut erhaltenen Präparaten stets über 5%, davon in einem Fall auch über 50%. Bei den 6 Präparaten mit zerstörter Gewebearchitektur waren in 4 Fällen über die Hälfte, aber nie mehr als 95% der Fasern atrophisch. In den beiden übrigen Fällen lag deren Anteil im Bereich zwischen 5% und 50%.

**Hypertrophe Fasern** waren in allen 11 Präparaten mit gut erhaltener Gewebearchitektur vorhanden. In 10 dieser Präparate bewegte sich deren Anteil im Bereich bis zu 5%, in einem Fall lag er darüber. Bei den Präparaten im fortgeschrittenen Stadium waren in einem Fall keine hypertrophen Fasern zu erkennen, in 3 Fällen lag der Anteil bei bis zu 5% und in einem Fall darüber.

**Hyperkontrahierte opake Fasern** waren bei den gut erhaltenen Präparaten in 2 Fällen nicht vorhanden. In 7 Fällen handelte es sich bei bis zu 5% aller Fasern um opake Fasern, 2 der 11 Präparate wiesen einen noch höheren Anteil auf. Die Präparate in fortgeschrittenem Stadium enthielten stets auch opake Fasern; deren Anteil war stets geringer als die Hälfte der Fasern eines Gesichtsfeldes (in 2 Fällen  $\leq 5\%$ ).

**Im HE-Präparat basophile Fasern** (= regenerierende Fasern). Die Identifizierung basophiler Fasern ist mit einem gewissen Unsicherheitsfaktor belastet, da im HE-Präparat unterschiedliche Blauabstufungen vorkommen und die Einstufung einer Faser als „eindeutig basophil“ beobachterabhängig ist. Es wurden daher nur Fasern gezählt, die eine vergleichsweise intensive Blaufärbung aufwiesen. Hierdurch wurde das Risiko einer hohen Dunkelziffer eingegangen, auf die sich beim Vergleich mit den empfindlicheren Regenerationsmarkern Vimentin oder N-CAM schließen lässt (s. dort). Basophile Fasern ließen sich in den DMD-Präparaten in 6 (=55%) der gut erhaltenen Muskelpräparate identifizieren und in einem (=17%) der Präparate in fortgeschrittenem Krankheitsstadium. Der Anteil der Fasern lag in den meisten dieser Fälle bei bis zu 5% aller Fasern, in zwei Fällen aus der Gruppe der besser erhaltenen Präparate lag er darüber. Die Kerne in basophilen Fasern lagen überwiegend zentral, in den übrigen Muskelfasern waren die Kerne überwiegend randständig lokalisiert. Die meisten der Kerne waren deutlich aktiviert mit prominenten Nukleoli (s. auch Abb. A.2a/b).

**Regressive Faserveränderungen und zelluläre Infiltrate:** Erstere ließen sich bei sämtlichen Biopsien nachweisen, dabei waren vor allem hyaline, seltener granulär und vacuolär degenerierte Fasern zu sehen (Abb. A.2a/A.3a). Sie waren meist herdförmig angeordnet (selten Einzelfasern) und traten stets im Zusammenhang mit zellulären Abräumaktionen auf. Das zelluläre Substrat fokaler Akkumulationen nicht-parenchymaler Zellen setzte sich zusammen aus freien Bindegewebszellen und aus Fibroblasten, auf die im Kapitel 4.1.2.2 näher eingegangen wird (Abb. A.2a/b sowie A.3a/b). Dass sich die fokalen Zellanhäufungen nicht ausschließlich aus Fibroblasten zusammensetzten, war daran erkennbar, dass nicht alle Zellen in den entsprechenden Färbereaktionen Anti-Fibroblasten- bzw. Vimentin-Reaktivität zeigten (Abb. A.2.e/f und A.3e/f).

Die myofibrilläre ATPase-Reaktion (bzw. die NADH-Reduktase-Reaktion) zeigte in allen Fällen vermehrte Kalibervariationen beider Hauptfasertypen bei erhaltenem Mosaikmuster. Netzförmige oder perifaszikuläre Atrophien wurden nicht beobachtet. Bei den Präparaten im fortgeschrittenen Stadium ließ sich in der myofibrillären ATPase-Reaktion (pH 9,4) eine Typ-I-Faser-Prädominanz feststellen. Bei der Kollagen-Typ-IV-Immunreaktion zeigten sich im Vergleich zum Normalkollektiv verbreiterte Membranen insbesondere bei Fasern, die durch andere Zellen invadiert wurden (Abb. A.2h/A.3h). Gelegentlich waren die normalerweise stetigen Membranen stellenweise unterbrochen oder fehlten vollständig.

#### 4.1.1.3 Dermatomyositis / Polymyositis

Bei drei der vier hier untersuchten Myositis-Präparate handelte es sich um die klinisch und histologisch gesicherte Diagnose einer Dermatomyositis (DM); beim vierten Präparat handelte es sich um eine Polymyositis (PM).

**Fibrose:** Bei allen DM-Präparaten war in der van-Gieson-Färbung (Abb. A.4b) eine gering ausgeprägte perimysiale Fibrose zu erkennen, dies besonders deutlich in der Umgebung von Gefäßen. Bei der PM war die Fibrosierung stellenweise stärker ausgeprägt. Zwei DM-Präparate zeigten ebenfalls eine geringgradige endomysiale Fibrose, wobei in einem Fall 15, im anderen 6 Faszikel pro Präparat betroffen waren und damit 84% bzw. 29% aller Faszikel. Beim PM-Präparat waren 2 Faszikel (2%) betroffen.

**Faserabrundungen:** Der Anteil abgerundeter Fasern lag stets unter 50%, bei 2 DM-Präparaten und dem PM-Präparat lag er unter 5% der Fasern (s. auch Abb. A.4a/b und A.5a).

**Kalibervariationen** zeigten sich bei den Myositiden in Form von Faseratrophien:

**Faseratrophien** waren bei den DM-Präparaten vor allem in der Faszikel-Peripherie ausgeprägt, wobei in einem Fall unter 5% aller Fasern betroffen waren und in zwei Fällen der Anteil im Bereich zwischen >5% und 50% lag. Die PM zeigte eine diffuse Atrophie; hier waren weniger als 5% der Fasern eines Gesichtsfeldes atroph.

**Hyperkontrahierte opake Fasern** konnten in einem DM-Präparat beobachtet werden. Ihr Anteil lag hier unter 5%.

**Im HE-Präparat basophile Fasern** waren in allen DM-Präparaten meist in gruppierter Anordnung, gelegentlich aber auch vereinzelt zu erkennen (Abb. A.5a). Ihr Anteil lag stets unter 5%. Das PM-Präparat enthielt keine basophilen Fasern.

**Regressive Faseränderungen und zelluläre Infiltrate** ließen sich ebenfalls in allen Myositis-Präparaten ausmachen. Bei den veränderten Fasern handelte sich überwiegend um einzelne apoptotische Fasern, deren Anteil in allen Präparaten unterhalb von 5% aller Fasern lag. Zelluläre Infiltrate bestanden aus in den HE- und van-Gieson-Präparaten erkennbaren freien Zellen, die stets gemeinsam mit Fibroblasten auftraten (Abb. A.4a/b und A.4e/f). Hierbei zeigte sich bei den Dermatomyositiden ein perimysiales Verteilungsmuster, während beim PM-Präparat auch eine endomysiale Verteilung zu beobachten war. Zum Vorkommen von Fibroblasten siehe auch Kapitel 4.1.2.3.

Fettgewebe, hypertrophe Fasern und netzförmige Atrophien (ATPase-Reaktion) waren bei den Myositis-Präparaten nicht zu beobachten. Die Kollagen-Typ-IV-Immunreaktion zeigte überwiegend normal konfigurierte Basalmembranen; im Bereich der Infiltrate kam es gelegentlich zu Verdickungen der Basalmembranen (Abb. A.4h).

#### 4.1.1.4 Amyotrophe Lateralsklerose

**Fibrose:** Bei den hier verwendeten 3 Fällen zeigte sich in der van-Gieson-Färbung eine zumeist diskrete Fibrosierung im perimysialen Bereich (Abb. A.7b). Eine endomysiale Fibrose ließ sich nicht erkennen.

**Faserabrundungen** kamen in 2 ALS-Präparaten bei weniger als 5% der Fasern vor.

**Kalibervariationen:** Die neurogene Degeneration zog in allen Präparaten Kalibervariationen bei jeweils mehr als der Hälfte, aber weniger als 95% der Fasern nach sich (Abb. A.7a).

**Faseratrophien:** Bei der ALS zeigte sich bei allen Präparaten die ausgeprägte neurogen netzförmige Atrophie einzelner Faserbündel; dabei kam es zu einer Verkleinerung des Muskelfaserkalibers und einer Formveränderung der Muskelfasern mit eckigen Querschnitten. Der Anteil derart atrophischer Fasern lag stets im Bereich zwischen >5% bis 50%. Die Zellkerne erschienen dicht aneinandergedrückt und relativ vermehrt, vereinzelt fanden sich auch zentrale Kerne. In der ATPase-Reaktion (Abb. A.7h) überwogen bei den betroffenen atrophischen Fasern die Typ-II-Fasern.

**Hypertrophe Fasern.** Der Anteil reaktiv hypertropher Fasern lag bei allen Präparaten im Bereich zwischen >5% und 50% (Abb. A.7a).

**Regressive Faseränderungen und zelluläre Infiltrate:** In allen ALS-Gewebsschnitten waren einzelne diffus verteilte freie Zellen und einzelne Fibroblasten im peri- und endomysialen Raum zu erkennen. Kleinere vereinzelte fokale zelluläre Abräumreaktionen kamen bei allen ALS-Präparaten vor.

Fettgewebsablagerungen und hyperkontrahierte opake Fasern waren in keinem ALS-Präparat zu erkennen. Eindeutig basophile Fasern ließen sich nach den Kriterien dieser Arbeit (s. Kap. 4.1.1.2) ebenfalls nicht identifizieren. Die Kollagen-Typ-IV-Immunreaktion zeigte linear stetige Membranen ohne Verdickungen.

#### *4.1.1.5 Leberzirrhose*

Es zeigte sich das histologische Bild einer Zirrhose in sehr fortgeschrittenem Stadium mit überwiegend aufgehobener und verwaschener Parenchym-Bindegewebsgrenze (Abb. A.8a/A.8b). In den Parenchyminseln lagen die Hepatozyten überwiegend unregelmäßig, netzartig und ohne bestimmte Ausrichtung, mitunter auch tubulär zusammengefügt. Es fanden sich verschieden gestaltete Leberzellen, teils groß oder ödematös gebläht, teils klein, im HE-Präparat basophil oder atrophisch. In den Randzonen ehemaliger Portalfelder und in den lockeren Parenchymnarben fanden sich gelegentlich Pseudogallengänge. Im Bindegewebe ließen sich an mehreren Stellen fokale leukozytäre Infiltrate erkennen mit Betonung der Umbauzonen (Abb. A.8b). An zahlreichen Stellen finden sich Mottenfraßnekrosen.

### 4.1.2 FIBROBLASTEN/FIBROZYTEN-FÄRBUNG

#### *4.1.2.1 Normalkollektiv*

Bei allen Biopsien aus dem Normalkollektiv ließen sich im Bereich von Bindegewebssepten sowie perivaskulär einzelne Zellen mit Fibroblasten-Reaktivität nachweisen, jedoch keine ausgeprägte Fibroblasten-Infiltration oder diffuse Vermehrung im interstitiellen Raum (Abb. A.1e).

#### *4.1.2.2 Duchenne Muskeldystrophie*

Bei allen Muskelbiopsien der Duchenne-Patienten ließen sich mittels des Antikörpers Fibroblasten und Fibrozyten nachweisen. Sie waren in allen 17 Präparaten sowohl diffus vermehrt als auch konzentriert auf umschriebene endo- oder perimysiale Foci (in 16 Präparaten), s. Abb. A.2e/A.3e. Die Anzahl solcher fokalen Akkumulationen bewegte sich je

nach Präparat zwischen keinem und 8 pro Gesichtsfeld (Median: 3). Unter den Präparaten mit weitgehend zerstörter Gewebearchitektur wies eines keine gegenüber dem Normalkollektiv auffällige Vermehrung von Fibroblasten auf.

#### 4.1.2.3 *Dermatomyositis / Polymyositis*

Zwischen der Poly- und Dermatomyositis bestand ein Unterschied im Muster des Vorkommens von Fibroblasten. In der *HE*- und *van-Gieson*-Färbung fanden sich fokale Akkumulationen von Fibroblasten bei der DM überwiegend im perimysialen und perivaskulären Bereich (Abb. A.4e/A.5d), während diese bei der PM auch im Endomysium zu erkennen waren. Parallel zu fokalen Anhäufungen der Zellen kam es immer auch zum Parenchymuntergang. In der Anti-Fibroblasten-Immunreaktion konnte bei der DM zudem eine diffuse Infiltration des endomysialen Raumes beobachtet werden. Die Anzahl der fokalen Fibroblasten-Ansammlungen lag bei den DM-Präparaten zwischen 1 und 7 (Median 5) und bei der PM bei 5 pro Gesichtsfeld.

#### 4.1.2.4 *Amyotrophe Lateralsklerose*

In den hier verwendeten 3 ALS-Präparaten waren vergleichsweise wenige Fibroblasten zu erkennen. In zwei Präparaten fand sich jeweils eine Stelle mit einer fokalen Akkumulation von Fibroblasten, bei einem Präparat fanden sich 3 Foci (Abb. A.7e). Die Anzahl der Fibroblasten in solchen Anhäufungen war geringer als bei der DMD oder den Myositiden. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um reine Abräumreaktionen von untergegangenen Fasern handelt. Die meisten der Fibroblasten lagen endomysial, es ließen sich aber auch perimysiale Zell-Akkumulationen beobachten.

#### 4.1.2.5 *Leberzirrhose*

In dem untersuchten Präparat fanden sich vorwiegend im Bereich des Bindegewebes - und hier mit Betonung der Umbauzonen - an mehreren Stellen fokale Zell-Akkumulationen, innerhalb derer sich Fibroblasten nachweisen ließen (Abb. A.8e). Von dort aus erfolgten Übergriffe auf das Parenchym entweder in breiter Front oder mit schmalen Zungen. Im Verein mit Epithelnekrosen ließen sich in diesem Zusammenhang regelmäßig Mottenfraßnekrosen erkennen.

### 4.1.3 TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1

#### 4.1.3.1 Normalkollektiv

In allen 16 Muskelbiopsien aus dem Normalkollektiv ließ sich TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität im perimysialen Bindegewebe der Skelettmuskulatur und in der perivaskulären EZM sowie innerhalb von Nervenfasern – sofern diese im Präparat mitvorhanden waren – nachweisen. TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität war hingegen nicht im gefäßfreien endomysialen Bindegewebe zu erkennen. Eine intrazelluläre oder subsarkolemmale Anfärbung einzelner Muskelfasern wurde nicht beobachtet (Abb. A.1c).

#### 4.1.3.2 Duchenne Muskeldystrophie

TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität war im EZR des Muskelgewebes aller 17 DMD-Patienten nachweisbar (Abb. A.2c). Bei den 11 Präparaten mit erhaltener Gewebearchitektur konnten peri- und endomysiale Ausprägungen unterschieden werden: Demnach kam es in 10 Fällen zu einer massiven und in einem Fall zu einer mäßigen perimysialen Ausprägung der TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität. Abhängig vom Präparat schwankte das endomysiale Vorkommen des Wachstumsfaktors zwischen einer Anzahl von 4 bis 39 betroffenen Faszikeln (Median: 8). Der prozentuale Anteil betroffener Faszikel an der Gesamtzahl der Faszikel eines Präparates bewegte sich zwischen 21% und 100% (Median: 29%), vgl. Abb. 4.4, Kap. 4.2.2.1. Die Präparate mit weitgehend zerstörter Gewebearchitektur zeigten in allen Fällen eine massive und nahezu homogene Ausprägung der Immunreaktivität in bindegewebig organisierten Arealen. Durch die schonende Behandlung der Schnitte waren gelegentlich Adipozyten zu beobachten, die sich nicht aus dem Präparat gelöst hatten; diese färbten sich intrazellulär stark homogen an. Eine eindeutig intrazelluläre Reaktivität von TGF- $\beta$ 1 in Muskelfasern konnte nicht identifiziert werden.

#### 4.1.3.3 Dermatomyositis / Polymyositis

In allen Myositis-Präparaten konnte eine mäßig ausgeprägte perimysiale Immunreaktivität von TGF- $\beta$ 1 festgestellt werden (Abb. A.4c/A.5b). Endomysiale Immunreaktivität konnte bei den drei DM-Präparaten in fünfzehn, sechs bzw. null Faszikeln beobachtet werden, was einem Anteil von 88%, 33% bzw. 0% der jeweils vorhandenen Faszikel entsprach. Im Polymyositis-Präparat zeigten zwei Faszikel endomysiale TGF- $\beta$ 1-Reaktivität, was 2% aller Faszikel entsprach.

#### 4.1.3.4 Amyotrophe Lateralsklerose

Im Gegensatz zur Muskeldystrophie Duchenne und den Myositiden kam es im ALS-Kollektiv insgesamt zu einer vergleichsweise geringen Ausprägung der TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität. In allen drei untersuchten Präparaten war der Wachstumsfaktor perimysial lokalisiert (Abb. A.7c). Eine endomysiale Immunreaktivität war nicht zu erkennen, Areale mit atrophen Fasern zeigten keine vermehrte TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität.

#### 4.1.3.5 Leberzirrhose

Wie bei den Muskelpräparaten ließ sich TGF- $\beta$ 1 überwiegend im Extrazellulärraum erkennen. Deutliche Immunreaktivität zeigte sich vor allem im Bereich der portalen und periportal Fibrose-Areale, soweit Portalfelder noch abgrenzbar waren. Eine positive Reaktivität fand sich zudem in dem Bindegewebe um Pseudolobuli. In aktiven Umbauzonen, wo sich entzündliche Reaktion und fibrotische Septen in die Pseudolobuli hinein ausbreiteten, fand sich vermehrte Reaktivität (Abb. A.8c). Bei perizellulärer Fibrose breitete sich die Immunreaktivität auch innerhalb der Pseudolobuli aus. Einige Endothelzellen reagierten ebenfalls mit dem Antikörper und zeigten hierbei eine intrazelluläre Anfärbung (Abb. A.8c).

### 4.1.4 TENASCIN

#### 4.1.4.1 Normalkollektiv

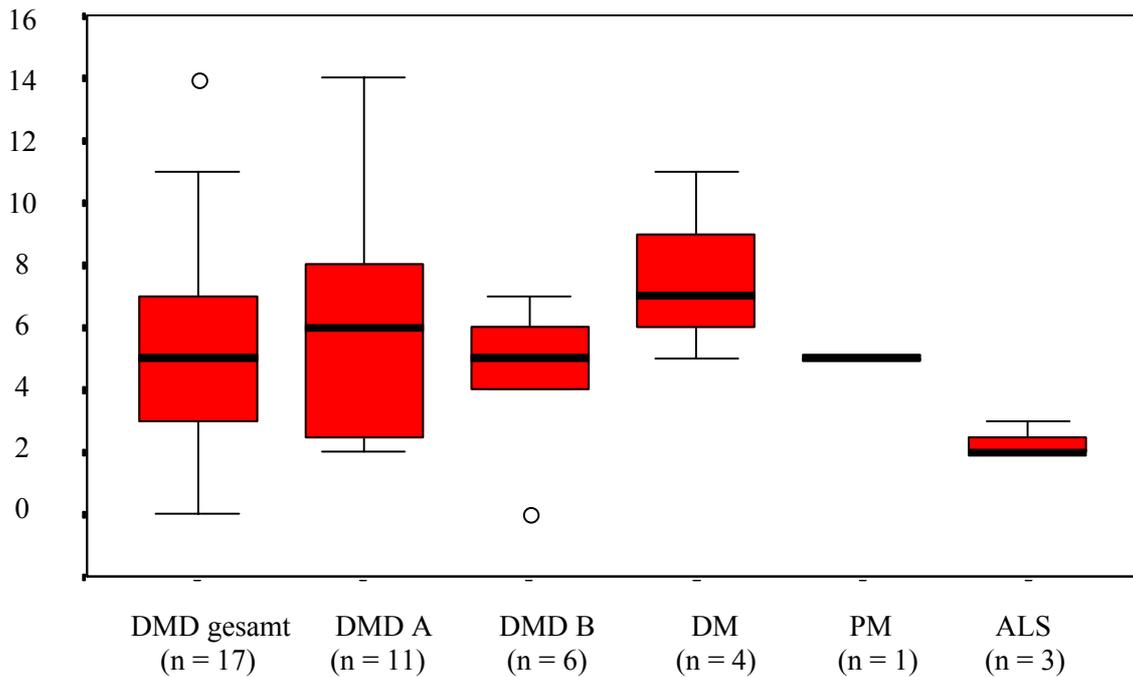
Die Präsenz von Tenascin-Immunreaktivität beschränkte sich in der immunhistochemischen Färbung auf Endothelien und die glatte Muskulatur vereinzelter Blutgefäße. Sie ließ sich ebenfalls innerhalb nervaler Strukturen (sofern im Präparat vorhanden) nachweisen. Es fand sich keine Tenascin-Immunreaktivität im Bereich des peri- oder endomysialen Bindegewebes und der EZM der Muskelfasern. Auch eine intrazelluläre Faseranfärbung kam nicht vor (Abb. A.1d).

#### 4.1.4.2 Duchenne Muskeldystrophie

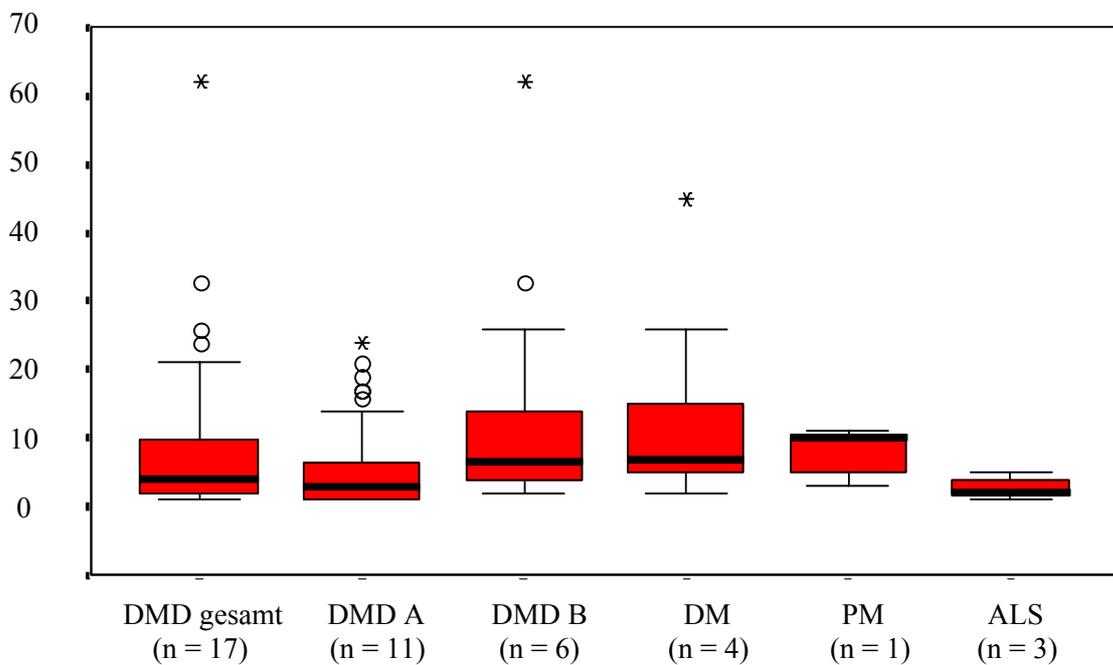
Tenascin-Immunreaktivität zeigte sich bei 16 der 17 Biopsien der Duchenne-Patienten in einem *fokalen* extrazellulären Verteilungsmuster. In sämtlichen Arealen, in denen es zur Reaktivität von Tenascin kam, waren fokale Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten zu erkennen. Das eine Präparat, in dem Tenascin nicht immunhistochemisch nachzuweisen war, zeigte auch keine fokale Zellansammlung. Nicht im Bereich jeder fokalen

Zellakkumulation wurde gleichzeitig auch Tenascin-Reaktivität nachgewiesen. Es bestand eine erhebliche Streubreite in der Anzahl der Foci, die - abhängig vom Präparat – bei einer Gesamtvergrößerung von 20:1 zwischen Null und 14 pro Gesichtsfeld schwankte (Median: 5). Unterschied man nach Krankheitsstadium, so lag der Median der Anzahl der Foci in den gut erhaltenen Präparaten (DMD A) bei 6 und bei den Präparaten in fortgeschrittenem Stadium (DMD B) bei 5 (Abb. 4.2).

Ein Focus bestand - mit Ausnahme der rein perimysial gelegenen - aus einer bestimmten Anzahl von Muskelfasern, die ganz bzw. teilweise von Tenascin-Immunreaktivität umgeben waren (vgl. Abb. A.2d und A.3d). Die Anzahl betroffener Fasern pro Focus lag in den untersuchten Gesichtsfeldern zwischen 1 und 62 (bei einer 20fachen Gesamtvergrößerung). Abb. 4.3 zeigt die Häufigkeitsverteilung dieser Foci mit je einer bestimmten Faseranzahl in sämtlichen DMD-Präparaten (ausgewertet wurde je ein Gesichtsfeld pro Präparat und ein Präparat pro Patient) und dieselben Häufigkeiten bei der Unterscheidung zwischen gut erhaltenen (DMD A) und solchen Präparaten mit zerstörter Gewebearchitektur (DMD B). Der Gesamt-Median lag bei 4. Unterschied man die Präparate nach ihrem Erhaltungsgrad, so lag der Median ganz bzw. teilweise umgebener Fasern bei der Gruppe DMD A bei 3 und bei den Präparaten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium bei 7 (in der Abb. 4.3 nicht enthalten). Es handelte sich nicht um Normalverteilungen. Der U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon ergab einen signifikanten Unterschied ( $p=0,0015$ ) in der Anzahl der von Tenascin-Reaktivität umgebenen Fasern zwischen den Gruppen DMD A und B. Bei allen Präparaten aus der Gruppe DMD A lagen die Foci überwiegend endomysial, wobei 2 bis 14 Faszikel pro Präparat betroffen waren (Median: 4). Der prozentuale Anteil betroffener Faszikel lag zwischen 5% und 36% aller Faszikel (Median: 27%). In 6 Fällen aus der Gruppe DMD A kam es zusätzlich zu einer perimysialen Reaktivität mit einer Anzahl von 1 bis 10 Foci (Median: 2). Bei den Präparaten aus der Gruppe DMD B konnte nicht sicher zwischen endo- und perimysial unterschieden werden.



**Abb. 4.2:** Anzahl der Foci pro Gesichtsfeld (GF) bei einer Gesamtvergrößerung von 20:1 in den verschiedenen Präparaten der untersuchten Erkrankungen. Dicker Balken = arithmet. Mittelwert (Median nicht dargestellt).



**Abb. 4.3:** Häufigkeitsverteilung der Anzahl der Fasern, die von Tenascin-Immunreaktivität umgeben waren, bei verschiedenen Erkrankungen.

#### 4.1.4.3 *Dermatomyositis / Polymyositis*

Tenascin-Immunreaktivität war in den Myositis-Präparaten ebenfalls fokal ausgeprägt im EZR anzutreffen (Abb. A.4d, A.5c). Die Foci lagen überwiegend endomysial und bildeten bei der DM konfluierende Netzwerke aus. Bei der PM konnten vergleichbare Netzwerke nicht beobachtet werden. Pro Gesichtsfeld lag der Median der Anzahl der Foci bei der DM bei 7 und bei der PM bei 5 (Abb. 4.2). Insgesamt waren fünf, sieben bzw. neun Faszikel pro Präparat betroffen, was jeweils Anteilen von 2x 35% bzw. 39% aller Faszikel entsprach. Eine eindeutige Korrelation der Tenascin-Reaktivität mit der perifaszikulären Atrophie bei der DM wurde nicht beobachtet. Die Anzahl betroffener Fasern lag bei der DM zwischen 2 und 45 Fasern (Median: 7). Die Grenzen zwischen den einzelnen Foci waren aufgrund der konfluierenden Netzwerke fließend. Bei der PM waren im untersuchten Gesichtsfeld 5 Foci zu erkennen; die Anzahl betroffener Fasern lag pro Focus zwischen 3 und 11 (Median: 10). Rein perimysiale Foci (mit Ausnahme der stets Tenascin-positiven Gefäßwände) waren bei den Myositiden nicht anzutreffen.

#### 4.1.4.4 *Amyotrophe Lateralsklerose*

Auch bei der ALS war Tenascin-Immunreaktivität in fokaler Ausprägung vorhanden (Abb. A.7d). In zwei der hier untersuchten drei Präparate konnten jeweils zwei Foci pro Gesichtsfeld festgestellt werden, in einem Präparat drei (Abb. 4.2). Bei den beiden ersteren handelte es sich dabei um jeweils einen perimysialen und einen endomysialen Herd; im dritten Fall waren es ein perimysialer und zwei endomysiale Foci. Dies entsprach einem Anteil von 3%, 4% bzw. 7% aller Faszikel. Pro Focus waren zwischen 1 und 5 Fasern betroffen (Median: 2).

#### 4.1.4.5 *Leberzirrhose*

In dem Leberpräparat fand sich vereinzelt fokal extrazelluläre Tenascin-Immunreaktivität, dies hauptsächlich in den aktiven Übergangsregionen zwischen Parenchym und fibrotischen Arealen. Dort konnte das Protein insbesondere im Bereich von fokalen zellulären Infiltraten und von Mottenfraßnekrosen beobachtet werden (Abb A.8d). In der Umgebung von Pseudogallengängen ließ sich das Protein ebenfalls nachweisen. In wenigen Arealen mit annähernd erhaltener ursprünglicher Struktur konnte Tenascin auch in der Peripherie der Portalfelder ausgemacht werden.

#### 4.1.5 VIMENTIN

##### 4.1.5.1 Normalkollektiv

Vimentin-Immunreaktivität war stets in Fibroblasten und Fibrozyten, glatten Gefäßmuskelzellen und den Endothelien auch kleinster Gefäße nachweisbar. Als Intermediärfilament quergestreifter Muskelfasern ließ es sich im Normalkollektiv nicht beobachten (Abb. A.1f).

##### 4.1.5.2 Duchenne Muskeldystrophie

Außer den schon bei den Normalbefunden erwähnten Strukturen konnte man bei der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen Vimentin bei allen DMD-Präparaten eine homogene intrazelluläre Immunreaktivität innerhalb von regenerierenden Skelettmuskelfasern erkennen (Abb. A.2f). Vimentin-Reaktivität zeigte sich häufig innerhalb gruppierter Verbände aus 2 bis max. 12 Muskelfasern (Abb. A.3f). Im Umfeld dieser gruppierten Faserverbände traten stets auch fokale Akkumulationen von Fibroblasten, die ebenfalls Vimentin-Immunreaktivität aufwiesen, auf. Daneben kamen in allen Präparaten auch diffus verteilte *einzelne* Vimentin-positive Fasern vor. Die Intensität der Immunreaktivität variierte innerhalb der einzelnen Präparate sowohl zwischen den gruppierten Faserverbänden als auch zwischen einzelnen Fasern (Abb. A.3f). Die Immunreaktivität innerhalb einzelner Muskelfasern wies innerhalb von gruppierten Faserverbänden stets dieselbe Intensität auf. Der Anteil Vimentin-reaktiver Fasern betrug in 6 Präparaten unter 5%, in 9 Präparaten zwischen 5% und 50% und in einem Präparat über 50% aller Fasern. Bis auf das letztgenannte Präparat, welches zur Gruppe der Präparate in späterem Krankheitsstadium gehörte, verteilten sich Präparate mit geringem und höherem Anteil Vimentin-positiver Fasern gleichmäßig auf frühes und fortgeschrittenes Krankheitsstadium.

##### 4.1.5.3 Dermatomyositis / Polymyositis

In allen Myositis-Präparaten fanden sich Vimentin-reaktive Fasern in der Größenordnung von <5% aller Fasern. Es handelte sich überwiegend um Einzelfasern (Abb. A.5e), seltener fanden sich gruppierte Anordnungen. Fibroblasten, die ebenfalls Vimentin-Reaktivität zeigten, kamen stets in- und außerhalb von Infiltraten vor. Bei DM und PM ließen sich sowohl homogen angefärbte Fasern beobachten als auch Fasern, die eine Betonung des Sarkolemmes bei nur wenig oder nicht angefärbtem Zellinnerem aufwiesen (Abb. A.4f)

#### 4.1.5.4 *Amyotrophe Lateralsklerose*

Der Anteil Vimentin-positiver Fasern lag in allen 3 ALS-Präparaten unter 5%. Es handelte sich überwiegend um Einzelfasern (Abb. A.7f); gelegentlich konnten gruppierte Anordnungen beobachtet werden. Vimentin-reaktive Fasern waren entweder homogen angefärbt oder wiesen eine Betonung des Sarkolemm bei blassem Zellinnerem auf. Einzelne Zellen (Fibroblasten) im Bereich fokaler Abräumreaktionen zeigten ebenfalls Vimentin-Immunreaktivität.

#### 4.1.5.5 *Leberzirrhose*

Vimentin-Immunreaktivität zeigte sich im Leberpräparat vorwiegend in nicht-parenchymalen Zellen, bei denen es sich wie auch im Muskelgewebe um Fibroblasten bzw. Fibrozyten handeln dürfte (Abb. A.8f). Deren Verteilung wurde bereits an anderer Stelle abgehandelt (s. Kap. 4.1.2.5). Daneben fanden sich auch einzelne Parenchymzellen, die Vimentin-Immunreaktivität zeigten. Hierbei handelt es sich um Myofibroblasten, die im Zusammenhang mit der zunehmenden Fibrose aus Ito-Zellen (hepat. Fettspeicherzellen) entstehen.

#### 4.1.6 N-CAM

##### 4.1.6.1 *Normalkollektiv*

N-CAM konnte in weniger als 1% der Muskelfasern intrazellulär in Form einer homogenen Immunreaktivität nachgewiesen werden, vgl. Abb. A.1g. Im Regelfall wurden lediglich Nervenfasern angefärbt. Größere Nerven konnten mit ihren sich aufzweigenden Ästen beobachtet werden. Selten färbten sich spindelig ausgezogene Strukturen im Bereich des Sarkolemm an, deren morphologisches Korrelat sowohl Satellitenzellen als auch Endplatten sein könnten, wobei beide Strukturen nicht immer sicher voneinander zu unterscheiden waren. Das Interstitium wurde nicht dargestellt. Fibroblasten zeigten ebenfalls keine N-CAM-Reaktivität.

##### 4.1.6.2 *Duchenne Muskeldystrophie*

Intrazelluläre N-CAM-Immunreaktivität war bei sämtlichen DMD-Präparaten in regenerierenden Skelettmuskelfasern nachweisbar. Der Anteil N-CAM-positiver Fasern belief sich bei 6 Präparaten auf bis zu 5% aller Fasern eines jeweils repräsentativen Gesichtsfeldes, bei

11 Präparaten lag deren Anteil im Bereich zwischen 5% und 50% aller Fasern. Analog zu Vimentin ließen sich sowohl gruppierte Faserverbände als auch diffus verteilte Einzelfasern ausfindig machen, die N-CAM-Immunreaktivität zeigten (Abb. A.2g/A.3g). Die Intensität der N-CAM-Reaktivität konnte zwischen den einzelnen Verbänden bzw. zwischen den einzelnen Fasern unterschiedlich sein (Abb. A.3g). Die Fasern waren homogen angefärbt. Das interstitielle Binde- und Fettgewebe wurde nicht dargestellt. Vereinzelt konnten auch hier Nerven, die N-CAM-Immunreaktivität zeigten, beobachtet werden.

#### *4.1.6.3 Dermatomyositis / Polymyositis*

Bei 2 DM-Präparaten und bei der PM lag der Anteil N-CAM-reaktiver Fasern im Bereich zwischen 5% und 50%. In einem DM-Präparat lag dieser Anteil unter 5%. Der größte Teil N-CAM-positiver Fasern zeigte bei allen Myositis-Präparaten eine vollständige Anfärbung des Sarkolemm und ein retikuläres Muster im Bereich des Faserinneren (Abb. A.4g). Homogen angefärbte Fasern fanden sich nur in einem DM-Präparat (Abb. A.5f).

#### *4.1.6.4 Amyotrophe Lateralsklerose*

Bei der ALS zeigten weniger als 5% der Fasern je Präparat N-CAM-Immunreaktivität. Es handelte sich größtenteils um Einzelfasern, gelegentlich konnten kleinere gruppierte Anordnungen beobachtet werden. Die Fasern waren entweder homogen angefärbt oder betonten das Sarkolemm bei schwach oder nicht angefärbtem Innenraum (Abb. A.7g).

#### *4.1.6.5 Leberzirrhose*

Im Präparat der Leberzirrhose konnte keine N-CAM-Immunreaktivität ausfindig gemacht werden.

## 4.2 CO- LOKALISATIONEN IM SERIENSCHNITT

### 4.2.1 FIBROBLASTEN/FIBROZYTEN-FÄRBUNG

#### 4.2.1.1 *Duchenne Muskeldystrophie*

Fibroblasten traten im Gewebe überwiegend gehäuft in größeren Ansammlungen auf. Im Bereich dieser fokalen Fibroblasten-Akkumulationen zeigten sich stets degenerative Umbau- bzw. Abräumvorgänge. Gleichzeitig waren in der Umgebung solcher Stellen häufig auch regenerierende Fasern zu beobachten. Im van-Gieson-Präparat sah man in der Umgebung dieser Stellen immer auch eine verstärkte Bildung extrazellulärer Substanz.

**Co-Lokalisation mit TGF- $\beta$ 1:** Bei der DMD konnte man im Bereich fokaler Akkumulationen der Fibroblasten stets TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität erkennen (Abb.2c/e). Das Vorkommen von TGF- $\beta$ 1 im Zusammenhang mit solchen Zell-Ansammlungen konnte nicht allein durch die Anwesenheit der Fibroblasten nachvollzogen werden, da die Immunreaktivität nicht im Bereich der Zellen selbst, sondern nur im Bindegewebe erkennbar war (vgl. Abb. A.6b).

**Co-Lokalisation mit Tenascin:** Im Bereich fokaler Fibroblasten-Akkumulationen wurde bei den 16 DMD-Präparaten, in welchen diese vorkamen, ein gemeinsames Vorkommen mit Tenascin-Immunreaktivität beobachtet (Abb. A.2d/e, A.6c). Fokale Tenascin-Immunreaktivität war in 7 Präparaten bei mehr als 95% der Fibroblasten-Akkumulationen zu erkennen. In 7 weiteren Präparaten zeigten weniger als 95%, aber über 50% der fokal angehäuften Fibroblasten Übereinstimmung mit Tenascin-Reaktivität und bei 2 Präparaten weniger als die Hälfte dieser Stellen. Demnach zeigte sich keineswegs an allen Stellen, an denen vermehrt Fibroblasten auftraten, auch gleichzeitig Tenascin-Reaktivität. Umgekehrt kam es allerdings nie zur Reaktivität von Tenascin, ohne dass zugleich auch Fibroblasten an der korrespondierenden Stelle im Serienschnitt zu beobachten waren (s. auch Kap. 4.2.3.1, Tab. 4.1 und Abb. A.3d/e sowie A.4d/e)

**Co-Lokalisation mit Vimentin:** In der Umgebung fokaler Vermehrungen von Fibroblasten kam es in allen DMD-Präparaten, die solche Stellen enthielten, zu einer >95%igen Co-Lokalisation mit Vimentin-Immunreaktivität (Abb. A.2f, A.3f, A.6d). Die hohe Vimentin-Reaktivität in diesen Arealen kommt dadurch zustande, dass Vimentin sowohl von Fibroblasten als auch von regenerierenden Muskelfasern synthetisiert wird und beides im Zusammenhang mit fokalen Akkumulationen von Fibroblasten vorkommt. Umgekehrt war der Nachweis Vimentin-positiver Zellen nicht zwingend an die Anwesenheit von Fibroblasten gebunden (s. Kap. 4.1.5.2 und 4.2.4.1).

**Co-Lokalisation mit N-CAM** (Abb. A.2g, A.3g): Bei 9 Präparaten kam es zu einer >95%igen Co-Lokalisation der Fibroblasten-Ansammlungen mit vereinzelt oder gruppierten Fasern, die N-CAM-Immunreaktivität zeigten. Bei 6 Präparaten waren solche Fasern innerhalb von >50% bis 95% aller Stellen anzutreffen, an denen sich eine fokale Akkumulation von Fibroblasten fand. Wie bei Vimentin kamen auch N-CAM-positive Fasern vor, die unabhängig von der Anwesenheit der Fibroblasten in den Präparaten zu beobachten waren (s. Kap. 4.2.5.1).

#### 4.2.1.2 *Dermatomyositis / Polymyositis*

Im Bereich der auch in den Myositis-Präparaten fokal gehäuft auftretenden Fibroblasten war im van-Gieson-Vergleichspräparat stets eine Vermehrung extrazellulärer Substanz zu erkennen. Diese Vermehrung trat verstärkt im Randbereich der Ansammlungen auf; zentral lag eine vergleichsweise geringe Fibrosierung vor (vgl. Abb. A.4b). Im Zusammenhang mit der bei der DM zu beobachtenden diffusen endomysialen Vermehrung von Fibroblasten konnte keine wesentliche Vermehrung des Bindegewebes festgestellt werden.

**Co-Lokalisation mit TGF- $\beta$ 1**: Wie schon bei der DMD konnte in sämtlichen Bereichen, in denen Fibroblasten akkumuliert auftraten, TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität auffindig gemacht werden. Es war auch hier nicht eindeutig zu klären, ob der Nachweis des Wachstumsfaktors auf der vermehrten Anwesenheit extrazellulärer Substanz oder auf der Anwesenheit der Fibroblasten selbst beruhte (vgl. Kap. 4.2.2.2 und Abb. A.4c, A.5b). Die Reaktivität von TGF- $\beta$ 1 beschränkte sich auf die Peripherie der Infiltrate, wenn dort im Van-Gieson-Präparat vermehrt Extrazellulärsubstanz nachweisbar war und der Zentralbereich ausgespart blieb (Abb. A.4a-c).

**Co-Lokalisation mit Tenascin**: Bei der PM und bei einem DM-Präparat konnte in >95% der vorhandenen Anhäufungen der Fibroblasten auch Tenascin-Immunreaktivität nachgewiesen werden. In einem DM-Präparat lag dieser Anteil im Bereich zwischen >50% und 95%, in einem weiteren DM-Präparat zeigten weniger als die Hälfte der Anhäufungen Tenascin-Reaktivität, vgl. Abb. A.4d. Tenascin bildete bei der DM konfluierende Netzwerke aus, die mit der diffusen Verteilung der Fibroblasten übereinstimmte (Abb. A.5c/d).

**Co-Lokalisation mit Vimentin**: Auch bei den Myositiden kam es durch die Anwesenheit Vimentin-positiver Fibroblasten zur Reaktivität des Intermediärfilaments an allen Stellen, an denen Fibroblasten nachweisbar waren (Abb. A.4e/f und A.5d/e). Lässt man die ohnehin Vimentin-positiven Fibroblasten außer Acht und betrachtet nur die Muskelfasern, so enthielten <5% der fokalen Fibroblasten-Ansammlungen Vimentin-positive Fasern (Abb. A.4f, A.5d). Bei der PM enthielten >50% der endomysialen fokalen Fibroblasten-Ansammlungen Vimentin-positive Fasern. Im Gegensatz zu Tenascin war die Reaktivität von Vimentin wie bei der DMD nicht an das Vorhandensein von Fibroblasten gebunden (vgl. Kap. 4.2.4.2).

**Co-Lokalisation mit N-CAM:** Bei allen DM-Präparaten befanden sich in der Umgebung fokaler Häufungen von Fibroblasten zugleich auch N-CAM-reaktive Fasern (Abb. A.4g, A.5f). Die Anzahl solcher Stellen lag bei 2 Fällen zwischen >5% und 50%, in einem Fall waren es über 95%. Mehr als die Hälfte der Infiltrate enthielten bei der PM N-CAM-positive Fasern. N-CAM-positive Fasern kamen analog zu den Vimentin-positiven Fasern auch unabhängig von Fibroblasten vor.

#### 4.2.1.3 Amyotrophe Lateralsklerose

Gegenüber den Normalbefunden lag eine geringgradig ausgeprägte diffuse Vermehrung der Fibroblasten und Fibrozyten vor sowie eine stellenweise fokale Häufung im Rahmen von Abräumreaktionen (Abb. A.7e). Im Gegensatz zu den vorgenannten Erkrankungen kam es bei der ALS im Bereich endomysialer fokaler Anhäufungen der Fibroblasten nicht zu einer vermehrten Bildung extrazellulärer Substanz.

**Co-Lokalisation mit TGF- $\beta$ 1:** TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität war in den ALS-Präparaten insgesamt schwach ausgeprägt. Im Gegensatz zu DMD und DM/PM war der Wachstumsfaktor ausschließlich im Bereich perimysialer Fibroblasten-Ansammlungen nachweisbar (Abb. A.7c), im Bereich endomysial gelegener Fibroblasten war keine vermehrte TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität erkennbar.

**Co-Lokalisation mit Tenascin:** Sämtliche fokalen Fibroblasten-Ansammlungen waren von fokaler Tenascin-Reaktivität umgeben, die sich gelegentlich in der Umgebung der Fasern ausbreitete (Abb. A.7d/e). Von den diffus im Gewebe verteilten Fibroblasten ging keine vermehrte Tenascin-Reaktivität aus.

**Co-Lokalisation mit Vimentin:** In der näheren Umgebung von Fibroblasten-Akkumulationen konnten immer Vimentin-reaktive Einzelfasern beobachtet werden (Abb. A.7f), gelegentlich auch gruppierte Fasern, die Immunreaktivität zeigten. Im Gegensatz zur DMD und den Myositiden ließen sich keine Vimentin-positiven Fasern außerhalb der näheren Umgebung von Infiltraten feststellen (vgl. Kap. 4.2.4.3).

**Co-Lokalisation mit N-CAM:** Fasern, die Vimentin-Reaktivität im Bereich fokaler Akkumulationen von Fibroblasten zeigten, waren bis auf eine Ausnahme auch N-CAM-positiv. N-CAM-positive Fasern außerhalb von Stellen mit vermehrtem Auftreten von Fibroblasten kamen nicht vor.

## 4.2.2 TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA-1

### 4.2.2.1 *Duchenne Muskeldystrophie*

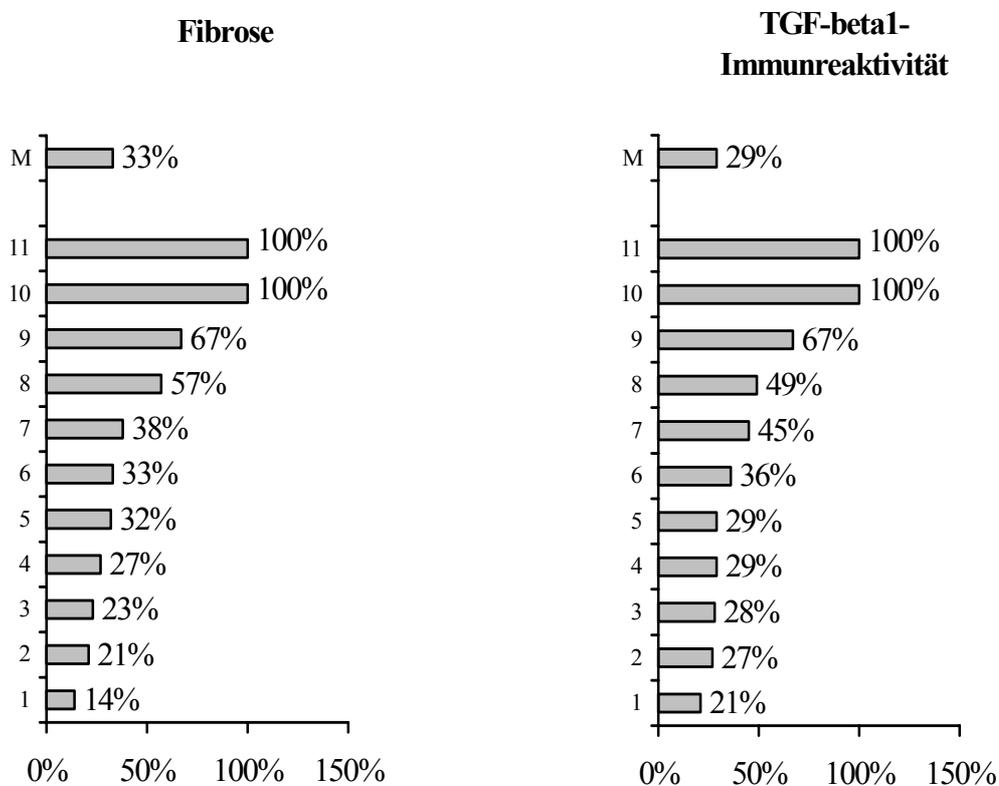
Verteilung und Ausprägung der TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität entsprachen weitgehend derjenigen der Fibrose, was in Abb. 4.4 anhand der jeweiligen endomysialen Ausprägungen bei den 11 Präparaten mit erhaltener Gewebearchitektur veranschaulicht wird. Die geringen prozentualen Unterschiede ergeben sich aus der Tatsache, dass bei der Auswertung nicht immer völlig identische Areale ausgezählt und bewertet werden konnten. Beim direkten Vergleich identischer Areale mit Van-Gieson-Serienschnitten bestätigte sich in allen DMD-Präparaten die gegenseitige Deckungsgleichheit fibrotischer Areale mit TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität (vgl. Abb. A.2b/c und A.3b/c).

Im Vergleich zum HE-Präparat ließ sich TGF- $\beta$ 1-Reaktivität stets in der Umgebung atropher und nekrotischer Fasern nachweisen. TGF- $\beta$ 1-Immunlokalisation fand sich immer auch im Bereich fokaler Akkumulationen von freien Zellen und Fibroblasten (Abb. A.2a-c, A.3a-c). Dies bestätigte sich im Vergleich zum Serienschnittpräparat mit Anti-Fibroblasten/ Fibrozyten-Reaktivität (Abb. A.2e, A.3e). Da die fokale Akkumulation von Fibroblasten stets auch mit einer vermehrten Bildung von Extrazellulärsubstanz einherging, war es wiederum nicht möglich, den Nachweis des Wachstumsfaktors alleine auf diese Anwesenheit der Fibroblasten oder anderer Zellen zurückzuführen. Nicht-parenchymale Zellen, die direkt in degenerierende Muskelfasern invadierten, zeigten keine TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität (Abb. A.6a-d).

Im Zusammenhang mit der Co-Lokalisation von TGF- $\beta$ 1 mit anderen Molekülen ist festzustellen, dass es sich bei Vimentin und N-CAM um intrazelluläre Proteine handelt, während TGF- $\beta$ 1 überwiegend im EZR vorkommt. Daher kann es nicht zu einer Co-Lokalisation im Sinne einer vollständigen Deckungsgleichheit im Serienschnitt kommen. Wenn im Folgenden von Co-Lokalisation die Rede ist, handelt es sich um Vimentin- bzw. N-CAM-positive Fasern, die an die Immunlokalisation extrazellulärer Proteine direkt angrenzten oder in der unmittelbaren Nähe aufzufinden waren.

Da sämtliche bei der DMD vorkommenden Bereiche mit fokalen Fibroblasten-Ansammlungen gleichzeitig TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität aufwiesen, entsprach die Co-Lokalisation von TGF- $\beta$ 1 mit den anderen hier untersuchten Matrix- und Strukturproteinen zugleich der Co-Lokalisation der Fibroblasten mit den entsprechenden Proteinen (s. Kap. 4.2.1.1). Außerhalb solcher Stellen kam es mit dem Protein Tenascin nie zu Co-Lokalisationen, da Tenascin-Reaktivität ausschließlich im Umfeld fokaler Fibroblasten-Anhäufungen zu finden war. Die TGF- $\beta$ 1-Reaktivität im Bereich Vimentin- bzw. N-CAM-positiver Fasern unterschied sich außerhalb von Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten nicht

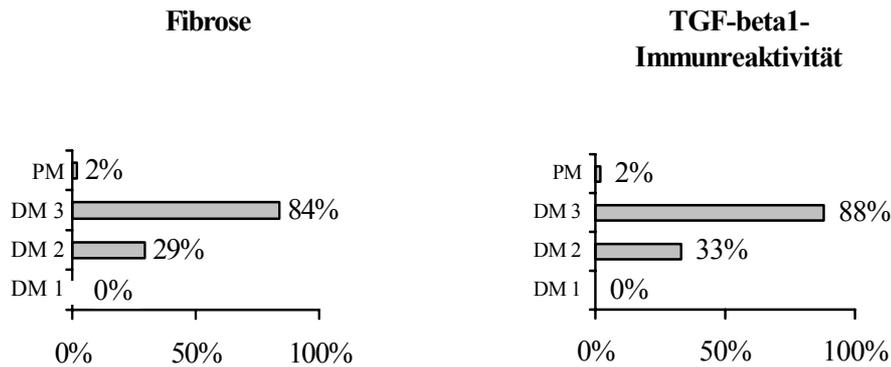
erkennbar von der TGF- $\beta$ 1-Reaktivität in der Umgebung unauffälliger Fasern. Die Stärke der jeweiligen Ausprägung war auch hier ausschließlich abhängig vom Ausmaß der Fibrose.



**Abb. 4.4:** Endomyxiale Ausprägung der Fibrose und der TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität bei 11 DMD-Präparaten mit erhaltener Gewearchitektur. Die einzelnen Prozentwerte beziehen sich auf die Gesamtzahl der Faszikel des jeweiligen Präparats. Gegenübergestellte Präparate sind Serienschnitte jeweils desselben Patienten. M = Median.

#### 4.2.2.2 Dermatomyositis / Polymyositis

Wie schon bei der DMD konnte auch hier ein enger Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Fibrose und der Immunreaktivität von TGF- $\beta$ 1 festgestellt werden (vgl. Abb. A.4b/c). Sowohl die perimysiale Ausprägung als auch die endomyxiale Verteilung (s. Abb. 4.5) entsprachen sich weitgehend.



**Abb. 4.5:** Endomyxiale Ausprägung der Fibrose (bezogen auf die Gesamtzahl der Faszikel eines Präparates) und der TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität bei 4 Myositis-Patienten. DM = Dermato-myositis, PM = Polymyositis.

Auch in den Myositis-Präparaten war TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität stets in der Umgebung atropher und nekrotischer Fasern vorhanden; diese Fasern waren i.S. einer Abräumreaktion stets auch von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten umgeben. In einem DM-Präparat konnte eine nekrotische Faser auffindig gemacht werden, bei der TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität in geringem Maße auch intrazellulär zu erkennen war. In der Umgebung von Fibroblasten lag bei den Myositiden insgesamt weniger Extrazellulärschubstanz vor als bei der DMD. Es konnte stets eine Reaktivität von TGF- $\beta$ 1 in der Umgebung fokaler Infiltrate beobachtet werden. An diesen Stellen trat die TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität - abhängig vom Ausmaß der Fibrose - betont in der Peripherie auf, wo auch Extrazellulärschubstanz vermehrt vorkam (Abb. A.4c). Das weitgehend bindegewebsfreie Zentrum dieser fokalen Infiltrate war teilweise völlig frei von TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität. Zur unterschiedlichen Verteilung von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten bei der DM und PM vgl. Kap. 4.1.1.3 und 4.1.2.3.

Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von TGF- $\beta$ 1 im Umfeld fokaler Infiltrate entsprach die Co-Lokalisation von TGF- $\beta$ 1 mit Tenascin, Vimentin bzw. N-CAM wie schon bei der DMD der Co-Lokalisation der Fibroblasten mit den entsprechenden Proteinen (s. Kap. 4.2.1.2). Außerhalb von fokalen Ansammlungen lymphohistiozytärer Zellen und Fibroblasten kam es nie zu einer Co-Lokalisation von TGF- $\beta$ 1 mit den anderen in dieser Arbeit untersuchten Molekülen.

#### 4.2.2.3 Amyotrophe Lateralsklerose

Aufgrund seiner insgesamt schwachen Immunreaktivität bei der ALS war die Beurteilung einer Co-Lokalisation von TGF- $\beta$ 1 mit anderen Strukturen und Wachstumsfaktoren im Serienschnitt erschwert und nicht immer eindeutig zuzuordnen. Beim Vergleich mit Van-Gieson-Präparaten fiel auf, dass TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität immer an Stellen zu finden war, an denen es zu einer vermehrten Bildung von Extrazellulärsubstanz im perimysialen Raum kam (Abb. A.7b/c). Diese Stellen befanden sich perivaskulär und in der Umgebung der bei der ALS seltenen Anhäufungen von lymphohistiozytärer Zellen und Fibroblasten. Bei 2 ALS-Präparaten kam es insgesamt bei <50% der fokalen Fibroblasten-Ansammlungen zur gleichzeitigen Reaktivität von TGF- $\beta$ 1, in einem Fall lag der Anteil im Bereich zwischen 50% und 95% der vorhandenen Ansammlungen. Zur Co-Lokalisation von TGF- $\beta$ 1 mit anderen Proteinen im Zusammenhang mit fokalem Auftreten von Fibroblasten vgl. Kap. 4.2.1.3. Außerhalb der genannten Strukturen fand sich keine TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität, insbesondere nicht im endomysialen Bereich.

#### 4.2.3 TENASCIN

##### 4.2.3.1 Duchenne Muskeldystrophie

Die hier erwähnten Angaben zur Co-Lokalisation gelten nur für Strukturen oder Proteine innerhalb von Foci, die Tenascin-Reaktivität aufwiesen. Zum Vorkommen außerhalb der Foci siehe die entsprechenden Kapitel, die sich mit den jeweiligen Proteinen befassen.

Bereits im reinen Tenascin-Präparat mit Kerngegenfärbung, vor allem aber im Vergleich zu den auf Anti-Fibroblasten/ Fibrozyten-Immunreaktivität untersuchten Serienschnitten, zeigten sich Zusammenhänge der Tenascin-Reaktivität mit fokalen Abräumaktionen und Akkumulationen von Fibroblasten. In 16 von 17 Präparaten waren im Bereich der Foci immer auch Fibroblasten bzw. Fibrozyten vorhanden; waren keine Fibroblasten vorhanden, so war auch keine Tenascin-Immunreaktivität zu erkennen (vgl. Abb. A.2d/c, A.3d/c). Ein Präparat zeigte keine Tenascin-Immunreaktivität (mit Ausnahme der immer angefärbten Gefäßwände); in diesem Präparat waren auch keine fokalen Fibroblasten-Anhäufungen zu sehen. Im Vergleich zum HE-Präparat zeigte sich innerhalb der erwähnten Zellakkumulationen bei 7 Präparaten, in denen basophile Fasern mit zentralen Kernen und prominenten Nukleoli nachweisbar waren, eine Co-Lokalisation Tenascin-positiver Foci mit diesen Fasern. In einem Fall kam es zu einer >95%igen lokalen Übereinstimmung; in 4 Fällen enthielten zwischen 5% und 50% der Foci auch basophile Fasern; in 2 Fällen kam es zu keiner Co-Lokalisation, obwohl basophile Fasern

im Präparat vorhanden waren. Eine Co-Lokalisation mit opaken überkontrahierten Fasern ergab sich nur in einem Präparat innerhalb <5% der Foci.

**Co-Lokalisation mit TGF- $\beta$ 1:** Da TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität immer auch im Bereich von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten vorhanden war, kam es innerhalb aller Foci, in denen Tenascin-Immunreaktivität zu erkennen war, zur Co-Lokalisation der beiden Proteine (vgl. Abb. A.2c/d, A.3c/d).

**Co-Lokalisation mit Vimentin:** Zur Definition der Co-Lokalisation beim Vergleich extrazellulär mit intrazellulär nachgewiesener Immunreaktivität der untersuchten Proteine vgl. Kapitel 4.2.2.1. Bei den DMD-Präparaten, die fokale Fibroblasten-Ansammlungen enthielten, fand sich Vimentin-Immunreaktivität innerhalb oder in der näheren Umgebung von >95% der Foci, in denen Tenascin-Immunreaktivität zu erkennen war. Einerseits waren es die Fibroblasten selbst, die Vimentin-Reaktivität zeigten, andererseits ließen sich im Bereich der Foci einzelne oder Gruppen Vimentin-positiver Muskelfasern ausmachen (Abb.A.3d/f). Zentral gelegene Fasern waren hierbei häufig intensiver angefärbt als Fasern in der Peripherie oder außerhalb der Foci. Die meisten Muskelfasern, die von Tenascin-Immunreaktivität umgeben waren, zeigten keine Vimentin-Reaktivität. In <5% waren keine Vimentin-positiven Fasern im Bereich der Foci zu erkennen. Wie in Kap. 4.2.4.1 beschrieben ist, befand sich die Mehrzahl Vimentin-positiver Fasern in den meisten Präparaten im Bereich fokaler Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten und dann zumeist in Form gruppierter Verbände (Abb. A.3f). Vimentin-positive Fasern traten jedoch auch unabhängig von Fibroblasten und damit von Tenascin-Immunreaktivität auf.

**Co-Lokalisation mit N-CAM** (Abb. A.2g, A.3g): In 13 Serienschnitten ließen sich innerhalb von mehr als 95% aller Tenascin-positiven Foci einzelne oder Gruppen von Muskelfasern ausmachen, die N-CAM-Immunreaktivität zeigten (Abb. A.2d/g, A.3d/g). Zu diesen Serienschnitten zählten sämtliche Präparate des fortgeschrittenen Krankheitsstadiums. Bei 2 Präparaten enthielten zwischen 50% und 95% aller Foci auch N-CAM-reaktive Fasern, bei einem Präparat lag die Übereinstimmung im Bereich bis 50%. Auch N-CAM-positive Fasern traten unabhängig vom Vorhandensein von Fibroblasten und Tenascin-Reaktivität auf.

#### 4.2.3.2 *Dermatomyositis / Polymyositis*

Die Fasern betroffener Faszikel unterschieden sich in den konventionellen Färbungen nicht von den Fasern unauffälliger benachbarter Faszikel. Beim Vergleich mit der Immunreaktion durch Antikörper gegen Fibroblasten/ Fibrozyten bestätigte sich, dass sich jeder Focus in der Umgebung positiv markierter nicht-parenchymaler Zellen befand (Abb. A.4d/f, A.5c/d).

Deshalb beziehen sich die folgenden Angaben zu Co-Lokalisationen immer auf die Umgebung betroffener Fibroblasten-Anhäufungen:

**Co-Lokalisation mit TGF- $\beta$ 1:** Dieser Wachstumsfaktor kam im Bereich aller Fibroblasten-Akkumulationen vor; Tenascin war somit stets mit TGF- $\beta$ 1 co-lokalisiert (Abb. A.4c/d, A.5b/c).

**Co-Lokalisation mit Vimentin** (Abb. A.4d/f): Bei den DM-Präparaten lag der Anteil Vimentin-reaktiver Fasern in der Größenordnung von <5% der Foci, bei der PM lag der Anteil geringfügig darüber. Die meisten der von Tenascin-Immunreaktivität umgebenen Fasern zeigten keine Vimentin-Reaktivität. Bei der DM fiel auf, dass Fasern im Bereich der Foci eine stärkere Intensität der Vimentin-Immunreaktivität aufwiesen als außerhalb gelegene. Fibroblasten zeigten auch bei DM und PM positive Vimentin-Immunreaktivität. Vimentin-positive Muskelfasern traten auch unabhängig von Fibroblasten und mononukleären Zellen auf (Kap. 4.2.4.2).

**Co-Lokalisation mit N-CAM** (Abb. A.4d/g): Die Anteile N-CAM-positiver Fasern lagen bei der PM und bei 2 DM-Präparaten im Bereich von <5% der Tenascin-Foci, in einem DM-Präparat im Bereich von >50%-95%. Die N-CAM-reaktiven Fasern waren häufig, aber nicht immer mit Vimentin-positiven Fasern identisch.

#### 4.2.3.3 Amyotrophe Lateralsklerose

Tenascin-Reaktivität konnte man auch bei der ALS immer in Bereichen erkennen, in denen sich ebenfalls fokale Anhäufungen von Fibroblasten bzw. Fibrozyten befanden (Abb. 7d/e). Die betroffenen Fasern innerhalb der Foci unterschieden sich lichtmikroskopisch nicht von benachbarten Muskelfasern.

**Co-Lokalisation mit TGF- $\beta$ 1:** Bei der ALS kam TGF- $\beta$ 1 ausschließlich in den perimysial lokalisierten Foci vor (Abb. A.7c). Daher kam es nie zu einer endomysialen Co-Lokalisation von Tenascin und TGF- $\beta$ 1. Insgesamt lag der Anteil der Foci, die zugleich TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität zeigten, bei allen ALS-Präparaten im Bereich von >5% bis 50%.

**Co-Lokalisation mit Vimentin:** In der Umgebung sämtlicher Foci konnten Vimentin-positive Fasern beobachtet werden. Es handelte sich hierbei vorwiegend um Einzelfasern (Abb. A.7f). In einem Präparat konnte eine Gruppierung aus 4 Fasern ausgemacht werden, die sich in einem Tenascin-Focus befanden und zugleich Vimentin-Immunreaktivität zeigten. Die oben erwähnten Einzelfasern wiesen alle eine stärker ausgeprägte Reaktivität des Intermediärfilaments auf, als es in dieser Gruppe der Fall war.

**Co-Lokalisation mit N-CAM:** Diese wurde ebenfalls in allen Foci beobachtet. Es handelte sich dabei bis auf eine Ausnahme um dieselben Fasern bzw. dieselbe Fasergruppe, die zugleich Vimentin und N-CAM-Immunreaktivität zeigten (Abb. A.7g).

#### 4.2.4 VIMENTIN

##### 4.2.4.1 Duchenne Muskeldystrophie

Insgesamt befanden sich bei 11 Präparaten zwischen >50% und 95% aller Vimentin-positiven Fasern im näheren Umfeld von fokalen Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten (Abb. A.2a/b/e/f, Abb. 3a/b/e/f); bei 4 Präparaten waren es zwischen >5% und 50% und in einem Präparat weniger als 5%. Es handelte sich hierbei weitgehend um gruppierte Faserverbände (Abb. A.3f), während es sich beim jeweils verbleibenden Anteil Vimentin-reaktiver Fasern überwiegend um Einzelfasern handelte. In einigen Präparaten waren im Rahmen von Abräumreaktionen einzelne Vimentin-positive Zellen zu erkennen, die ins Innere nekrotischer Muskelfasern invadierten (Abb. A.6d).

**Basophile Fasern:** Beim Vergleich mit dem HE-Präparat fiel auf, dass gruppierte basophile Fasern - soweit sie im Präparat nachweisbar waren - stets Vimentin-Immunreaktivität zeigten. Umgekehrt lag der Anteil basophiler Fasern bei allen Präparaten zwischen 0% und 44% der Vimentin-positiven Fasern. Diese Fasern stellten sich auch in der Vimentin-Immunreaktion als gruppierte Verbände dar und lagen stets im Bereich fokaler Infiltrate. Sie wiesen eine vergleichsweise intensive homogene Färbung auf. Vimentin-positive Fasern, die nicht als basophile Fasern identifiziert wurden, waren hingegen häufig weniger intensiv im Faserinneren angefärbt und zeigten eine Betonung des Sarkolemms. Zahlreiche Faserverbände sowie die diffus verteilten Vimentin-positiven Einzelfasern erwiesen sich in den konventionellen Färbungen als unauffällig im Rahmen der Erkrankung und waren lichtmikroskopisch nicht von benachbarten Muskelfasern zu unterscheiden.

**Co-Lokalisation mit TGF- $\beta$ 1** (Abb. A.2c/f): Da TGF- $\beta$ 1 grundsätzlich im Bereich von Fibroblasten-Ansammlungen nachweisbar war (vgl. Kap. 4.2.1.1) und diese Zellen Vimentin-Immunreaktivität aufweisen, kam es hier immer zu einem gemeinsamen Auftreten der beiden Proteine. Außerhalb von fokalen Fibroblasten-Ansammlungen kam es - abhängig vom Ausmaß der Fibrose - ebenfalls häufig zur Co-Lokalisation, wobei die regionale Reaktivität von TGF- $\beta$ 1 aufgrund seiner ubiquitären Verteilung Vimentin-positive Fasern und nicht immunreaktive Fasern gleichermaßen betraf.

**Co-Lokalisation mit Tenascin:** Außerhalb von fokalen Fibroblasten-Ansammlungen konnte in keinem Fall eine Co-Lokalisation der beiden Proteine beobachtet werden, weil Tenascin-Reaktivität nur im Zusammenhang mit Fibroblasten auftrat. Da Vimentin-Immunreaktivität in jeder fokalen Ansammlung von Fibroblasten nachweisbar war, Tenascin-Immunreaktivität jedoch nicht, entsprach die Co-Lokalisation der beiden Proteine dem Vorkommen des Matrixproteins Tenascin mit Fibroblasten (s. Kap. 4.2.1.1 u. 4.2.3.1). Fasern in der Umgebung der Tenascin-Foci wiesen häufig eine stärkere Intensität ihrer Färbung auf als Fasern außerhalb

der Foci. Die in jedem DMD-Präparat diffus verteilten einzelnen Vimentin-positiven Muskelfasern zeigten keinen Zusammenhang mit Tenascin-Immunreaktivität.

**Co-Lokalisation mit N-CAM:** In zahlreichen Vimentin-positiven Muskelfasern ließ sich im Serienschnitt N-CAM-Immunreaktivität nachweisen (Abb. A.2f/g). Im Bereich fokaler Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten zeigten die (meist gruppierten) Vimentin-positiven Fasern bei 12 Präparaten in mehr als 95% auch N-CAM-Immunreaktivität, bei 4 Präparaten waren es zwischen 50% und 95% (Abb. A.3f/g); ein Präparat enthielt keine fokalen Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten. Außerhalb dieser Stellen lag die Deckungsgleichheit bei 12 Präparaten zwischen >50% und 95% und bei 4 Präparaten zwischen >5% und 50%. In einem DMD-Präparat kam es außerhalb von fokalen Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten nicht zur gemeinsamen Reaktivität der beiden Regenerationsmarker.

#### 4.2.4.2 *Dermatomyositis / Polymyositis*

Weniger als die Hälfte der Vimentin-positiven Fasern befanden sich bei den DM-Präparaten im Bereich fokaler Akkumulationen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten, der größere Anteil bestand aus Einzelfasern, die diffus im Präparat verteilt waren.

Ein gemeinsames Auftreten mit in der HE-Färbung basophilen Fasern konnte in einem DM-Präparat im Bereich zweier fokaler Infiltrate beobachtet werden.

**Co-Lokalisation mit TGF- $\beta$ 1:** Mit Ausnahme der Vimentin-positiven Fasern in der Umgebung fokaler Infiltrate (<50%) konnte bei der DM kein Zusammenhang mit der Reaktivität von TGF- $\beta$ 1 erkannt werden. Für das eine Präparat der PM galt dasselbe, nur dass der Anteil Vimentin-positiver Fasern im Bereich der Infiltrate hier über 50% lag und somit auch der Anteil an Fasern, die mit TGF- $\beta$ 1 co-lokalisiert auftraten.

**Co-Lokalisation mit Tenascin** (vgl. Abb. A.4d-g): Tenascin-Reaktivität trat sowohl bei der DM als auch bei der PM stets zusammen mit Fibroblasten auf (vgl. Kap. 4.2.1.2 und 4.2.3.2). Über die Hälfte der Vimentin-positiven Fasern innerhalb der Präparate lag außerhalb von Bereichen, die von Fibroblasten durchsetzt waren bzw. außerhalb von fokalen Fibroblasten-Ansammlungen, und war daher nicht mit Tenascin co-lokalisiert. Der (jeweils kleinere) Anteil Vimentin-reaktiver Fasern im Bereich fokaler Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten war dadurch, dass Tenascin bei der DM nicht immer in jeder Ansammlung nachweisbar war, unterschiedlich häufig mit diesem Wachstumsfaktor co-lokalisiert. Bei 2 DM-Präparaten waren weniger als 5% der Vimentin-positiven Fasern mit Tenascin co-lokalisiert und in einem DM-Präparat lag der Anteil im Bereich zwischen >5% und 50%. Bei der PM hingegen lagen >50% der Vimentin-reaktiven Fasern in Foci, die Tenascin-Immunreaktivität aufwiesen.

**Co-Lokalisation mit N-CAM:** Sowohl bei der DM als auch bei der PM zeigten >95% der Vimentin-positiven Fasern zugleich N-CAM-Immunreaktivität (vgl. Abb. A.4f/g). Dies galt jedoch umgekehrt nicht immer (vgl. Kap. 4.2.5.2: Co-Lokalisation mit Vimentin).

#### 4.2.4.3 Amyotrophe Lateralsklerose

Vimentin-positive Fasern befanden sich immer in der näheren Umgebung von den bei der ALS vergleichsweise seltenen fokalen Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten. Basophile Fasern wurden bei der ALS nicht identifiziert.

**Co-Lokalisation mit TGF- $\beta$ 1:** Dieser Wachstumsfaktor war bei der ALS ausschließlich perimysial nachweisbar. Seine Ausprägung reichte in keinem Fall so weit in den endomysialen Bereich, dass von einer Co-Lokalisation mit dort gelegenen Fasern gesprochen werden könnte (Abb. A.7c/f).

**Co-Lokalisation mit Tenascin:** Alle Fasern, die Vimentin-Immunreaktivität zeigten, lagen innerhalb oder in der näheren Umgebung von Tenascin-Foci (Abb. A.7d/f).

**Co-Lokalisation mit N-CAM:** Bei 2 ALS-Präparaten zeigten alle Vimentin-positiven Fasern N-CAM-Immunreaktivität; in einem Präparat lag der Anteil der Fasern, in denen Reaktivität für beide Proteine nachzuweisen war, im Bereich zwischen >50-95% der Vimentin-positiven Fasern.

### 4.2.5 N-CAM

#### 4.2.5.1 Duchenne Muskeldystrophie

Bei 12 Präparaten waren über 50% bis 95% aller N-CAM-positiven Fasern eines Gesichtsfeldes (bei einer Gesamtvergrößerung von 20:1) im Bereich fokaler Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten auszumachen, bei 3 Präparaten lag deren Anteil im Bereich von >5% bis 50%, bei einem Präparat waren es unter 5%. Meist handelte es sich um gruppierte Faserverbände (Abb. A.3g).

Im HE-Präparat *basophile* Fasern mit prominenten Nukleoli wiesen - sofern sie in einem Präparat vorkamen - stets eine starke N-CAM-Reaktivität auf. Umgekehrt lag der Anteil basophiler Fasern zwischen 0% und 38% der N-CAM-reaktiven Fasern. Es handelte sich dabei überwiegend um gruppierte Faserverbände, die eine vergleichsweise intensive Immunreaktivität aufwiesen. Zahlreiche - meist weniger intensiv gefärbte - Faserverbände sowie die diffus verteilten N-CAM-positiven Einzelfasern waren ohne lichtmikroskopisch auffälliges Korrelat in den konventionellen Färbungen.

**Co-Lokalisation mit TGF- $\beta$ 1** : Analog zu Vimentin kam es im Bereich fokaler Anhäufungen von freien Zellen und Fibroblasten stets zur Co-Lokalisation der beiden Wachstumsfaktoren, vgl. Abb. A.2c/g und A.3c/g. Außerhalb dieser Stellen war die Reaktivität von TGF- $\beta$ 1 allein abhängig vom Ausmaß der Fibrose im Präparat und veränderte sich nicht erkennbar in der Umgebung N-CAM-positiver Fasern.

**Co-Lokalisation mit Tenascin** (Abb. A.2d/g): Mit Tenascin kam es nur in der Umgebung von fokalen Fibroblasten-Ansammlungen zur Co-Lokalisation. Bei 7 Präparaten zeigten über 95% aller fokalen Fibroblasten-Ansammlungen, die N-CAM-positive Fasern enthielten, ebenfalls eine fokale Tenascin-Reaktivität. Bei weiteren 6 Präparaten lag der Anteil dieser Areale zwischen >50% und 95%, bei 2 Präparaten zwischen >5% und 50% und bei einem unter 5%.

**Co-Lokalisation mit Vimentin:** Im Umfeld sämtlicher fokalen Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten, in denen N-CAM-positive Fasern vorkamen, ließen sich ebenfalls Vimentin-positive Fasern nachweisen, überwiegend in gruppierter Anordnung. Es handelte sich dabei häufig um identische Fasern bzw. Fasergruppen (Abb. A3f/g). Die bereits oben erwähnten basophilen Fasern zeigten immer für beide Regenerationsmarker Immunreaktivität in vergleichsweise starker Intensität. Auch außerhalb von Leukozyten-Anhäufungen kam es häufig zur Co-Lokalisation beider Proteine: Bei einem Präparat wiesen über 95% aller N-CAM-positiven Fasern auch Vimentin-Reaktivität auf; bei 10 Präparaten waren es zwischen >50% und 95%, bei 5 Präparaten zwischen >5% und 50%. Bei einem Präparat kam es zu keiner Co-Lokalisation außerhalb von Arealen, die eine fokale Häufung von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten enthielten.

#### 4.2.5.2 *Dermatomyositis / Polymyositis*

Der Anteil an N-CAM-reaktiven Fasern, der im Bereich fokaler Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten zu beobachten war, lag bei 2 DM-Präparaten im Bereich zwischen >5% und 50% aller N-CAM-positiven Fasern, bei einem DM-Präparat lag er unter 5%. Die meisten N-CAM-positiven Fasern waren somit außerhalb entzündlicher Infiltrate.

In einem DM-Präparat zeigte sich N-CAM-Immunreaktivität bei in der HE-Färbung basophilen Fasern (Abb. A.5a/f). Diese Fasern wiesen eine homogene Färbung der gesamten Faser auf (sonst überwog ein randbetontes sarkolemmales Färbemuster).

**Co-Lokalisation mit TGF- $\beta$ 1:** Mit Ausnahme derjenigen Fasern, die in der Umgebung fokaler Infiltrate lokalisiert waren, konnte analog zu Vimentin bei DM und PM kein Zusammenhang mit der Reaktivität von TGF- $\beta$ 1 erkannt werden.

**Co-Lokalisation mit Tenascin:** Tenascin trat zwar nur zusammen mit Fibroblasten auf, war aber nicht in jeder fokalen Fibroblasten-Anhäufung vertreten. Bei 2 DM-Präparaten kam es bei

weniger als 5% der N-CAM-reaktiven Fasern zu einer Co-Lokalisation mit Tenascin, in einem Fall lag der Anteil im Bereich zwischen >5% und 50%. Bei der PM waren mehr als die Hälfte der N-CAM-positiven Fasern mit Tenascin co-lokalisiert.

**Co-Lokalisation mit Vimentin** (Abb. A.4f/g): Insgesamt kamen in allen Myositis-Präparaten mehr N-CAM-positive als Vimentin-positive Fasern vor. Im Bereich fokaler Infiltrate waren bei der DM zwischen >5% und 50% der (seltenen) N-CAM-positiven Fasern mit Vimentin-positiven Fasern identisch, bei der PM >95% der Fasern. Außerhalb von fokalen Akkumulationen nicht-parenchymaler Zellen zeigten in 2 DM-Präparaten zwischen >5% bis 50% der N-CAM-positiven Fasern zugleich Vimentin-Immunreaktivität, in einem DM-Präparat und bei der PM kam es ohne Anwesenheit von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten nicht zur Co-Lokalisation der beiden Proteine.

#### 4.2.5.3 *Amyotrophe Lateralsklerose*

Bis auf eine Ausnahme (eine fokale Ansammlung von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten, in deren Umgebung keine N-CAM-Reaktivität vorlag) waren alle N-CAM-positiven Fasern identisch mit Fasern, die Vimentin-Immunreaktivität zeigten (Abb. A.7f/g). Zur Co-Lokalisation dieser Fasern mit Infiltraten, basophilen Fasern und weiteren Wachstumsfaktoren s. Kap. 4.2.4.3.

### 4.3 ÜBERSICHT ÜBER VORKOMMEN UND AUSPRÄGUNG DER UNTERSUCHTEN PROTEINE UND DEREN CO-LOKALISATION

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verschiedenen Ausprägungsgrade der Wachstumsfaktoren bei den untersuchten Erkrankungen und über die Ausprägung der jeweiligen Co-Lokalisationen (Einzelheiten s. die vorhergehenden Abschnitte).

Um einen Überblick über die verschiedenen Ausprägungsgrade auch bei unterschiedlichen Patientenzahlen und teilweise nicht beurteilbaren Befunden zu erhalten, wurde den jeweiligen Ausprägungsgraden eine Ziffer zugeordnet (keine = 0, geringe = 1, mäßige = 2, starke = 3). Bei prozentualen Anteilen wurden Gruppen gebildet, innerhalb derer sich die jeweiligen Anteile befanden, und den Gruppen eine Ziffer zugeordnet ([0%] = 0; [>0-5%] = 1, [>5-50%] = 2, [>50%-95%] = 3; [>95%] = 4). Aus den bei jedem Präparat ermittelten Ziffern wurden Mittelwerte für das jeweilige Patientenkollektiv gebildet. Dieser Mittelwert wird hier durch die Anzahl der Plus-Zeichen repräsentiert. Für die Ausprägungsgrade entsprachen dabei: [0]: Minuszeichen; [0,01-0,49]: (+); [0,50-1,49]: +; [1,50-2,49]: + +; [2,50-3,00]: + + +. Für die prozentualen Anteile entsprachen [0]: Minuszeichen; [0,01-1,49]: (+); [1,50-2,49]: +; [2,50-3,49]: + +; [3,50-4,00]: + + +. Nicht beurteilbare Befunde wurden bei der Bildung des Mittelwerts nicht berücksichtigt, sodass diese sich im Ergebnis nicht störend auswirken konnten.

**Tabelle 4.1:** Übersicht über Vorkommen, Ausprägung und Co-Lokalisation der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine. DMD = Muskeldystrophie Duchenne, A = frühes Stadium (erhaltene Gewebearchitektur), B = fortgeschrittenes Stadium (zerstörte Gewebearchitektur), DM = Dermatomyositis, PM = Polymyositis, ALS = amyotrophe Lateralsklerose, N = Normalkollektiv, GF = Gesichtsfeld, A.v.F. = Akkumulationen von Fibroblasten.

	<i>DMD</i>		<i>DM</i>	<i>PM</i>	<i>ALS</i>	<i>N</i>
	<i>A</i>	<i>B</i>				
Fallzahl	11	6	3	1	3	16
<b><u>Fokale Akkumulationen von Fibroblasten:</u></b>						
Anzahl pro GF:	1 – 8	0– 4	1 – 7	5	1 – 3	-
Median	3	2	5	5	1	

(Fortsetzung nächste Seite)

Tabelle 4.1 (Fortsetzung):

	<i>DMD</i>		<i>DM</i>	<i>PM</i>	<i>ALS</i>	<i>N</i>
	<i>A</i>	<i>B</i>				
<b><u>Fokale Akkumulationen von Fibroblasten (Fortsetzung):</u></b>						
<u>Co-Lokalisation mit:</u>						
TGF-β1	+++		+++	+++	(+)	
Tenascin	++		++	+++	+++	
Vimentin	+++		(+)	++	+++	
N-CAM	+++		+	++	+++	
<b><u>TGF-β1:</u></b>						
Perimysial	+++	+++ <sup>(1)</sup>	++	++	++	+
Endomysial	+	+++ <sup>(1)</sup>	+	(+)	-	-
<u>Co-Lokalisation mit:</u>						
Fibrose	+++		+++	+++	+++ <sup>(2)</sup>	
Fibroblasten- Akkumulationen						
- perimysial	+++		+++	+++	+++	
- endomysial	+++		+++	+++	-	
Tenascin (in A.v.F.)	++		++	+++	-	
Vimentin (in A.v.F.)	+++		(+)	++	-	
N-CAM (in A.v.F.)	++		++	+++	-	
<b><u>Tenascin:</u></b>						
Anzahl der Foci pro GF:	3 – 14	0 - 7	5 - 11	5	2 - 3	-
Median	6	5	7	5	2	
Anzahl Fasern pro Focus:	1 – 24	2 - 62	2 - 45	3 - 11	1 - 5	
Median	3	7	7 <sup>(3)</sup>	10	2	
<u>Co-Lokalisation mit:</u>						
Fibroblasten- Akkumulationen	+++		+++	+++	+++	
TGF-β1						
- perimysial	+++		+++	+++	+++	
- endomysial	+++		+++	+++	-	
Vimentin	+++		(+)	+	+++	
N-CAM	+++		+	+	+++	

(Fortsetzung nächste Seite)

Tabelle 4.1 (Fortsetzung)

	<i>DMD</i>		<i>DM</i>	<i>PM</i>	<i>ALS</i>	<i>N</i>
	<i>A</i>	<i>B</i>				
<b><u>Vimentin:</u></b>						
Anteil Vimentin-pos. Fasern	+		(+)	(+)	(+)	-
<u>davon:</u> im Bereich fokaler Akkumulationen von Fibroblasten (A.v.F.)	++		++	+++	+++	
<u>Co-Lokalisation mit:</u>						
TGF-β1						
- innerhalb A.v.F.	+++		+++	+++	-	
- außerhalb A.v.F.	+		-	-	-	
Tenascin						
- innerhalb A.v.F.	++		(+)	++	+++	
- außerhalb A.v.F.	-		-	-	-	
N-CAM						
- innerhalb A.v.F.	+++		+++	+++	+++	
- außerhalb A.v.F.	++		+++	+++	+++	
<b><u>N-CAM:</u></b>						
Anteil N-CAM-pos. Fasern	+		(+)	(+)	(+)	(+)
<u>davon:</u> im Bereich von A.v.F.	++		+	++	+++	-
<u>Co-Lokalisation mit:</u>						
TGF-β1						
- innerhalb A.v.F.	+++		+++	+++	-	-
- außerhalb A.v.F.	+		-	-	-	-
Tenascin						
- innerhalb A.v.F.	++		(+)	++	+++	-
- außerhalb A.v.F.	-		-	-	-	-
Vimentin						
- innerhalb A.v.F.	+++		+	+++	+++	-
- außerhalb A.v.F.	++		(+)	-	-	-

<sup>(1)</sup> zwischen peri- und endomysial konnte hier nicht unterschieden werden

<sup>(2)</sup> bei der ALS kam es nur zu einer sehr geringen Fibrosebildung

<sup>(3)</sup> Die Foci bildeten konfluierende Netzwerke mit fließenden Grenzen aus

## 5 DISKUSSION

### 5.1 BINDEGEWEBSPROLIFERATION BEI ERKRANKUNGEN DES SKELETTMUSKELS

In der vorliegenden Arbeit wurden Skelettmuskelbiopsien von Patienten mit dystrophischen und entzündlichen Myopathien untersucht, bei denen jeweils unterschiedlich ausgeprägte Formen der Bindegewebsproliferation festgestellt werden konnten. Bei der DMD zeigte sich erwartungsgemäß eine Zunahme der Fibrose mit Progression der Erkrankung.

Die Bindegewebsproliferation wird übereinstimmend als Folge der Degeneration des Muskelgewebes betrachtet. Durch die zunehmende fibrotische Umwandlung kommt es demnach zu irreversiblen Veränderungen in der Organisation des Muskelgewebes, was die ursprüngliche Balance zwischen De- und Regeneration im Verlauf der Dystrophie weiter zugunsten der Degeneration verändert [Engel et al. 1994; Dubowitz 1985]. Insbesondere in den fortgeschrittenen Stadien, in denen es zur regelrechten Ummauerung der Muskelfasern und damit zur Isolation von der Blutversorgung kommt, soll die Fibrosierung des Gewebes die Ernährung der Muskelfasern verhindern. Klinisch kommt es in diesem Stadium zur Ausbildung von Muskelkontrakturen [Engel et al. 1994]. Auch bei anderen Erkrankungen wie z.B. der Glomerulonephritis, der idiopathischen Lungenfibrose, der Sklerodermie oder der Leberzirrhose, die in der vorliegenden Arbeit als Vergleichspräparat herangezogen wurde, kommt es zur Bindegewebsproliferation und mit zunehmendem Ausmaß der Fibrose zur Irreversibilität der Erkrankungen. Man geht davon aus, dass bei all diesen Erkrankungen eine fokale Freisetzung von Zytokinen wie Transforming Growth Factor Beta-1 (TGF- $\beta$ 1) zur Kollagensynthese und zur Proliferation von Fibroblasten führt [Kovacs 1991]. Auch andere Zytokine, wie beispielsweise Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Tumornekrosefaktor (TNF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Interleukin-1 (IL-1), sind nachweislich in die Entstehung der Fibrose verwickelt, wobei ein synergistisches oder koordiniertes Zusammenspiel dieser Zytokine vermutet wird [Bernasconi et al. 1995]. In zahlreichen in-vitro-Untersuchungen reichten schon geringe Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 für einen starken chemotaktischen Effekt auf neutrophile Granulozyten, T-Zellen, Monozyten und Fibroblasten aus, welche daraufhin aktiviert werden und selbst TGF- $\beta$ 1, bFGF, TNF und IL-1 produzieren [Wahl et al. 1987; Postlethwaite et al. 1987; Kim et al. 1992; Husmann et al. 1996].

## 5.2 TGF- $\beta$ 1

### 5.2.1 DIE BEDEUTUNG VON TGF- $\beta$ 1 BEI DER BINDEGEWEBSPROLIFERATION

TGF- $\beta$ 1 wird allgemein als der am stärksten in die Fibrosebildung involvierte Wachstumsfaktor angesehen [Border et al. 1994; Massag e et al. 1994; Davidson, 1992]. Aus diesem Grunde wurde das Vorkommen des Proteins im Zusammenhang mit Bindegewebsproliferation in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. In normaler Skelettmuskulatur (und bei der ALS) kam TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität im perimysialen Bindegewebe, in perivaskulärer Extrazellulärmatrix (EZM) und in Nervenfasern vor. Bei sämtlichen Präparaten der vorgenannten Myopathien bestand eine enge Korrelation der Reaktivität von TGF- $\beta$ 1 mit dem Vorhandensein von Bindegewebe. In allen untersuchten Präparaten fand sich stets eine diffuse Reaktivität. Zelluläre Reaktionen wie das fokale Auftreten von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten sowie regenerative Prozesse konnten aufgrund der hier untersuchten morphologischen Kriterien nicht auf das Vorhandensein des Wachstumsfaktors zurückgeführt werden. Bei einem zum Vergleich mituntersuchten Präparat einer zirrhotischen Leber konnte das Protein ebenfalls in fibrotischen Arealen festgestellt werden, eine erhöhte Aktivität fand sich hier vorwiegend im Bereich aktiver Umbauzonen im Übergangsbereich von Parenchym und Bindegewebe.

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene enge Korrelation zwischen Fibrose und TGF- $\beta$ 1 in myopathisch verändertem Muskel wurde ebenfalls in anderen Arbeiten beschrieben [Bernasconi et al. 1995; Yamazaki et al. 1994]. Bei der DMD lagen in der Arbeit von Bernasconi et al. signifikante Mengenunterschiede im Vergleich zu Normalkollektiv und spinaler Muskelatrophie SMA vor (bei der SMA kommt es wie bei der ALS zu einer neurogenen Atrophie des Skelettmuskels). Auch für die PM und die DM konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 mit dem Auftreten von Fibrose korreliert [Confalonieri et al. 1997]. Ein enger Zusammenhang zwischen Fibrose und der Reaktivität des Wachstumsfaktors besteht auch bei den so genannten congenitalen Muskeldystrophien. Die quantitative Menge an TGF- $\beta$ 1 ist dort aber geringer als bei der DMD, obwohl das Ausmaß der Fibrose stärker ist [Bernasconi et al. 1999].

TGF- $\beta$ 1 alleine soll nach einer Arbeit von Roberts et al. [1990] ausreichen, um zu einer Vermehrung extrazellulärer Matrixkomponenten zu führen. Nach Husmann et al. [1996] besteht die eigentliche biologische Aufgabe von TGF- $\beta$  in der Reorganisation von Basalmembranen und EZM während der Regeneration eines Gewebes. Bei der DMD und bei entzündlichen Muskelerkrankungen soll es durch st ndige pathologische Neuanregung dieser biologischen Aufgabe zur dauerhaften Hochregulation von TGF- $\beta$ 1 kommen. Als Ursache werden hierbei Membranschäden diskutiert, die bei der DMD durch das Fehlen des membranstabilisierenden

Proteins Dystrophin und bei DM und PM z.B. durch oxidative Prozesse ausgelöst werden sollen. Die aufgrund dieser Prozesse bleibende Hochregulation von TGF- $\beta$ 1 wird schließlich als Triebfeder der Gewebsfibrose angesehen. Der bereits oben erwähnte chemotaktische Effekt auf zahlreiche Zellen der B- und T-Zell-Linie sowie auf Fibroblasten *in vitro* legt zusätzlich einen Zusammenhang zwischen der Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 und dem Auftreten dieser Zellen nahe.

Die enge Verbindung zwischen dem Auftreten des Wachstumsfaktors und der Vermehrung von EZM-Material führten zu der Annahme, dass Fibroblasten bzw. Fibrozyten, die als Hauptproduzenten extrazellulärer Substanzen gelten, für die Synthese von TGF- $\beta$ 1 mitverantwortlich sein könnten. Durch die Färbereaktion gegen Fibroblasten/ Fibrozyten konnte diese Subpopulation auch in der vorliegenden Arbeit als ein Bestandteil sämtlicher fokaler Zell-Akkumulationen in den untersuchten Erkrankungen sichtbar gemacht werden.

TGF- $\beta$ 1 trat bei der DMD und den Myositiden immer im Zusammenhang mit der fokalen Akkumulation von Fibroblasten und mononukleären Zellen auf, was die Vermutung eines Zusammenhanges zwischen dem Vorkommen des Wachstumsfaktors und dem fokalen Auftreten dieser Zellen nahelegt. Allerdings konnte das Vorkommen von TGF- $\beta$ 1 auch innerhalb fokaler Akkumulationen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten nur im Zusammenhang mit der Proliferation von Bindegewebe beobachtet werden. Ein nach morphologischen Kriterien eindeutiger Anhalt für eine Induktion der Infiltrate durch TGF- $\beta$ 1 bzw. umgekehrt für die Synthese des Zytokins durch Fibroblasten *in vivo* konnte somit nicht festgestellt werden. Die Tatsache, dass die in wenigen Schnittpräparaten erkennbaren direkt in Muskelfasern invadierenden Fibroblasten keine TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität aufwiesen, spricht sogar eher gegen diese Annahme. Zu diesem Ergebnis kamen auch Confalonieri et al. [1997] bei der Untersuchung von TGF- $\beta$ 1 bei der DM und PM. Bezüglich der DMD wurde in der gesichteten Literatur bislang noch keine Meinung geäußert. Für die Möglichkeit einer Synthese des Wachstumsfaktors durch die Muskelfasern selbst konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit wie auch in der gesichteten Literatur kein Anhalt gefunden werden.

Beleuchtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der angeführten Literatur unter dem Aspekt, dass es sich bei TGF- $\beta$ 1 um den bedeutendsten Fibroseinduktor handeln soll, so muß zusammenfassend festgestellt werden, dass dem Protein aufgrund der *in vitro* nachgewiesenen Effekte bei der Proliferation von Extrazellulärmatrix sicherlich eine entscheidende Rolle zukommt. Allerdings gibt es mehrere Anhaltspunkte, die dafür sprechen, dass die Bedeutung des Wachstumsfaktors möglicherweise bislang zu hoch eingeschätzt wurde. Auch die Tatsache, dass zur Darstellung des Proteins eine Verstärkungsreaktion benötigt wurde, läßt Zweifel zumindest an der quantitativen Bedeutung von TGF- $\beta$ 1 aufkommen. Einschränkend muss hier jedoch festgestellt werden, dass eine sichere Quantifizierung mit den in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methoden nicht möglich ist. In der oben erwähnten Arbeit von Bernasconi et al. [1995] wurde hingegen eine Quantifizierung von TGF- $\beta$ 1-mRNA

mittels Q-PCR-Technik bei der DMD vorgenommen. In jener Arbeit wurde eine Abnahme des TGF- $\beta$ 1-Wertes mit zunehmendem Bindegewebsanteil im Gewebe bei zunehmendem Alter der Patienten gefunden. Höchstwerte an TGF- $\beta$ 1 traten im Muskelgewebe von DMD-Patienten im Alter zwischen 2 und 6 Jahren auf. Auch wenn der Verdacht in jener Arbeit nicht geäußert wurde, so wäre aufgrund dieser Ergebnisse denkbar, dass die Synthese des Wachstumsfaktors mit zunehmender Bindegewebsproliferation nachlässt. Möglicherweise spielt das Protein nur in der aktiven Phase der Fibroseentwicklung eine Rolle. Hierfür sprechen die Befunde bei der Leberzirrhose, wo sich TGF- $\beta$ 1 zwar im gesamten Bindegewebe, verstärkt aber in den aktiven Übergangszonen zwischen Parenchym und Bindegewebe nachweisen ließ. Bei inaktiven bzw. "ausgebrannten" Zirrhosen verlagert sich die Aktivität von TGF- $\beta$ 1 dann zunehmend in den Randbereich der Fibrosestraßen, wo vermutlich noch aktive Fibrogenese stattfindet [Nagy et al. 1991]. Das zuvor erwähnte geringere Vorkommen von TGF- $\beta$ 1 bei den congenitalen Dystrophien trotz stärkerem Ausmaß der Fibrose lässt ebenfalls darauf schließen, dass TGF- $\beta$ 1 bei der Bildung der Fibrose, im fortgeschrittenem Erkrankungsstadium aber keine ausschlaggebende Rolle mehr spielen könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen mit Bernasconis Arbeit insoweit in Widerspruch, dass die Immunreaktivität von TGF- $\beta$ 1 in dieser Arbeit bei fortschreitender Erkrankung und zunehmender Fibrosebildung gleichermaßen zunahm. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich jedoch miteinander vereinbaren, wenn man in Betracht zieht, dass durch die PCR eine Momentaufnahme der augenblicklichen Syntheseleistung erstellt, die Menge an gebundenem TGF- $\beta$ 1 aber nicht erfasst wird. Zirkulierendes TGF- $\beta$ 1 hat zwar nur eine Halbwertszeit von wenigen Minuten [Coffey et al. 1987], es kann aber in der interstitiellen Matrix akkumulieren [Thompson et al. 1989]. Es besteht eine Bindung hoher Affinität zu Betaglycan, dem Kernprotein des Proteoglycans, die in der Lage ist, TGF- $\beta$ 1 vor dem Abbau zu schützen. Dieser Bindung wurde auch die Funktion eines verzögerten Freisetzungsmechanismus oder eines Langzeitreservoirs zugeschrieben [Andres et al. 1989, Massagué 1990]. Als weiterer Faktor muss berücksichtigt werden, dass die Gesamtmenge an Zellen, die zur Synthese von TGF- $\beta$ 1 fähig wären, in fortgeschrittenen Stadien relativ rückgängig ist, da ein Großteil des Gewebes durch Binde- und Fettgewebe ersetzt wird und somit Proben identischer Größe oder identischen Gewichts bei der PCR an Vergleichbarkeit einbüßen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper ist gegen eine Aminosäuresequenz im C-terminalen Bereich von TGF- $\beta$ 1 gerichtet, welche sowohl in der latenten und gebundenen Form des Proteins, als auch im bioaktiven Dimer enthalten ist [Massagué 1990]. Daher ist nicht auszuschließen, dass es sich bei dem in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen TGF- $\beta$ 1 in fortgeschrittenen Stadien der DMD um an Betaglycan und andere Matrixkomponenten gebundenes Protein handeln könnte. Ob und inwieweit dieses im Gewebe gebundene TGF- $\beta$ 1 wiederum Einfluss auf die weitere Bindegewebsproliferation bzw.

auf die Einwanderung von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten nehmen kann, wäre noch zu klären.

Der Verdacht, dass die Degeneration der Skelettmuskulatur im dystrophischen Prozess der DMD bei der Synthese von TGF- $\beta$ 1 eine entscheidende Rolle spielen könnte, wurde bislang auch durch Untersuchungen an MDX-Mäusen gestützt. Bei diesen Dystrophin-defizienten Mutanten kommt es zwar zum Untergang von Muskelfasern, die extensive Proliferation des Bindegewebes, wie sie bei der DMD der Fall ist, unterbleibt jedoch. Dies hat zu der These geführt, dass Fibrosebildung keine unbedingte Folge der Faserdegeneration sein muss und dass vermutlich Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle im zweiten fibrotisch-degenerativen Stadium der DMD spielen [DiMario et al. 1989; Iannaccone et al. 1995]. Es gibt noch weitere Tiermodelle, z.B. die Dystrophin-defiziente Katze, bei der es ebenfalls nicht zur Ausbildung einer Fibrose kommt [Carpenter et al. 1989]. Bei Dystrophin-defizienten Hunden hingegen verläuft die Erkrankung wie beim Menschen [Kornegay et al. 1988]. Von all diesen Tieren sind die Mäuse bislang am besten untersucht. Es hat sich gezeigt, dass in der Skelettmuskulatur von MDX-Mäusen ab der 7. Woche zahlreiche nekrotische und hyperkontrahierte Fasern sowie Phagozytose-Phänomene vorkamen, also ähnliche Befunde, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit bei der DMD erhoben wurden. Im Vergleich fortgeschrittener Stadien mit früheren Krankheitsstadien konnte bei der DMD eine Zunahme degenerativer Zeichen wie Fibrose, Faserabrundungen, Kalibervariationen, Einzelfaseratrophie, hypertrophe und hyperkontrahierte opake Fasern beobachtet werden; regenerative basophile Fasern nahmen in ihrer Häufigkeit ab. Untersuchungen an MDX-Mäusen zeigten hingegen eine stetige Zunahme basophiler regenerierender Fasern und nur eine geringe Zunahme der Fibrose. Ab der 20. Woche konnten bei den Mäusen praktisch nur noch regenerative Phänomene beobachtet werden. TGF- $\beta$ 1 kommt bei MDX-Mäusen im Vergleich zu gesunden Mäusen nicht vermehrt vor und korreliert auch im Tiermodell mit dem Ausmaß der (nicht vorhandenen) Fibrose [Iannaccone et al. 1995]. Die Tatsache, dass TGF- $\beta$ 1 beim Menschen vermehrt im Extrazellulärraum synthetisiert wird, hoch reguliert bleibt und womöglich durch Induktion der Fibrosebildung eine Verschiebung der Balance zwischen De- und Regeneration bewirkt, wäre ein Erklärungsmodell, um den Unterschied zwischen DMD und MDX-Maus erklären. Mensch und MDX-Maus unterscheiden sich nach diesem Modell somit vorwiegend durch die Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1, während sich die Faserdegeneration - bedingt durch den Dystrophinmangel - im Wesentlichen gleicht.

## 5.2.2 TGF- $\beta$ 1 IM ZUSAMMENSPIEL MIT ANDEREN WACHSTUMSFAKTOREN UND STRUKTURPROTEINEN

Da TGF- $\beta$  in vitro neben anderen Proteinen in der Lage ist, die Synthese von Tenascin zu induzieren [Pearson et al. 1993; Chimal-Monroy et al. 1999], lag es im Interesse dieser Arbeit, mögliche Co-Lokalisationen im Serienschnitt zu ermitteln. Dies hätte zur Klärung der Frage beitragen können, ob TGF- $\beta$ 1 auch in vivo zur Synthese anderer Proteine beiträgt. Tenascin-Aktivität fand sich bei allen untersuchten Erkrankungen im Bereich von fokalen Ansammlungen nicht-parenchymaler Zellen, unter denen stets Fibroblasten identifiziert werden konnten. Typischerweise ließ sich das Molekül nie in sämtlichen dieser Ansammlungen nachweisen. Zwischen den verschiedenen Erkrankungen gab es zudem unterschiedliche Ausprägungsmuster.

TGF- $\beta$ 1 kam bei der DMD, der DM und der PM praktisch immer im Zusammenhang mit dem fokalen Auftreten von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten vor. Es fand sich aber auch an allen anderen Stellen im Gewebe, die durch eine vermehrte Bindegewebsbildung auffielen. Hierdurch kam es zwangsläufig zu einer gelegentlichen Co-Lokalisation von TGF- $\beta$ 1 und Tenascin. Für einen Zusammenhang zwischen dem gemeinsamen Vorkommen der beiden Proteine ergaben sich jedoch nach morphologischen lichtmikroskopischen Kriterien keinerlei Hinweise. Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit belegen lediglich einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Bindegewebe und dem Auftreten von TGF- $\beta$ 1.

Es wäre dennoch denkbar, dass Tenascin im Rahmen z.B. von Abräumreaktionen mit der Invasion von mononukleären Zellen und der Vermehrung von Fibroblasten durch die Bildung von TGF- $\beta$ 1 induziert, nach einer gewissen Zeit aber wieder abgebaut wird. TGF- $\beta$ 1 hingegen könnte bei denjenigen Erkrankungen, die mit Fibrosebildung einhergehen, hochreguliert werden und dann z.B. an Betaglycan gebunden auch in Regionen nachweisbar bleiben, aus denen sich die Aktivität der freien Zellen und der Fibroblasten mittlerweile verlagert hat. Dies würde erklären, warum es bei DMD, DM und PM nur im Zusammenhang mit fokalen Ansammlungen von Fibroblasten zur Co-Lokalisation mit Tenascin kommt und dies wiederum nicht in jeder Ansammlung.

Auch wenn in-vitro-Untersuchungen die Induktion von Tenascin durch TGF- $\beta$ 1 nahe legen, darf man jedoch nicht aus den Augen verlieren, dass die Induktion von Tenascin in vivo völlig unabhängig von TGF- $\beta$ 1 ablaufen könnte und dem Wachstumsfaktor somit insgesamt keine so entscheidende Rolle zukäme – weder bei der Fibroseinduktion, noch bei der Induktion von Tenascin. Der in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte Nachweis von Tenascin ohne gleichzeitigen Nachweis von TGF- $\beta$ 1-Immunreaktivität bei den hier verwendeten 3 ALS-Präparaten würde diese Aussage unterstreichen. Zudem wurde beschrieben, dass Tenascin auch von einer Reihe weiterer Zytokine wie bFGF, Aktivin, TNF- $\alpha$ , PDGF, IL-1 und IL-4 induziert

werden kann [Mackie 1998; Tucker et al. 1993; Umbhauer et al. 1992; Rettig et al. 1994; Mackie et al. 1992; McCachren et al. 1992].

Da - wie bereits oben erwähnt - in-vitro-Untersuchungen zu dem Ergebnis kamen, dass TGF- $\beta$ 1 in dystrophischen und entzündlichen Prozessen von vorhandenen freien Zellen und Fibroblasten synthetisiert werden könnte, wäre auch denkbar, dass diese bei der ALS nicht oder nur vorübergehend zur Synthese des Zytokins angeregt werden oder dass TGF- $\beta$ 1 bei der ALS nicht oder nur wenig aktiviert wird. Um das in inaktiver Form sezernierte Molekül zu aktivieren, müssen bestimmte Bedingungen vorherrschen wie ein niedriger pH-Wert und die Freisetzung von Proteasen und Syalidasen [Jullien et al. 1989]. Zudem legen die unterschiedlichen Ätiologien der Erkrankungen eine unterschiedliche Organisation und verschiedene Aufgaben der freien Zellen und der Fibroblasten nahe: Bei der ALS handelt es sich vorwiegend um vereinzelte Abräumreaktionen, während bei der DM und der PM überwiegend entzündliche Infiltrate im Rahmen von Autoimmun-Prozessen vorliegen. Bei der DMD spielen ebenfalls Abräumvorgänge und über Mediatoren vermittelte Infiltrate eine Rolle, daneben sind lymphohistiozytäre Zellen und Fibroblasten aber auch in Vorgänge wie in die Fibrosebildung und in regenerative Vorgänge verwickelt. Als Erklärungsmodell für die kaum nachweisbare Reaktivität von TGF- $\beta$ 1 im Rahmen fokaler Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten bei der ALS wäre somit denkbar, dass bei DMD, DM und PM unterschiedliche Zellpopulationen bzw. Zellen mit unterschiedlichen molekularen Charakteristiken TGF- $\beta$ 1 synthetisieren. Hinweisend hierfür wäre zum einen, dass sich die genannten Ansammlungen in der vorliegenden Arbeit bereits unter konventionellen lichtmikroskopischen Bedingungen in Größe und Anzahl deutlich von Erkrankung zu Erkrankung unterschieden; zum anderen wurden bei den verschiedenen Krankheiten - mit Ausnahme der Fibroblasten - völlig heterogene Zellpopulationen als Substrat der Zellansammlungen beschrieben (Näheres im Kapitel 5.3.2). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Synthese von TGF- $\beta$ 1 bei der ALS durch andere Faktoren gehemmt wird, die bei DMD und DM / PM nicht auftreten.

Geht man also davon aus, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von freien Zellen und Fibroblasten und der Synthese von TGF- $\beta$ 1 gäbe und dass auch eine Induktion von Tenascin im Rahmen dieses Zusammenspiels zustande käme, so kann es sich hierbei kaum um ein uniformes Geschehen handeln. Zusammenfassend gibt es im Zusammenspiel von TGF- $\beta$ 1 und Tenascin zwei Möglichkeiten: Entweder findet eine Induktion nur in vitro statt, oder es handelt sich um einen mehrarmigen Regulationsmechanismus, der allerdings auch ohne das Auftreten von TGF- $\beta$ 1 stattfinden kann.

Ähnliches gilt für die Regenerationsmarker Vimentin und N-CAM, die regelmäßig innerhalb von Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten nachzuweisen waren. Mit Ausnahme der ALS und der Normalbefunde fanden sich in allen Biopsien einzelne oder seltener

auch gruppierte Fasern, die Vimentin, N-CAM oder beides gleichzeitig synthetisieren, ohne dass es - verglichen mit umgebenden unauffälligen Fasern - zu Veränderungen im Auftreten von TGF- $\beta$ 1 gekommen wäre. Ein direkter oder indirekter Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Synthese der beiden Proteine kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, da entsprechende Fasern nur bei denjenigen Erkrankungen unabhängig von Fibroblasten und freien Zellen auftraten, bei denen gleichzeitig eine endomysiale Reaktivität des Zytokins nachweisbar war (DMD, DM und PM), - was bei der ALS nicht der Fall war. In der gesichteten Literatur gibt es allerdings bisher keine Hinweise auf entsprechende Zusammenhänge.

Insgesamt ist am ehesten davon auszugehen, dass die Bedeutung von TGF- $\beta$ 1 bei der Induktion von Tenascin und dem Einfluss auf regenerative Prozesse überschätzt wurde. Bei der Fibrosebildung ist eine nicht unerhebliche Rolle a.e. zu Beginn der Fibrogenese anzunehmen.

### 5.3 TENASCIN

#### 5.3.1 DAS AUFTRETEN UND DIE ROLLE VON TENASCIN IN PATHOLOGISCH VERÄNDERTER SKELETTMUSKULATUR

Tenascin-Immunreaktivität wurde in der vorliegenden Arbeit bei allen untersuchten Erkrankungen fokal endomysial und seltener auch perimysial lokalisiert nachgewiesen. Bei DMD, PM und ALS fand sich stets ein Zusammenhang mit dem fokalen Auftreten von Fibroblasten. Die Anzahl der Foci wie auch die Anzahl der von Tenascin-Reaktivität umgebenen Fasern schwankte zwischen den einzelnen Präparaten bzw. innerhalb der jeweiligen Präparate stark. Bei DMD-Präparaten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium waren im Mittel weniger Foci, dabei jedoch signifikant mehr betroffene Fasern pro Focus zu erkennen als bei denjenigen Präparaten, in denen der normale Aufbau der Gewebearchitektur erhalten war. Bei den hier verwendeten 3 Fällen der ALS traten die Foci insgesamt seltener auf als bei den anderen untersuchten Erkrankungen und es waren stets nur wenige (niemals mehr als 5) Fasern innerhalb eines Focus betroffen. Auch bei den 4 DM-Präparaten konnten im Bereich der Foci Fibroblasten beobachtet werden. Bei dieser Erkrankung bildete Tenascin konfluierende Netzwerke aus, die sich auf größere Areale ausdehnten. Die Anzahl betroffener Fasern unterschied sich von den entsprechenden Werten bei der DMD und der ALS, wobei kritisch zu beachten ist, dass in den Kontrollgruppen DM, PM und ALS nur sehr geringe Fallzahlen vorlagen. Eine enge Korrelation der Reaktivität des Wachstumsfaktors mit dem perifaszikulären Muster der Faseratrophie konnte bei der DM nicht festgestellt werden. Tenascin kam bei DMD, DM und PM sowohl in fibrotischen als auch in nicht-fibrotischen Arealen vor. In normaler Skelettmuskulatur hingegen fand sich eine Immunlokalisation des Proteins lediglich in

Gefäßwänden, Nerven und Sehnenansätzen. Eine endomysiale Reaktivität wurde im Normalkollektiv niemals beobachtet und kann somit als pathologisch gewertet werden.

Das Auftreten von Tenascin bei der DMD wurde bereits von Settles et al. [1996] beschrieben, der allerdings nicht näher auf das Reaktivitätsmuster einging. Gullberg et al. [1997] nahmen eine Untersuchung an 3 DMD-Präparaten vor, bei denen eine fokale Tenascin-Reaktivität in Arealen mit beginnender Faserregeneration, aber auch in Bereichen, die reife Muskelfasern enthielten, auftrat. Als wesentliches Ergebnis jener Untersuchung wurde eine 100%-ige Korrelation mit der Invasion von Makrophagen bei der DMD und der PM (DM und ALS wurden nicht untersucht) festgestellt, was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (bei einer größeren Fallzahl) vereinbaren ließe. Die in der dieser Arbeit beobachteten Reaktivitätsmuster bei der DM und PM wurden bereits in einer übereinstimmenden Untersuchung unserer Arbeitsgruppe beschrieben [Müller-Felber et al. 1998]. Über das Vorkommen von Tenascin bei der ALS wurde in der gesichteten Literatur bisher nichts veröffentlicht. Als Näherungsmodell zur ALS lassen sich Studien über den experimentell denervierten Skelettmuskel anführen, wo eine Assoziation zwischen der gesteigerten Proliferation von Fibroblasten an der neuromuskulären Junktion und der Synthese von Tenascin nachgewiesen werden konnte [Gatchalian et al. 1989; Weis et al. 1991].

Über die genaue pathophysiologische Rolle von Tenascin gibt es bisher noch keine Klarheit. Die meisten Autoren schreiben dem Protein eine Rolle bei regenerativen Prozessen zu, etwa bei der Wundheilung [Murakami et al. 1989] oder nach Reinnervation des Skelettmuskels [Martini et al. 1991; Tews et al. 1997]. Allerdings hat sich gezeigt, dass bei Tenascin-defizienten Mäusemutanten keine Abnormitäten in der Wundheilung vorkommen [Saga et al. 1992]. Dennoch ist anzunehmen, dass Tenascin eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Erkrankungen hat, wobei das Matrixprotein eine Rolle bei der Aufrechterhaltung mechanischer Stabilität, Reinnervation und Proliferation des Muskelgewebes spielen dürfte [Chiquet-Ehrismann 1995]. Andere gehen von einer Involvierung des Moleküls in die Fibrosebildung aus [Gullberg et al. 1997]; die fehlende Fibrosebildung bei MDX-Mäusen bei reichlich vorhandenem Tenascin spricht allerdings gegen diese Annahme (s.u.).

### 5.3.2 UNTER WELCHEN BEDINGUNGEN KOMMT ES ZUM AUFTRETEN VON TENASCIN?

Das Auftreten von Tenascin ist wahrscheinlich ein temporäres Phänomen. So kommt es nach Denervierung zu einem vermehrten Vorkommen des Matrixproteins im Rattenmuskel, das nach der 6. Woche wieder abklingt [Tews et al. 1997]. Auch bei MDX-Mäusen nimmt die von der 3. Woche an zunehmende Tenascin-Reaktivität in der Muskulatur ab der 10. Woche wieder ab, bis ab der 12. Woche nur noch wenige regenerierende Fasern betroffen sind [Settles et al. 1996].

Das zeitlich begrenzte Vorkommen von Tenascin wäre eine Erklärung dafür, dass die Immunlokalisation des Proteins in der vorliegenden Arbeit bei der DMD und der PM nicht in jeder fokalen Ansammlung von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten zu erkennen war und dass auch die Ausprägung (erkennbar an der Anzahl betroffener Fasern pro Focus) zwischen den einzelnen Foci selbst innerhalb eines einzelnen Präparats stark schwanken konnte. Umgekehrt könnte es natürlich auch sein, dass das Protein grundsätzlich nicht in der Umgebung jeder fokalen Ansammlung von Fibroblasten und freien Zellen vorkommen muss. Bei der DMD scheint es nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit so zu sein, dass die Anzahl der Foci bei fortschreitender Erkrankung abnimmt, die Anzahl der Fasern, die sich innerhalb der Foci befinden, jedoch zunimmt.

Die Tatsache, dass Tenascin bei DMD, PM und ALS stets in der Umgebung von Fibroblasten vorkam, lässt vermuten, dass die fokalen Ansammlungen dieser Zellen als Keimzentren der Tenascin-Foci fungieren. Als mögliche Induktoren einer vermehrten Synthese des Matrixproteins werden TGF- $\beta$ 1, bFGF, Aktivin, TNF- $\alpha$ , PDGF, IL-1 und IL-4 beschrieben (s. Kap. 5.2.2). Aktivierte Makrophagen und T-Zellen sind in der Lage, die meisten dieser Zytokine zu bilden. Bei entzündlichen Muskelerkrankungen konnte zudem gezeigt werden, dass in Muskelfasern, die entzündlichen Infiltraten benachbart sind, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  hochreguliert werden [Tews et al. 1996]. Aufgrund dieser bekannten Zusammenhänge und der Tatsache, dass Tenascin bei DMD, BMD (Becker-Kiener'sche Muskeldystrophie) und PM immer zusammen mit der Invasion von Makrophagen auftritt, kamen Gullberg et al. zu dem Schluss, dass Tenascin bei den genannten Erkrankungen als Reaktion auf die durch Entzündungszellen freigesetzten Zytokine von Fibroblasten synthetisiert wird [Gullberg et al. 1997]. Bei der BMD handelt es sich um eine Variante der DMD mit gegenüber der Norm reduziertem Dystrophin. Als weitere Bestandteile der Zellansammlungen werden in anderen Arbeiten bei der DMD aktivierte T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen beschrieben [McDouall et al. 1990; Arahata et al. 1984; Mantegazza et al. 1993, 1994]. Bei der DM wurden als Zusammensetzung der Infiltrate vor allem B-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen beobachtet; die Infiltrate bei der PM hingegen bestehen vor allem aus CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen [Engel et al. 1994; Dalakas et al. 1995; Hohlfeld et al. 1994; Orimo et al. 1994]. Bei der ALS werden Leukozyten-Ansammlungen überwiegend aus aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und Makrophagen gebildet; CD8<sup>+</sup> Suppressor- bzw. zytotoxische Zellen werden hier nur selten beobachtet [Troost et al. 1992]. Betrachtet man die anderen Subpopulationen in fokalen Zellanhäufungen, so ist die Tenascin-Reaktivität bei der DMD zu 90% mit der Invasion von T-Zellen assoziiert, kaum jedoch bei der PM und DM, weshalb Fibroblasten als Syntheseort des Matrixproteins favorisiert werden. Diese These wird dadurch untermauert, dass eine Akkumulation von Tenascin in traumatisiertem Skelettmuskel noch vor der Aktivierung von Satellitenzellen schon am 2. Tag nach dem ursprünglichen Verletzungsereignis in der

Umgebung proliferierender Fibroblasten eintritt [Hurme et al. 1992]. Umgekehrt gibt es Hinweise darauf, dass die Synthese von Tenascin einer Invasion mononukleärer Zellen vorausgeht. Zu diesem Ergebnis kam unsere Arbeitsgruppe, da bei der Untersuchung von DM-Biopsien in mehr als zwei Dritteln der Fälle kein Zusammenhang mit dem Auftreten von CD4+ oder CD3+ T-Zellen gefunden wurde [Müller-Felber et al. 1998].

Durch die Färbereaktion mit Antikörpern gegen Fibroblasten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass bei der DM ebenfalls eine Assoziation zwischen dem Nachweis von Tenascin und dem Auftreten von Fibroblasten besteht, wobei diese bei der DM vorwiegend diffus über das Gewebe verteilt sind und nur gelegentlich zu größeren Zell-Konglomeraten akkumulieren. Geht man davon aus, dass Fibroblasten in der Lage sind, Tenascin zu synthetisieren, so wäre deren diffuse Verteilung ein Erklärungsmodell für die konfluierenden Netzwerke bei der DM. Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass auch bei der DMD eine diffuse Verteilung der Fibroblasten vorliegt, es aber nicht zur Ausbildung derartiger Netzwerke kommt. Hier konzentrieren sich die Tenascin-Foci überwiegend auf die Stellen, an denen mononukleäre Zellen und Fibroblasten akkumulieren. Man kann also davon ausgehen, dass man es bei DMD und DM wahrscheinlich mit unterschiedlichen Aktivierungs-Mechanismen zu tun hat. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Tenascin auch unabhängig von der Anwesenheit von freien Zellen und / oder von Fibroblasten synthetisiert werden kann, sofern Bedingungen vorherrschen, in denen die oben erwähnten Aktivatoren im Gewebe vorkommen. Dies wäre beispielsweise in einer Stressreaktion auf Ischämie der Fall, wie sie bei der DM als Folge der zugrundeliegenden Angiopathie postuliert wird [Banker 1975; Müller-Felber et al. 1998].

### 5.3.3 DIE BEDEUTUNG VON TENASCIN BEI DER REGENERATION DES SKELETTMUSKELS

Zur Beurteilung der Rolle von Tenascin bei der Regeneration des Skelettmuskels wurde in der vorliegenden Arbeit die Co-Lokalisation des Wachstumsfaktors mit regenerativen Fasern untersucht. Diese lassen sich durch die beiden Regenerationsmarker Vimentin und N-CAM identifizieren. Im HE-Präparat handelt es sich bei regenerierenden Muskelfasern um Fasern, die ein basophiles Zytoplasma und häufig zentral liegende Kerne aufweisen. Beim Vergleich der Befunde zeigten sich hierbei Unterschiede zwischen den verschiedenen Erkrankungen: Bei der DMD kamen in allen Tenascin-Foci Fasern vor, die Vimentin-Immunreaktivität zeigten. In über  $\frac{3}{4}$  der Präparate kamen in allen Foci auch N-CAM-reaktive Fasern vor, wobei es sich oftmals um gruppierte Faserverbände handelte, die in großer Übereinstimmung gleichzeitig Immunreaktivität für Vimentin und N-CAM zeigten. Einige dieser Fasern ließen sich im HE-Präparat als basophile Fasern mit zentral gelegenen Kernen identifizieren. Bei den hier

verwendeten 3 ALS-Präparaten waren in allen Foci Einzelfasern auszumachen, die gleichzeitig Vimentin- und N-CAM-Immunreaktivität zeigten. Fasergruppen kamen nur selten vor, basophile Fasern wurden nicht identifiziert. Bei den 4 Fällen der DM hingegen kam es innerhalb der Foci fast nie zur Co-Lokalisation mit Vimentin- und nur in einem Fall zu einer vergleichsweise häufigen Co-Lokalisation mit N-CAM-reaktiven Fasern. Bei dem einzigen PM-Präparat kam es hingegen mehrfach zur Co-Lokalisation von Tenascin-Immunreaktivität mit beiden Regenerationsmarkern, wobei die zuletzt aufgeführten Beobachtungen aufgrund der geringen Fallzahl kritisch zu bewerten sind.

Eine Co-Lokalisation des Matrixproteins Tenascin mit regenerativen Fasern bei der DMD wurde bereits in der Arbeit von Gullberg et al. erwähnt, wobei basophile Fasern und ferner Fasern, die Nestin (ebenfalls ein Regenerationsmarker) synthetisierten, zum Vergleich herangezogen wurden [Gullberg et al. 1997]. In jener Arbeit wurden keine exakten Angaben zur Häufigkeit gemacht; es wird aber von einer überwiegenden Co-Lokalisation der Tenascin-Foci mit Nestin-positiven Zellen gesprochen, was in etwa dem Co-Lokalisationsmuster von Tenascin und N-CAM in der vorliegenden Arbeit entsprechen dürfte. Die Zusammenhänge zwischen Tenascin-Reaktivität und Fasern, die bei PM und DM Immunreaktivität für Vimentin bzw N-CAM zeigten, wurden von unserer Arbeitsgruppe bereits an einem größeren Kollektiv als in der vorliegenden Arbeit beschrieben [Müller-Felber et al. 1998]; die Ergebnisse sind miteinander vereinbar.

Die erwähnten Zusammenhänge lassen darauf schließen, dass Tenascin bei der DMD, ALS und PM eine Rolle bei regenerativen Vorgängen im Skelettmuskel spielen könnte; seine Aufgabe bei der DM bleibt unklar. Auffällig war in der vorliegenden Arbeit, dass es zwischen den verschiedenen Erkrankungen nicht nur Unterschiede in der Anzahl der Foci gab, in denen es zur Co-Lokalisation mit regenerativen Fasern kam, sondern dass auch die Anzahl regenerativer Fasern innerhalb eines jeweiligen Focus (sofern vorhanden) - abhängig vom Präparat, aber auch von Krankheit zu Krankheit - variierte. Bei den hier verwendeten 3 Fällen der ALS kamen regenerierende Fasern zwar in jedem Focus vor, aber es handelte sich bis auf eine Ausnahme immer nur um wenige Einzelfasern und die Foci waren insgesamt seltener als bei den anderen untersuchten Erkrankungen. Betrachtet man die Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten auch bei der ALS als Orte, von denen eine Zell-Regeneration ausgehen könnte, so wäre die „Regenerationsleistung“ dieser Keimzentren bei der ALS offensichtlich erheblich geringer als z.B. bei der DMD oder der PM. Auch die Anzahl der Fasern, die innerhalb eines Focus von Tenascin-Reaktivität umgeben waren, war wesentlich kleiner als bei allen anderen untersuchten Erkrankungen. Es wäre zu klären, inwieweit diese vergleichsweise geringe Ausprägung der Tenascin-Reaktivität in den Foci mit der vergleichsweise geringen Regenerationsleistung bei der ALS in Verbindung steht.

Um die Bedeutung von Tenascin bei der DMD besser einordnen zu können, ist es sinnvoll, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den bereits oben erwähnten Untersuchungen an MDX-Mäusen zu vergleichen. Es wäre möglich, dass Tenascin bei beiden Erkrankungen eine Schlüsselrolle während des Überganges von der degenerativen in die regenerative Phase zukommt. Die Zunahme der Tenascin-Reaktivität vor dem Auftreten regenerierender Fasern und das Verschwinden des Matrixproteins nach erfolgter Einleitung des regenerativen Zyklus bei der MDX-Maus scheinen dies zu bestätigen. Wie u.a. in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, bleibt Tenascin bei der DMD hingegen hochreguliert. Da die regenerativen Vorgänge bei der DMD im Gegensatz zur MDX-Maus nicht überwiegen, könnte es sein, dass der Stimulus zur Synthese des Wachstumsfaktors als Versuch des Organismus, eine Regeneration herbeizuführen, bis zuletzt aufrechterhalten bleibt. Bislang wurde angenommen, dass hierbei auch das Auftreten von TGF- $\beta$ 1 eine Rolle spielen könnte, da es im Bindegewebe akkumuliert und dadurch als potentieller Induktor der Tenascin-Synthese ständig im Gewebe vorhanden ist, jedoch durch Induktion der Fibrosebildung eine Regeneration gleichzeitig unmöglich macht. Über die genaue Funktion der Fibroblasten in diesem hypothetischen Wechselspiel kann nur spekuliert werden. Gegebenenfalls sind diese bei MDX-Mäusen in der Lage, Tenascin bzw. andere Wachstumsfaktoren über einen quantitativ kritischen Punkt hinaus zu synthetisieren, sodass es zum Überwiegen regenerativer Prozesse im Sinne einer Proliferation von Fasern mit stabileren, Utrophin-haltigen Membranen kommt (Utrophin ersetzt bei MDX-Mäusen wahrscheinlich die Funktion des fehlenden Dystrophins). Eine durch Tinsley et al. nachgewiesene Korrelation zwischen dem Auftreten von zentronukleären Fasern und dem Vorkommen von Utrophin im Skelettmuskel von MDX-Mäusen deutet auf einen solchen Vorgang hin [Tinsley et al. 1998]. Ziel der Regeneration bei DMD und MDX-Mäusen wäre es demnach, die Menge an regenerierenden Fasern über einen gewissen Punkt hinaus zu steigern, bevor durch die verbleibenden instabilen Fasern im Zusammenspiel mit freien Zellen, Fibroblasten und weiteren Zytokinen der unumkehrbare Prozess der Gewebsfibrosierung eingeleitet wird.

#### 5.4 VIMENTIN

Vimentin wurde in der vorliegenden Arbeit als Marker für regenerierende Fasern verwendet, da diese mit konventionellen Färbemethoden nicht immer eindeutig identifizierbar waren. Von den Biopsien aus dem Normalkollektiv abgesehen, kamen Vimentin-positive Fasern in allen Myopathie-Präparaten der vorliegenden Arbeit vor. Darüber hinaus wurde Vimentin-Immunlokalisation auch bei den gesunden Kontrollen stets in den im Gewebe vorhandenen Fibroblasten, in Endothelzellen sowie in glatten Muskelzellen der Blutgefäße nachgewiesen.

Diese Beobachtungen decken sich mit den in der Literatur beschriebenen Angaben zur Vimentin-Reaktivität in normaler Skelettmuskulatur [Sarnat, 1992; Tokuyasu et al. 1985]. Bei der Mehrzahl der 17 DMD-Präparate zeigte eine größere Anzahl von Fasern Immunreaktivität für das Protein, als dies bei den Myositis- und ALS-Präparaten der Fall war. Handelte es sich bei der DMD um gruppierte Faserverbände, die Vimentin-Reaktivität zeigten, so lagen diese immer in der näheren Umgebung fokaler Akkumulationen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten. Ließen sich die Faserverbände eindeutig als basophile Fasern mit zentral gelegenen Kernen identifizieren, so zeigten sie meist eine stärkere Anfärbung als im HE-Präparat unauffällige, aber Vimentin-reaktive Fasern. In der gesichteten Literatur herrscht ein breiter Konsens darüber, dass es sich bei Vimentin um einen frühen Regenerationsmarker handelt: Regenerierende Muskelfasern entwickeln sich sowohl beim Embryo als auch beim Erwachsenen aus Myoblasten oder „schlafenden“ Satellitenzellen unter der Basallamina benachbarter Muskelfasern [Sarnat et al. 1992]. Unabhängig von einer Verletzungsursache machen diese Fasern im ausgereiften Muskel dieselbe Entwicklung durch wie im Fetus [Reznik et al. 1970]. Da fetale Fasern stets Vimentin synthetisieren, verwundert es nicht, dass das Protein auch innerhalb regenerierender Fasern der adulten Muskulatur enthalten ist [Thornell et al. 1980]. Das Vorkommen von Vimentin in regenerierenden Fasern wurde bei der DMD, congenitalen Myopathien, entzündlichen Muskelerkrankungen und verschiedenen Formen der SMA beschrieben [Bornemann et al. 1993; Sarnat 1991; Soubruiard et al. 1995; Young et al. 1994]. Fanin et al. zeigten eine im Vergleich zur DMD höhere Anzahl Vimentin-reaktiver Fasern bei inflammatorischen Myopathien auf [Fanin et al. 1999]. Dies steht scheinbar im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit; eine Erklärung dafür findet sich aber möglicherweise in der Größe der untersuchten Kollektive: Zum einen wurden in der vorliegenden Arbeit nur 4 Myositis-Präparate untersucht. Es wäre möglich, dass diese Präparate sämtlich in einem Krankheitsstadium entnommen wurden, bei dem es noch nicht zu einer vergleichbar starken Regeneration und Synthese von N-CAM gekommen war. Zum anderen untersuchten Fanin et al. nur 4 DMD-Präparate aus einem relativ selektierten Patientengut (alle Erkrankten waren jünger als 9 Jahre). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte fast ein Drittel der 17 DMD-Präparate einen ähnlich niedrigen Anteil an Vimentin-reaktiven Fasern. Zwar konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Progression der Erkrankung und der Zunahme der Anzahl Vimentin-reaktiver Fasern festgestellt werden, es wäre aber denkbar, dass Fanin et al. nur solche Präparate untersuchten, bei denen alters- oder zufallsbedingt nur wenige Fasern Vimentin synthetisierten. Zudem wurde in jener Arbeit beim Vergleich der DMD mit entzündlichen Myopathien nicht zwischen DM und PM unterschieden. Eine solche Differenzierung liegt in einer früheren Untersuchung unserer Arbeitsgruppe vor, bei der mehr Vimentin-reaktive Fasern bei der PM im Vergleich zur DM beobachtet wurden [Müller-Felber et al. 1998]. Da in der vorliegenden Arbeit bei DM und PM zu kleine Kollektive vorlagen,

konnte nicht auf einen solchen Zusammenhang geschlossen werden; die Daten lassen sich aber mit den statistischen Angaben der letztgenannten Arbeit gut vereinbaren. Zu einem Auftreten von Vimentin in der Muskulatur bei ALS, wie sie bei den hier verwendeten 3 Fällen beobachtet wurde, konnten keine Angaben in der gesichteten Literatur gefunden werden. Auch bei den verschiedenen Formen der SMA kommt es – analog zur ALS – zu einer neurogenen Degeneration der Skelettmuskulatur, weshalb man davon ausgehen kann, dass vergleichbare Bedingungen vorliegen. Bei infantilen Formen der SMA (Typ Werdnig-Hoffmann) wurde das Vorkommen von Vimentin-Reaktivität im Bereich schmaler Muskelfasern beschrieben, wobei die Immunlokalisation des Intermediärfilaments auf subsarkolemmale Regionen beschränkt war [Sarnat 1991, 1992]. Die Anzahl Vimentin-positiver Fasern bei der infantilen SMA lag bei einer weiteren Untersuchung an 33 Patienten unter 1%, wobei bei 8 Patienten keine Vimentin-positiven Fasern entdeckt wurden [Bornemann et al. 1993]. Auch in experimentell denervierter Rattenmuskulatur wurde keinerlei Vimentin-Expression beobachtet [Tews et al. 1997].

Die Tatsache, dass basophile Fasern in der vorliegenden Arbeit bei der DMD eine vergleichsweise stärkere Intensität aufwiesen als unauffällige Fasern, deutet auf eine Abnahme des Auftretens des Intermediärfilaments in fortschreitenden Entwicklungsstadien der Muskelfasern hin. Ein solches Verschwinden des Intermediärfilaments wurde bei der fetalen Entwicklung beschrieben, beispielsweise während der Wanderung der Nuklei von der zentralen zur peripheren Lage innerhalb fetaler Myotubuli [Sarnat 1992; Tokuyasu et al. 1985]. Im Bereich von Infiltraten kam es in der vorliegenden Arbeit häufig, aber durchaus nicht immer zur Co-Lokalisation mit Tenascin-Immunreaktivität. Die Fasern im Bereich der Tenascin-Foci waren häufig gruppiert und vergleichsweise stark homogen angefärbt, wohingegen Vimentin-positiv-positive Fasern außerhalb der Foci gelegentlich eine Betonung des Sarkolemm und ein vergleichsweise blass angefärbtes Zellinneres aufwiesen. Geht man davon aus, dass Vimentin, wie oben erwähnt, auch in adulter Muskulatur vermutlich in frühen regenerativen Phasen synthetisiert wird und danach wieder verschwindet, so würden diese Beobachtungen die Bedeutung des Matrixproteins Tenascin bei der frühen Regeneration im Skelettmuskel unterstreichen. Schon in den vorigen Kapiteln wurde postuliert, dass Tenascin eine Rolle dabei spielen könnte, den Prozess der Regeneration einzuleiten und dann wieder rasch abzuklingen. Die frisch regenerierenden gruppierten Fasern mit starker homogener Vimentin-Reaktivität innerhalb von Tenascin-Foci könnten das morphologische Äquivalent für diese Annahme darstellen. In der Umgebung weiter im Regenerationsprozess fortgeschrittener Fasern hingegen könnte die Tenascin-Aktivität bereits wieder nachgelassen haben und somit im Präparat nicht mehr erkennbar sein.

Bei den Vimentin-positiven Fasern außerhalb fokaler Ansammlungen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten handelte es sich meist um einzelne Fasern; ein Bezug zum Vorkommen anderer hier mituntersuchter Wachstumsfaktoren oder zu bestimmten

Strukturen im Präparat ließ sich bei diesen nicht feststellen. Bei der DM lagen die vergleichsweise seltenen Vimentin-positiven Fasern hauptsächlich als Einzelfasern vor und waren wie die zuletzt beschriebenen Fasern bei der DMD ohne erkennbaren Zusammenhang mit anderen Proteinen oder Strukturen diffus im Gewebe verteilt. Bei dem PM-Präparat hingegen konnten vergleichsweise mehr Fasern in der Umgebung von fokalen Infiltraten ausfindig gemacht werden; hierbei handelte es sich überwiegend zugleich um Tenascin-Foci. Auch hier fanden sich zudem einzelne, diffus im Präparat verteilte Fasern. Eine fehlende Korrelation der Vimentin-positiven Fasern mit dem Auftreten von Tenascin bei der DM im Gegensatz zu einer vorhandenen Korrelation bei der PM wurde bei einem größeren Kollektiv bereits beschrieben [Müller-Felber et al. 1998]. Bei der ALS kamen Vimentin-reaktive Fasern nur in der Umgebung von fokal akkumulierenden Fibroblasten und freien Zellen und immer im Zusammenhang mit Tenascin-Reaktivität vor; die Fasern waren im Gegensatz zu den oben erwähnten Befunden bei der SMA [Sarnat 1992] homogen angefärbt.

Versucht man diese Beobachtungen zu einem einheitlichen Bild zusammenzufassen, so stellt man fest, dass es über alle Erkrankungen hinweg zwei Formen regenerierender Fasern gibt: zum einen diejenigen Fasern, die im Zusammenhang mit der Akkumulation von mononukleären Zellen und Fibroblasten vorkommen, dabei gruppiert auftreten können, basophilen Fasern entsprechen und bei denen ein Zusammenhang mit dem Auftreten des Matrixproteins Tenascin gesehen werden könnte; zum anderen solche Fasern, die außerhalb von Infiltraten und ohne erkennbare Korrelation zu Infiltraten oder Tenascin-Reaktivität diffus im Gewebe verteilt vorkommen. Bei der DMD und der PM wären demnach beide Formen zu beobachten, bei der DM nur die diffus im Gewebe verteilten Fasern und bei der ALS nur der erstgenannte Typ. Somit läge es nahe, auf mindestens zwei mögliche Regenerations-Mechanismen in der Skelettmuskulatur zu schließen - einem von eingewanderten freien Zellen und / oder von Fibroblasten sowie eventuell auch von Tenascin abhängigen Aktivationsvorgang mit fokalen Zell-Akkumulationen als regenerativen Keimzentren und mindestens einem weiteren, der eventuell durch andere Faktoren (TGF- $\beta$ 1?) ausgelöst wäre. Dieses Modell ließe sich gut mit dem im vorigen Kapitel beschriebenen Verdacht auf unterschiedliche Aktivierungs-Mechanismen bei der DM im Gegensatz zur PM und zur DMD vereinbaren. Aufgrund des Fehlens von Vimentin in denervierter Muskulatur kamen auch andere Arbeitsgruppen zu dem Ergebnis, dass es unterschiedliche "Regenerationsprogramme" geben muss [Tews et al. 1997]. Da eine Reaktivität von Vimentin in der vorliegenden Arbeit bei der ALS immer nur im Zusammenhang mit dem Auftreten von mononukleären Zellen und Fibroblasten zu erkennen war und es keine Korrelation zu neurogenen Faseratrophien gab, ist anzunehmen, dass es sich hierbei am ehesten um ein Regenerationsprogramm nach Fasernekrose handelt, das unabhängig von der zugrundeliegenden Erkrankung ablaufen könnte.

Ob bei dem diffus im Gewebe verteilten zweiten Typ regenerierender Fasern ein Zusammenhang mit dem Auftreten von TGF- $\beta$ 1 zu sehen ist, kann nur spekuliert werden. Dieser Verdacht kommt dadurch zustande, dass diese Fasern in der vorliegenden Arbeit nur bei denjenigen Erkrankungen vorkamen, in welchen TGF- $\beta$ 1 ubiquitär im Gewebe verteilt war und nicht bei der ALS, bei der endomysial auch kein TGF- $\beta$ 1 nachweisbar war. Einflüsse von TGF- $\beta$ 1 auf die Regeneration von Muskelfasern - etwa durch Stimulation von PDGF, das wiederum stimulierend auf die Proliferation von Satellitenzellen wirkt - wurden beschrieben [Husmann et al. 1996]. Es ist allerdings anzunehmen, dass die Regeneration von Muskelfasern durch weitaus komplexere Interaktionen als nur durch das Auftreten eines einzigen Wachstumsfaktors bewirkt wird.

## 5.5 N-CAM

Auch N-CAM diene in der vorliegenden Arbeit als Regenerationsmarker. Im Normalkollektiv konnten nur sehr selten N-CAM-reaktive Fasern beobachtet werden; bei den gelegentlich auffallenden spindelig ausgezogenen Strukturen im Bereich des Sarkolemmes könnte es sich um Satellitenzellen oder um neuromuskuläre Endplatten handeln. Auch andere Arbeitsgruppen wiesen N-CAM bzw. Leu 19-Reaktivität<sup>1</sup> in Satellitenzellen, proliferierenden Myoblasten und Myotuben sowie in regenerierenden Fasern nach [Hohlfeld et al. 1989; Schubert et al. 1989]. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde bei gesunden Kontrollen decken sich mit den erwähnten Beobachtungen aus der Literatur.

Bei der DMD entsprach die Häufigkeitsverteilung und die Co-Lokalisation N-CAM-positiver Fasern mit anderen hier untersuchten Strukturen und Proteinen weitgehend der von Vimentin (s.o.). Allerdings waren N-CAM-reaktive Fasern etwas seltener als Vimentin mit fokalen Akkumulationen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten bzw. mit Tenascin-Reaktivität co-lokalisiert. In den meisten DMD-Präparaten zeigte sich, dass über die Hälfte der N-CAM-positiven Fasern identisch mit Vimentin-positiven Fasern waren. Bei der DM fand sich analog zu Vimentin keine Korrelation mit dem Auftreten von entzündlichen Zellinfiltraten oder mit der Immunlokalisation von Tenascin; bei der PM lagen vergleichsweise mehr Fasern im Bereich von fokalen Infiltraten bzw. von Tenascin-Foci vor. Bei den Myositiden verteilte sich die Häufigkeit der beiden Regenerationsmarker Vimentin und N-CAM zwar ähnlich; dies darf aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass in diesen Präparaten weniger als die Hälfte der N-

---

<sup>1</sup> Bei dem Leu 19-Antigen und N-CAM besteht eine Kreuzreaktivität der Antikörper und mit biochemischen Methoden wurden identische Eigenschaften nachgewiesen. Wahrscheinlich sind beide Moleküle identisch [Lanier et al. 1989; Müller-Felber et al. 1992].

CAM-positiven Fasern identisch mit Vimentin-positiven Fasern waren. Der Anteil der Fasern, die N-CAM-Reaktivität zeigten, lag darüber hinaus höher als der Anteil Vimentin-positiver Fasern. Anders die Situation bei der ALS: Hier zeigten die Fasern stets Immunlokalisation für beide Proteine; es lagen also völlig analoge Verhältnisse bezüglich der Co-Lokalisation mit dem fokalen Auftreten von Fibroblasten und mit Tenascin-Reaktivität vor. N-CAM-positiv Fasern kamen bei der DMD und bei den Myositiden etwa gleich häufig, bei der ALS hingegen vergleichsweise selten vor. Analog zu Vimentin gab es zum einen Fasern, die gruppiert, im Bereich fokaler Zellakkumulationen aus mononukleären Zellen und Fibroblasten und co-lokalisiert mit Tenascin auftraten sowie zum anderen einzelne Fasern, die diffus im Gewebe verteilt waren, ohne dass ein Bezug zu bestimmten Strukturen oder zur Reaktivität eines der hier untersuchten Proteine hergestellt werden konnte.

Das Vorkommen von N-CAM in regenerierenden Muskelfasern bei dystrophischen Myopathien, DM, PM und ALS wurde bereits beschrieben [Behr 1994; Illa et al. 1992]. In der Arbeit von Illa et al. wurde eine Zunahme N-CAM-reaktiver Fasern in Abhängigkeit von der Aktivität einer Myopathie beschrieben und die größte Anzahl dieser Fasern bei aktiven inflammatorischen Myopathien beobachtet, bei welchen zugleich auch die meisten Satellitenzellen vorkamen. Die Arbeit ging nicht darauf ein, mit welcher dystrophischen Muskelerkrankung bzw. mit welchen Krankheitsstadien verglichen wurde. Ein eindeutiger häufigeres Vorkommen von N-CAM bei inflammatorischen Myopathien im Vergleich zur DMD konnte in der vorliegenden Arbeit zwar nicht bestätigt werden, doch mag dies zum einen an der geringen Fallzahl und zum anderen vermutlich an unterschiedlichen Aktivitätszuständen liegen (s. vorheriges Kapitel). Ansonsten decken sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen der vorgennanten Untersuchungen. Analog zu Vimentin wurde eine fehlende Korrelation N-CAM-positiver Fasern mit der Reaktivität des Matrixproteins Tenascin bei der DM und eine vorhandene Korrelation bei der PM beschrieben [Müller-Felber et al. 1998], was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt. Da die Häufigkeitsverteilung und die Co-Lokalisation mit fokalen Akkumulationen von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten sowie mit Tenascin-Reaktivität bei N-CAM-positiven Fasern nahezu gleich war wie bei Vimentin-positiven Fasern, können in Bezug auf die Regeneration des Skelettmuskels analoge Schlüsse gezogen werden wie im vorangehenden Kapitel. Der darin für Vimentin geäußerte Verdacht einer Stimulation regenerierender Zellen durch TGF- $\beta$ 1 wurde für N-CAM im Rahmen der Chondrogenese bei der Maus beschrieben [Chimal-Monroy et al. 1999].

Für die große Zahl diffus verstreuter N-CAM-positiver Fasern, die - außer der je nach Grunderkrankung unterschiedlich häufigen Co-Lokalisation mit Vimentin - unauffällig waren und keine weiteren Zeichen für Regeneration aufwiesen, lässt sich aufgrund der Eigenschaft von N-CAM, im Zusammenhang mit Nerveinsprossung zu stehen, ein weiteres Modell hinzufügen: Die Denervierung und die instabile Situation an der postsynaptischen Membran bei

degenerativen Prozessen. Möglicherweise ist bei denjenigen Myopathien, die mit einer Fibrosebildung einhergehen, der Kontakt zwischen Regenerat und Nerv durch bindegewebige Ummauerung der Muskel- und Nervenfasern gestört. Bei der DMD konnte gezeigt werden, dass bei der Hälfte der postsynaptischen Membranen fokale Degenerationen auftreten, auch wenn die terminalen Axone ansonsten unauffällig gebaut waren [Engel 1984]. Nach Covault et al. reicht eine instabile Synapsensituation für die Bildung von N-CAM aus [Covault et al. 1985; 1986]. Die Tatsache, dass die oben erwähnten Fasern in der vorliegenden Arbeit ausschließlich bei denjenigen Erkrankungen auftraten, die mit einer verstärkten Bildung interstitieller Fibrose einhergingen, unterstützt diese Annahme.

Ein mögliches Erklärungsmodell für die gruppiert auftretenden Fasern im Bereich der Infiltrate bei der DMD wäre, dass es sich bei diesen Fasern um die bekannten degenerativen Faserveränderungen handelt. Diese sollen durch segmentale Nekrose einer in viele Einzelfasern aufgespaltenen Faser entstehen [Engel 1986]. Die aufgespaltenen Fasern könnten wieder Kontakt zu Nerven suchen und aus diesem Grund N-CAM synthetisieren. Wie oben bereits erwähnt, lagen bei den inflammatorischen Myopathien mehr N-CAM-reaktive als Vimentin-reaktive Fasern vor; diese Fasern waren größtenteils nicht identisch und die Mehrheit N-CAM-positiver Fasern zeigte ein anderes Reaktivitätsmuster als bei den anderen Myopathien. Bei der DMD gab es hingegen einen hohen Grad an Übereinstimmung und bei der ALS kam es zu einer 100%-igen Co-Lokalisation N-CAM- und Vimentin-positiver Fasern. Dies könnte zum einen für verschiedene Regenerationsmechanismen sprechen, wobei es möglich wäre, dass Fasern nur Vimentin, nur N-CAM oder aber beide Regenerationsmarker gleichzeitig synthetisieren. Für die entzündlichen Myopathien sowie für den Zustand nach experimenteller Denervation (hier kommt es nicht zum Auftreten von Vimentin) wäre demnach denkbar, dass derjenige Regenerations-Mechanismus überwiegt, bei dem es vorwiegend zum Auftreten von N-CAM kommt; bei DMD und PM würden alle drei Mechanismen ausgelöst und bei der ALS nur derjenige, bei dem beide Proteine zugleich synthetisiert werden. Der Verdacht auf verschiedene "Regenerations-Programme" während der Reinnervation im Gegensatz zu denjenigen, die bei Myopathien und bei experimentell ausgelöster Nekrose ablaufen, wurde bereits geäußert [Tews et al. 1997]. Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, dass die beiden Proteine zwar von identischen Fasern, aber zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlaufe der Regeneration synthetisiert werden, wobei sie über einen gewissen Zeitraum hinweg gleichzeitig in einer Faser beobachtet werden können.

Im Zusammenhang mit den Befunden bei den hier verwendeten 3 ALS-Präparaten soll hier auf einen interessanten Sachverhalt aufmerksam gemacht werden: Nach experimenteller Denervation kommt es bei Kaninchen zu einem starken Anstieg der Leu-19/N-CAM-Reaktivität vom 2. Tag an und zu einem Maximum am 11. Tag, woraufhin es zu einer Abnahme bei Typ-I-Fasern kommt, während Typ-II-Fasern positiv bleiben [Müller-Felber et al. 1993].

Vergleichbare Zusammenhänge konnten auch bei Mäusen, Hühnern und Ratten nachgewiesen werden, wobei bei der Ratte gleichzeitig gezeigt wurde, dass das Auftreten des Adhäsionsmoleküls in frühen Stadien nach Denervation mit dem Auftreten von Tenascin einhergeht [Daniloff et al. 1986; Tews et al. 1997]. Auch bei verschiedenen Formen der SMA wurden N-CAM-reaktive Fasern beschrieben. Bei der infantilen SMA Typ I und II (Werdnig-Hoffmann und intermediärer Typ) kommt es hierbei zu einer starken Reaktivität von N-CAM und Vimentin im Bereich atropher Fasern. Bei der SMA Typ III (Kugelberg-Welander) liegen hingegen nur wenige N-CAM- und fast keine Vimentin-positiven Fasern vor [Walsh et al. 1987; Soubrouillard et al. 1995]. In der vorliegenden Arbeit wurden bei der ALS nur sehr wenige Fasern entdeckt, die N-CAM- bzw. Vimentin-Immunreaktivität zeigten. Auch in der zuvor erwähnten Arbeit von Illa et al. wurde gezeigt, dass N-CAM-positive Fasern bei der ALS vergleichsweise selten vorkommen. Man kann also davon ausgehen, dass die Anzahl N-CAM-positiver Fasern mit zunehmender Chronizität eines Denervationsprozesses abnimmt. Über die Ursache dieses Zusammenhanges kann nur spekuliert werden: Entweder muss bei chronisch neurogenen Myopathien im Gegensatz zur akuten Denervation von einer reduzierten Regenerationsleistung ausgegangen werden oder aber es regenerieren vergleichbar viele Fasern über einen wesentlich längeren Zeitraum hinweg, sodass sich bei der „Momentaufnahme“ einer Muskelbiopsie nur wenige bzw. keine Fasern im Zustand der Regeneration befinden und dabei N-CAM synthetisieren. Allerdings ist damit noch nicht erklärt, warum regenerierende Fasern bei chronischer Denervation Vimentin synthetisieren, bei akuter Denervation jedoch nicht, und weshalb diese Fasern bei der ALS in der vorliegenden Arbeit immer zusammen mit dem Auftreten von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten auftraten. Dass Tenascin im Zusammenhang mit dieser Form der Regeneration eine Rolle spielen könnte, kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen ebenfalls nur vermutet werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Wachstumsfaktoren spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Fibrogenese und bei de- und regenerativen Vorgängen im Skelettmuskel. Entsprechende Gewebeeränderungen sind in unterschiedlichem Ausmaß bei der Muskeldystrophie Duchenne (DMD), der Dermatomyositis (DM), Polymyositis (PM) und der ALS im Muskelgewebe zu beobachten. In der hier vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 40 Muskelbiopsien immunhistochemisch auf das Vorkommen der Proteine TGF- $\beta$ 1 und Tenascin sowie der Regenerationsmarker Vimentin und N-CAM untersucht (17 DMD, 3 DM, 1 PM, 3 ALS und 17 aus einem Normalkollektiv).

Dabei zeigte sich, dass das Auftreten von TGF- $\beta$ 1 bei allen untersuchten Erkrankungen immer mit dem Ausmaß der für die Erkrankungen spezifischen Gewebsfibrose korreliert. Ein Bezug zwischen TGF- $\beta$ 1 und regenerierenden Fasern lässt sich im Zusammenhang mit diffus verteilten Fasern bei der DMD, der DM und der PM allenfalls vermuten. Hinweise auf eine Verbindung zwischen Denervierung und dem Auftreten von TGF- $\beta$ 1 fanden sich nicht.

Tenascin-Reaktivität trat stets fokal im Zusammenhang mit Zellakkumulationen aus Fibroblasten und lymphohistiozytären Zellen auf. Zwischen den Myopathien waren hierbei unterschiedliche Reaktivitätsmuster festzustellen. Mit Ausnahme der DM, bei der kein eindeutiger Zusammenhang mit dem Auftreten von Vimentin bzw. N-CAM gefunden wurde, war Tenascin stets co-lokalisiert mit regenerierenden Fasern. Eine Co-Lokalisation von Tenascin und TGF- $\beta$ 1 wurde nur in Herden beobachtet, in denen es zur Proliferation von EZM kam und nicht bei den hier untersuchten drei ALS-Präparaten, bei welchen Tenascin-Reaktivität auch unabhängig von TGF- $\beta$ 1-Reaktivität auftrat. Mit Ausnahme der ALS fanden sich immer auch regenerierende Fasern ohne Zusammenhang mit dem fokalen Auftreten von Tenascin.

Die Untersuchungen bestätigen den Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von TGF- $\beta$ 1 und dem fibrotischen Umbau des Gewebes. Allerdings kommt das Protein grundsätzlich vor, sobald Bindegewebe vorhanden ist. In der Zusammenschau mit anderen Untersuchungen ist eine Bedeutung in frühen Phasen der Fibrogenese naheliegend, während es sich in späteren Phasen um an Matrixkomponenten gebundenes Protein handeln könnte. Eine in-vivo-Induktion von Tenascin durch TGF- $\beta$ 1, wie sie in vitro nachgewiesen wurde, muss aufgrund des ubiquitären Vorkommens von TGF- $\beta$ 1 generell und bei der ALS im Besonderen in Frage gestellt werden, da es hier endomysial nicht zur Co-Lokalisation der beiden Proteine kam.

Tenascin scheint in Wechselbeziehung mit dem fokalen Auftreten von Fibroblasten eine zeitlich begrenzte Rolle bei der Regeneration des Skelettmuskels zu spielen. Die Beobachtungen bezüglich des gemeinsamen Auftretens mit Vimentin und N-CAM deuten auf verschiedene "Regenerationsprogramme" bei unterschiedlichen Krankheiten hin. Tenascin könnte in diesem Zusammenhang eine Schlüsselrolle zukommen.

## ANHANG

## A.1 TABELLEN

**Tabelle A.1:** Daten zum monoklonalen Antikörper gegen Fibroblasten

<b>Fibroblasten + proliferierende Fibrozyten</b>	
<i>Klon</i>	AS02, monoklonal
<i>Immunglobulinklasse</i>	Maus IgG1
<i>Spezifität</i>	Der Antikörper erkennt ein membranständiges Antigen humaner Fibroblasten mit einem Molekulargewicht von 30-35 kDa. Auch proliferierende Fibrozyten werden erkannt.
<i>Reaktivität</i>	Fibroblasten unterschiedlichen Ursprungs werden markiert
<i>Quelle</i>	Dianova GmbH, Hamburg, BRD
<i>Verdünnung</i>	1 : 50

**Tabelle A.2:** Daten zum monoklonalen Antikörper gegen Tenascin

<b>Tenascin</b>	
<i>Klon</i>	TN2, monoklonal
<i>Immunglobulinklasse</i>	Maus IgG1, kappa
<i>Spezifität</i>	Der Antikörper erkennt humanes Tenascin.
<i>Reaktivität</i>	Die Extrazellulärmatrix von Blutgefäßen und bei regionaler Zellproliferation und Gewebsneubildung wird markiert mit Betonung des interstitiellen Stromas über den Basalmembranen.
<i>Quelle</i>	DAKO Corp., Carpinteria, USA
<i>Verdünnung</i>	1 : 20

**Tabelle A.3:** Daten zum polyklonalen Antikörper gegen Transforming Growth Factor beta-1

<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	
<i>Klon</i>	Polyklonal
<i>Immunglobulinklasse</i>	Kaninchen IgG
<i>Spezifität</i>	Der Antikörper erkennt die Aminosäuresequenz 328 bis 353 im carboxyterminalen Bereich von humanem TGF- $\beta$ 1 und einer Reihe weiterer Spezies.
<i>Reaktivität</i>	Septales Bindegewebe und die Extrazellulärmatrix von Blutgefäßen und Skelettmuskelgewebe sowie (lt. Hersteller) Fibroblasten und degenerierende Myozyten werden markiert.
<i>Quelle</i>	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
<i>Verdünnung</i>	1 : 20

**Tabelle A.4:** Daten zum monoklonalen Antikörper gegen Vimentin

<b>Vimentin</b>	
<i>Klon</i>	V9, monoklonal
<i>Immunglobulinklasse</i>	Maus IgG1, kappa
<i>Spezifität</i>	Der Antikörper erkennt das 57 kDa Intermediärfilamentprotein des Menschen und einer Reihe weiterer Spezies.
<i>Reaktivität</i>	Zellen mesenchymalen Ursprungs – einschließlich lymphoider Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten und glatter Muskelzellen - sowie regenerierende Skelettmuskelzellen werden markiert.
<i>Quelle</i>	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark
<i>Verdünnung</i>	1 : 20

**Tabelle A.5:** Daten zum monoklonalen Antikörper gegen Neural Cell Adhesion Molecule

<b>Neural Cell Adhesion Molecule (N-CAM)</b>	
<i>Klon</i>	UJ13A, monoklonal
<i>Immunglobulinklasse</i>	Maus IgG2a, kappa
<i>Spezifität</i>	Der Antikörper reagiert mit der humanen 125kDa Isoform des Sialoglycoproteins (nicht-transmembran).
<i>Reaktivität</i>	Gewebe neuroektodermalen Ursprungs wie fetaler Skelettmuskel, aber auch regenerierende Skelettmuskelzellen werden markiert.
<i>Quelle</i>	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark
<i>Verdünnung</i>	1 : 10

**Tabelle A.6:** Daten zum monoklonalen Antikörper gegen Kollagen Typ IV

<b>Kollagen Typ IV</b>	
<i>Klon</i>	COL-94, monoklonal
<i>Immunglobulinklasse</i>	Maus IgG1
<i>Spezifität</i>	Der Antikörper erkennt ein Epitop, das auf den $\alpha$ 1- und/oder den $\alpha$ 2-Ketten humanen Kollagens Typ IV lokalisiert ist.
<i>Reaktivität</i>	Natives Kollagen Typ IV des Menschen und von Primaten wird markiert.
<i>Quelle</i>	Sigma Chemical. Company, St. Louis, USA.
<i>Verdünnung</i>	1 : 50

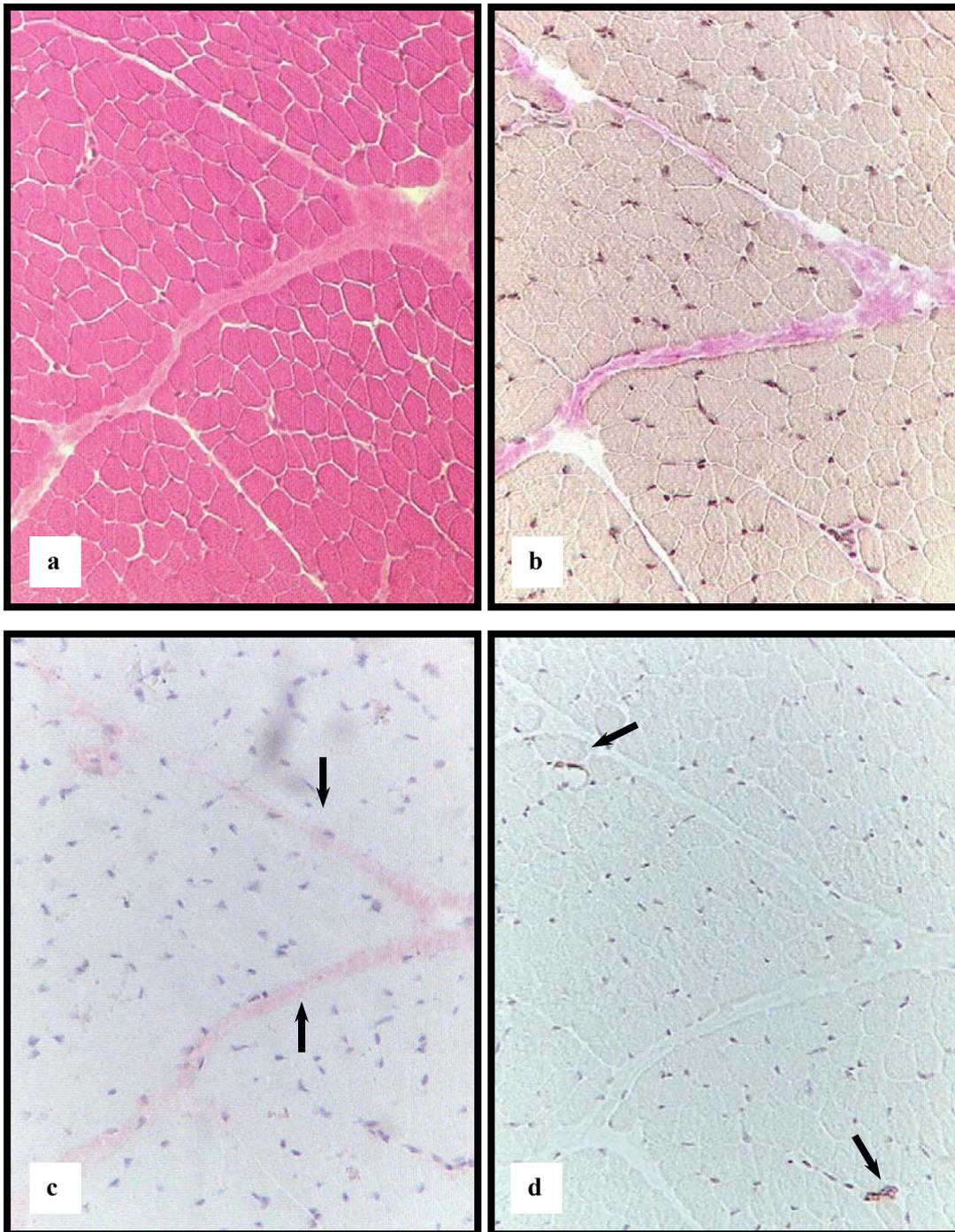
**Tabelle A.7:** Daten zum polyklonalen Sekundärantikörper (konventionelles Verfahren)

<i>Klon</i>	Polyklonal
<i>Immunglobulinklasse</i>	Kaninchen IgG
<i>Spezifität</i>	Der Antikörper reagiert mit IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA und IgM von der Maus.
<i>Quelle</i>	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark
<i>Verdünnung</i>	1 : 50

**Tabelle A.8:** Daten zum Sekundärantikörper des Vectastain® Elite ABC-Kits

<i>Klon</i>	Polyklonal
<i>Immunglobulinklasse</i>	Ziege IgG
<i>Spezifität</i>	Kaninchen IgG (schwere + leichte Ketten)
<i>Quelle</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>Verdünnung</i>	1 : 200

## A.2 ABBILDUNGEN



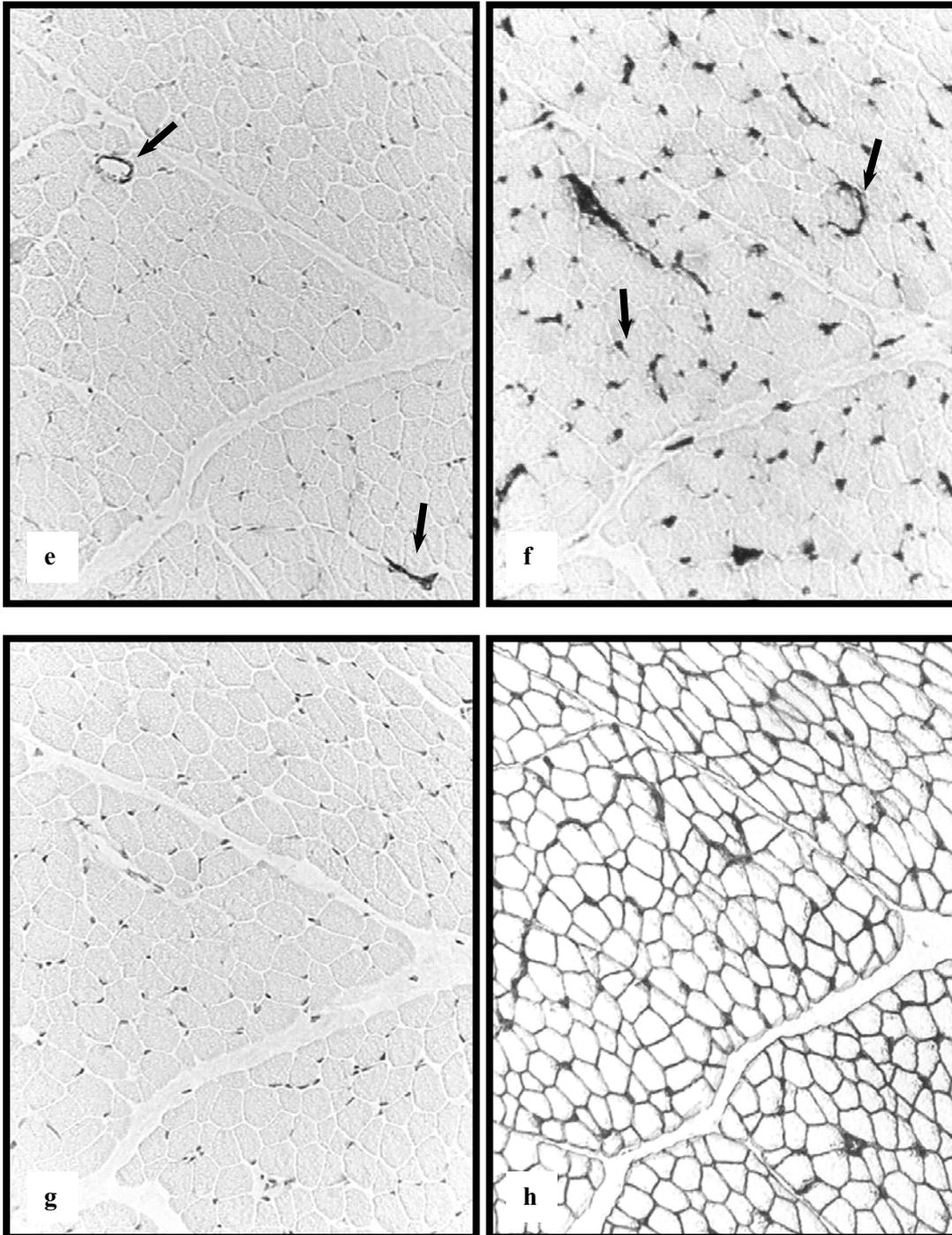
**Abb. A.1a-d:** Querschnitt Skelettmuskulatur, Normalbefund, Vergrößerung x 200.

**a:** Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung. Normale Architektur der Muskelfaszikel.

**b:** Van-Gieson-Färbung. Perimysiales Bindegewebe rosarot.

**c:** TGF- $\beta$ 1-Färbung. Perimysiales Bindegewebe schwach positiv markiert ( $\rightarrow$ ).

**d:** Tenascin-Färbung. Positiv markierte Gefäßendothelien ( $\rightarrow$ ).



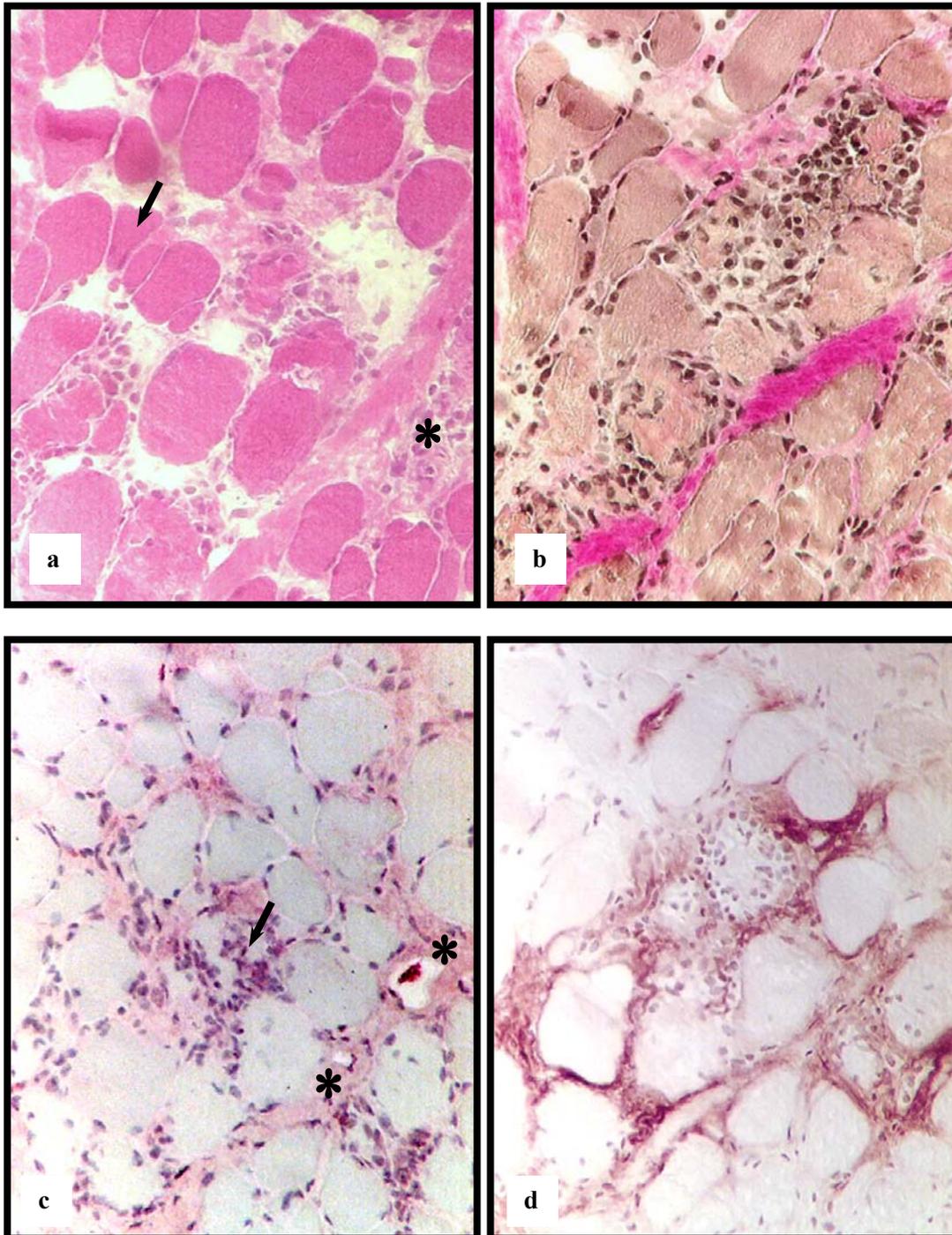
**Abb. A.1e-h** Normalbefund, Vergrößerung x 200.

**e:** Anti-Fibroblasten/-Fibrozyten-Färbung. Vereinzelt Fibrozyten perivaskulär (→).

**f:** Vimentin-Färbung. Positiv markierte Endothelien und Kapillaren (→).

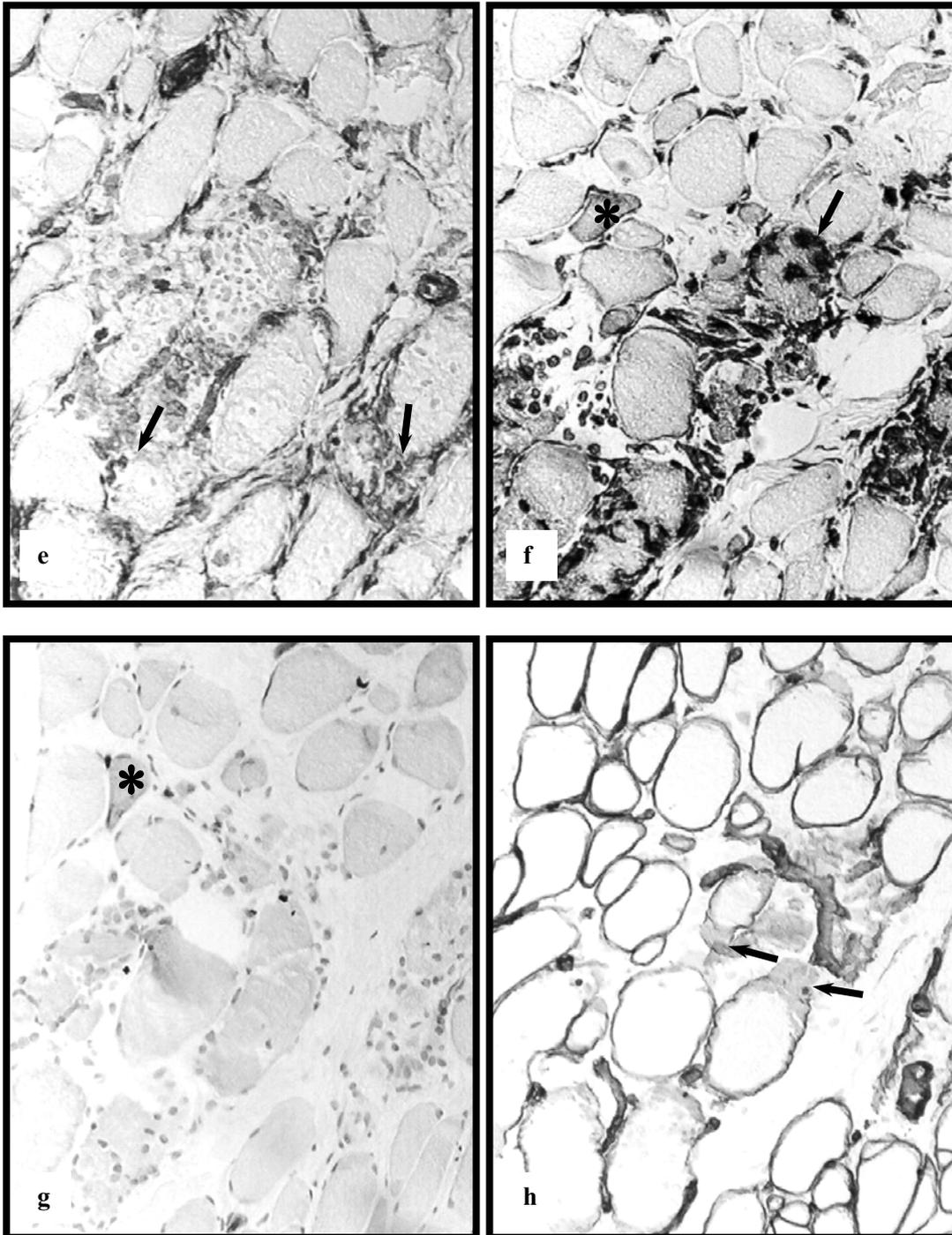
**g:** N-CAM-Färbung. Muskelfasern sind nicht angefärbt.

**h:** Kollagen-Typ-IV-Färbung. Positiv markierte Basalmembranen.



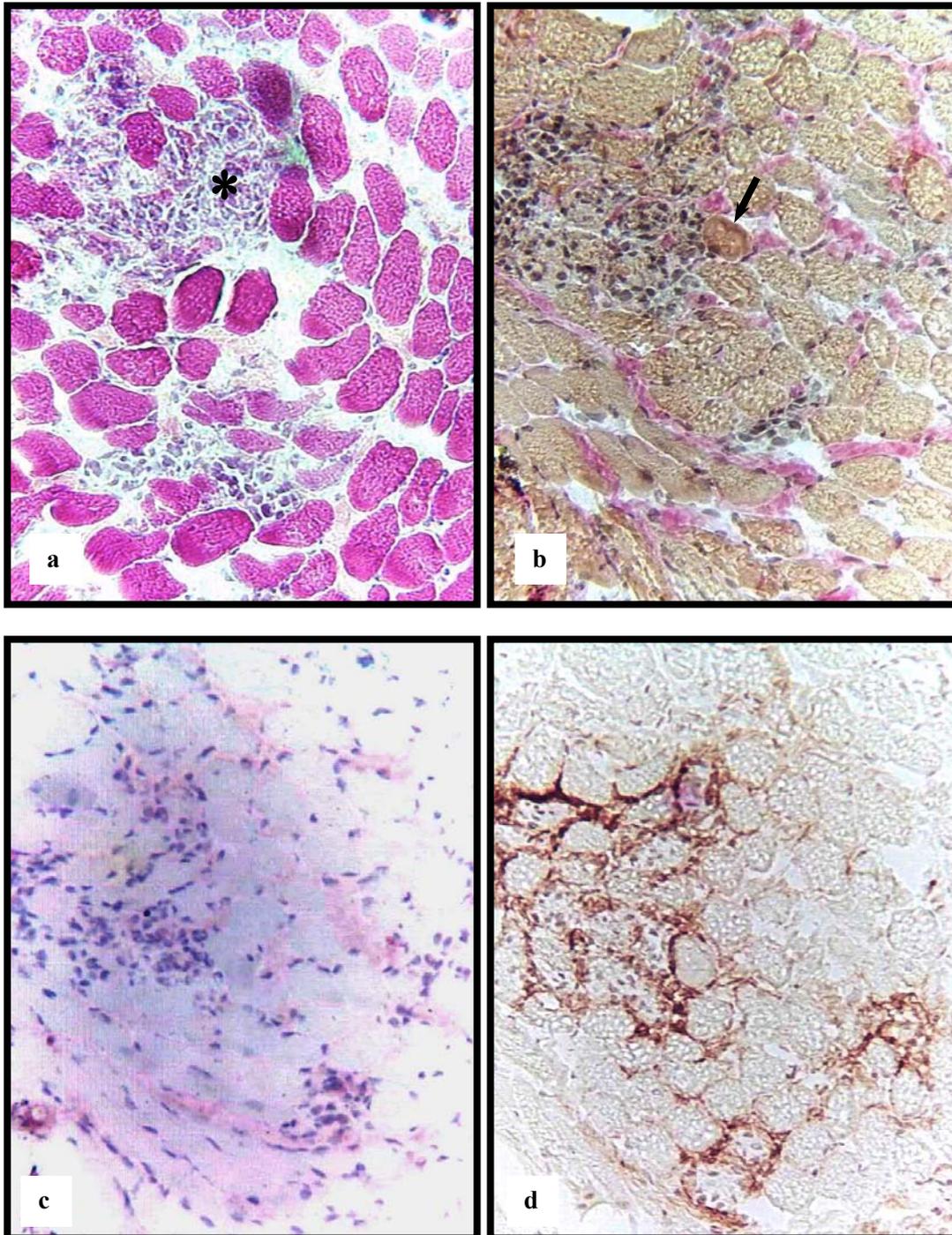
**Abb. A.2a-d:** Muskeldystrophie Duchenne, Vergrößerung x 200.

- a:** HE-Färbung. Myopathisches Gewebssyndrom mit Kalibervariationen, Faserabrundungen, opaken Fasern, regenerativen (→) und regressiven Faserveränderungen, Fasernekrosen (\*).
- b:** Van-Gieson-Färbung. Peri- und endomysiale Fibrose, fokale Akkumulation von lymphohistiozytären Zellen und Fibroblasten, Invasion in nekrotische Fasern.
- c:** TGF-β1-Färbung. Co-Lokalisation mit Fibrose (\*), aber nicht mit invadierenden Zellen (→).
- d:** Tenascin-Färbung. Focus im Bereich des Infiltrates.



**Abb. A.2e-h:** Muskeldystrophie Duchenne, Vergrößerung x 200.

- e:** Anti-Fibroblasten/-Fibrozyten-Färbung. Fibroblasten/ Fibrozyten (→) im Bereich von Abräumreaktionen.
- f:** Vimentin-Färbung. Positiv markierte Zellen, die in Muskelasern invadieren (→).  
Vimentin-positive Fasern mit überwiegend subsarkolemmal betontem Färbemuster (\*).
- g:** N-CAM-Färbung. Positiv markierte Fasern mit homogenem Muster (\*).
- h:** Kollagen-Typ-IV-Färbung. Breite und ausgefranste Basalmembranen in nekrot. Fasern (→).



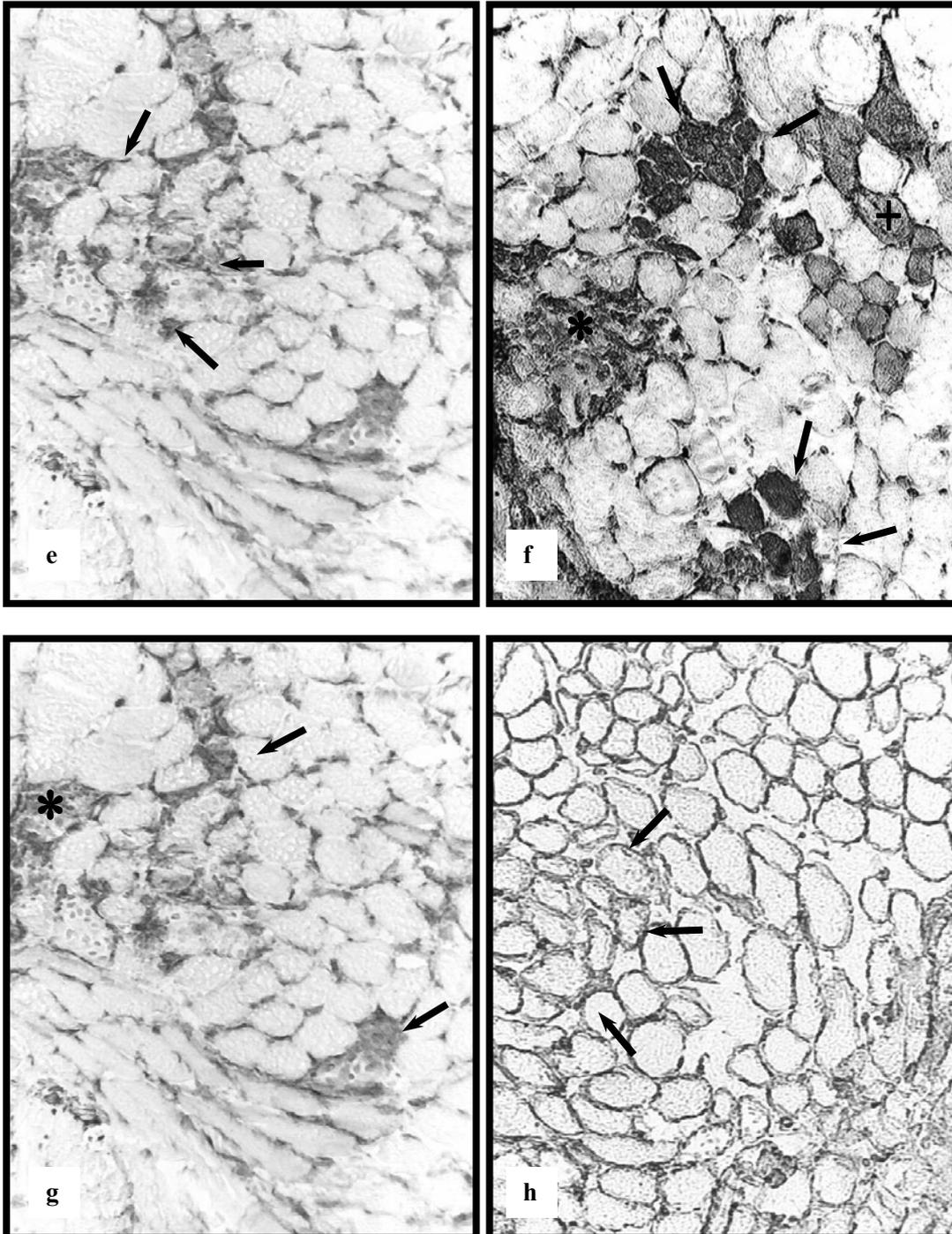
**Abb. A.3a-d:** Muskeldystrophie Duchenne, Vergrößerung x 200.

**a:** HE-Färbung. Fokale Zellakkumulation i.S. einer Abräumreaktion (\*).

**b:** Van-Gieson-Färbung. Opake Faser (→) im Bereich der Abräumreaktion.

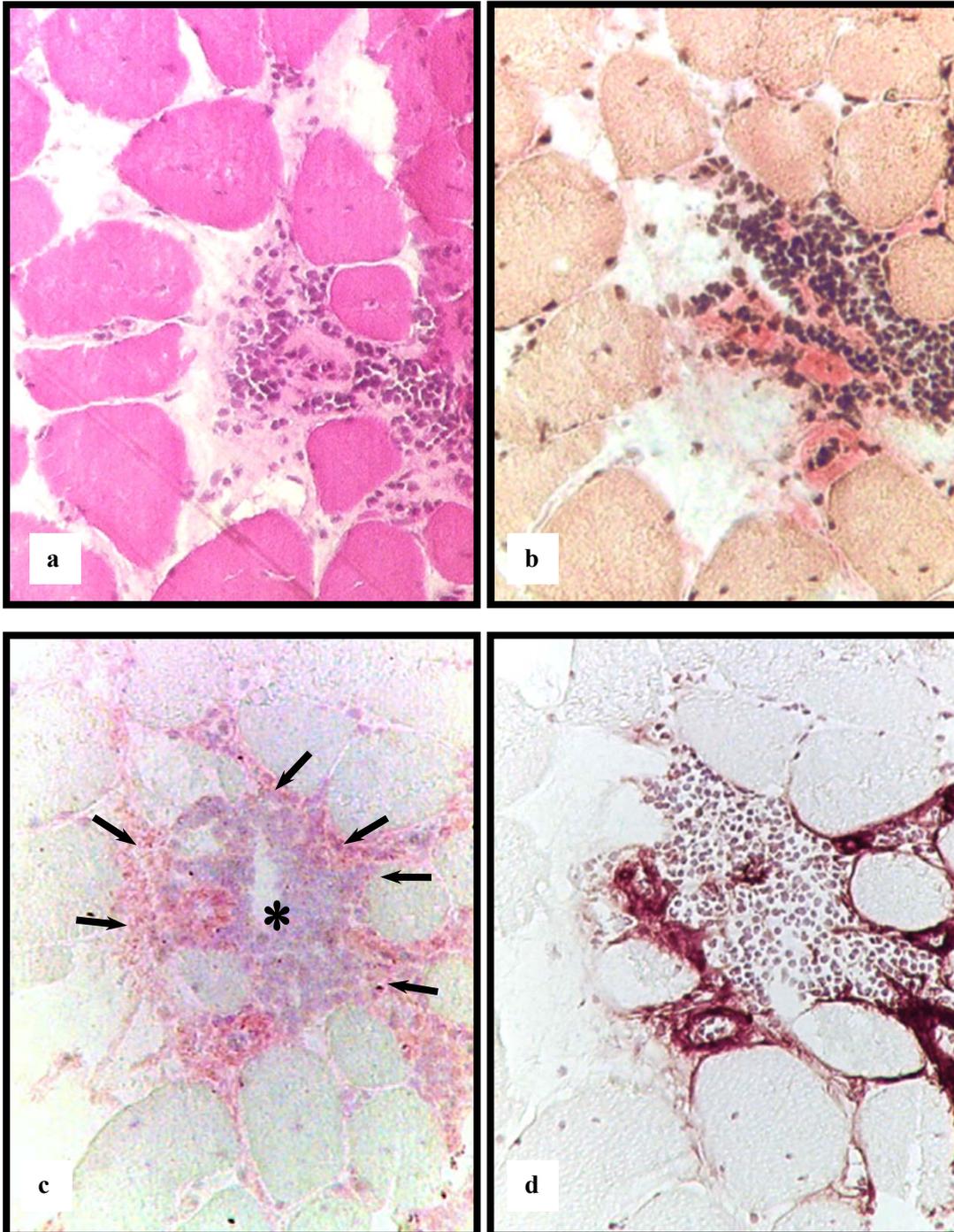
**c:** TGF- $\beta$ 1-Färbung. Diffuse Anfärbung des Bindegewebes.

**d:** Tenascin-Färbung. Fokale Ausprägung im Bereich der Abräumreaktion.



**Abb. A.3e-h:** Muskeldystrophie Duchenne, Vergrößerung x 200.

- e:** Anti-Fibroblasten/-Fibrozyten-Färbung. Fibroblasten im Bereich der Abräumreaktion (→).
- f:** Vimentin-Färbung. Kleine, kräftig angefarbte regenerierende Fasern im Bereich der fokalen Abräumreaktion (\*). In der näheren Umgebung der fokalen Zellakkumulation größere kräftig angefarbte Fasern (→) und schwächer angefarbte Fasern (+).
- g:** N-CAM-Färbung. Teilweise Übereinstimmung der angefarbten Fasern mit der Vimentin-Reaktivität im Bereich der Abräumreaktion (\*) und in deren Umgebung (→).
- h:** Kollagen-Typ-IV-Färbung. Fasern mit breiten und ausgefransten Basalmembranen (→).



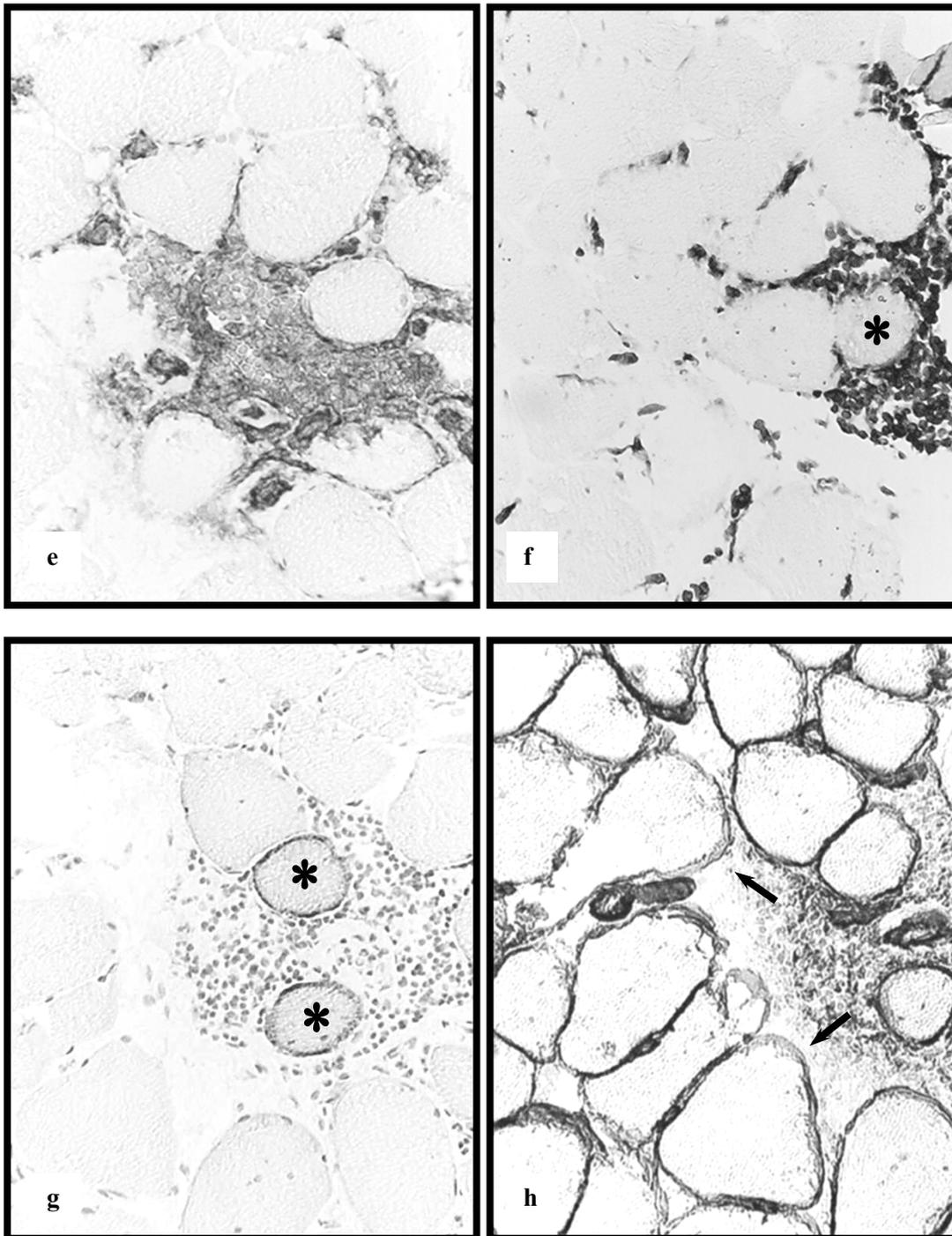
**Abb. A.4a-d:** Dermatomyositis, Vergrößerung x 400.

**a:** Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung. Infiltrat, atrophe und nekrotische Fasern; zentrale Kerne.

**b:** Van-Gieson-Färbung. Fokales Infiltrat, Bindegewebe vorwiegend in der Peripherie.

**c:** TGF- $\beta$ 1-Färbung. Positiv markiertes Bindegewebe in der Peripherie des Infiltrates ( $\rightarrow$ ); Zentrum bleibt weitestgehend ausgespart (\*).

**d:** Tenascin-Färbung. Fokal positiv markierte Fasermembranen im Bereich des Infiltrates.



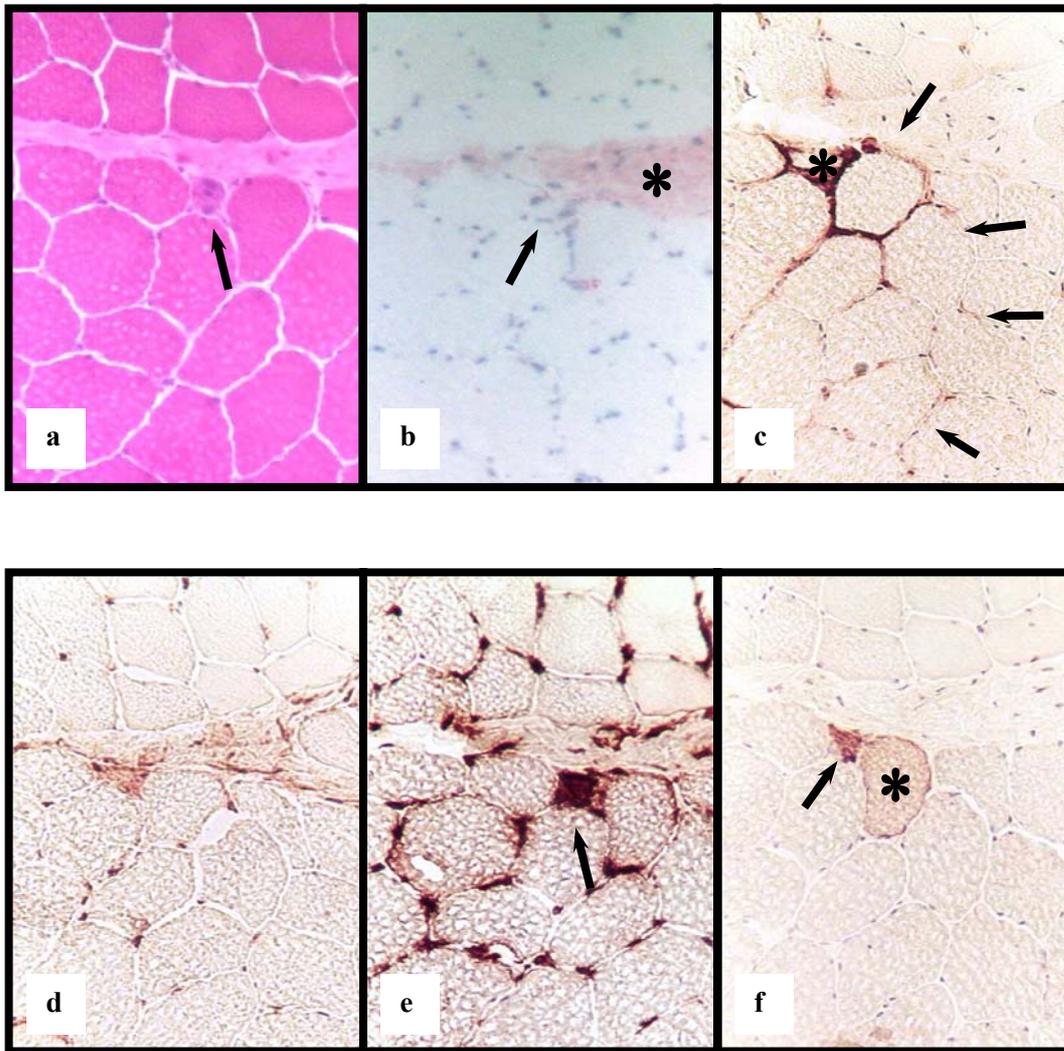
**Abb. A.4e-h:** Dermatomyositis, Vergrößerung x 400.

**e:** Anti-Fibroblasten/-Fibrozyten-Färbung. Zahlreiche positiv markierte Zellen im Bereich des Infiltrats.

**f:** Vimentin-Färbung. Positiv markierte Faser mit sarkolemalem Färbemuster (\*), positiv markierte nicht-parenchymale Zellen (Fibroblasten).

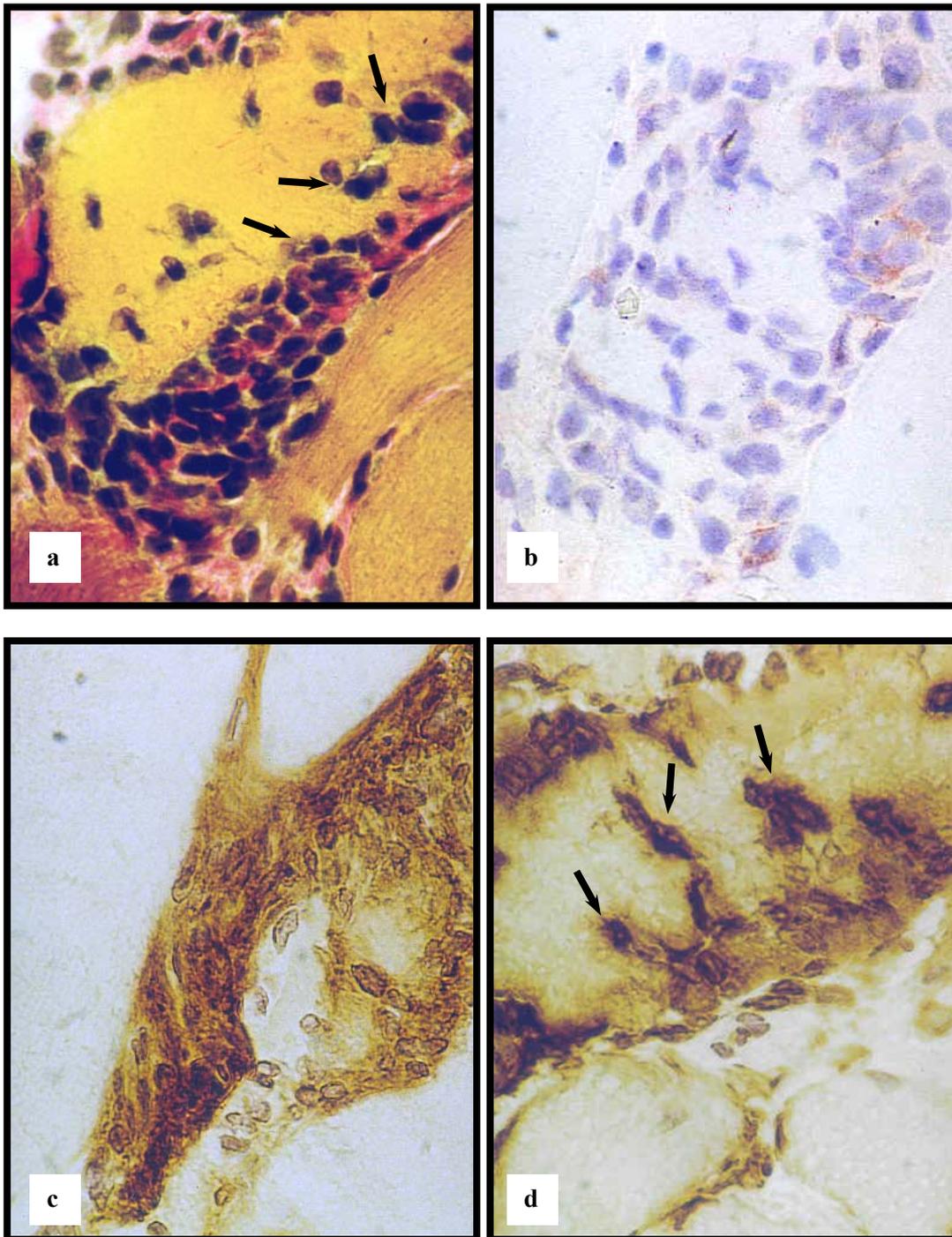
**g:** N-CAM-Färbung. Positiv markierte Muskelfasern mit sarkolemalem Färbemuster (\*).

**h:** Kollagen-Typ-IV-Färbung. Verbreiterte und ausgefranste Basalmembranen (→).



**Abb. A.5a-f:** Dermatomyositis, Vergrößerung x 200.

- a:** HE-Färbung. Basophile Faser mit zentral gelegenen Kernen (→).
- b:** TGF- $\beta$ 1-Färbung. Anfärbung des Bindegewebes (\*). Die regenerierende Faser selbst ist nicht angefärbt (→), auch in der Umgebung zeigt sich keine auffällig vermehrte Reaktivität.
- c:** Tenascin-Färbung. Im Bereich der regenerierenden Faser (\*) kräftige Immunreaktivität. Konfluierende Netzwerke, teils angedeutet (→).
- d:** Fibroblasten-Färbung. Fibroblasten analog zur Tenascin-Reaktivität verteilt.
- e:** Vimentin-Färbung. Die regenerierende Faser zeigt starke homogene Immunreaktivität (→).
- f:** N-CAM-Färbung. Neben der regenerierenden Faser mit homogenem Färbemuster (→) größere Faser mit sarkolemalem Färbemuster (\*).



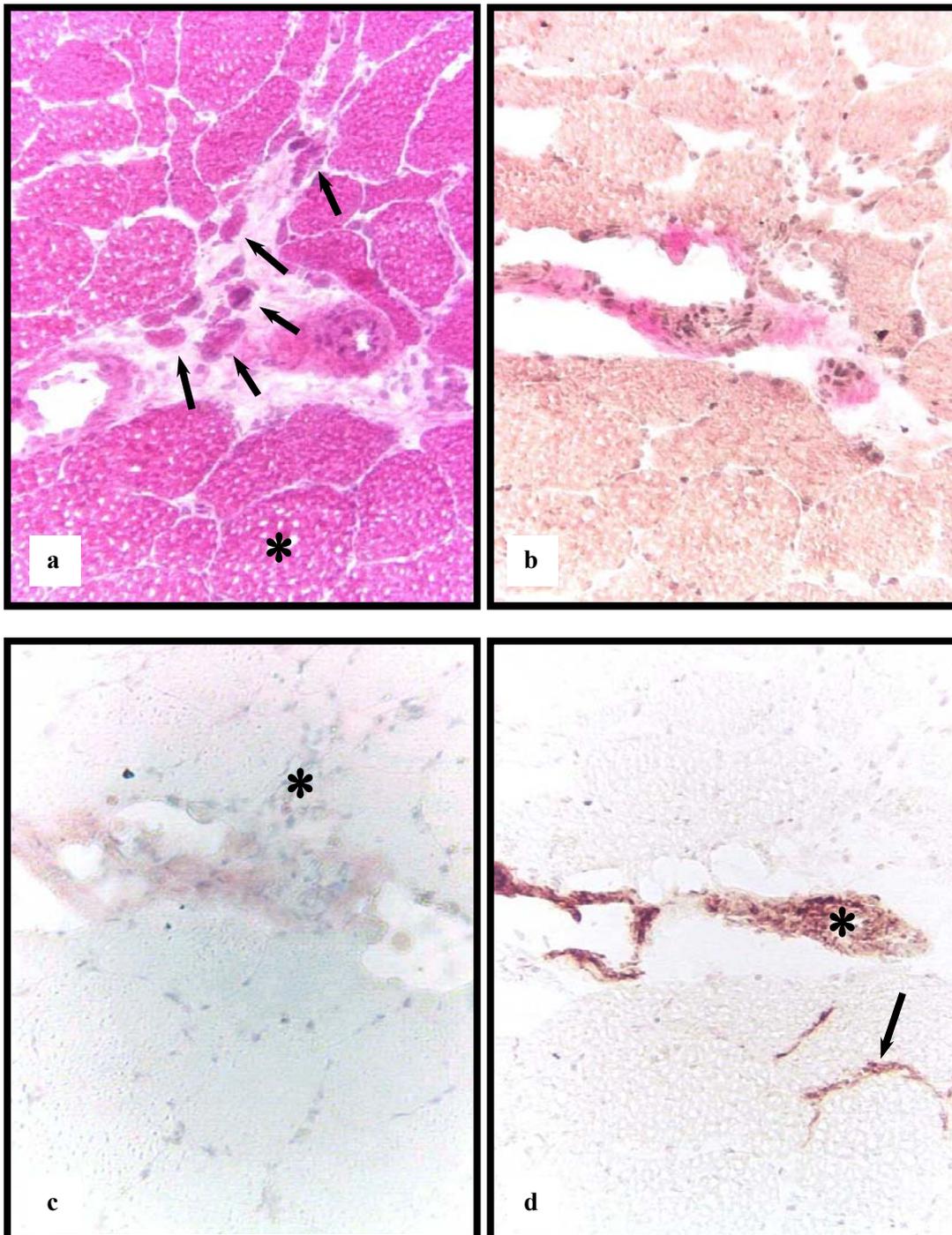
**Abb. A.6a-d:** Muskeldystrophie Duchenne, Vergrößerung x 400.

**a:** Van-Gieson-Färbung. Invasion nicht-parenchymaler Zellen in nekrotische Muskelfaser (→).

**b:** TGF- $\beta$ 1-Färbung. TGF- $\beta$ 1 ausschließlich extrazellulär.

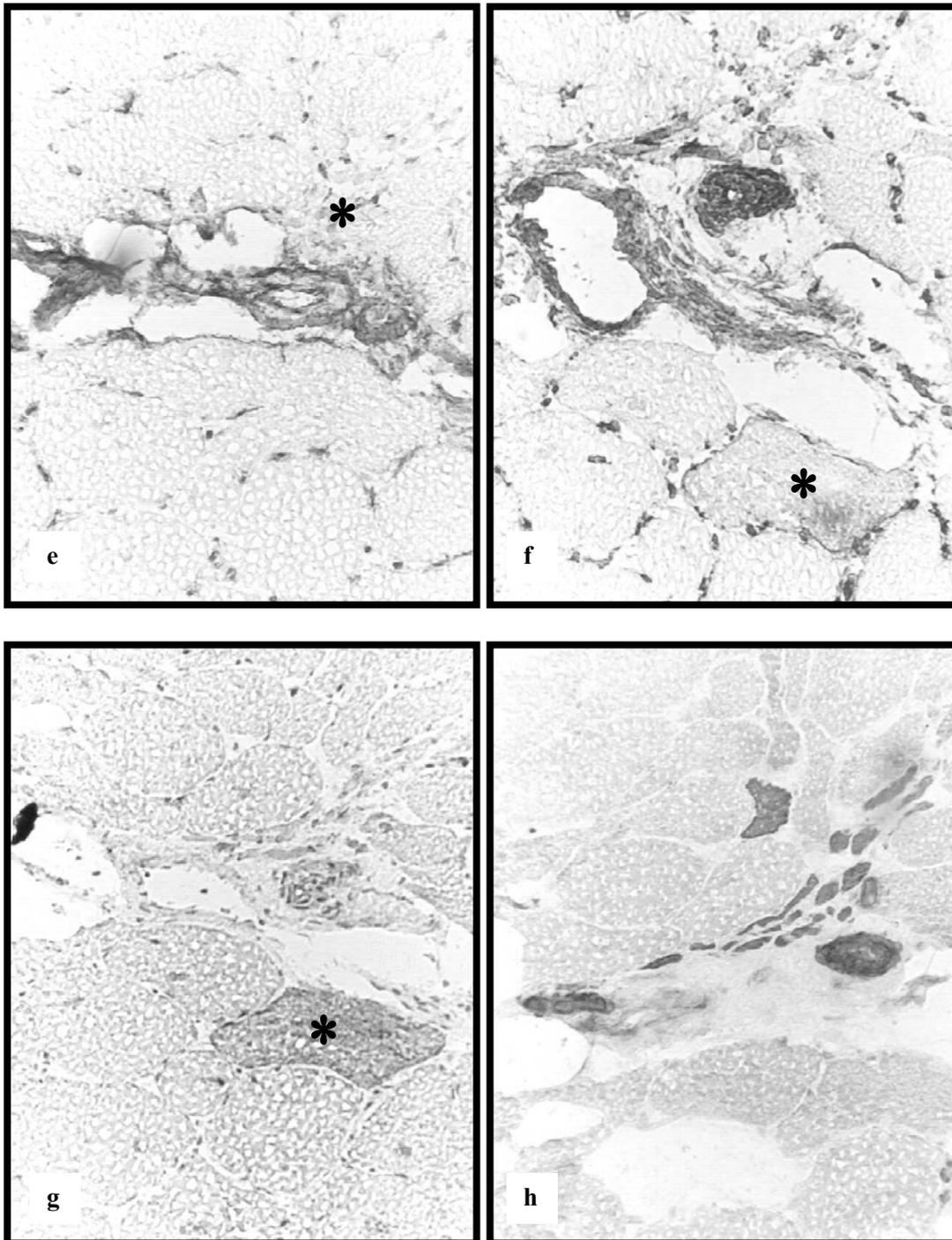
**c:** Tenascin-Färbung. Tenascin ausschließlich extrazellulär im Bereich des Infiltrates.

**d:** Vimentin-Färbung. Positiv markierte invadierende nicht-parenchymale Zellen (→).



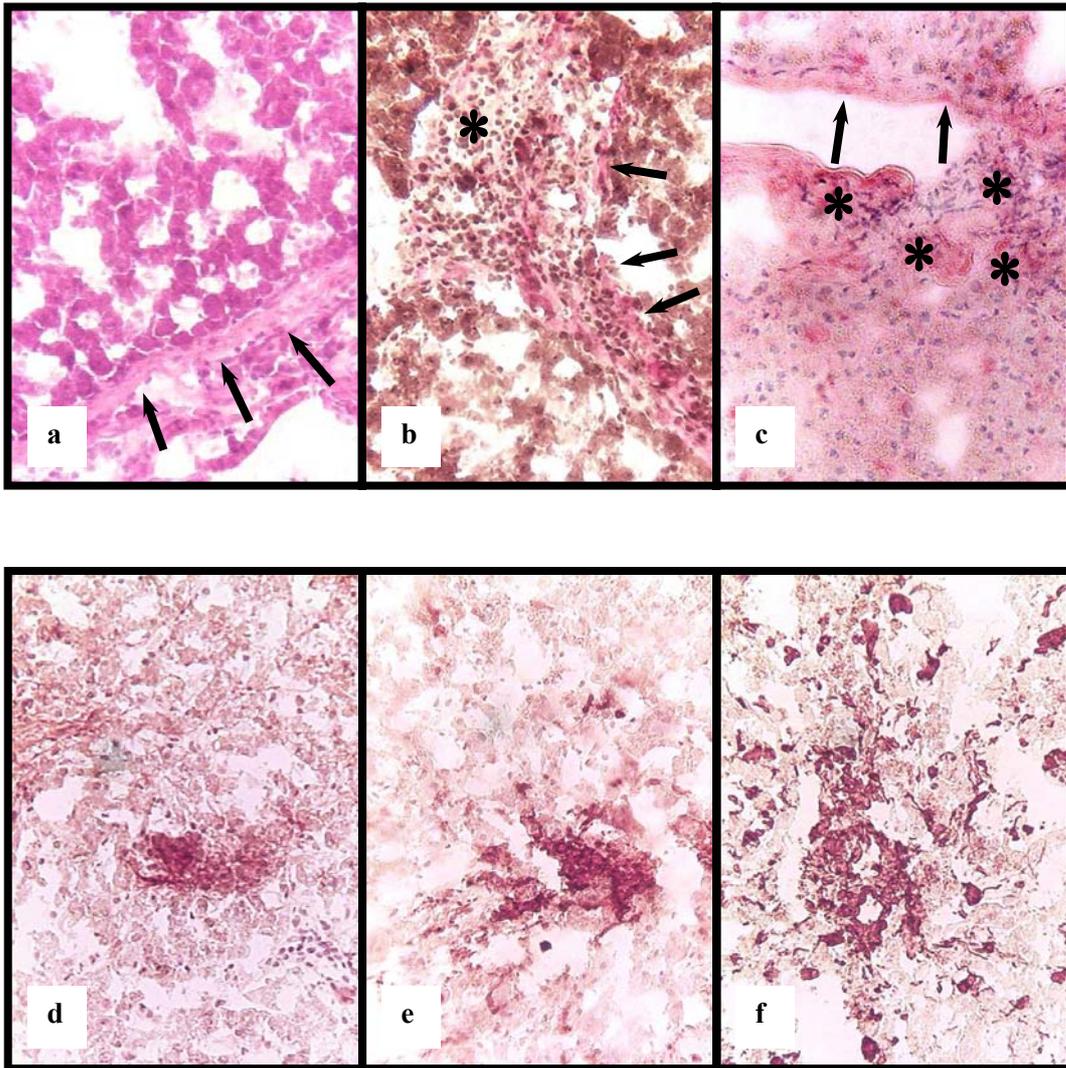
**Abb. A.7a-d:** ALS, Vergrößerung x 200.

- a:** HE-Färbung. Faseratrophie (Pfeile). Hypertrophe Fasern (\*) und Kalibervariationen.
- b:** Van-Gieson-Färbung. Allenfalls diskrete Bindegewebsvermehrung (rosa) im Bereich der Atrophie als Folge einer Abräumreaktion.
- c:** TGF- $\beta$ 1-Färbung. Bindegewebe mit schwacher Immunreaktivität, keine Anfärbung im Bereich der gruppierten atrophischen Fasern (\*).
- d:** Tenascin-Färbung. Perimysiale Reaktivität im Bereich eines Blutgefäßes (\*), wo sich auch vermehrt Fibroblasten befinden. Zusätzlich auch vereinzelte endomyxiale Reaktivität (→).



**Abb. A.7e-h:** ALS, Vergrößerung x 200.

- e:** Anti-Fibroblasten/-Fibrozyten-Färbung. Fibroblasten vorwiegend im perimysialen Bindegewebe, vereinzelt auch endomysial. Kein eindeutiger Zusammenhang mit gruppierten atrophischen Fasern (\*) erkennbar.
- f:** Vimentin-Färbung. Einzelne Faser mit sehr diskreter intrazellulärer Immunreaktivität (\*).
- g:** N-CAM-Färbung. Dieselbe Faser (\*) mit deutlicher homogener Anfärbung.
- h:** Myofibrilläre ATPase-Reaktion. Überwiegende Atrophie von Typ-II-Fasern (dunkel).



**Abb. A.8a-f:** Leberzirrhose, Vergrößerung x 200.

- a:** HE-Färbung. Aktive Bindegewebssepten (→). In der Umgebung Pseudoleberläppchen ohne Zentralvene.
- b:** van-Gieson-Färbung. Kollagenfaserzüge (→) bei fibrös-narbiger Parenchymzergliederung. Fokale Leukozytenvermehrung (\*).
- c:** TGF- $\beta$ 1-Färbung. Deutliche Immunreaktivität im Bereich fibrotischer Areale in Umbauzonen (\*). Vereinzelt intrazelluläre Aktivität in Endothelzellen (→).
- d:** Tenascin-Färbung. Immunlokalisation im Bereich einer fokalen Zellakkumulation in einer aktiven Übergangszone.
- e:** Fibroblasten-Färbung. Es handelt sich um dasselbe Areal wie bei (d). Fokale Vermehrung von Fibroblasten, zungenförmiger Übergriff auf das Parenchym.
- f:** Vimentin-Färbung. Bei den Zellen mit intrazytoplasmatischer Immunreaktivität handelt es sich u.a. um Myofibroblasten, die aus Fettspeicherzellen oder Ito-Zellen hervorgehen.

**A.3 LITERATURVERZEICHNIS**

Andres J.L., Stanley K., Cheifetz S., Massagué J.: Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. *J. Cell. Physiol.* 1989; 109: 3137-3145.

Antonelli J.R.: Ossifying fibroma of the maxillary sinus: a case report. *Ann. Dent.* 1989; 48(1): 33-36.

Arahata K., Engel A.G.: Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I. Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Ann. Neurol.* 1984; 16: 193-208.

Arahata K., Ishiura S., Ishiguro T., Tsukahara T., Suhara Y., Eguchi C., Ishihara T., Nonaka I., Ozawa E., Sugita H.: Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* 1988; 333: 861-863.

Assoian R.K., Komoriya A., Meyers C.A., Miller D.M., Sporn M.B.: Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 1983; 258(11): 7155-7160.

Assoian R.K., Fleurdelys B.E., Stevenson H.C., Miller P.J., Madtes D.K., Raines E.W., Ross R., Sporn M.B.: Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84(17): 6020-6024.

Assoian R., Sporn M.B. : Type  $\beta$  transforming growth factors in human platelets: release during platelet granulation and action on vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Biol.* 1986; 102: 1217-1223.

Banker B.Q.: Dermatomyositis of childhood. Ultrastructural alterations of muscle and intramuscular blood vessels. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1975; 34: 46-75.

Banker B.Q.: The congenital muscular dystrophies. In: Engel A.G., Fanzini-Armstrong C., editors. *Myology*, Volume 1. New York: McGraw-Hill 1994: 1275-1289.

Bascom C.C., Sipes N.J., Coffey R.J., Moses H.L.: Regulation of epithelial cell proliferation by transforming growth factors. *J. Cell. Biochem.* 1989; 39: 183-90.

Battaglia C., Mayer U., Aumalley M., Timpl R.: Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nitogen by sites in the protein core. *Eur. J. Biochem.* 1992; 208(2): 359-366.

Behr Th.M.: Immunhistologische Darstellung skelettmuskelloassoziierter Proteine in der humanen Muskelgewebekultur und bei dystrophischen Myopathien. Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1994.

Bell C.: *The Nervous System of the Human Body*. 2<sup>nd</sup> ed. Longman & others, London 1830 (zitiert nach dem Index-Catalogue of the Library of the Surgeon-General's Office, United States Army, Vol. I, Government Printing Office, Washington 1880).

Bender A., Ernst N., Iglesias A., Dornmaier K., Wekerle H., Hohlfeld R.: T cell receptor repertoire in polymyositis: clonal expansion of autoaggressive CD8<sup>+</sup>T cells. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 1863-1868.

Bernasconi P., Di Blasi C., Mora M., Morandi L., Galbiati S., Confalonieri P., Cornelio F., Mantegazza R.: Transforming growth factor- $\beta$ 1 and fibrosis in congenital muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders* 1999; 9: 28-33.

Bernasconi P., Torchiana E., Confalonieri P., Brugnoli R., Barresi R., Mora M., Cornelio F., Morandi L., Mantegazza R.: Expression of transforming growth factor - beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic Zytokine. *J. Clin. Invest.* 1995; 96(2): 1137-1144.

Bonewald L.F.: Regulation and regulatory activities of transforming growth factor beta. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 1999; 9(1): 33-44.

Bonilla E., Samitt C.E., Miranda A.F., Hays A.P., Salvati G., DiMauro S., Kunkel L.M., Hoffman E.P., Rowland L.P.: Duchenne muscular dystrophy: Deficiency of dystrophin at the muscular cell surface. *Cell* 1988; 54: 447.

Border W.A., Noble N.A.: Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *New England Journal of Medicine* 1994; 331:1286-1292.

Bornemann A., Schmalbruch, H.: Anti-vimentin staining in muscle pathology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1993; 19(5): 414-419.

Brown P.D., Wakefield L.M., Levison A.D., Sporn M.B.: Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factors beta's 1, 2 and 3. *Growth Factors* 1990; 3: 35-43.

- Brown, C.H.: Infantile amyotrophic lateral sclerosis of the familial type. *J. Nerv. Ment. Dis.* 1986; 21: 707-716.
- Carpenter J.L., Hoffman E.P., Romanul F.C., Kunkel L.M., Rosales R.K., Ma N.S., Dasbach J.J., Rae J.F., Moore F.M., McAfee M.B.: Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am. J. Pathol.*, 1989; 135: 909-919.
- Chimal-Monroy J., Diaz deLeon L.: Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilage condensations. *Int. J. Dev. Biol.* 1999; 43(1): 59-67.
- Chiquet M., Fambrough, D.: Chick myotendinous antigen. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis, *J. Cell. Biol.* 1984; 98: 1926-1936.
- Chiquet M., Vrucinic-Filipi N., Schenk S., Beck K., Chiquet-Ehrismann R.: Isolation of chick tenascin variants and fragments, *Eur. J. Biochem.* 1991; 199, 379-388.
- Chiquet-Ehrismann R.: What distinguishes tenascin from fibronectin? *FASEB J.* 1990; 2: 2598-2604.
- Chiquet-Ehrismann R.: Tenascin, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia* 1995; 51(9-10): 853-862.
- Coffey, R.J., Kost L.J., Lyons R.M., Moses H.L., LaRusso N.F.: Hepatic processing of transforming growth factor-beta in the rat. *J. Clin. Invest.* 1987; 263: 5707-5713.
- Confalonieri P., Bernasconi P., Cornelio F., Mantegazza R.: Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Polymyositis and Dermatomyositis Correlates with Fibrosis but not with Mononuclear Cell Infiltrate. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1997; 56(5): 479-484.
- Covault J., Sanes J.R.: Neural cell adhesion molecule (NCAM) accumulates in denervated and paralyzed skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985; 82: 4544-4548.
- Covault J., Merlie J.P., Goridis C., Sanes J.R.: Molecular isoforms of N-CAM and its RNA in developing and denervated skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 1986; 102: 731-739.
- Cullen M.J., Walsh J., Nicholson L.V.B., Harris J.B.: Ultrastructural localization of dystrophin in human muscle using gold immunolabelling. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1990; 240: 197-210.
- Cunningham B.A., Hemperly J.J., Murray B.A., Prediger E.A., Brackenbury R., Edelman G.M.: Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 1987; 236: 799-806.

Dalakas M.C.: Immunopathogenesis of inflammatory myopathies. *Ann. Neurol.* 1995; 37(S1): S74-S86.

Daniloff J.K., Levi G., Grumet M., Rieger F., Edelman G.M.: Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair. *J. Cell. Biol.* 1986; 103 (3): 929-945.

Daniloff J.K., Crossin K.L., Pincon-Raymond M., Murawski M., Rieger F., Edelman G.M.: Expression of cytotactin in the normal and regenerating nervous system. *J. Cell. Biol.* 1989; 108: 625-635.

Davidson J.M.: Wound repair. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. J.I. Gallin, I.M. Goldstein and R. Snyderman, editors. Raven Press Ltd., New York 1992; 809-819.

Derynck R., Jarrett J.A., Chen E.Y., Eaton D.H., Bell J.R., Assoian R.K., Roberts A.B., Sporn M.B., Goeddel D.V.: Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316(6030): 701-705.

DiMario J., Buffinger N., Yamada S., Strohmann C.: Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science* 1989; 44: 688-690.

Dubowitz V.: The muscular dystrophy. In: *Muscle Biopsy: A practical Approach*. 2<sup>nd</sup> edition, Bailliere Tindall, East Sussex U.K. 1985; 289-404.

Duchenne G.B.A.: Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclerosique. *Arch. gén. de med.* 1868; 11: 5-25, 179-209, 305-321, 421-443, 552-588.

Eickelberg O., Köhler E., Reichenberger F., Bertschin S., Woodtli Th., Erne P., Perruchaud A.P., Roth M.: Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3. *Am. J. Physiol.* 1999; 276: L814-L824.

Emslie-Smith A.M., Arahata K., Engel A.G.: Major histocompatibility class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies. *Hum. Pathol.* 1989; 20: 224-231.

End P., Panayotou G., Entwistle A., Waterfield M.D., Chiquet M.: Tenascin: a modulator of cell growth. *Eur. J. Biochem.* 1992; 209: 1041-1051.

Engel A.G.: Immuneffektormechanismen bei entzündlichen Myopathien: Klinische Bedeutung, therapeutische Auswirkungen. In: Pongratz, D., Reimers C.D., Schmidt-Achert M. (Hrsg.): *Aktuelle Myologie*. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1992; 42-54.

Engel A.G., Banker B. (Hrsg.): Myology. McGraw Hill, New York 1986.

Engel A.G., Hohlfeld R., Banker B.Q.: Polymyositis and Dermatomyositis Syndromes. In: Engel A.G., Franzini-Armstrong C. (Hrsg.): Myology. McGraw-Hill, New York 1994; 1335-1383.

Engel A.G., Tsujihata M., Jerusalem F.: Quantitative assessment of motor endplate ultrastructure in normal and diseased human muscle. In: Dyck P.M., Thomas P.K., Lambert E.H., Bunge R. (Hrsg.): Peripheral Neuropathy Vol. I, 1984; 871-882.

Engel A.G., Yamamoto M., Fischbeck K.H.: Dystrophinopathies. In: Engel A.G., Franzini-Armstrong C. (Hrsg.): Myology. McGraw-Hill, New York 1994: 1133-1187.

Erickson H.P., Bourdon M.A.: Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1989; 5: 71-92.

Espevik T., Waage A., Faxvaag A., Shalaby M.R.: Regulation of interleukin-2 and interleukin-6 production from T-cells: involvement of interleukin-1 $\beta$  and transforming growth factor- $\beta$ . *Cell. Immunol.* 1990; 126: 47-56.

Fanin M., Angelini C.: Regeneration in sarcoglycanopathies: expression of sarcoglycans and other muscle proteins. *Journal of the Neurological Sciences* 1999; 165: 170-177.

Gatchalian C.L., Schachner M., Sanes J.R.: Fibroblasts that proliferate near denervated synaptic sites in skeletal muscle synthesize the adhesive molecules tenascin (J1), N-CAM, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan. *J. Cell. Biol.* 1989; 108: 1873-1890.

Gerogatos S.D., Blobel G.: Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and nuclear envelope in avian erythrocytes: A basis for vectorial assembly of intermediate filaments. *J. Cell. Biol.* 1987; 105: 105-115.

Gullberg D., Velling T., Sjöberg G., Salmivirta K., Gaggero B., Tiger C.F., Edström L., Sejersen T.: Tenascin-C expression correlates with macrophage invasion in Duchenne muscular dystrophy and in myositis. *Neuromuscular Disorders* 1997; 7: 39-54.

Hargis, A. M., Haupt K.H., Prieur D.J., Moore M.P.: Animal model of human disease. Dermatomyositis. Familiar canine dermatomyositis. *Am. J. Pathol.* 1985; 120(2): 323-325.

Hoffman E.P., Brown R.H., Kunkel L.M.: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1987; 51: 919-928.

Hohlfeld R.: Induction of HLA DR expression on human myoblasts with interferon gamma. *Am. J. Pathol.* 1989; 136: 503-508.

Hohlfeld R.: Mechanismen der Autosensibilisierung bei muskulären Autoimmun-Erkrankungen. In: Pongratz, D., Reimers C.D., Schmidt-Achert M. (Hrsg.): Aktuelle Myologie. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1992; 38-41.

Hohlfeld R: Immunpathogenese der Myositiden. *Management of Neuromuscular Diseases.* Letter Nr. 2, Ausg.1/1996.

Hohlfeld R., Engel A.G.: The immunobiology of muscle. *Immunol. Today* 1994; 15: 269-274.

Hurme T., Kalimo H.: Adhesion in skeletal muscle during regeneration. *Muscle Nerve* 1992; 15: 482-489.

Husmann I., Soulet L., Gautron J., Martelli F., Barritault D.: Growth Factors in Skeletal Muscle Regeneration. *Zytokine & Growth Factor Reviews* 1996; 7( 3): 249-258.

Hynes R.O., Lander A.D.: Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 1992; 68: 303-322.

Iannaccone S., Quattrini A., Smirne S., Sessa M., de Rino F., Ferini-Strambi L., Nemni R.: Connective tissue proliferation and 5growth factors in animal models of Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 1995; 128: 36-44.

Ignotz R.A., Endo T., Massague J.: Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 1987; 262(14): 6443-6446.

Illa I., Leon-Monzon M., Dalakas M.C.: Regenerating and Denervated Human Muscle Fibers and Satellite Cells Express Neural Cell Adhesion Molecule Recognized by Monoclonal Antibodies to Natural Killer Cells. *Ann. Neurol.* 1992; 31:46-52.

Jerusalem F.: Entzündliche Muskelerkrankungen: Polymyositis, Dermatomyositis, Overlap-Syndrome, Mixed Connective Tissue Disease. In: Seitz D., Vogel P. (Hrsg.): Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Bd. 2: Hämoblastosen, Zentrale Motorik, Iatrogene Schäden, Myositiden. Springer, Berlin – Heidelberg – New York – Tokyo 1983; 309-325.

Jerusalem F.: Muskelerkrankungen. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart 1991.

Jones F.S., Burgoon M.P., Hoffman S., Crossin K.L., Cunningham B.A., Edelman G.M.: A cDNA clone for cytactin contains sequences similar to epidermal growth factor-line repeats and segments of fibronectin and fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 2186-2190.

Jullien P., Berg T.M., Laurence D.A.: Acidic cellular environments: activation of latent TGF- $\beta$  and sensitization of cellular responses to TGF- $\beta$  and ERGF. *Int. J. Cancer* 1989; 43: 886-891.

Kanzaki T., Olofsson A., Moren A., Wernstedt C., Hellman U., Miyazono K., Claesson-Welsh L., Heldin C.H.: TGF  $\beta$ 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF  $\beta$ 1 with multiple repeat sequences. *Cell* 1990; 61: 1051-61.

Kim S.J., Angel P., Lafyatis R., Hattori K., Kim K.Y., Sporn M.B., Karin M., Roberts A.B.: Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol. Cell. Biol.* 1990; 10(4): 1492-1497.

Kim S.J., Park K., Koeller D., Kim K.Y., Wakefield L.M., Sporn M.B., Roberts A.B.: Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor- $\beta$ 1 gene. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 13702-13707.

Kornegay J.N., Tuler S.M., Miller D.M., Levesque D.C.: Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve*, 1988; 11: 1056-1064.

Kovacs, E.J.: Fibrogenic Zytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol. Today*. 1991; 12: 17-23.

Kunkel L.M., Monaco A.P., Middlesworth W.: Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985; 82: 4778-4782.

Lanier L.L., Le A.M., Civin C.I.: The relationship of CD 16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 1986; 136: 4480-4486.

Lefaucheur J.P., Pastoret C., Sebille A.: Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat. Rec.* 1995; 242(1): 70-76.

Lehnert S.A., Akhurst R.J.: Embryonic expression pattern of TGF beta type-1 RNA suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action. *Development* 1988; 104(2): 263-273.

Leonhardt H.: Bindegewebe. In: Leonhardt: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York 1990; 113-133.

Leonhardt H.: Quergestreiftes Muskelgewebe. In: Leonhardt: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York 1990; 202-213.

Mackie E.J.: Molecules in focus: tenascin-C. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1997; 29(10): 1133-1137.

Mackie E.J., Abraham L.A., Taylor S.L., Tucker R.P., Murphy L.I.: Regulation of Tenascin-C expression in bone cells by transforming growth factor-beta. *Bone* 1998; 22(4): 301-307.

Mackie E.J., Scott-Burden T., Hahn A.W., Kern F., Bernhardt J., Regenass S., Weller A., Buhler F.R.: Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. *Am. J. Pathol.* 1992; 141: 377-388.

Mantegazza R., Andretta F., Oksenberg J.R.: Molecular analysis of TCR repertoire of T lymphocyte infiltrate in polymyositis: evidence for restricted TCR V $\alpha$  and V $\beta$  rearrangements. *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 2880-2886.

Mantegazza R., Bernasconi P.: Cellular aspects of myositis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1994; 6(6): 568-74.

Martini R., Schachner M.: Complex expression pattern of tenascin during innervation of the posterior limb buds of the developing chicken, *J. Neurosci. Res.* 1991; 28: 261-279.

Massagué J.: The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1990; 6: 597-641.

Massagué J.: TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67: 753-791.

Massagué J.L., Attisano L., Wrana J.L.: The TGF- $\beta$  family and its composite receptors. *Trends Cell. Biol.* 1994; 4: 172-178.

Massagué J.L., Weis-Garcia F.: Serine / threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv.* 1996; 27: 41-64.

Matsumura K., Campbell K.P.: Dystrophin-glycoprotein complex: Its role in the pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 1994; 17(1): 2-15.

McCachren S.S., Lightner V.A.: Expression of human tenascin in synovitis and its regulation by interleukin-1. *Arthritis Rheum.* 1992; 35: 1185-1196.

McDouall R.M., Dunn M.J., Dubowitz V.: Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 1990; 99: 199-217.

Mitsumoto H., Hanson M.R., Chad D.A.: Amyotrophic Lateral. Sclerosis. Recent Advances in Pathogenesis and Therapeutic Trials. *Arch. Neurol.* 1988; 45: 189-202.

Miyazono K., Olofsson A., Colosetti P., Heldin C.H.: A role of the latent TGF  $\beta$ 1 binding protein in the assembly and secretion of TGF  $\beta$ 1. *EMBO J.* 1991; 10: 1091-101.

Mizoi T., Ohtani H., Miyazono K., Miyazawa M., Matsuno S., Nagura H.: Immunoelectron microscopic localization of transforming growth factor beta 1 and latent transforming growth factor beta 1 binding protein in human gastrointestinal carcinomas: qualitative difference between cancer cells and stromal cells. *Cancer Res.* 1993; 53: 183-190.

Monaco A.P., Neve R.L., Colletti-Feener C., Bertelson C.J., Kurnit D.M., Kunkel L.M.: Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne Muscular dystrophy gene. *Nature* 1986; 323: 646-650.

Morin S., de la Porte S., Fiszman M, Koenig J.: Inhibition of proliferation in 8-week-old mdx mouse muscle fibroblasts in vitro. *Differentiation* 1995; 59(3): 145-154.

Müller-Felber W., Küllmer K., Fischer P., Reimers C.-D., Wagner S., Harland U., Schmidt-Achert M., Pongratz D.: Fibre type specific expression of Leu19-antigen and N-CAM in skeletal muscle in various stages after experimental denervation. *Virchows Archiv A. Pathol. Anat.* 1993; 422: 277-283.

Müller-Felber W., Toepfer M., Müller T., Müller-Höcker J., Fischer P., Lochmüller H., Pongratz D.: Tenascin is a Useful Marker in the Diagnosis of Inflammatory Myopathies. *Eur. J. Med. Res.* 1998; 3: 281-287.

Murakami R., Yamaoka I., Sakakura T.: Appearance of tenascin in healing skin of the mouse: possible involvement in seaming of wounded tissues. *Int. J. Dev. Biol.* 1989; 33: 439-444.

Nagy P., Schaff Z., Iapis K.: Immunohistochemical detection of transforming growth factor- $\beta$ 1 in fibrotic liver disease. *Hepatology* 1991; 14: 269-273.

Olofsson A., Miyazono K., Kanzaki T., Colosetti P., Engstrom U., Heldin C.H.: Transforming growth factor  $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 secreted by human glioblastoma cell line. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 19482-19488.

Orimo S., Koga R., Goto K., Nakamura K., Arai M., Tamaki M., Sugita H., Nonaka I., Arahata K.: Immunohistochemical analysis of perforin and granzyme A in inflammatory myopathies. *Neuromuscular Disorders* 1994; 4: 219-226.

Padgett R.W., Cho S.H., Evangelista C.: Smads are the central component in transforming growth factor-beta signalling. *Pharmacol. Ther.* 1998; 78(1): 47-52.

- Partridge T.: Animal models of muscular dystrophy, what can they teach us? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1991; 17: 353-363.
- Pastoret C., Sebille A.: mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J. Neurol. Sci.* 1995; 129(2): 97-105.
- Pastoret C., Sebille A.: Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle Nerve* 1995; 18(10): 1147-1154.
- Paulsson M.: Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1992; 27(1-2): 93-127.
- Pearson C.A., Pearson D., Shibahara S., Hofsteenge J., Chicket-Ehrismann R.: Tenascin cloning and induction by TGF-beta. *EMBO J.* 1993; 7: 2977-2982.
- Pertovaara L., Sistonen L., Bos T.J., Vogt P.K., Keski-Oja J., Alitalo K.: Enhanced jun gene expression is an early genomic response to transforming growth factor beta stimulation. *Mol. Cell. Biol.* 1989; 9(3): 1255-1262.
- Pollman M.J., Naumovski L., Gibbons G.H.: Cell Type-Specific Modulation by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Endothelial Cells Versus Smooth Muscle Cells. *Circulation* 1999; 99: 2019-2026.
- Pongratz D.: Dermatomyositis, Polymyositis, Einschlußkörpermyositis. Klinik, Diagnostik und Therapie. Management of Neuromuscular Diseases, Letter Nr.1, Aug. 9/1995
- Pongratz D.E.: Dermatomyositis / Polymyositis. In: Pongratz D.E., Reimers C.D., Hahn D., Nägele M., Müller-Felber W. (Hrsg.): Atlas der Muskelkrankheiten. Urban & Schwarzenberg, München – Wien – Baltimore 1990; 126-128.
- Pongratz D.E.: Myositiden. In: Krück F., Kaufmann V., Bünte H., Gladtko E., Tölle R., Wilmanns W. (Hrsg.): Therapie Handbuch. Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore 1995; N16/2-N16/7.
- Postlethwaite A.E., Keski-Oja J., Moses H.L., Kang A.H.: Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor  $\beta$ . *J. Exp. Med.* 1987; 165: 251-256.
- Purchio A.F., Cooper J.A., Brunner A.M., Lioubin M.N., Gentry L.E., Kovacina K.S., Roth R.A., Marquardt H.: Identification of mannose 6-phosphate in two asparagine-linked sugar

chains of recombinant transforming growth factor-beta 1 precursor. *J. Biol. Chem.* 1988; 263(28): 14211-14215.

Ray P.N., Belfall B., Duff C., Logan C., Kean V., Thompson M.W., Sylvester J.E., Gorski J.L., Schmickel R.D., Worton R.G.: Cloning of a breakpoint of an Xp 21 translocation associated with duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1985; 318: 672-675.

Rettig W.J., Erickson H.P., Albino A.P., Garin-Chesa P.: Induction of human tenascin (neuronectin) by growth factors and Zytokines: cell type-specific signals and signalling pathways. *J. Cell. Sci.* 1994; 107: 487-97.

Reznik M.: Satellite cells, myoblasts, and skeletal muscle regeneration. In: Mauro A., Shafiq S.A., Milhorat A.T. (Hrsg.): *Regeneration of striated muscle and myogenesis*. Amsterdam: Excerpta Medica 1970; 133-156.

Riede, U.-N.: Dermatomyositis. In: Riede U.-N., Schäfer H.-E.: *Allgemeine und Spezielle Pathologie*, 3. Aufl., Thieme Stuttgart – New York. 1993; 201-202.

Roberts A.B., Joyce M.E., Bolander M.E., Sporn M.B.: Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ): a multifunctional effector of both soft and hard tissue regeneration. In: *Growth Factors in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects*. Westermark B., Betsholtz C., Hokfeld B. (Hrsg.): Excerpta Medica, Amsterdam 1990; 89-101.

Roberts A.B., Sporn M.B.: The transforming growth factor  $\beta$ s. In: Sporn M.B., Roberts A.B. (Hrsg.): *Peptide Growth Factors and their Receptors I*. Springer, Basel 1990; 419-472.

Ruoslahti E., Reed J.C.: Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994; 77: 477-478.

Rutishauser, U.: Adhesion molecules of the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1993; 3: 709-715.

Rutishauser U., Acheson A., Hall A.K., Mann D.M., Sunshine J.: The neural cell adhesion molecule (N-CAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 1988; 240: 53-57.

Saga Y., Yagi T., Ikawa J., Sakakura T., Aizawa S.: Mice develop normally without tenascin. *Genes. Dev.* 1992; 6: 1821-1831.

Salzberg S., Mandelboim M., Zalcborg M., Shainberg A.: Interruption of myogenesis by transforming growth factor beta 1 or EGTA inhibits expression and activity of the myogenic-

associated (2'-5') oligoadenylate synthetase and PKR. *Exp. Cell. Res.* 1995 Jul; 219(1): 223-232.

Sanes J.R.: The extracellular matrix. In: Engel A.G., Fanzini-Armstrong C., editors. *Myology*, Volume 1. New York: McGraw-Hill 1994: 242-260.

Sanes J.R., Schachner M., Covault J.: Expression of several adhesive macromolecules (N-CAM, L1, J1, NILE, uvomorulin, laminin, fibronectin, and a heparan sulfate proteoglycan) in embryonic, adult, and denervated adult skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 1986; 102: 420-431.

Sarnat H.B.: Vimentin/desmin immunoreactivity of myofibres in developmental myopathies. *Acta Paediatr. Jpn.* 1991; 33(2): 238-246.

Sarnat H.B.: Vimentin/desmin immunoreactivity of myofibers in developmental myopathies. *Acta Paediatr. Jpn.* 1992; 33(2): 238-246.

Sarnat H.B.: Ontogenesis of striated muscle. In: Polin R.A., Fox W.W. (Hrsg.): *Neonatal and fetal medicine: physiology and pathophysiology*. Orlando F.L, Saunders W.B. 1992; 1560-1578.

Sarnat H.B.: Vimentin and desmin in maturing skeletal muscle and developmental myopathies. *Neurology* 1992; 42: 1616-1624.

Sato Y., Rifkin D.B.: Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J. Cell. Biol.* 1989; 109(1): 309-315.

Schlote W., Riede U.-N., Schäfer H.-E.: Skelettmuskulatur. In: Riede U.-N., Schäfer H.-E.: *Allgemeine und Spezielle Pathologie*, 3. Aufl., Thieme Stuttgart – New York 1993; 1096-1112.

Schröder J.M., Adams R.D.: The ultrastructural morphology of the muscle fiber in myotonic dystrophy. *Acta Neuropathol.* 1968; 10: 218-241.

Schubert W., Zimmermann K., Cramer M., Starzinski-Powitz A.: Lymphocyte antigen leu-19 as a molecular marker of regeneration in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989; 86: 307-311.

Schulick A.H., Taylor A.J., Zuo W., Qiu C.B., Dong G., Woodward R.N., Agah R., Roberts A.B., Virmani R., Dichek D.A.: Overexpression of transforming growth factor  $\beta$ 1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 6983-6988.

Settles D.L., Cihak R.A., Erickson H.P.: Tenascin-C expression in dystrophin-related muscular dystrophy. *Muscle & Nerve* 1996; 19(2):147-154.

Sjöberg G., Edström L., Lendahl U., Sejersen T.: Myofibers from Duchenne/Becker muscular dystrophy and myositis express the intermediate filament nestin. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1994; 53(4): 416-423.

Soubrouillard C., Pellissier J.F., Lepidi H., Mancini J., Rougon G., Figarella-Branger D.: Expression of developmentally regulated cytoskeleton and cell surface proteins in childhood spinal muscular atrophies. *J. Neurol. Sci.* 1995; 133(1-2): 155-163.

Sporn M.B., Roberts A.B., Wakefield L.W., de Crombrughe B.: Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor beta. *J. Cell. Biol.* 1987; 105: 1039-1045.

Steward M.: Intermediate filament structure and assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993; 5: 3-11.

Taylor H.C., Lightner V.A., Beyer W.F. Jr., McCaslin D., Briscoe G., Erickson H.P.: Biochemical and structural studies of tenascin/hexabrachion proteins. *J. Cell. Biochem.* 1989; 41: 71-90.

Tews D.S., Goebel H.H.: Zytokine expression of profile in idiopathic inflammatory myopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996; 55(3): 342-347.

Tews D.S., Goebel H.H., Schneider I., Gunkel A., Stennert E., Neiss W.F.: Expression of Stress Proteins, Intermediate Filaments, and Adhesion Molecules in Experimentally Denervated and Reinnervated Rat Facial Muscle. *Experimental Neurology* 1997; 146: 125-134.

Thompson N.L., Flanders K.C., Smith J.M., Ellingsworth L.R., Roberts A.B., Sporn M.B.: Expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J. Cell. Biol.* 1989; 108: 661-669.

Thornell L-E., Edström L., Eriksson A., Henriksson K.G., Angquist K.A.: The distribution of intermediate filament protein (skeletin) in normal and diseased human muscle. *J. Neurol. Sci.* 1980; 47: 153-170.

Timpl R.: Proteoglycans of basement membranes. *Experientia* 1993; 49(5): 417-428.

Tinsley J.: Utrophin or dystrophin: Which is the better potential gene therapeutics agent for Duchenne muscular dystrophy? *Curr. Res. Mol. Therap.* 1998; 1: 695-700.

- Tinsley J., Deconinck N., Fisher R., Kahn D., Phelps S., Gillis J.M., Davies K.: Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nature Medicine* 1998; 4(12): 1441-1444.
- Tokuyasu K.T., Maher P.A., Dutton A.J., Singer S.J.: Intermediate filaments in skeletal and cardiac muscle tissue in embryonic and adult chicken. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1985; 455: 200-212.
- Troost D., Das P.K., van den Oord J.J., Louwse E.S.: Immunohistochemical alterations in muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis: mononuclear cell phenotypes and expression of MHC products. *Cli. Neuropathol.* 1992; 11(3): 115-120.
- Tsunawaki S., Sporn M., Ding A., Nathan C.: Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 1988; 334(6179): 260-262.
- Tucker R.P., Hammarback J.A., Jenrath D.A., Mackie E.J., Xu Y.: Tenascin expression in the mouse: in situ localisation and induction in vitro by bFGF. *J. Cell. Sci.* 1993; 104: 69-76.
- Umbhauer M., Riou J.F., Spring J., Smith J.C., Boucaut J.C.: Expression of tenascin mRNA in mesoderm during *Xenopus laevis* embryogenesis: the potential role of mesoderm patterning in tenascin regionalization. *Development* 1992; 116: 147-157.
- Vater R., Cullen M.J., Harris J.B.: The expression of vimentin in satellite cells of regenerating skeletal muscle in vivo. *Histochem. J.* 1994; 26(12): 916-928.
- Wagner E.: Fall einer seltenen Muskelkrankheit. *Arch. Heilkd.* 1863; 4: 282-283.
- Wagner E.: Ein Fall von acuter Polymyositis. *Dtsch. Arch. Klein. Med.* 1887; 40: 241-266.
- Wahl S.M., Hunt D.A., Wakefield L.M., McCartney-Francis N., Wahl L.M., Roberts A.B., Sporn M.B.: Transforming Growth Factor Type  $\beta$  induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 5788-5792.
- Walsh F.S., Moore S.E., Lake B.D.: Cell adhesion molecule N-CAM is expressed by denervated myofibres in Werdnig-Hoffman and Kugelberg-Welander type spinal muscular atrophies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1987; 50(4): 439-442.
- Watkins S.C., Hoffman E.P., Slayter H.S., Kunkel L.M.: Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature* 1988; 333: 863-866.
- Weis J., Fine S.M., David C., Savarirayan S., Sanes J.R.: Integration site-dependent expression of a transgene reveals specialized features of cells associated with neuromuscular junctions, *J. Cell Biol.* 1991; 113: 1385-1397.

Wilcox J.N., Derynck R.: Developmental expression of transforming growth factors alpha and beta in mouse fetus. *Mol. Cell. Biol.* 1988; 8(8): 3415-3422.

Williams A.F., Barclay AN.: The immunoglobulin superfamily – domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 1988; 6: 381-406.

Woodley D.T., Rao C.N., Hassell J.R., Liotta L.A., Martin G.R., Kleinman H.K.: Interactions of basement membrane components. *Biochem. Biophys. Acta* 1983; 761(3): 278-283.

Worton R.G., Duff C., Sylvester J.E., Schmickel R.D., Willard H.F.: Duchenne muscular dystrophy involving translocation of the dmd gene next to ribosomal RNA genes. *Science* 1984; 224: 1447-1449.

Yamada T., Kawamata T., Walker D.G., McGeer P.L.: Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1992; 84(2): 157-162.

Yamazaki M., Minota S., Sakurai H., Miyazono K., Yamada A., Kanazawa I., Kawai M.: Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and its Relation to Endomysial Fibrosis in Progressive Muscular Dystrophy. *American Journal of Pathology* 1994; 144(2): 221-226.

Yanagishita M.: Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol. Jpn.* 1993; 43(6): 283-293.

Young C., Lin M.Y., Wang P.J., Shen Y.Z.: Immunocytochemical studies on desmin and vimentin in neuromuscular disorders. *J. Formos. Med. Assoc.* 1994; 93(10): 829-35.

Yurchenco P.D., Ruben G.C.: Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J. Cell. Biol.* 1987; 105: 2559-2568.

Yurchenco P.D., Schittny J.C.: Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 1990; 4: 1577-1590.

## **DANKSAGUNG**

Meinem Doktorvater Prof. Dr. W. Müller-Felber danke ich für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen, die ich durch ihn erhalten habe.

Herrn Prof. Dr. D. Pongratz danke ich für die mir großzügig zur Verfügung gestellten Arbeitsmöglichkeiten am Friedrich-Baur-Institut.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau Dr. P. Fischer und Herrn Dr. M. Toepfer für die konstruktive und immer wieder ermutigende Betreuung bei der Erstellung der Doktorarbeit. Beiden verdanke ich, dass die vorliegende Untersuchung entstehen konnte und die ursprünglich avisierte Zielsetzung inhaltlich ausgeweitet werden konnte.

Mein besonderer Dank gilt dem technischen Personal des Friedrich-Baur-Institutes, insbesondere Frau cand. med. B. Mendel, die mir bei der Einarbeitung im Labor und bei allen auftretenden Problemen stets Hilfestellung und neue Anregungen gab. Bei Frau E. Wiens und Frau S. Galuschka möchte ich mich zudem für die Übernahme zahlreicher Routinefärbungen bedanken und bei Frau H. Gramm für die gute Zusammenarbeit bei der Nutzung des Mikroskops.

Bei meiner Lebensgefährtin möchte ich mich für ihren unermüdlichen liebevollen Beistand in jeder Phase dieser Arbeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihre finanzielle Unterstützung, meinem Vater zudem für die Korrektur der Arbeit.

## LEBENS LAUF

Name: Torsten Gerald Müller  
Geburtsdatum: 1. März 1971  
Geburtsort: Bietigheim  
Wohnort: München  
Familienstand: in fester Partnerschaft  
Eltern: Erik Müller  
Maria Müller-Pastorek  
Ausbildung: 1977 - 1981 Grundschule Kleinsachsenheim  
1981 - 1990 Gymnasium Bietigheim-Bissingen  
Berufl. Werdegang: 1991 - 1992 Zivildienst beim DRK KV Ludwigsburg  
1992 - 1999 Studium der Humanmedizin LMU München  
2000 - 2001 AiP und Assistenzarzt im Städt. KH München-  
Harlaching, Abteilung für Neurologie und  
klinische Neurophysiologie  
seit 2002 Assistenzarzt im BKH Haar, Abt. für  
Psychiatrie