

Aus der Klinik für Neuropädiatrie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expression von MMP-1- und TIMP-1-mRNA bei Muskeldystrophie vom
Typ Duchenne

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Olaf Brückmann
aus Mannheim

Gutachter/in:

1. Priv.-Doz. Dr.med. A. von Moers
2. Priv.-Doz. Dr.med. W. Stenzel
3. Priv.-Doz. Dr.med. U. Schara

Datum der Promotion: 3.9.2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1 Einleitung | 5 |
| 1.1 Dystrophinopathien | 5 |
| 1.1.1 Definition und Grundlagen..... | 5 |
| 1.1.2 Geschichte | 6 |
| 1.1.3 Epidemiologie | 6 |
| 1.1.4 Klinik der DMD und BMD | 6 |
| 1.1.5 Ätiologie und Pathogenese | 8 |
| 1.1.6 Diagnostik..... | 11 |
| 1.1.7 Symptomatische Therapie | 12 |
| 1.1.8 Neue Therapieansätze..... | 14 |
| 1.2 Extrazelluläre Matrix..... | 17 |
| 1.2.1 Überblick..... | 17 |
| 1.2.2 Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1)..... | 22 |
| 1.2.3 Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase-1 (TIMP-1)..... | 23 |
| 1.3 Fragestellung | 24 |
| 2 Material und Methoden | 25 |
| 2.1 Gewebeproben..... | 25 |
| 2.1.1 Patienten und Kontrollen..... | 25 |
| 2.1.2 Muskelbiopsie und Konservierung des Gewebes..... | 27 |
| 2.2 <i>In situ</i> -Hybridisierung | 27 |
| 2.2.1 Grundlagen | 27 |
| 2.2.2 Allgemeines..... | 29 |
| 2.2.3 Herstellung der ³⁵ S-markierten RNA-Sonden | 29 |
| 2.2.4 Hybridisierung..... | 30 |
| 2.2.5 Waschen nach Hybridisierung | 31 |
| 2.2.6 Autoradiographie..... | 32 |
| 2.2.7 Auswertung und photographische Dokumentation | 32 |
| 2.3 Immunhistochemie und sequentielle Doppelmarkierung..... | 33 |
| 2.3.1 Grundlagen der Immunhistochemie | 33 |
| 2.3.2 APAAP-Methode..... | 33 |
| 2.3.3 Sequentielle Doppelmarkierung | 34 |
| 2.3.4 Auswertung und photographische Dokumentation | 35 |

| | |
|---|----|
| 2.4 Statistische Methoden bei der Auswertung der Ergebnisse | 36 |
| 3 Ergebnisse | 37 |
| 3.1 Expression von MMP-1mRNA..... | 38 |
| 3.2 Expression von TIMP-1mRNA..... | 46 |
| 3.3 Vergleich der Expression von MMP-1-und TIMP-1mRNA..... | 52 |
| 3.4 Alterskorrelation der MMP-1-und TIMP-1mRNA | 54 |
| 3.5 Verteilung MMP-1- und TIMP-1mRNA exprimierender Zellen..... | 55 |
| 3.6 Charakterisierung der exprimierenden Zellen | 56 |
| 4 Diskussion | 58 |
| 5 Zusammenfassung | 70 |
| 6 Literaturverzeichnis..... | 72 |
| 7 Abkürzungen | 87 |
| 8 Chemikalien | 89 |

Lebenslauf

Danksagung

1. Einleitung

Seit der Entdeckung des Dystrophingens vor über 20 Jahren und der Erkenntnis, daß ein Defekt in dieser Region meist die Entwicklung einer progressiven Muskeldystrophie zur Folge hat, gab es zahlreiche Untersuchungen, um die Pathogenese der "Dystrophinopathien" im einzelnen zu verstehen. Trotz vieler neuer Erkenntnisse gibt es bis heute weder eine wirkungsvolle Therapie, noch ist klar, weshalb es zu einem Untergang von Muskelfasern kommt. Ein bisher nur wenig beforschtes Phänomen bei den Dystrophinopathien ist die Bindegewebsvermehrung in der Muskulatur, die sowohl durch eine gesteigerte Synthese als auch durch einen verminderten Abbau von Bindegewebe bedingt sein kann. Ein Aspekt des Bindegewebsabbaues soll in dieser Arbeit auf mRNA-Ebene untersucht werden.

Es soll zunächst auf das Krankheitsbild und auf in diesem Zusammenhang wichtige Gesichtspunkte der extrazellulären Matrix eingegangen werden.

1.1 Dystrophinopathien

1.1.1 Definition und Grundlagen

Bei den Dystrophinopathien handelt es sich um X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankungen, die mit einer fehlerhaften oder gänzlich fehlenden Produktion des Zytoskelettproteins Dystrophin einhergehen. Neben den beiden wichtigsten Formen, der Duchenne'schen Muskeldystrophie (DMD) und der Becker'schen Muskeldystrophie (BMD), werden die X-chromosomale dilatative Kardiomyopathie (XLDC) und der „Glycerolkinasemangel mit Dystrophinopathie“ zu den Dystrophinopathien gerechnet. Bei der DMD, der malignen Verlaufsform der Dystrophinopathien ist das Dystrophin stark vermindert oder nicht nachweisbar, wohingegen die mildere Verlaufsform (BMD) eine weniger starke Verminderung des Dystrophins zeigt. Da aber zwischen diesen beiden extremen Verlaufstypen Übergangsformen existieren, kann man neben der vorwiegend klinischen Einteilung in DMD und BMD bei den Dystrophinopathien von einem Kontinuum unterschiedlich progredienter Krankheitsverläufe sprechen, deren Ursache eine Mutation im Dystrophingen ist.

1.1.2 Geschichte

1861 beschrieb Guillaume B. Duchenne, ein Neurologe aus Paris, das Bild einer infantilen Muskeldystrophie mit ihren klinischen Merkmalen und histologischen Veränderungen wie Muskelfasernekrosen, Bindegewebsvermehrung und fettige Degeneration. Die normale elektrische Erregbarkeit der Muskulatur sowie die ausgeprägte Pseudohypertrophie der Waden ließen Duchenne eine myopathische Genese der Erkrankung annehmen. Obwohl Meryon bereits 1852 einen progressiven Muskelschwund bei kleinen Jungen beobachtet hatte, der ebenfalls mit einer Faserdegeneration bei intaktem Nervensystem einherging, wurde diese Erkrankung nach Duchenne benannt. Der Begriff der Muskeldystrophie ("dystrophia muscularis progressiva") wurde dann im Jahre 1884 von Erb eingeführt, der vor allem histologische Veränderungen anhand von Muskelbiopsien beschrieb. Als Becker und Kiener 1955 eine Familie mit 14 männlichen, an Muskeldystrophie erkrankten Patienten beschrieben, die ein wesentlich höheres Lebensalter erreichten, konnte nun eine X-chromosomal rezessiv vererbte Muskeldystrophie mit milderem Verlauf, die Becker'sche Muskeldystrophie (BMD), von der DMD abgegrenzt werden.

1.1.3 Epidemiologie

Die DMD ist mit einer Inzidenz von 1:3500 männlichen Neugeborenen die häufigste erbliche Myopathie (Emery 1991) und ist nach der Mukoviszidose die häufigste genetische Erkrankung im Kindesalter. Die Neumutationsrate wird auf rund ein Drittel geschätzt und ist damit wesentlich höher, als bei anderen X-chromosomal rezessiv vererbten Erkrankungen (Moser 1984; Emery 1980). Der Grund dafür dürfte in der Größe des Dystrophingenes von 2,4 Megabasen liegen. Das Auftreten einer BMD ist weniger häufig, ihr Anteil an den X-chromosomal Muskeldystrophien wird auf ungefähr 10% geschätzt (Grimm 1986; Bushby et al.1991).

1.1.4 Klinik der Dystrophinopathien

Sind Patienten mit DMD bei Geburt zunächst meist unauffällig, so fallen sie zwischen dem zweiten bis sechsten Lebensjahr durch eine verzögerte motorische Entwicklung auf. Verspätetes Laufenslernen, Unsicherheit beim Sitzen, Stehen und Laufen sind Ausdruck einer Muskelschwäche im Beckengürtel- und Oberschenkelbereich. Charakteristisch sind neben einem "Watschelgang", Schwierigkeiten beim Treppensteigen und häufigem Hinfallen auch die Art des Aufrichtens aus der Rückenlage, das "Gowers-Zeichen", von Gowers 1886 beschrieben: die Kinder drehen sich in

Bauchlage, nehmen die Vierfüßlerstellung ein, versuchen dann die Hände den Füßen anzunähern, so daß sich der Körperschwerpunkt über den gestreckten Beinen befindet und richten den Oberkörper langsam auf, indem sie mit den Händen an ihren Beinen emporklettern. Beim Stehen zeigt sich wegen der Schwäche der Bauch-, Becken- und Rückenmuskulatur eine ausgeprägte Hyperlordose im Lendenwirbelbereich. Zeitgleich oder mit einigen Jahren Verzögerung folgen eine Schwäche der oberen Extremität und des Schultergürtels, was sich unter anderem durch Seitwärtsgleiten der Schulterblätter beim Anheben der Arme äußert. Auffällig ist eine frühzeitige Schwäche der proximalen Muskulatur. Atrophien, die sich weitgehend parallel zur Muskelschwäche entwickeln, sind oft durch Fettgewebe maskiert, lassen sich jedoch häufig am Schultergürtel und am unteren Drittel des M. quadriceps femoris erkennen (Mortier 1994). Neben den Atrophien besteht gleichzeitig eine Hypertrophie bzw. Pseudohypertrophie der Wadenmuskulatur, seltener auch anderer Muskeln, wie z.B. des M. deltoideus oder der Zunge. Schon sehr früh zu beobachten ist ein Verlust der Muskeleigenreflexe, wobei der Achillessehnenreflex bei einem Drittel der Erkrankten bis in das Endstadium hinein auslösbar bleibt (Mortier 1994). Ein fortschreitender Untergang der quergestreiften Muskulatur führt zu einem Verlust der Gehfähigkeit meist zwischen dem siebenten und dreizehnten Lebensjahr (Dubowitz 1995). Dagegen scheinen die Sphincteren von den degenerativen Veränderungen nicht wesentlich betroffen zu sein, da eine Inkontinenz auch in späteren Jahren nicht beobachtet wird. Kaminski et al. (1992) konnten zeigen, daß sogar bei über 20 Jahre alten DMD-Patienten die extraokuläre Motorik keine wesentliche Einschränkung aufweist.

Bei den meisten Patienten ist die Herzmuskulatur mitbetroffen, jedoch ließ sich in einer Untersuchung von Utsunomiya (1990) eine kontinuierliche Verschlechterung der linksventrikulären Funktion, die sich parallel zur Skelettmuskelschwäche entwickelte, nur bei rund 50% der DMD-Patienten nachweisen. Während Veränderungen der Herzmuskulatur bei ca. 10 bis 20% der Patienten klinisch relevant werden, zeigen 90% der Patienten typische EKG-Veränderungen: Es finden sich hohe R-Zacken in den rechts-präkordialen Ableitungen, eine Erhöhung des R:S-Quotienten und tiefe Q-Zacken in den lateralen und links-präkordialen Ableitungen (Emery 1972; Dubowitz 1995; Gulati et al. 2005).

In einer Untersuchung von Billard (1998), in der die Lesefähigkeit von 21 DMD-Patienten untersucht wurde, schnitten DMD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kindern schlechter ab. Die körperliche Behinderung kann diese Beobachtung nicht erklären, da Kinder mit spinaler

Muskelatrophie und vergleichbarer körperlicher Einschränkung eine wesentlich bessere Lesefähigkeit zeigten. Die Streuung in der DMD-Gruppe war sehr hoch, so gab es neben Kindern mit normalen oder überdurchschnittlichen Fähigkeiten solche mit deutlichen Defiziten. Diese Ergebnisse bestätigen vorausgegangene Untersuchungen, in denen bei DMD-Patienten eine variable Minderung vor allem der verbalen Intelligenz festgestellt wurde (Leibowitz and Dubowitz 1981; Wheelan 1987).

Sobald DMD-Patienten ihre Gehfähigkeit verloren haben, stellen sich mit zunehmender Muskelschwäche und Immobilität Haltungsanomalien und Muskelkontrakturen ein. Besonders ungünstig ist die Entwicklung einer Kyphoskoliose, die die beginnende respiratorische Insuffizienz aufgrund der Schwäche der Atemmuskulatur verstärken kann (Smith et al. 1989). Die stetig abnehmende Vitalkapazität, Entwicklung von Partial- und Globalinsuffizienz, häufige Infektionen der Atemwege oder selten kardiale Probleme begrenzen die Lebenserwartung. Die Mehrzahl der Patienten stirbt bereits vor dem 20. Lebensjahr, ein Überleben bis zu 25 Jahren ist in 20% der Fälle möglich.

Der Krankheitsverlauf der BMD unterscheidet sich von der DMD durch die wesentlich geringere Progredienz. Ähnlich wie bei der DMD werden die Patienten klinisch auffällig durch eine Muskelschwäche im Beckengürtelbereich, die im Alter von ca. zwölf Jahren manifest wird. Der Verlust der Gehfähigkeit tritt in Abhängigkeit vom Manifestationsalter mit 25 bis 40 Jahren ein, in einzelnen Fällen aber auch später. Die Lebenserwartung wird durch Lungen- oder Herzversagen begrenzt und beträgt ca. 35 bis 50 Jahre, einzelne Patienten wurden aber über 70 Jahre alt (Dubowitz 1995).

1.1.5. Ätiologie und Pathogenese

Ursache für die Entstehung von Dystrophinopathien ist ein Defekt des Dystrophingens. Dieses Gen besteht aus einer Sequenz von rund 2,4 Millionen Basenpaaren auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Bande Xp21) und wird in eine aus 79 Exons bestehende mRNA übersetzt, aus der dann das aus 3685 Aminosäuren bestehende Dystrophin gebildet wird. Strukturell können beim Dystrophin vier Domänen unterschieden werden (Koenig et al. 1988):

1. N-terminale, dem α -Aktinin ähnliche, an F-Aktin bindende Domäne
2. sich 25fach wiederholende Folge von 100 Aminosäuren; dreifach helikal gewunden; ähnlich dem Cytoskelettprotein Spektrin
3. Cysteinreiche Domäne
4. C-terminale Domäne

Das Dystrophin ist über Teile der 3. und 4. Domäne an den transsarkolemmalen Dystrophin-assoziierten-Proteinkomplex (DAG) gebunden (Ibraghimov-Breskrovnaya et al. 1992), der wiederum über Merosin, einer Lamininisoform, an die extrazelluläre Matrix gebunden ist. Das Dystrophin ist also ein subsarkolemmales Zytoskelettprotein, das über seine Aktinbindung die Sarkomere mit der Plasmamembran und der extrazellulären Matrix verbindet (Arahata et al. 1988; Ervasti et Campbell 1993; Koenig et al. 1988). Zusammen mit anderen Proteinen bildet Dystrophin eine die Myofibrille umgebende Gitterstruktur in longitudinaler und transversaler Anordnung, die auch als Costamer bezeichnet wird, jedoch gibt es Hinweise darauf, daß in der Herzmuskulatur Dystrophin auch innerhalb anderer Organisationsformen vorliegt (Stevenson et al. 1997). Dystrophin kommt nicht nur in Skelett- und Herzmuskulatur vor, sondern auch in Purkinjezellen im Neocortex und der äußeren plexiformen Schicht der Retina, was die kardiale Beteiligung, intellektuelle Retardierung und die fehlende b-Welle im Elektroretinogramm der Patienten möglicherweise erklärt (Drenckhahn et al. 1996; Girlanda et al. 1997; Billard et al. 1998). Die Existenz gewebespezifischer Promotoren belegt die Beobachtung einer Dystrophindefizienz, die ausschließlich die Herzmuskulatur betrifft (Muntoni et al. 1995). Innerhalb des Dystrophingens gibt es sogenannte "hot spots", das heißt Genabschnitte, in denen Mutationen gehäuft auftreten. Es handelt sich dabei um die ersten 20 Exons und um die Exons 44 und 45 (Vaskova-Goldman et al. 1997). Führt der Defekt zu einer Verschiebung des Leserasters ("out of frame"), wird kein (funktionsfähiges) Dystrophin gebildet, und es entwickelt sich in der Regel eine DMD. Findet dagegen keine Verschiebung des Leserasters ("in frame") statt, so kommt es zu einer nur geringen Veränderung oder Verminderung des Dystrophins, und der Betroffene erkrankt an einer BMD (Niemann-Seyde et al. 1992; Gangopadhyay et al. 1992).

Diese Veränderungen führen auf noch nicht genau verstandene Weise zum fortschreitenden Abbau der Muskulatur. Eine noch immer diskutierte Theorie besagt, daß eine erhöhter Empfindlichkeit

gegenüber mechanischer Belastung zu Mikroläsionen der Zellmembran, sogenannten "Deltaläsionen" (Mokri et al. 1975) führt, und ein konsekutiver Kalziueinstrom eine Nekrose der Muskelzellen verursacht (Turner et al. 1988). Die unterschiedliche mechanische Belastung wurde als mögliche Erklärung für die Betonung der proximalen Muskulatur und die fehlende Beteiligung der äußeren Augenmuskeln angesehen, wobei Wiesen et al. (2007) eine erhöhte Elastizität und eine verminderte Vulnerabilität durch exzentrische Kontraktion der äußeren Augenmuskeln durch strukturelle Unterschiede des M-Bandes beschrieben. Befunde am mdx-Muskel ergaben, daß veränderte Rezeptormuster und Rezeptorenfunktionen eine gestörte Kalziumhomöostase bewirken (Yeung et al. 2006).

Unklar bleibt, ob der Dystrophinmangel selbst, die Kombination aus Mangel an Dystrophin und Dystrophin-assoziiertem Glycoproteinkomplex (DAG) oder sekundäre Veränderungen für die Entstehung und den Verlauf der Dystrophinopathien entscheidend sind; denn es kommt bei der DMD zu einer starken Verminderung des DAG. Bei Sarkoglykanopathien werden bei intaktem Dystrophin Teile des DAG nicht gebildet, und es zeigt sich eine DMD-ähnliche, schwere Muskeldystrophie (Kakulas 1996; Fadic et al. 1997). Bei der BMD ist der DAG nur wenig vermindert (Matsumura et al. 1993).

Sekundäre Veränderungen können den Krankheitsverlauf positiv oder negativ beeinflussen. Bei der mdx-Maus - einem dystrophindefizienten Tiermodell der DMD (Bulfield et al. 1984; Hoffman et al. 1987) – kommt es nach anfänglichem Untergang von Muskelgewebe zu einer erfolgreichen Regeneration und die mdx-Mäuse sind zunächst nur leicht betroffen. Das könnte an der starken Expression von Utrophin, einem dem Dystrophin ähnlichen Protein, liegen. Diese Vermutung kann durch die Tatsache bekräftigt werden, daß Doppel-knock-out-Mutanten, das heißt Mäuse, die weder Dystrophin, noch Utrophin bilden können, klinisch der DMD sehr ähnlich sind (Grady et al. 1997; Deconinck et al. 1997). Bei der mdx -Maus kommt es im Vergleich zur DMD zu einer wesentlich weniger ausgeprägten Fibrosierung der Muskulatur: Neben anderen negativen Auswirkungen könnten dadurch Satellitenzellen in ihrer Teilung behindert werden, und es käme so zu einer ineffektiven Regeneration der Muskulatur (Bernasconi et al. 1995).

Weitere Aspekte zur Pathogenese sind erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Mastzellgranula, erhöhte Lipidperoxidation und Veränderungen von Strukturproteinen wie Nebulin, Desmin und Titin (Übersicht bei Engel et al. 1994). Es bleibt festzuhalten, daß die genauen Mechanismen des Muskelzellunterganges nicht geklärt sind.

1.1.6 Diagnostik

Charakteristische klinische Zeichen wie Intoleranz körperlicher Belastung in Form von Muskelschmerzen und Krämpfen können erste Hinweise auf das Vorliegen einer Dystrophinopathie geben (Figarella-Branger et al. 1997; Firth et al. 1983). Wegen des X-chromosomal rezessiven Erbganges kann eine positive Familienanamnese mit erkrankten männlichen Verwandten mütterlicherseits aufschlußreich sein. Stark erhöhte Serumwerte der Kreatinkinase (CK) von über 1000 U/l (Mortier 1994) und eine deutliche Amplitudenverringernng der b-Welle im Elektretinogramm (Girlanda 1997) sind typische Zeichen einer DMD. Die diagnostische Bedeutung der CK-Erhöhung liegt darin, daß sie schon vor Beginn der klinischen Symptomatik auftritt und so schon frühzeitig auf die Erkrankung hinweisen kann. Mit zunehmendem Alter der Patienten und abnehmender Gesamtmuskelmasse wird die CK-Erhöhung jedoch weniger deutlich, so daß extrem hohe Werte vorwiegend bis zum Alter von zehn Jahren beobachtet werden können (Mortier 1994). Zur Sicherung der Diagnose sind ggf. eine Muskelbiopsie und immer der molekularbiologische Nachweis des Gendefektes notwendig.

Mittels Multiplex-PCR können mindestens 95% der Deletionen und Duplikationen erfaßt werden (den Dunnen et al. 2006). In einer Arbeit von Stockley et al. (2006) konnten durch multiplex PCR und Sequenzierung bei 98% der DMD-Patienten und bei 60% der BMD-Patienten allein durch DNA-Analyse eine eindeutige Diagnose gestellt werden. Da für diese Untersuchung lediglich eine Blutentnahme erforderlich ist, sollte die DNA-Untersuchung den ersten Schritt zur Sicherung der Diagnose darstellen. Ergibt sich bei der DNA-Untersuchung kein eindeutiges Ergebnis, führt die Muskelbiopsie nebst Immunhistochemischer Untersuchung der Gewebeproben weiter (Freund et al. 2007).

Nach Standardfärbungen der Muskelpräparate können folgende charakteristische Veränderungen beobachtet werden:

- 1) Starke Kaliberschwankungen der Muskelfasern; überkontrahierte, dunkel anfärbbare Fasern; die Fasern liegen z.T. nicht mehr dicht an dicht und zeigen eine stärker gerundete Form
- 2) Muskelfasersplitterung; atrophe, nekrotische Fasern neben Fasern mit Basophilie des Sarkoplasmas und zentral liegenden Kernen als Zeichen der Regeneration
- 3) resorptive, entzündliche Rundzellinfiltrate

- 4) mit Fortschreiten der Erkrankung zunehmende peri- und endomysiale Fibrose sowie fettige Degeneration

Entscheidend ist der immunhistologische Nachweis einer Verminderung (BMD) oder des Fehlens (DMD) von Dystrophin. Dazu stehen drei verschiedene Antikörper zur Verfügung: "dys1" ist gegen die rod-domain, "dys2" gegen das C-terminale Ende und "dys3" gegen das N-terminale Ende von Dystrophin gerichtet, der entsprechende Nachweis kann am Muskelschnitt erfolgen. Der Western-Blot bietet sich an, um einen relativen Mangel oder Veränderungen im Molekulargewicht des Dystrophins feststellen zu können. Da mit diesen Methoden das unmittelbare Genprodukt der Region Xp21 nachgewiesen wird, kann damit bei klinisch schwierig einzuordnenden Fällen auch das Vorliegen einer Dystrophinopathie ausgeschlossen werden (Jay 1993). Als einfaches, weniger invasives und kostengünstigeres Verfahren könnte sich die Hautbiopsie etablieren. Tanveer et al. (2009) konnten für dieses Verfahren eine der Muskelbiopsie vergleichbare Sensitivität und Spezifität zeigen.

Bei der Diagnostik des Überträgerinnenstatus können eine milde klinische Symptomatik, CK-Erhöhung oder typische Familienanamnese Hinweise geben. Die Nachweisbarkeit hängt oft davon ab, ob ein Indexpatient mit bekanntem Gendefekt vorhanden ist, da der heterozygote Nachweis der Mutation schwierig ist. Durch die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) aber auch durch die RT-PCR (Reverse Transscriptase- PCR) stehen Methoden zu Verfügung, durch die effizient und mit hoher Sensitivität Deletionen nachgewiesen werden können (VelAizquez-Wong et al. 2008)

Eine pränatale Diagnostik ist durch eine Kombination aus Multiplex PCR und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bei mehr 92% aller Dystrophinmutationen möglich (Huang et al. 2007)

1.1.7 Symptomatische Therapie

In den letzten Jahren wurden auf dem Gebiet der Gentherapie (s. 1.1.8) große Fortschritte gemacht, und unterschiedliche Strategien wie beispielsweise Ersetzen von Dystrophin oder Regeneration der Muskulatur werden in vorklinischen und klinischen Studien untersucht (Yokata et al. 2009; Banks

et Chamberlain 2008). Die breite klinische Anwendung dieser Verfahren ist gegenwärtig allerdings noch nicht möglich.

Durch symptomatische Behandlung kann eine deutliche Verzögerung des Krankheitsverlaufes erzielt werden. Zunächst ist es wichtig, Muskelkraft und Gelenkfunktionen durch maßvolle körperliche Aktivität und gezielte Krankengymnastik möglichst lange Zeit zu erhalten. Bei zunehmender Muskelschwäche und beginnenden Kontrakturen hat sich eine frühzeitige operative Korrektur bewährt, weil dadurch u.a. eine durch unphysiologische Haltung verursachte übermäßige Beanspruchung der Muskulatur vermieden werden kann (Rideau et al. 1986; Forst et al. 1990). Die Versorgung mit entsprechenden Orthesen kann zum einen das Auftreten von Sekundärdeformitäten verzögern, zum anderen die Fähigkeit zu laufen oder zu stehen, mit günstigen Auswirkungen auf Kreislauf, Psyche, Mineralhaushalt der Knochen wesentlich unterstützen (Heckmatt et al. 1985). Eine Versorgung mit einem Rollstuhl wird notwendig, wenn die Gehfähigkeit nicht mehr vorhanden ist. Besonders wichtig ist es, eine Skoliose frühzeitig zu korrigieren, da ihre Entstehung die Ateminsuffizienz, die sich ohnehin aufgrund muskulärer Schwäche entwickelt, entscheidend verstärken kann. Zur Korrektur einer Skoliose bietet sich eine langstreckige Arthrodesen an (Miller et al. 1991; Boachie et al. 1989).

Kontrollierte Doppelblindstudien haben gegen Ende der 80er Jahre positive Effekte einer Steroidgabe auf den Verlauf der DMD belegt. Unter einer Dauermedikation von Prednison (0,75mg/kg KG pro Tag) zeigten sich bei 5 bis 15 Jahre alten DMD-Patienten im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Vitalkapazität sowie eine Verbesserung der Muskelkraft. Während der ersten drei Therapiemonate besserte sich der Zustand der Jungen stetig und konnte dann für einen Zeitraum von maximal vier Jahren stabilisiert werden. Dem gegenüber stand eine kontinuierliche Verschlechterung in der Kontrollgruppe. Außerdem trat ein Gehverlust in der Gruppe, die mit Kortison behandelt worden waren, durchschnittlich zwei Jahre später als in der Kontrollgruppe ein (Brook et al. 1987; DeSilva et al. 1987; Mendell et al. 1989; Yilmaz et al. 2004). Die Wirkungsweise des Kortisons ist unklar, eine höhere Kreatininausscheidung mit dem Urin läßt aber auf eine verbesserte Regenerationsfähigkeit der Muskulatur schließen (Griggs et al. 1983). Ein Verabreichungsschema mit 10 Tagen Kortisongabe und 10 Tagen ohne Kortisongabe im Wechsel zeigte bei vergleichbarer Wirksamkeit weniger Nebenwirkungen (Straathof et al. 2009).

Da ähnlich positive Effekte bei einer Behandlung mit Azathioprin nicht auftraten, scheint der Wirkungsmechanismus der Kortisonbehandlung nicht eine einfache Immunsuppression zu sein (Griggs et al. 1993). Der positive Effekt einer Kortisonbehandlung tritt vor allem bei jüngeren Patienten auf. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Gewichtszunahme, cushingoider Habitus, vermindertes Wachstum und Knochenbrüche (Straathof et al. 2009). Selten entwickelt sich ein Hypertonus oder eine Katarakt. (Porschke 1994).

Die respiratorische Insuffizienz kann durch eine assistierte Beatmung behandelt werden. Die Indikation hierfür ist bei klinischen Zeichen einer Hypoventilation oder einem Absinken der Vitalkapazität unter 1000ml oder im Falle der Entwicklung einer nächtlichen Globalinsuffizienz mit $p\text{CO}_2 > 45\text{mmHg}$ und $p\text{O}_2 < 60\text{mmHg}$ gegeben. Die zunächst nur nachts durchgeführte Beatmung mit positivem intermittierendem Druck (IPPV) über eine individuell angepasste nasale Maske führt zu einer wesentlich verbesserten Atmung auch am Tage, gemessen an den Blutgaswerten und einer Stabilisierung der Vitalkapazität (Dreher et al. 2007). Von der nächtlichen Heimbeatmung profitieren die Patienten in mehrfacher Hinsicht: durch Beseitigung der Symptomatik eines Schlafapnoesyndroms (u.a. exzessive Tagesmüdigkeit) ergibt sich für die Patienten eine gesteigerte Lebensqualität, der Entstehung von pulmonaler Hypertension und Atelektasenbildung wird vorgebeugt, der Entstehung von Infektionen wird entgegen gewirkt. Die Lebenserwartung erhöht sich um einige Jahre (Manzur et Muntoni 2009; Baydur et al. 2000). Hinsichtlich der Kardiomyopathie steht eine Senkung der Nachlast im Vordergrund (Wagner 2008). Bei optimaler Betreuung in einem DMD-spezifischen, interdisziplinären Team kann das Erwachsenenalter in den meisten Fällen erreicht werden (Manzur et al. 2008).

1.1.8 Neue Therapieansätze

Das Ziel der verschiedenen Strategien ist es, eine Dystrophinexpression in der gesamten erkrankten Skelett- und Herzmuskulatur zu erreichen. Dystrophin muß in ausreichender Menge gebildet werden, damit ein therapeutischer Effekt zu erwarten ist. Experimente an mdx-Mäusen lassen vermuten, daß ungefähr 25% der Muskelfasern Dystrophin exprimieren müssen, um das klinische Bild wesentlich zu verbessern (Yokota et al. 2009). Die Dystrophinbildung sollte möglichst dauerhaft erfolgen, um klinische Verbesserungen langfristig aufrecht zu erhalten.

Ein Forschungsansatz ist die Myoblasten- oder Stammzellimplantation. In Zellkulturen konnte gezeigt werden, daß undifferenzierte Muskelzellvorläuferzellen neben der Ausdifferenzierung zu intakten Myotuben auch die Fähigkeit haben mit dystrophindefizienten Muskelzellen zu verschmelzen und so dystrophinproduzierende Muskelzellen bilden können. Für eine effiziente muskuläre Regeneration ist die Identifikation einer geeigneten Stammzellpopulation aus multiplen Typen von myogenen Stammzellen kritisch (Farini et al. 2009). Mesenchymale Stammzellen sind besonders geeignet, da sie omnipotent sind und auch in ausgewachsenem Gewebe vorkommen. Mittels Transfer humaner Stammzellen aus Fettgewebe konnte bei mdx-Mäusen eine Dystrophin-Expression wiederhergestellt werden. Darüber hinaus haben die humanen multipotenten Stammzellen aus Fettgewebe durch verstärkte MyoD-Expression die Fähigkeit mit DMD-Myoblasten zu fusionieren und Dystrophin zu exprimieren (Goudenege et al. 2009).

Ein weiterer Therapieansatz ist die Integration intakter, Dystrophin kodierender cDNA sowie der notwendigen Promotoren in das Genom von DMD-Muskelzellen mittels Vektorentransfer. Als Vektoren wurden nicht toxische, nicht replikationsfähige Enteroviren benutzt, in deren Genom zunächst nur verkürzte Genkonstrukte oder das "Dystrophin-Minigen" (6,3 kb Dystrophin-cDNA), das bei einem BMD-Patienten mit äußerst milder Verlaufsform entdeckt wurde, integriert wurden. Wang et al. (2009) konnten durch virale Vektoren Minidystrophin in Skelettmuskulatur von mdx-Mäusen übertragen. Die untersuchte Muskulatur zeigte geringere pathologische Veränderungen und die Mäuse zeigten eine verbesserte Muskelfunktion und eine verlängerte Lebenserwartung.

Ein weiterer Ansatz ist das so genannte „exon skipping“. Durch Antisense Oligoribonukleotide (ASOs) kann der veränderte Genabschnitt so korrigiert werden, so daß bei der überwiegenden Anzahl der behandelten Muskelzellen (Muskelzellkulturen von DMD-Patienten) die Dystrophinsynthese wiederhergestellt werden konnte (Alter et al. 2006; Goyenvalle et al. 2009). Durch in vivo-Versuche an mdx-Mäusen und GRMD-Hunden (golden retriever muscular dystrophy, einem der DMD sehr ähnlichen Tiermodell (Howell et al. 1997)) konnten stabilere, weniger toxische und effizientere ASOs gefunden werden, durch deren Anwendung ein milderer Phänotyp erreicht werden konnte. Klinische Studien an DMD-Patienten werden durchgeführt (Nakamura et Takeda 2009).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für ASOs (und für „short interfering RNAs = siRNA“) ist eine Korrektur der erhöhten mRNA-Level des cyclinabhängigen Kinase Inhibitors p21. Eine

Erhöhung von p21 korreliert mit einer herabgesetzten Proliferation von Myoblasten. Eine in vitro- Untersuchung konnte über eine AON- und siRNA- gesteuerte Blockierung von p21 stark erhöhte Proliferationsraten von Myoblasten nachweisen (Endesfelder et al. 2005).

Es ist fraglich, ob sich Dystrophin, das vom Immunsystem von DMD-Patienten als fremd erkannt wird, auch unter Immunsuppression bei DMD-Patienten dauerhaft integrieren läßt. Deshalb wird eine mögliche Kompensation durch Utrophin diskutiert (Campbell et Crosbie 1996; Matsumura et al. 1992; Deconinck et al. 1997; Grady et al. 1997). Untersuchungen an mdx-Mäusen mit Haploinsuffizienz des Utrophingenes (mdx/utrn +/-) ergaben, daß durch partielles Fehlen von Utrophin verstärkt Entzündungsreaktion und Fibrose nachweisbar waren. Utrophin kann also bei der mdx-Maus Dystrophin funktionell teilweise ersetzen (Zhou et al. 2008).

Neuere Therapieansätze an Tiermodellen zeichnen sich oft dadurch aus, daß positive Effekte der Skelettmuskulatur nur schwach oder nicht an der Herzmuskulatur nachweisbar sind. Dies könnte dazu führen, daß durch verlängerte Überlebensraten die Kardiomyopathien bei DMD zunehmende Bedeutung bekämen (Townsend et al. 2009).

Sowohl an mdx-Mäusen als auch bei GRMD wurde die prinzipielle Durchführbarkeit einer Gentherapie gezeigt (Übersicht bei Wang et al. 2009), jedoch bestehen weiterhin verschiedene Probleme wie die Erreichbarkeit möglichst aller Muskelzellen, die dauerhafte Transfektion der Zellen, die Auslösung einer Immunantwort (Gilchrist et al. 2002) sowie die potentielle Toxizität der Vektorsysteme.

Um irreversible strukturelle Veränderungen durch endomysiale Fibrose zu vermeiden, sind antifibrotische therapeutische Strategien notwendig (Desguerre et al. 2009).

Durch Imatinib, eine antineoplastische Substanz, deren antiinflammatorische und antifibrotischen Effekte an Tierversuchen zur Leber-, Nieren- und Lungenfibrose bekannt sind, konnte bei der mdx-Maus die Muskelnekrose, die Entzündungsreaktion und die Fibrose deutlich reduziert werden. Die Symptome der Mäuse waren ebenfalls gebessert. Durch eine Hemmung des PDGF-Rezeptors (platelet derived growth factor) werden die fibrogenen Zytokine TNF- α und IL-1 supprimiert (Huang et al. 2009).

Ein weiterer Ansatzpunkt für eine antifibrotische Therapie könnte eine Modulation von Osteopontin, einem Zytokin, das die Einwanderung und das Überleben von Immunzellen beeinflusst, sein. An mdx-Mäusen, die kein Osteopontin bilden können, wurde neben einer

reduzierten Fibrose in Skelett- und Herzmuskulatur eine verbesserte muskuläre Funktion festgestellt (Vetrone et al. 2009).

Wegen der komplexen Pathogenese der DMD könnte eine Kombination der unterschiedlichen therapeutischen Ansätze am ehesten zum Ziel zu führen (Wang et al. 2009).

1.2 Extrazelluläre Matrix

1.2.1 Überblick

Die extrazelluläre Matrix (EZM) setzt sich aus unterschiedlichen Matrixkomponenten wie Kollagenen, Elastin, Proteoglykanen und adhäsiven Glykoproteinen zusammen, durch deren unterschiedliche Kombination eine außerordentliche Vielfalt an Matrixbausteinen erreicht wird. Durch verschiedene "Splicing"-Varianten werden sehr unterschiedliche Zusammensetzungen möglich. Die Bedeutung der EZM geht weit über rein mechanische Aufgaben hinaus, sie bestimmt Morphologie, Differenzierung, Orientierung und Stoffwechsel der Zellen, die sie umgibt. Über eine Beeinflussung der Genexpression dieser Zellen können Mediatoren entstehen, die wiederum auf die extrazelluläre Matrix einwirken. Die EZM unterliegt also als dynamisches Gebilde durch permanenten Auf-, Ab- und Umbau einer fortwährenden Modifikation und kann dadurch auch speziellen Anforderungen wie z.B. Wachstum, Entzündung oder Wundheilung gerecht werden (Eckes et al. 2000; Gordon et Hahn 2009)

Bestandteile der EZM sind auch die Matrix abbauenden Enzyme, die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), deren spezifische Inhibitoren, die TIMPs ("Tissue inhibitors of metalloproteinases") sowie Zytokine, die sich auf deren Expression auswirken, gezählt. Im folgenden soll kurz auf die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix eingegangen werden.

Die Kollagene stellen den quantitativ bedeutendsten Proteinanteil des menschlichen Körpers dar. Bedingt durch ihren Aufbau aus drei Polypeptidketten, die in Form einer Trippelhelix angeordnet sind, besitzen sie eine einzigartige Kombination aus Zugfestigkeit und Elastizität gegenüber Verbiegungskräften. Um eine Kollagenfaser von einem Millimeter Durchmesser zu zerreißen, wäre beispielsweise eine Zugbelastung mit 10 bis 40 kg erforderlich. Eine wichtige Aufgabe der Kollagene besteht darin, Geweben und Organen mechanische Stabilität zu verleihen. Es sind 28 Kollagene bekannt (Gordon et Hahn 2009), wobei die interstitiellen Kollagene- Kollagen I, II und III- ca. 90% des Gesamtkollagens beim Menschen ausmachen. Unterschieden werden fibrilläre

Kollagene (I, II, III, V, XI) netzbildende Kollagene (IV, VIII, X), fibrillenassoziierte Kollagene (IX, XII, XIV, XXII), perlschnurartige Kollagene (VI), Verankerungsfibrillen (VII) und Kollagene mit Transmembrandomänen (XIII, XVII, XXIII, XXV). Über Aufbau und Verteilung der häufigsten Kollagentypen informiert die folgende Tabelle 1.

| Typ | Molekülzusammensetzung | Gewebeverteilung |
|------|--|--|
| I | $\alpha 1(I)_2\alpha 2(I)$ | größere interstitielle Fibrillen |
| | $\alpha 1(I)_3$ | Haut, Knochen, Skleren, Lungen |
| II | $\alpha 1(II)_3$ | Glaskörper, Knorpel, Nucleus pulposus |
| III | $\alpha 1(III)_3$ | Haut, Blutgefäße etc.(Retikuläre Fasern) |
| IV | $\alpha 1(IV)_2\alpha 2(IV)$ | Basalmembranen |
| VI | $\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$ | Zwischengewebe, auch Knorpel |
| XI | $\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$ | zusammen mit Kollagen Typ II |
| XII | $\alpha 3(XII)_3$ | Zusammen mit Kollagen Typ I |
| XIII | $\alpha 3(XIII)_3$ | In Endothelzellen |
| XIV | $\alpha 3(XIV)_3$ | zusammen mit Kollagen Typ I |

Tabelle 1: Kollagene und ihre Lokalisation (Auswahl)

(Übersicht bei Gordon et Hahn 2009)

Charakteristisches Merkmal aller Kollagentypen ist die repetitive Aminosäuresequenz (Gly-Xaa-Yaa)_n, wobei die Position Xaa oder Yaa auffallend häufig mit Prolin, die Position Yaa oft mit Hydroxyprolin besetzt ist. Die Kollagene werden von aktivierten Fibrozyten, den Fibroblasten, synthetisiert, die je nach Gewebe auch aus transdifferenzierten Mesangialzellen (Niere), glatten Muskelzellen (Arterien) oder Itozellen (Leber) hervorgehen können (Schuppan 1995). Über mehrere Stufen entsteht hydroxiliertes Prokollagen, das durch Sekretion aus der Zelle in den extrazellulären Raum gelangt. Durch enzymatische Modifizierung und Anordnung in Pentameren sowie Ausbildung kovalenter Bindungen entstehen schließlich sehr stabile säureunlösliche Kollagenfibrillen. Die je nach Gewebe unterschiedlichen Halbwertszeiten der Kollagenfibrillen

machen neben der Neusynthese einen kontinuierlichen Abbau notwendig. Der Kollagenabbau erfolgt durch Matrix-Metalloproteasen (s.u.).

Elastin ist Bestandteil elastischer Fasern, die einen relativ kleinen Anteil an den Komponenten der EZM darstellen, und gewährleistet so beispielsweise die Windkesselfunktion der Aorta. Elastin wird ähnlich wie die Kollagene von Bindegewebszellen über die Vorstufen Pro- und Tropoelastin synthetisiert. Sein hoher Gehalt an hydrophoben Aminosäuren könnte auf die Bedeutung hydrophober Wechselwirkung bei der Aggregation hinweisen. Der Abbau erfolgt durch spezifische Elastase oder Matrix-Metalloproteinasen (Schuppan et Hahn 1987).

Proteoglykane bestehen aus einem größeren Kohlenhydratanteil (80-94%) und einem kleineren Proteinanteil (6-20%). Sie stellen strukturell und funktionell die vielseitigste Gruppe innerhalb der extrazellulären Matrix dar. Das Rückgrat der Proteoglykane bildet ein Core-Protein, an das zahlreiche Heteroglykanketten geheftet sind, die größtenteils aus sich wiederholenden identischen Disaccharideinheiten bestehen. Ein Monosaccharid dieser Disaccharideinheiten ist immer ein Hexosamin (Glucosamin oder Galactosamin), das andere ein stickstofffreies Monosaccharid, meist Glucuronsäure. Wegen dieser typischen Zusammensetzung werden diese in Proteoglykanen vorkommenden Heteroglykane als Glykosaminoglykane (GAGs) bezeichnet, über die die Proteoglykane an Proteinrezeptoren binden können. Eine ältere Bezeichnung ist saure Mucopolysaccharide. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung erhält man unterschiedliche GAGs wie Hyaluronat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat oder Keratansulfat. Durch unterschiedlichste Variationen sowohl im Protein-, als auch im Kohlenhydratanteil entsteht eine Vielfalt von Proteoglykanen, die eine gewebespezifische Verteilung aufweisen:

| | |
|----------------|----------------|
| Aggrekan | Knorpel |
| Betaglykan | Plasmamembran |
| Decorin | EZM |
| Biglykan | EZM |
| Perlekan | Basalmembran |
| Syndekan | Endothelzellen |
| Thrombomodulin | Endothelzellen |
| | |

Proteoglykane sind nicht nur am Aufbau der Glykokalix beteiligt, sie können wegen ihrer negativ geladenen Glykanseitenketten neben Wasser auch Kationen wie Kalzium oder Peptidhormone binden. So wird beispielsweise der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) durch seine Bindung an Heparansulfat von Proteoglykanen vor Proteolyse geschützt und kann durch Abbau des bindenden Heparansulfats dosiert als Wachstumsfaktor wirksam werden (Schuppan 1995). TGF β 1 (transforming growth factor β 1) kann durch Decorin inaktiviert werden. Die Bedeutung der Proteoglykane liegt also neben ihrer Wechselwirkung mit Kollagenfibrillen in der Beeinflussung des Stofftransportes durch Permeabilitätsbarrieren und in der Modulation von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren.

Zu den nichtkollagenen oder adhäsiven Glykoproteinen der extrazellulären Matrix zählen die Nektine (Fibronectin, Vitronectin, Osteonectin, Tenascin, Thrombospondin, Undulin, Entactin), die Kontakt zu den im Bindegewebe eingelagerten Zellen herstellen. Fibronectin ist an der Organisation von Granulationsgewebe, an Chemotaxis und der Induktion von Phagozytose beteiligt. Zu den adhäsiven Glykoproteinen zählen weiterhin die Laminine, die wesentlich am Aufbau der Basalmembran beteiligt sind. Von Adhäsionsrezeptoren vom Typ der heterodimeren Integrine oder membranassoziierten Proteoglykane werden adhäsive Glykoproteine oder andere Bestandteile der ECM über das RGD-Epitop (Kurzschreibweise für Arg-Gly-Asp) gebunden. Auf diese Weise wird ein Kontakt zwischen Zellerinnerem und Matrix hergestellt. Dadurch werden wichtige Vorgänge wie die Einnistung des befruchteten Eies, Einwanderung von Granulozyten in Entzündungsgebiete, Embryogenese oder Immunreaktionen bewerkstelligt (Schuppan et al 2001). Der Abbau von Bindegewebe erfolgt durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Dabei handelt es sich um eine Gruppe meist zinkabhängiger Enzyme, von denen 28 Subtypen mit unterschiedlichem Substratspektrum bekannt sind (Wojtowicz-Praga et al. 1997; Woessner et Nagase 2000; Woessner 2002; Rodgers et al. 2009):

| MMP | andere Bezeichnungen | Substrat |
|------------|---|---|
| MMP-1 | interstitielle Kollagenase, Fibroblasten-Kollagenase | Kollagen I, II, III, VII, X, Gelatin, Proteoglykan Core-Protein |
| MMP-2 | 72K Gelatinase, Gelatinase A, Typ IV Kollagenase | Kollagen IV, V, VII, X, XI, Gelatin, Elastin, Fibronektin, Proteoglykan Core-Protein |
| MMP-3 | Stromelysin-1 | Kollagen IV, V, IX, X, Fibronektin, Laminin, Prokollagenase, Proteoglykan Core-Protein |
| MMP-7 | Matrilysin | Kollagen IV, Gelatin, Fibronektin, Laminin, Prokollagenase, Proteoglykan Core-Protein |
| MMP-8 | PNM-Kollagenase | wie MMP-1 |
| MMP-9 | 92K Gelatinase, Gelatinase B, Typ IV Kollagenase | Kollagen IV, V, Gelatin, Elastin, Proteoglykan Core-Protein |
| MMP-10 | Stromelysin-2 | wie MMP-3 |
| MMP-11 | Stromelysin-3 | wie MMP-3 |
| MMP-12 | Metalloelastase, Makrophagen-Elastase | Elastin |
| MMP-13 | Kollagenase-3 | Kollagen I, II, III |
| MMP-14 | membrangebundene MMP-1 | ProMMP-2 |
| MMP-15 | membrangebundene MMP-2 | ProMMP-2 |
| MMP-16 | membrangebundene MMP-3 | wie MMP-3 |
| MMP-19 | | Angiogenese |
| MMP-28 | Epilysin | Transformation vom Epithel zum Mesenchym |

Tabelle 2: Matrix-Metalloproteasen und ihre Substrate (Auswahl)

Die MMPs werden von Fibroblasten oder Endothelzellen gebildet, in inaktiven Vorstufen (Zymogene) sezerniert und durch limitierte Proteolyse aktiviert. Für die Enzymaktivität ist neben einem neutralen pH-Wert das Vorhandensein von Ca^{++} -Ionen notwendig. Nach Aktivierung werden die Enzyme rasch abgebaut. Neben unspezifischen Inhibitoren wie $\alpha 2$ -Makroglobulin existieren spezifische Inhibitoren, die TIMPs ("tissue inhibitors of metalloproteinase"). Es sind

gegenwärtig TIMP-1 bis TIMP-4 bekannt (Suhr et al. 2009), wobei TIMP-1 die aktiven Formen aller MMPs hemmen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA-Expression von MMP-1 und TIMP-1, dem wichtigsten Inhibitor von MMP-1, untersucht. So soll im folgenden näher auf diese beiden Enzyme eingegangen werden.

1.2.2 Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1)

MMP-1 gehört einer Gruppe von Metalloproteasen (vgl. Tabelle 2) an, deren kodierende Nukleinsäuresequenzen sich durch hohe Sequenzhomologie auszeichnet (Woessner 1991). Das trifft auch auf die Mitte der 90er Jahre entdeckten membrangebundenen MMP-14/15 zu (Sato et al. 1994). MMP-1, welches auch Fibroblasten-Kollagenase genannt wird, wird zu den interstitiellen Kollagenasen gezählt, und wird von Fibroblasten gebildet. Das Enzym wird als inaktive Vorstufe (Prokollagenase) sezerniert und mittels limitierter Proteolyse am N-terminalen Ende aktiviert (Woessner 1991). Die spezifische Aktivität von MMP-1 (s. Tabelle 2) kann durch Stromelysin (MMP-3/10) um den Faktor 5 bis 8 gesteigert werden (He et al. 1989; Matrisian et al. 1990). Für die Proteaseaktivität ist neben Zink im aktiven Zentrum des Enzyms ein neutraler pH-Wert und die Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen notwendig (Wojtowicz-Praga et al. 1997). MMP-1 kann auf vielfältige Weise auf RNA-Ebene gesteuert werden:

Faktoren, die die MMP-1-mRNA-Expression erhöhen (Han 2006; Wollbold et al. 2009; Woessner 1991)

- EGF (epidermal growth factor)
- bFGF (basic fibroblast growth factor)
- PDGF (platelet derived growth factor)
- Il-1 (Interleukin-1)
- TNF α (Tumornekrosefaktor α)
- HGF (hepatocyte growth factor)
- IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ (Interferon- $\alpha/\beta/\gamma$)

Heparin aktiviert möglicherweise die MMP-1-Promotoren. So war die Transkriptionsrate von MMP-1-mRNA in humanen Herzfibroblasten um das 2- bis 4-fache gesteigert (Tyagi et al. 1997).

Faktoren, die die Gesamtexpression von MMP-1-mRNA herabsetzen (Belluci et al. 2007; Woessner 1991; Clark et al. 1987):

- TIMP-1
- Retinoide
- Glucokortikoide
- bFGF
- TGF β 1 (transforming growth factor β 1)

Daneben kann aktiviertes MMP-1 durch LIMP (large inhibitor of metalloprotease = Komplex aus MMP-2 und TIMP-2) gehemmt werden. TIMP-1 kann darüber hinaus eine "Superaktivierung" von MMP-1 durch Stromelysin (MMP-3) verhindern, indem es Stromelysin hemmt (Iredale 1997).

Außerdem gibt es einige synthetische MMP-Inhibitoren wie Batimastat (BB-94), Marimastat (BB-2516) oder Bryostat-1, die im Rahmen der Tumorforschung entwickelt wurden (Wojtowicz-Praga et al. 1997).

1.2.3 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1)

TIMP-1, ein ubiquitär vorkommendes Glykoprotein von 28,5 kDa bildet mit MMP-1 und -3 in stöchiometrischem Verhältnis einen schwer löslichen, inaktiven Komplex. Dies trifft sowohl auf das Proenzym, als auch auf die aktivierte bzw. durch Stromelysin "superaktivierte" Form von MMP-1 zu. Die Gensequenz wurde erstmals von Docherty et al. 1985 veröffentlicht. Während TIMP-1 gegenüber Hitze und Säure weitgehend unempfindlich ist, kann es leicht durch reduzierende oder alkylierende Substanzen inaktiviert werden (Woessner et Nagase 2000). In vivo Untersuchungen zeigten, daß Fibroblasten und Endothelzellen TIMP-1 exprimieren können (Herbst et al. 1997). Durch die Fähigkeit von TIMP-1, sich bei Überexpression hemmend auf die Tumorausbreitung bei Mäusen auszuwirken, hat TIMP-1 große Bedeutung in der Tumorforschung erlangt (Wojtowicz-Praga et al. 1997).

Faktoren, die die Gesamtexpression von TIMP-1-mRNA erhöhen (Wollbold et al. 2009; Tyagi et al.1997 ; Kordula et al.1992 ; Clark et al.1989 ; Iredale 1997):

- Il-6 (Interleukin-6)
- Il-1 (Interleukin-1)
- TNF α (Tumornekrosefaktor α)
- TGF β 1 (transforming growth factor β 1)
- EGF (epidermal growth factor)
- bFGF (basic fibroblast growth factor)
- Retinoide
- Cholesterol

HGF kann die TIMP-1-mRNA-Expression herabsetzen. Doch kann ein gesteigerter Kollagenabbau letztendlich auch durch MMP-1-Erhöhung erreicht werden. Im Rahmen der Wundheilung kommt es, nachdem der Defekt durch EZM und Zellen aufgefüllt ist, zur "Streßrelaxation" der fibrogenen Zellen, was u.a. zur verminderten Synthese von TIMP-1 führt (Iredal 2001).

1.3 Fragestellung

Die Bindegewebsvermehrung bei der DMD ist ein bekanntes, lange wenig beachtetes Phänomen. Bei Erkrankungen wie der Leber- oder Lungenfibrose ist sie Gegenstand intensiver Forschung. So konnten durch die Untersuchungen dieser Erkrankungen Einblicke in die Bedeutung und Komplexität der EZM gewonnen werden. Neben vielen einzelnen Aspekten wurde insgesamt klar, daß eine intakte EZM nicht nur für die Architektur, sondern auch für die Funktion komplexer Organe unverzichtbar ist. Da die Entstehung einer Fibrose sowohl durch eine gesteigerte Kollagenproduktion als auch durch einen (im Verhältnis zur Produktion) verminderten Kollagenabbau bedingt sein kann, sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden: Wie verhält sich die mRNA-Expression von MMP-1 und TIMP-1 bei DMD-Patienten im Vergleich zu Gesunden? Gibt es eine Alterskorrelation? Welche Zellen exprimieren mRNA für MMP-1 oder TIMP-1?

2. Material und Methoden

2.1 Gewebeproben

2.1.1 Patienten und Kontrollen

In der vorliegenden Arbeit wurden Muskelgewebeproben von Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne und mit anderen Myopathien untersucht sowie Proben normaler Muskulatur miteinander verglichen. Die Gewebeproben pathologischer Muskulatur stammten entweder von Patienten, die im Rahmen ihrer Grunderkrankung im Sozialpädiatrischen Zentrum I (Zentrum für Kinder mit Myelodysplasien und Muskelerkrankungen) betreut wurden, oder von Patienten, die sich stationär auf der Station 29 (Schwerpunkt Neuropädiatrie/ Allgemeinpädiatrie) der Charité-Kinderklinik, Campus Virchow-Klinikum, behandelt wurden. Die Muskelbiopsien erfolgten mit Einverständnis zu diagnostischen Zwecken, wobei Normalmuskulatur bei nicht bestätigtem Verdacht auf neuromuskuläre Erkrankung gewonnen wurde, pathologische Kontrollmuskulatur beim Vorliegen anderer neuromuskulärer Erkrankungen (siehe Tabelle 3). Die Diagnosen wurden klinisch und histologisch gesichert, bei 9 Patienten wurden sie molekulargenetisch bestätigt (siehe Tabelle 3). Alle Muskelproben stammten aus der proximalen unteren Extremität, in einem Fall handelte es sich um paraspinale Muskulatur. Das Forschungsvorhaben wurde durch die Ethikkommission genehmigt.

| Nummer | Geschlecht | Alter | Diagnose | Mutation |
|---------------|-------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| 1 | m | 8 Jahre | DMD | Exon 7-39 |
| 2 | m | 7 Jahre | DMD | Exon 51 |
| 3 | m | 8 Jahre | DMD | - |
| 4 | m | 2 Jahre | DMD | Exon 48-49 |
| 5 | m | 2 Jahre | DMD | - |
| 6 | m | 10 Jahre | DMD | - |
| 7 | m | 6 Jahre | DMD | Exon 46-47 |
| 8 | m | 8 Jahre | DMD | Exon 46-47 |
| 9 | m | 4 Jahre | DMD | - |
| 10 | m | 6 Jahre | DMD | Exon 10-43 |
| 11 | m | 3 Jahre | DMD | - |

| Nummer | Geschlecht | Alter | Diagnose | Mutation |
|--------|------------|----------|--------------------------------------|------------|
| 12 | m | 6 Jahre | DMD | Exon 45-47 |
| 13 | m | 3 Jahre | DMD | - |
| 14 | m | 12 Jahre | DMD | Exon 45 |
| 15 | m | 4 Jahre | DMD | - |
| 16 | m | 10 Jahre | DMD | Exon 51 |
| 17 | m | 14 Jahre | DMD | - |
| 18 | m | 5 Jahre | gesunde Muskulatur | |
| 19 | m | 9 Jahre | gesunde Muskulatur | |
| 20 | m | 15 Jahre | gesunde Muskulatur | |
| 21 | m | 4 Jahre | gesunde Muskulatur | |
| 22 | m | 1 Jahr | gesunde Muskulatur | |
| 23 | m | 15 Jahre | gesunde Muskulatur | |
| 24 | m | 15 Jahre | gesunde Muskulatur | |
| 25 | m | 6 Jahre | gesunde Muskulatur | |
| 26 | m | 7 Jahre | gesunde Muskulatur | |
| 27 | m | 13 Jahre | gesunde Muskulatur | |
| 28 | m | 12 Jahre | V.a. Mitochondriopathie | |
| 29 | m | 4 Jahre | CMD mit Laminin $\alpha 2$ Defizienz | |
| 30 | m | 10 Jahre | Glycogenose Typ II (juvenil) | |
| 31 | m | 9 Jahre | LGMD | |
| 32 | w | 22 Jahre | unklare Myopathie | |
| 33 | m | 6 Jahre | unklare Myopathie | |
| 34 | m | 9 Jahre | unklare Myopathie | |
| 35 | w | 6 Jahre | CMD mit Selenoproteindefizienz | |
| 36 | w | 3 Jahre | CMD mit Laminin $\alpha 2$ Defizienz | |
| 37 | m | 1 Monat | kongenitale Myopathie | |
| 38 | w | 4 Jahre | CMD, keine genaue Zuordnung | |

Tabelle 3: bearbeitete Muskelgewebeproben

2.1.2 Muskelbiopsie und Konservierung des Gewebes

Die Muskelproben wurden entweder in offener Biopsie oder mittels Nadelbiopsie entnommen. In einer sterilen Nierenschale mit NaCl-getränkten, sterilen Mullbinden wurde das Gewebe quer zur Faserrichtung in ca. 3 x 3 mm große Stückchen geschnitten und auf Korkplättchen, die mit einem Tropfen Einbettmedium versehen waren, übertragen. Unmittelbar darauf wurden sie in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Methylbutan für 5 sec vorgefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff gelegt. Die längerfristige Lagerung erfolgte dann bei -80°C.

2.2 In situ-Hybridisierung

2.2.1 Grundlagen

Durch die ersten in situ-Hybridisierungen (John et al., 1969; Gall et al., 1969) konnten mittels radioaktiv markierter RNA-Sonden repetitive DNA-Sequenzen nachgewiesen werden, der Nachweis einer Einzelkopiesequenz gelang 1981 erstmals Harper et al. Seither konnten mittels in situ -Hybridisierung zahlreiche Nukleinsäuresequenzen lokalisiert werden, unter anderem auch das Dystrophingen (Ried et al. 1990). Es ist mit dieser Methode möglich, RNA- oder DNA-Sequenzen direkt im biologischen Präparat sichtbar zu machen und bestimmten Zellen oder Chromosomen zuzuordnen. Im Gegensatz dazu werden in verschiedenen Blot-Verfahren DNA- (Southern-Blot) oder RNA-Fragmente (Northern-Blot) aus Gewebe isoliert, mittels Elektrophorese getrennt und anschließend hybridisiert. Durch densitometrische Verfahren kann dann allerdings eine Quantifizierung wesentlich einfacher und eleganter als mittels in situ-Hybridisierung erfolgen.

Das Prinzip der Hybridisierung beruht auf der Reassoziationskinetik zweier komplementärer Nukleinsäuremoleküle: eine markierte "Sonde" bildet mit einer zellulären "Zielsequenz" ein stabiles Hybrid und kann anschließend durch geeignete Nachweisverfahren sichtbar gemacht werden. Neben der radioaktiven Markierung gibt es verschiedene enzymatische Nachweissysteme, wobei hier die wesentlich schnellere Durchführbarkeit und die lange Haltbarkeit der Sonden ohne Aktivitätsverlust von großem Vorteil sind, jedoch muß eine geringere Sensitivität in Kauf genommen werden (Leitch et al. 1994). Bei radioaktiver Markierung, die durch enzymatischen Einbau von Nukleotiden, die einen β -Strahler enthalten, erfolgt, kann man zwischen Isotopen mit niedriger Emissionsenergie (z.B.: $^3\text{H}=0,018 \text{ MeV}$) und solchen mit hoher Emissionsenergie (z.B.:

$^{32}\text{P}=1,71\text{ MeV}$) unterscheiden: Je höher die Emissionsenergie desto größer die Sensitivität/kürzer die Expositionszeit bei abnehmender Auflösung (breitere Streuung der Silberkörner). Einen Kompromiß stellt das in dieser Arbeit verwendete ^{35}S mit einer mittleren Emissionsenergie (0,17 MeV) dar. Im folgenden soll kurz schematisch das Prinzip einer RNA-RNA-Hybridisierung geschildert werden.

Zunächst muß die zur Zielsequenz komplementäre DNA (cDNA) in die multiple Klonierungsstelle (MPS) eines Transkriptionsvektors, meist ein Plasmid, integriert werden. Diese multiple Klonierungsstelle wird von zwei verschiedenen Promotorsequenzen (z.B. T7; Sp6) flankiert, die von den entsprechenden Bakteriophagen-RNA-Polymerasen hochspezifisch erkannt werden und enthält darüber hinaus Sequenzen, an denen Restriktionsendonukleasen (z.B.: HIND III; Eco RI) angreifen und das Plasmid linearisieren können. Die Linearisierung erfolgt in bezug auf den entsprechenden Promotor stromabwärts der integrierten cDNA, also so, daß in 3'—>5' Richtung (in der bei der Transkription abgelesen wird) auf den entsprechenden Promotor die cDNA-Sequenz folgt. In Gegenwart radioaktiv markierter und unmarkierter Nukleotide werden durch entsprechende DNA-abhängige RNA-Polymerasen in einer sogenannten "run-off"-Transkription zahlreiche RNA-Transkripte definierter Länge und Sequenz erzeugt, die in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase entweder komplementär (= "Antisense") oder identisch/antikomplementär (= "Sense") zur nachzuweisenden Zielsequenz sind. Mit der Antisense-Sonde kann die gesuchte Sequenz hybridisiert werden, die Sense-Sonde dient als Negativkontrolle. Um die Bedingungen für die Hybridisierung zu optimieren, muß zum einen das Gewebe für die Sonde möglichst durchlässig gemacht werden, zum anderen die Länge der Sonde gekürzt werden, wobei zu beachten ist, daß die Stabilität der Hybride mit abnehmender Sondenlänge kleiner wird. Waschschritte und Inkubation mit RNase A, die nur Einzelstränge abbaut, dienen dazu, überschüssige oder unspezifisch gebundene Sonde nach erfolgter Hybridisierung zu entfernen. Durch Autoradiographie, das heißt Beschichtung der Präparate mit Photoemulsion, kann die hybridisierte Sonde sichtbar gemacht werden. Durch die emittierte β -Strahlung werden Silberhalogenide der Photoemulsion zu metallischem Silber reduziert und durch photographische Entwicklung werden die Silberkörnchen ("grains") sichtbar gemacht. Bei der Auswertung muß zwischen unspezifischen Signalen, das heißt willkürlich über den Gewebeschnitt verteilten "grains", und spezifischen Signalen, bei denen eine deutliche Signalhäufung über Zellkernen und der unmittelbaren Umgebung zu beobachten ist, unterschieden werden. Unter

"Hintergrundaktivität" versteht man Signale, die durch die Photoemulsion selbst bedingt sind, also auch auf beschichteten Objektträgern ohne Gewebe zu sehen sind.

2.2.2 Allgemeines

Zum Schutz sowohl der RNA-Sonden als auch der zu hybridisierenden Zielsequenzen vor RNasen, wurden für alle im folgenden beschriebenen Arbeitsschritte autoklavierte Einmalplastikwaren sowie 5h bei 250°C gebackene Glaswaren verwendet. Da RNasen, die als stabile Enzyme Erhitzen bis 100°C unbeschadet überstehen können, auch an Händen vorkommen, mußten stets Einmalhandschuhe ohne Puder, das enzymatische Reaktionen stören kann, getragen werden (Sambrook et al. 1989). Soweit möglich wurden Lösungen und Wasser mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, 0,1%), einem starken RNase-Inhibitor, behandelt und anschließend autoklaviert, nicht autoklavierbare Lösungen wurden in gebackenen Flaschen mit DEPC-Wasser angesetzt.

Die im folgenden erläuterten Arbeitsschritte wurden nach der Anleitung von Herrn Dr. Herbst "RNA/RNA-in situ-Hybridisierung" (Labor Herbst, in situ-Hybridisierung 1.95) durchgeführt.

2.2.3 Herstellung der ³⁵S -markierten RNA-Sonden

Die bereits linearisierten, die cDNA für die MMP-1- bzw. TIMP-1-Sonde enthaltenden Plasmide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Herbst zur Verfügung gestellt. Es gibt einige Publikationen, in denen diese Plasmide bereits verwendet wurden (Herbst et al. 1997; Milani et al. 1994). Die run-off-Transkription erfolgte mit ³⁵S -UTP (Fa. NEN Du Pont, Bad Homburg) als markiertem Nukleotid. Inkubation mit T7-RNA-Polymerase (Gibco-BRL, Karlsruhe) lieferte sowohl bei der MMP-1-, als auch bei der TIMP-1-Sonde das Antisense-Transkript (komplementär zur mRNA-Zielsequenz), während die Inkubation mit Sp6-RNA-Polymerase (Gibco-BRL, Karlsruhe) bei beiden Sonden das Sense-Transkript (antikomplementär zur mRNA-Zielsequenz) ergab. Der Transkriptionsansatz bestand aus einfach konzentriertem Sp6- bzw. T7-Puffer (Gibco-BRL, Karlsruhe), 5mM DTT, jeweils 1mM ATP, CTP, GTP und ³⁵S -UTP, RNase-Inhibitor (Promega, Heidelberg), sowie linearisiertem Plasmid (Inkubationszeit 1,5 Stunden bei 37°C). In der sich anschließenden Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Fällung wurden störendes Protein (Zwischenphase) sowie freie Nukleotide (Lösungsmittelphase) entfernt und die RNA-Sonden unter Zusatz von 3M Natriumacetat (pH=6.0) und 100%igem Ethanol aus dem wäßrigen Überstand bei -80°C ausgefällt.

Um eine für die Gewebepenetration optimale Sondenlänge von ungefähr 150 Basen zu erhalten, wurden die RNA-Sonden durch kontrollierte alkalische Hydrolyse aufgespalten, wobei in Abhängigkeit von der Ausgangslänge der entsprechenden cDNA-Sequenzen (MMP-1=0,7kb; TIMP-1=0.56kb) die MMP-1-Sonde 48 min und die TIMP-1-Sonde 44 min bei 60°C inkubiert wurden. Der Hydrolysepuffer bestand aus 80 mM NaHCO₃, 120 mM Na₂CO₃ (pH=10) sowie 10 mM DTT. Die alkalische Hydrolyse wurde nach Ablauf der errechneten Zeiten durch Zusatz von Stoppuffer (200 mM Natriumacetat; 1% Essigsäure; 10mM DTT) beendet. Nach erneuter Alkohol-fällung (s.o.), Verwerfen des Überstandes sowie Trocknen des Pellets in der Vakuumzentrifuge wurden die Sonden in 30 µl 10mM DTT gelöst und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Zur Überprüfung des Einbaus radioaktiven ³⁵S-UTPs wurde 1 µl der jeweiligen in DTT gelösten Sonde in 2ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und eine Messung im Szintillationszähler vorgenommen. Für diesen Ansatz ergab sich eine spezifische Aktivität von 1.7-3,4 x10⁶ cpm.

2.2.4 Hybridisierung

Aus den Gewebeproben wurden 6µm dicke Gefrierschnitte gefertigt, auf gebackene und mit 2% (v:v) APES in Aceton (Sigma, München) beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 80°C 3min getrocknet. Um die mRNA im Gewebe zu fixieren und eventuell eingebrachte RNasen zu inaktivieren, wurden die Schnitte 20-60 min in 4% PFA/PBS (pH=7,0; im Eiswasserbad) fixiert. Anschließend wurde in dreifach und einfach konzentrierter PBS-Lösung (1 x PBS: 0,13M NaCl; 8mM Na₂HPO₄; 2mM NaHPO₄; pH=7,0) gespült und in aufsteigender Alkoholreihe (30%;70%;90%;100% Ethanol/DEPC-H₂O) dehydriert. Nach mindestens einstündigem Trocknen wurden die Schnitte bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Die so fixierten Schnitte wurden zunächst zur Denaturierung basischer Proteine 20min mit 0,2N HCl behandelt und in 1 x PBS-Lösung (pH=7,0) mehrmals gespült. Um das Gewebe für die Sonden besser zugänglich zu machen, wurde mit 0,125 mg/ml Pronase in 1 x PBS (pH=7,0; 10min) inkubiert, zur Neutralisation wurde 0,1M Glycin/1xPBS verwendet. Es schlossen sich mehrere Spülgänge in 1 x PBS-Lösung an, wobei vor dem letzten Spülen 20min in 4% PFA/PBS (pH=7,0; im Eiswasserbad) nachfixiert wurde. Zur Neutralisation positiv geladener Moleküle, zur Verringerung unspezifischer Bindung der Sonde, wurde das Gewebe in frisch hergestellter Essigsäureanhydrid-Lösung (1:250 verdünnt in 0,1M Triethanolamin [pH=8,5]) unter

permanentem Schütteln inkubiert. Nach Spülen in 1 x PBS-Lösung, anschließender Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (30%; 70%; 90%; 100% Ethanol/DEPC-H₂O) und zweistündigem Lufttrocknen war die Vorbereitung der Schnitte bis zur eigentlichen Hybridisierung abgeschlossen. Pro Objektträger wurden 25µl eines Hybridisierungsgemisches auf die vorbereiteten Schnitte aufgetragen, wobei die Sonde in einem speziellen "Sondenmix" (50% Formamid; 10mM DTT; 200000 cpm ³⁵S -markierte RNA pro 25 µl) vor Zugabe zum "Hybridisierungsmix" 30sec bei 80°C denaturiert wurde. Das fertige Hybridisierungsgemisch ("Hybridisierungsmix"+"Sondenmix" im Verhältnis 4:1) setzte sich wie folgt zusammen:

50% deionisiertes Formamid; 10mM DTT; 10mM TrisHCl (pH=7,5); 0,3M NaCl;
10 mM Na₃PO₄ (pH=6,8); 5mM EDTA (pH=8,0); 0,002%(w/v) Ficoll; 0,002%(w/v)
Polyvinylpyrrolidone; 0,002% Rinderserumalbumin; 1mg/ml Hefe-tRNA; 10% Dex-
transulfat; 200 000 cpm ³⁵S -markierte RNA pro Objektträger

Die Gewebe wurden blasenfrei mit silikonisierten (Silikonlösung von Serva, Heidelberg) Deckgläschen abgedeckt und in feuchten Kammern 16h bei 52°C inkubiert. Zur Befeuchtung wurden die Kammern mit Zellstoff ausgelegt, der mit 50%igem Formamid getränkt worden war. Pro Gewebe wurden jeweils drei Schnitte mit der Antisense-Sonde und zwei Schnitte mit der Sense-Sonde hybridisiert. In jedem Hybridisierungsdurchlauf wurden neben pathologischen Geweben stets auch Proben normaler Muskulatur mitgeführt.

2.2.5 Waschen nach Hybridisierung

Nach Ablauf der Hybridisierungszeit wurden die Objektträger in Posthybridisierungswaschlösung (50% deionisiertes Formamid; 10mM DTT; 10mM TrisHCl (pH=7,5); 0,3M NaCl; 10mM Na₃PO₄ (pH=6,8); 5mM EDTA (pH=8,0); 0,002%(w/v) Ficoll; 0,002%(w/v) Polyvinylpyrrolidone; 0,002% Rinderserumalbumin)

4,5h bei 52°C gewaschen (Schüttelwasserbad). Die Posthybridisierungswaschlösung wurde nach 30min erneuert und die Deckgläschen vorsichtig entfernt. Anschließend wurde 1,5h in TES-Lösung (10mM TrisHCl; 1mM EDTA; 0,5M NaCl) gespült (37°C; Schüttelwasserbad). Während dieser Zeit erfolgte zum Abbau unspezifisch gebundener, einsträngig vorliegender RNA-Sonde eine Inkubation mit RNase A (20 µg/ml TES-Lösung) über 30min. Entfernt wurden die so

entstandenen RNA-Fragmente durch Waschschrirte mit SSC-Lösung (0,3M NaCl; 30mM Na₃-Citrat) in abnehmender Konzentration (Raumtemperatur, auf dem Schüttler, 1h), gefolgt von Dehydrierung in Ethanol/0,3M NH₄-Acetat (30%; 70%; 90%; 100%) und Lufttrocknung über Nacht.

2.2.6 Autoradiographie

In der Dunkelkammer wurden die Objektträger mit Photoemulsion LM-1/RPN 40 (Amersham international, UK) beschichtet und nach mindestens 1h Lufttrocknen lichtdicht bei 4°C in Kartell-Boxen gelagert. Diese enthielten CaCl₂ als Trocknungsmittel. Durch Vorversuche wurde eine 40-tägige Expositionszeit festgelegt, die einen guten Kompromiß zwischen der Signalstärke, Erkennbarkeit der darunter liegenden Strukturen und einer akzeptablen Hintergrundaktivität erbrachte. Entwickelt wurde in Kodak D 19 (Kodak, UK), 1:1 mit Aqua dest. verdünnt (3min, unter Schütteln), beendet durch 1% Essigsäure (50sec) und anschließender Fixierung mit Kodak Fixierer 3000 (Kodak, UK), 1:4 mit Aqua dest. verdünnt. Die Präparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

2.2.7 Auswertung und photographische Dokumentation

Die Auswertung wurde an einem Lichtmikroskop mit integriertem Photoapparat (Camera C-35AD-4, Olympus Optical Co., Tokio) vorgenommen. Dazu wurden von jedem mit der Antisense-Sonde hybridisiertem Präparat in fünf repräsentativen Gesichtsfeldern (Vergrößerung 1: 400) gezählt: Gesamtzahl nichtmyogener Zellen, Anzahl MMP-1 bzw. TIMP-1-mRNA-exprimierender nichtmyogener Zellen, Gesamtzahl ("grains") spezifischer Signale. Hierzu wurde die Anzahl der "grains" über exprimierenden Zellen zunächst ausgezählt und in Gruppen von 10-20, 21-30, 31-50, 51-100 und >100 "grains" pro Zelle eingeteilt. Die Gesamtexpression wurde dann errechnet, indem die Zellzahl der entsprechenden Gruppe mit dem Mittelwert dieser Gruppe multipliziert wurde. Z.B.: Faktor 15 in der Gruppe 10-20, Faktor 25 in der Gruppe 21-30 usw., die Gruppe >100 wurde mit 125 bewertet. Die Produkte jeder Gruppe wurden dann zur "Gesamtexpression" addiert). Aus diesen Werten wurde dann die durchschnittliche Expressionsstärke berechnet, indem die Gesamtzahl radioaktiver Signale durch die Anzahl exprimierender Zellen geteilt wurde. Der Anteil

positiver Zellen an den nichtmyogenen Zellen ergab sich aus dem Quotienten "Anzahl exprimierender Zellen" geteilt durch Gesamtzahl nichtmyogener Zellen.

Für die jeweiligen Patientengruppen charakteristische Präparatausschnitte wurden auf EPY-64T Farbfilm (Kodak) abgebildet, wobei entsprechende Ausschnitte in "Antisense" und "Sense" soweit möglich gegenübergestellt wurden.

2.3 Immunhistochemie und Sequentielle Doppelmarkierung

2.3.1 Grundlagen der Immunhistochemie

Um bestimmte Zell- oder Gewebekomponenten zu lokalisieren, können immunhistochemische Methoden angewandt werden. Zellstrukturen, die als Antigen wirken (=Epitop), werden von der komplementären Region (=Paratop) spezifischer Antikörper erkannt. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex kann durch Markierung eines der Bindungspartner, meist des Antikörpers, sichtbar gemacht werden. Häufig angewandte Markierungstechniken sind die Immunfluoreszenz und die Immunenzymtechnik, wobei die erstgenannte methodisch einfacher und schneller auszuführen ist, die andere eine bessere morphologische Analyse zulässt und darüber hinaus lange Zeit haltbare Präparate liefert.

2.3.2 APAAP-Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Cordell et al. 1984 erstmals beschriebene "Alkalische Phosphatase-Antialkalische Phosphatase"-Methode (APAAP) eingesetzt, bei der der primäre Antikörper über einen sogenannten Brückenantikörper mit dem APAAP-Komplex verbunden wird. Letzterer besteht aus einem monoklonalen Antikörper, gerichtet gegen alkalische Phosphatase, und alkalischer Phosphatase. Damit sowohl der Primärantikörper, als auch der Antikörper des APAAP-Komplexes vom Brückenantikörper gebunden werden können, müssen beide von derselben Spezies stammen. Zur Färbung wird Naphtol-As-Bi-Phosphat von der alkalischen Phosphatase zum entsprechenden Phenol umgesetzt, das wiederum aus dem Chromogen Neufuchsin einen roten, alkohollöslichen Azofarbstoff bildet. Durch Zusatz von Levamisol wird die Aktivität eventuell vorhandener endogener alkalischer Phosphatase blockiert (Ponder et al. 1981),

Rinderserumalbumin und Kaninchenserum sollen unspezifische Bindungen der Antikörper verhindern und somit die Hintergrundfärbung reduzieren.

2.3.3 Sequentielle Doppelmarkierung

Zur Charakterisierung der Zellen, bei denen mRNA für MMP-1 oder TIMP-1 nachweisbar war, wurde die APAAP-Methode mit anschließender *in situ*-Hybridisierung kombiniert. Es kamen die folgenden primären Antikörper (Dako, Hamburg) in entsprechender Verdünnung zum Einsatz:

| | | |
|-----------------|----------|--|
| CD 68 | (1:50) | —> Makrophagen |
| CD 31 | (1:50) | —> Endothelzellen |
| Vimentin | (1:1000) | —> Fibroblasten |
| Desmin | (1:100) | —> unreife Muskelzellen |
| Merosin/Laminin | (1:100) | —> Basalmembran, Lokalisation von Satellitenzellen |

Für die Doppelmarkierung wurden exemplarisch Gewebeproben zweier DMD-Patienten ausgewählt, die in der vorangegangenen, einfachen *in situ* -Hybridisierung hohe Spezifität und ausreichende Signalstärke aufwiesen. Es mußten wiederum sämtliche oben beschriebenen Vorkehrungen gegen RNasen getroffen werden, wobei Antikörper als solche nie frei von RNasen sind und somit ein besonderes Problem darstellen. Dies dürfte, zusammen mit der größeren Anzahl an Arbeitsschritten, der Grund für den generellen Intensitätsverlust an radioaktivem Signal bei der sequentiellen Doppelmarkierung sein.

Die Herstellung der Gefrierschnitte erfolgte wie für die einfache *in situ* -Hybridisierung, die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur, gefolgt von Fixierung in 4% PFA/PBS. Da Phosphatpuffer die alkalische Phosphatase in ihrer enzymatischen Aktivität behindern kann, wurde anschließend mehrmals in einfach konzentriertem TBS (1 x TBS: 0,05M Tris; 0,15M NaCl; pH=7,5) gespült. Nach weitgehender Entfernung des Spülpuffers erfolgte die Inkubation (in feuchter Kammer; 30min bei Raumtemperatur) mit dem Primärantikörper in o.g. Verdünnung mit Antikörperverdünnungspuffer (einfach konzentriertes RPMI-1640 [Seromed, Berlin]; 1% Rinderserumalbumin; 5000U/ml Heparin [beides von Sigma, München]; 2,5mg/ml Hefe-tRNA

[Gibco-BRL, Karlsruhe]), indem auf jeden Schnitt 100µl des verdünnten Antikörpers pipettiert wurden. Nach jeweils gründlichem Spülen in 1 x TBS wurden zunächst 100µl Brückenantikörper (Rabbit-anti-mouse: Dako Z259, Hamburg)-1:10 verdünnt mit inaktiviertem Kaninchenserum-, dann 100µl APAAP-Komplex (Dako D651, Hamburg) 1:20 verdünnt mit Antikörperversdünnpuffer (s.o.) auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurden die Präparate 7-20min unter ständigem Schütteln in APAAP-Substratlösung entwickelt. Dazu wurden drei Lösungen A, B und C hergestellt: Lösung A: 350ml TBS (0,05M Tris; 0,15M NaCl; pH=9,7); 125ml Propandiol (0,2M); 200mg Levamisol. Lösung B: 250mg Naphtol-As-Bi-Phosphat; 3ml Dimethylformamid. Lösung C: 100mg Natriumnitrit; 2,5ml Aqua dest.; 1ml Neufuchsin-Stammmlösung (5g Neufuchsin [Merck, Darmstadt]) in 100ml 2N HCl gelöst). Es wurden zuerst Lösung A und C gemischt, dann Lösung B dazugegeben. Nach Titration auf pH=8,8 mit 2N HCl und anschließender Filtration konnten die Präparate in der fertigen Substratlösung entwickelt werden. Nach mehreren Spülgängen zunächst in 1xTBS (pH=7,5), dann in 1xPBS (pH=7,0) und einer zusätzlichen Fixierung in 4% PFA/PBS (im Eiswasserbad, pH=7,0) konnte mit der eigentlichen Hybridisierung (s.o.) begonnen werden, wobei alle folgenden Arbeitsschritte denen der einfachen "in situ -Hybridisierung" (s.o.) entsprachen. Bei der Dehydratation mit alkoholischen Lösungen war besondere Vorsicht notwendig, um die Farbkomplexe im Präparat nicht aufzulösen. Nach Entwicklung erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, eingedeckt wurden die Präparate mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt).

2.3.4 Auswertung und photographische Dokumentation

Die doppelt markierten Präparate wurden lichtmikroskopisch durchgemustert, wobei radioaktive Signale für MMP-1- und TIMP-1-mRNA den immunhistologisch angefärbten Zellen (entsprechend der eingesetzten Antikörper) zugeordnet wurden. Einige repräsentative Ausschnitte wurden, wie bereits unter 2.2.7 beschrieben, photographiert.

2.4 Statistische Methoden bei der Auswertung der Ergebnisse

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde die mRNA-Expression von MMP-1 und TIMP-1 in den Gruppen "DMD", "normale Kontrolle" und "pathologische Kontrolle" quantitativ miteinander verglichen. Dazu wurden die Parameter Anzahl exprimierender Zellen, Gesamtexpression in fünf Gesichtsfeldern und durchschnittliche Expressionsstärke der Zellen (Gesamtexpression geteilt durch Anzahl exprimierender Zellen) in den verschiedenen Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests statistisch ausgewertet und auf ihre Signifikanz hin überprüft. Mit Hilfe des Programms SPSS wurden Boxplots erstellt, durch die sich Größenverteilungen graphisch darstellen lassen. Ein Ergebnis galt als statistisch signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit höchstens 5% betrug ($p < 0,05$).

3. Ergebnisse

Um die Expression von MMP-1- und TIMP-1-mRNA in den Gruppen "DMD", "normale Kontrolle" und "pathologische Kontrolle" statistisch miteinander vergleichen zu können, wurden anhand der Antisense-Präparate folgende Werte ermittelt (vgl. 2.2.7):

| Nr. | Diagn | MMP nmZ | MMP pos Z | MMPges Expr | MMP ApZ | MMP ØExpr | TIMP nmZ | TIMP pos Z | TIMPges Expr | TIMP ApZ | TIMP ØExpr |
|-----|-------|------------|--------------|----------------|------------|--------------|-------------|---------------|-----------------|-------------|---------------|
| 1 | DMD | 1235 | 485 | 12610 | 0,39 | 26,00 | 1230 | 155 | 4085 | 0,13 | 26,35 |
| 2 | DMD | 1045 | 325 | 7720 | 0,31 | 23,75 | 1005 | 142 | 3975 | 0,14 | 27,99 |
| 3 | DMD | 845 | 257 | 6530 | 0,30 | 25,41 | 1223 | 233 | 7665 | 0,19 | 32,90 |
| 4 | DMD | 1150 | 390 | 8970 | 0,34 | 23,00 | 1325 | 247 | 6470 | 0,19 | 26,19 |
| 5 | DMD | 1302 | 566 | 16245 | 0,43 | 28,70 | 1216 | 323 | 8155 | 0,27 | 25,25 |
| 6 | DMD | 913 | 330 | 8605 | 0,36 | 26,08 | 1052 | 112 | 3915 | 0,11 | 34,96 |
| 7 | DMD | 1263 | 469 | 23170 | 0,37 | 49,40 | 1257 | 341 | 19535 | 0,27 | 57,29 |
| 8 | DMD | 1269 | 469 | 20255 | 0,37 | 43,19 | 1515 | 256 | 19840 | 0,17 | 77,50 |
| 9 | DMD | 960 | 128 | 3355 | 0,13 | 26,21 | 1249 | 195 | 7675 | 0,16 | 39,36 |
| 10 | DMD | 764 | 314 | 9660 | 0,41 | 30,76 | 786 | 137 | 4380 | 0,17 | 31,97 |
| 11 | DMD | 1445 | 432 | 15875 | 0,30 | 36,75 | 2150 | 269 | 12040 | 0,13 | 44,76 |
| 12 | DMD | 1067 | 296 | 11910 | 0,28 | 40,24 | 1362 | 326 | 11500 | 0,24 | 35,28 |
| 13 | DMD | 1085 | 385 | 9995 | 0,35 | 25,96 | 993 | 117 | 3495 | 0,12 | 29,87 |
| 14 | DMD | 649 | 362 | 10435 | 0,56 | 28,83 | 785 | 330 | 7970 | 0,42 | 24,15 |
| 15 | DMD | 915 | 437 | 12810 | 0,48 | 29,31 | 1155 | 447 | 16125 | 0,39 | 36,07 |
| 16 | DMD | 902 | 466 | 15480 | 0,52 | 33,22 | 1186 | 307 | 9315 | 0,26 | 30,34 |
| 17 | DMD | 715 | 232 | 6655 | 0,32 | 28,69 | 835 | 135 | 4800 | 0,16 | 35,56 |
| 18 | nKo | 525 | 173 | 3165 | 0,33 | 18,29 | 780 | 92 | 1450 | 0,12 | 15,76 |
| 19 | nKo | 349 | 194 | 3850 | 0,56 | 19,85 | 328 | 137 | 2165 | 0,42 | 15,80 |
| 20 | nKo | 236 | 141 | 3480 | 0,60 | 24,68 | 261 | 74 | 1235 | 0,28 | 16,69 |
| 21 | nKo | 485 | 340 | 6560 | 0,70 | 19,29 | 376 | 93 | 575 | 0,25 | 6,18 |
| 22 | nKo | 672 | 254 | 4875 | 0,38 | 19,19 | 340 | 81 | 1240 | 0,24 | 15,31 |
| 23 | nKo | 360 | 197 | 4010 | 0,55 | 20,36 | 383 | 39 | 575 | 0,10 | 14,74 |
| 24 | nKo | 278 | 201 | 5050 | 0,72 | 25,12 | 292 | 65 | 445 | 0,22 | 6,85 |
| 25 | nKo | 532 | 177 | 3660 | 0,33 | 20,68 | 560 | 68 | 400 | 0,12 | 5,88 |
| 26 | nKo | 536 | 224 | 4835 | 0,42 | 21,58 | 363 | 166 | 2905 | 0,46 | 17,50 |
| 27 | nKo | 365 | 180 | 3575 | 0,49 | 19,86 | 357 | 35 | 245 | 0,10 | 7,00 |
| 28 | pKo | 744 | 241 | 5810 | 0,32 | 24,11 | 701 | 184 | 3050 | 0,26 | 16,58 |
| 29 | pKo | 679 | 325 | 6760 | 0,48 | 20,80 | 589 | 142 | 2225 | 0,24 | 15,67 |
| 30 | pKo | 758 | 333 | 7930 | 0,44 | 23,81 | 817 | 200 | 4115 | 0,24 | 20,58 |
| 31 | pKo | 814 | 280 | 7145 | 0,34 | 25,52 | 763 | 308 | 7015 | 0,40 | 22,78 |
| 32 | pKo | 651 | 389 | 9110 | 0,60 | 23,42 | 771 | 270 | 4660 | 0,35 | 17,26 |
| 33 | pKo | 592 | 472 | 11700 | 0,80 | 24,79 | 483 | 353 | 7645 | 0,73 | 21,66 |
| 34 | pKo | 580 | 265 | 7075 | 0,46 | 26,70 | 912 | 268 | 5500 | 0,29 | 20,52 |
| 35 | pKo | 848 | 437 | 13260 | 0,52 | 30,34 | 833 | 217 | 3930 | 0,26 | 18,11 |
| 36 | pKo | 1106 | 504 | 15275 | 0,46 | 30,31 | 1481 | 388 | 13780 | 0,26 | 35,52 |
| 37 | pKo | 2182 | 782 | 15435 | 0,36 | 19,74 | 2046 | 343 | 8945 | 0,17 | 26,08 |
| 38 | pKo | 1079 | 464 | 10550 | 0,43 | 22,74 | 1260 | 199 | 4685 | 0,16 | 23,54 |

Tabelle 4; Daten für quantitative Analyse; Erklärung siehe nächste Seite

Erklärung zur Tabelle 4:

| | | |
|-----------|---|--|
| Diagn: | = | Diagnose |
| nKo: | = | Kontrollgruppe, normale Muskulatur |
| ØExp.: | = | durchschnittliche Expressionsstärke |
| pos Z: | = | Anzahl der positiven (betreffende mRNA exprimierende) Zellen |
| nmZ: | = | Anzahl nichtmyogener Zellen |
| pKo: | = | Kontrollgruppe, pathologische Muskulatur - genaue Diagnose siehe 2.2.1 |
| ges Expr: | = | Gesamtexpression, Anzahl der "grains" |
| ApZ: | = | Anteil positiver Zellen an den nichtmyogenen Zellen |

Die mit der Sense-Sonde hybridisierten Gewebeschnitte, die als Negativkontrollen dienten, zeigten nur unspezifische Hintergrundsignale. Da einige Gewebeproben sich nur schlecht schneiden ließen und deshalb keine Serienschnitte angefertigt werden konnten, war die Gegenüberstellung korrespondierender Stellen in "Antisense" und "Sense" nicht immer möglich. Aus diesem Grund wurden nur von einigen Gewebeproben sowohl "Antisense"-, als auch "Sense"-Präparate abgebildet, in denen gleiche Ausschnitte erkennbar sind.

3.1 Expression von MMP-1-mRNA

Die Gesamtexpression von MMP-1-mRNA war in der Gruppe "DMD" gegenüber der normalen Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,0001$) erhöht, gegenüber der Gruppe "pathologische Kontrolle" gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied (Diagramm 1).

Gesamtexpression von MMP-1-mRNA

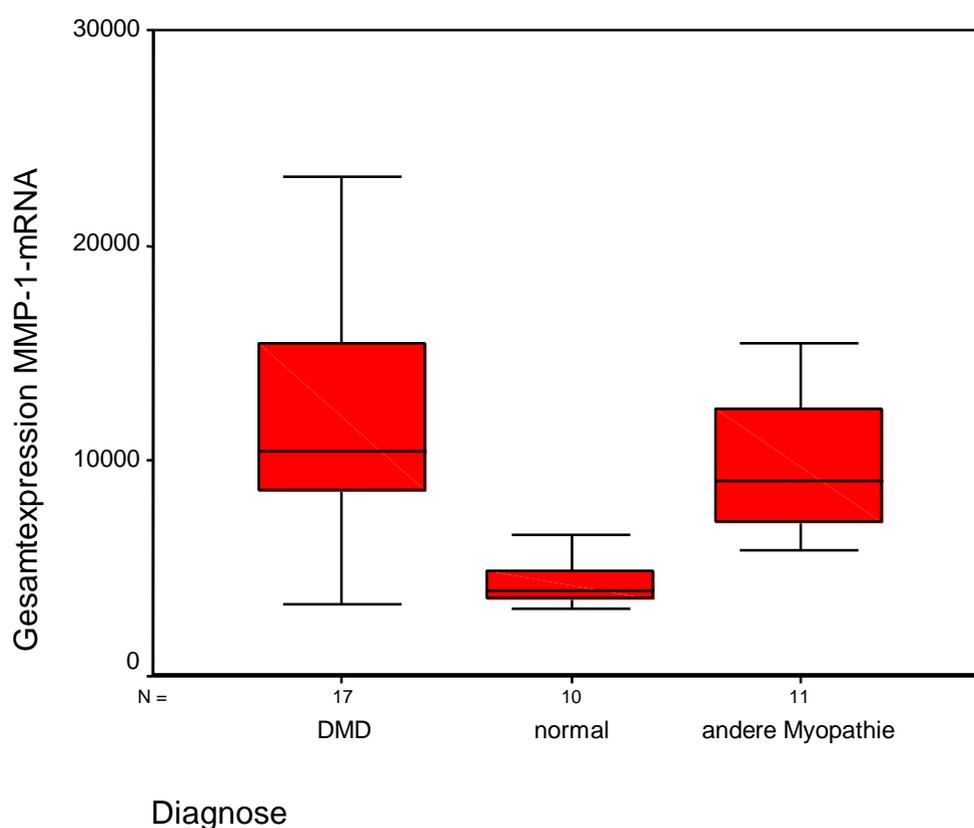


Diagramm 1: Gesamtexpression von MMP-1-mRNA

Erläuterung: Der Kasten stellt den Interquartilsbereich IQR dar: die untere Grenze ist die 25., die obere Grenze die 75. Perzentile, der Querstrich innerhalb der Box der Median. Die Werte, die maximal 1,5 * IQR über oder unter der Box liegen, bilden die Linien (Whiskers). Werte außerhalb dieses Bereichs, aber noch innerhalb von 3 * IQR gelten als Ausreißer und werden von SPSS mit einem Kreis eingezeichnet. Extremwerte liegen mehr als 3 * IQR von der Box entfernt und werden durch Sterne gekennzeichnet.

Die durchschnittliche Expression pro exprimierender Zelle ergab eine signifikante Erhöhung bei DMD ($p < 0,00001$) und pathologischer Kontrolle ($p < 0,015$) gegenüber normalen Kontrollen, wobei die DMD-Gruppe auch gegenüber den pathologischen Kontrollen

($p < 0,01$) eine signifikant höhere durchschnittliche Expression zeigte (Diagramm 2).

Durchschnittliche Expression von MMP-1-mRNA

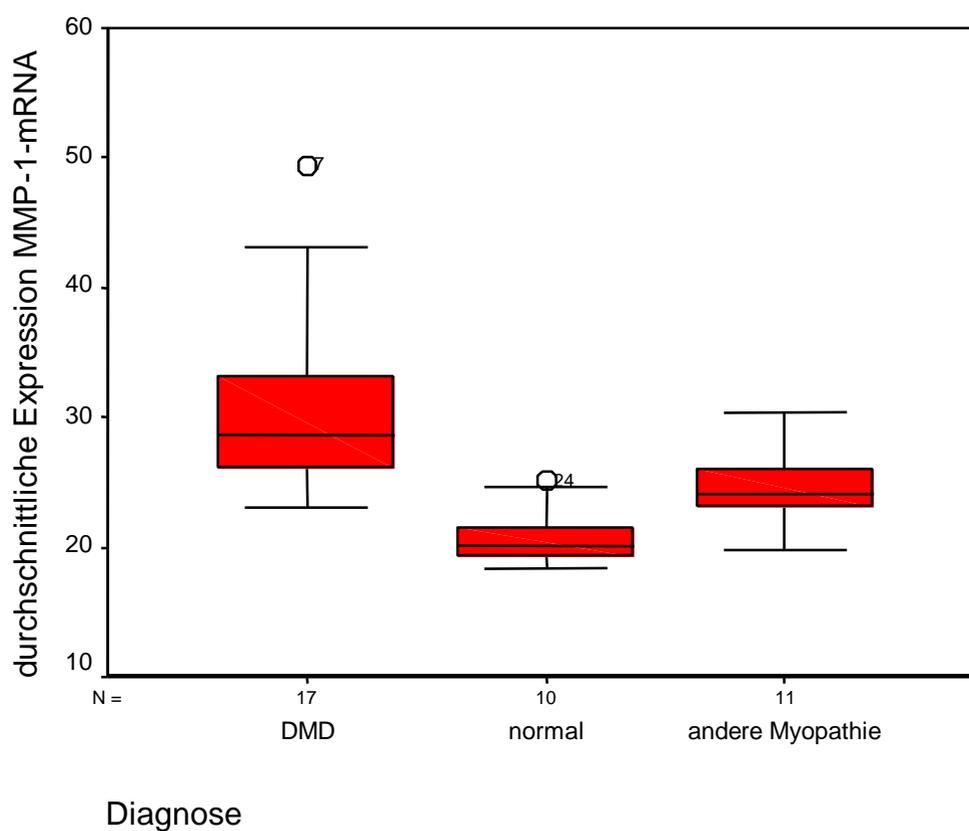


Diagramm 2: durchschnittliche Expression von MMP-1-mRNA. (Erläuterung zur Darstellung unter Diagramm 1)

Es zeigte sich, daß in der DMD-Gruppe der Anteil MMP-1-mRNA exprimierender Zellen im Vergleich zu den anderen Gruppen am niedrigsten war, obwohl die MMP-1-Gesamtexpression am höchsten war. Daraus läßt sich ableiten, daß die Erhöhung von MMP-1-mRNA eher durch Mehrproduktion der einzelnen Zellen als durch Rekrutierung

nichtproduzierender Zellen erreicht wurde. Der Anteil exprimierender Zellen war gegenüber normal ($p < 0,015$) und gegenüber der pathologischen Kontrollgruppe ($p < 0,05$) statistisch signifikant kleiner (Diagramm 3).

Anteil MMP-1-mRNA positiver Zellen an nichtmuskulären Zellen

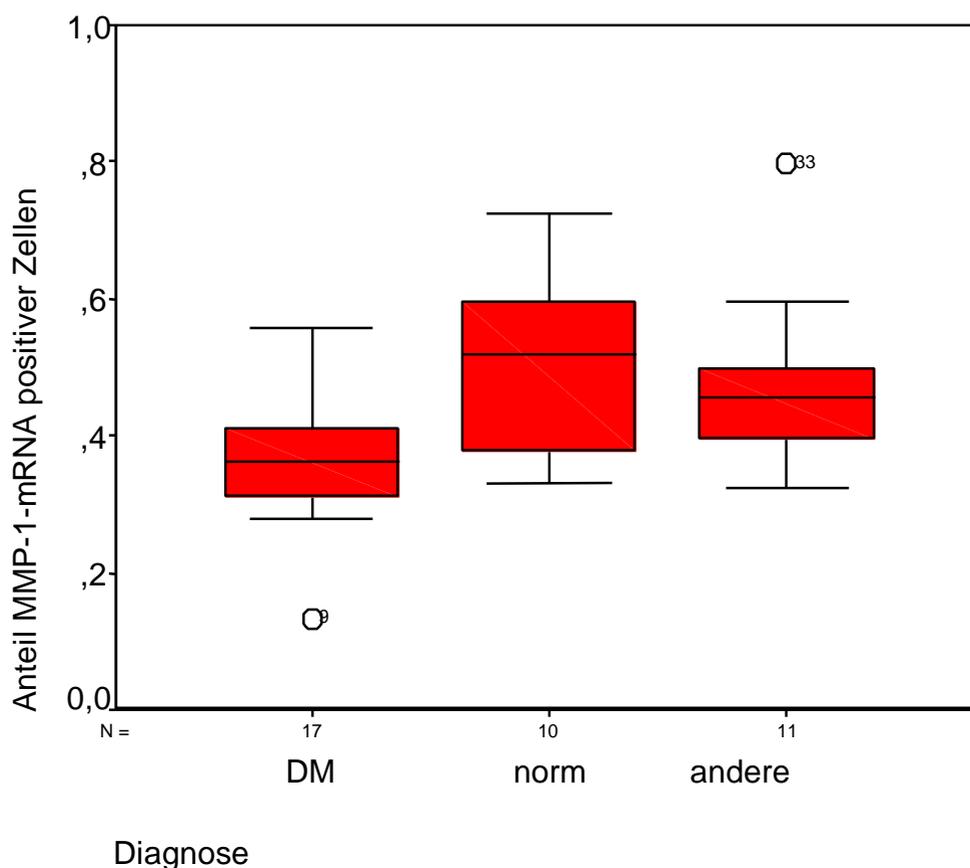


Diagramm 3: Anteil MMP-1-mRNA exprimierender Zellen an der Gesamtzahl nicht-myogener Zellen. (Erläuterung zur Darstellung unter Diagramm 1)

Auf den folgenden Seiten sind jeweils zwei mit der Antisense- und zwei mit der Sense-Sonde hybridisierte Präparate einander gegenübergestellt, um den Unterschied zwischen den

spezifischen (das heißt eine deutliche Signalhäufung über Zellkernen und unmittelbarer Umgebung) Antisense-Signalen und der nur unspezifischen (zufällig verteilten) Hintergrundaktivität der Sense-Präparate zu verdeutlichen. Außerdem kann ein Eindruck von der generellen Hintergrundaktivität gewonnen werden, und es lassen sich auf den Abbildungen 1, 2 und 3a einige für DMD typische histologische Veränderungen wie große Kaliberschwankungen, gerundete Zellen, hyperkontrahierte und nekrotische Fasern oder Zellinfiltrate erkennen. In Abb. 2 sind Antisense-Präparate aus den Gruppen "DMD", "normale Kontrolle" und "pathologische Kontrolle" einander gegenübergestellt, um die schon statistisch beschriebenen verschiedenen Expressionsstärken anhand der Präparate zu verdeutlichen.

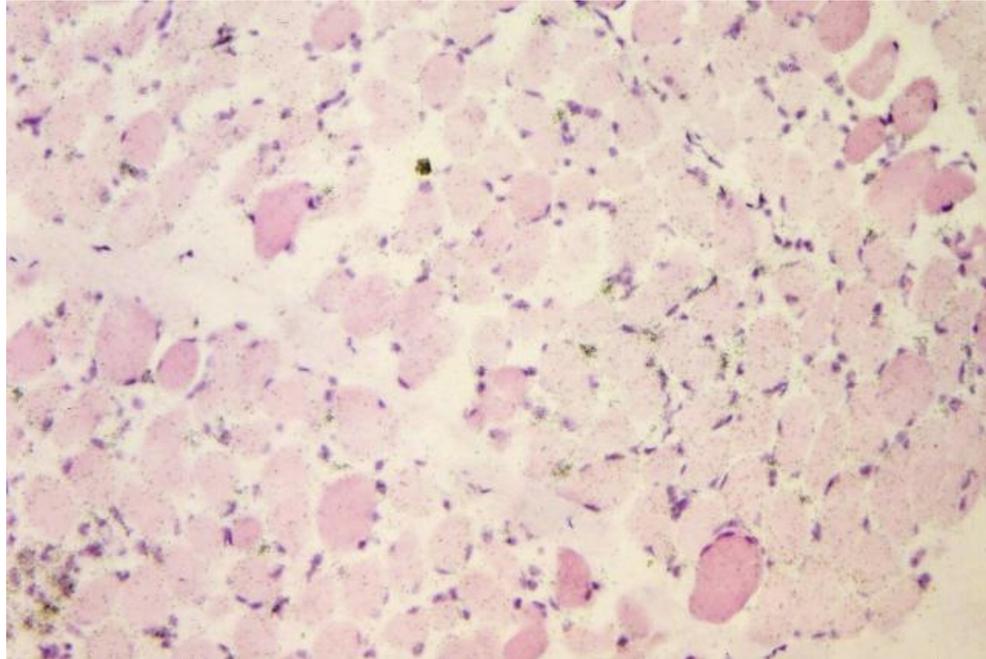


Abb.1a: DMD, MMP-1-mRNA-Antisense (Vergrößerung 200fach)

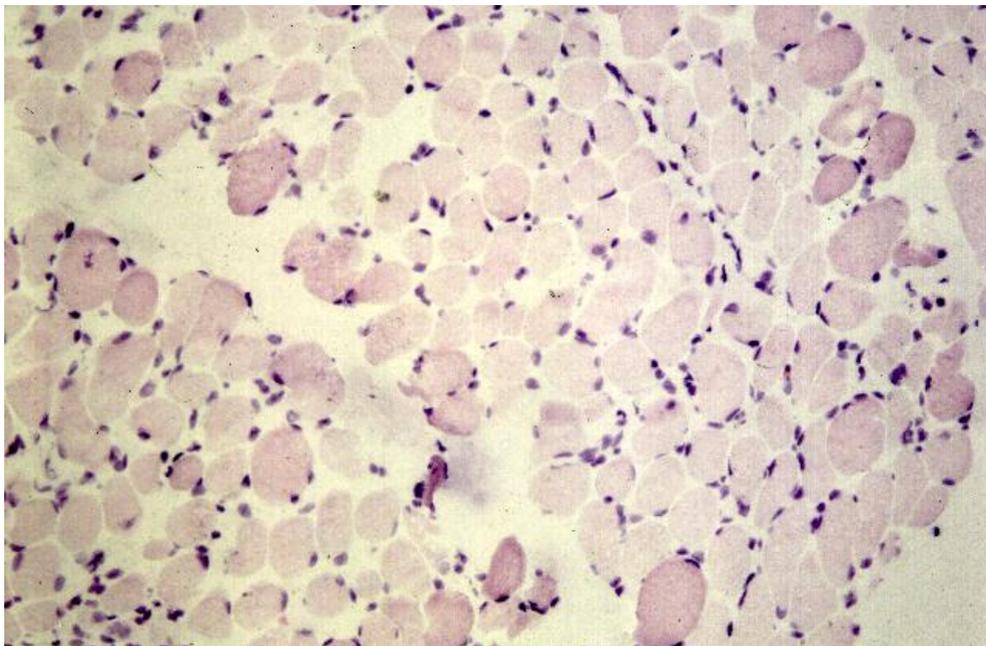


Abb. 1b: DMD, MMP-1-mRNA-Sense (Vergrößerung 200fach)

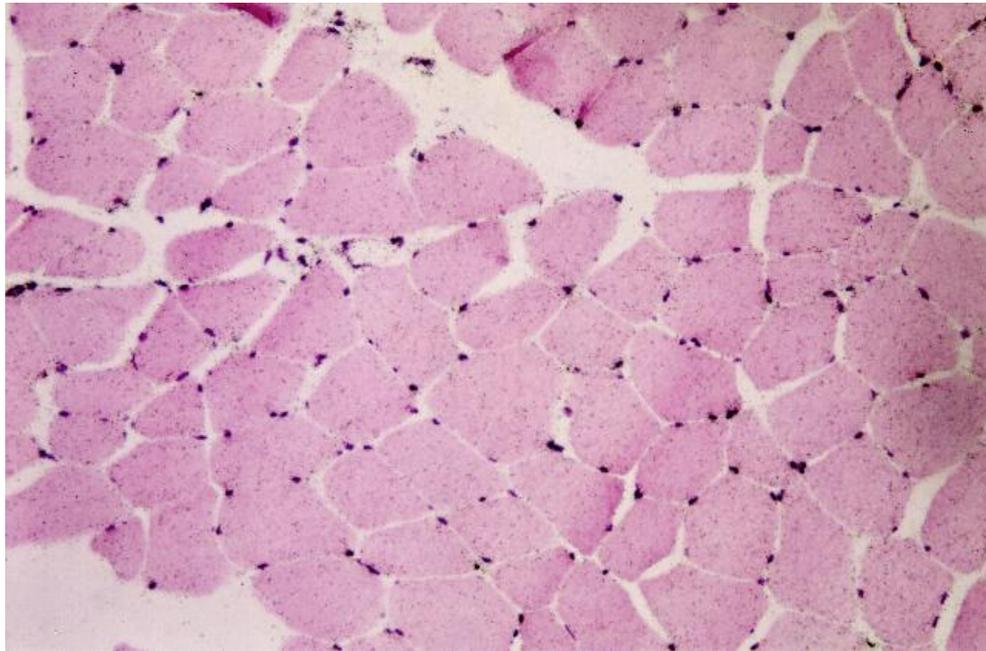


Abb.2a : normale Kontrolle, MMP-1-mRNA-Antisense (Vergrößerung 200fach)

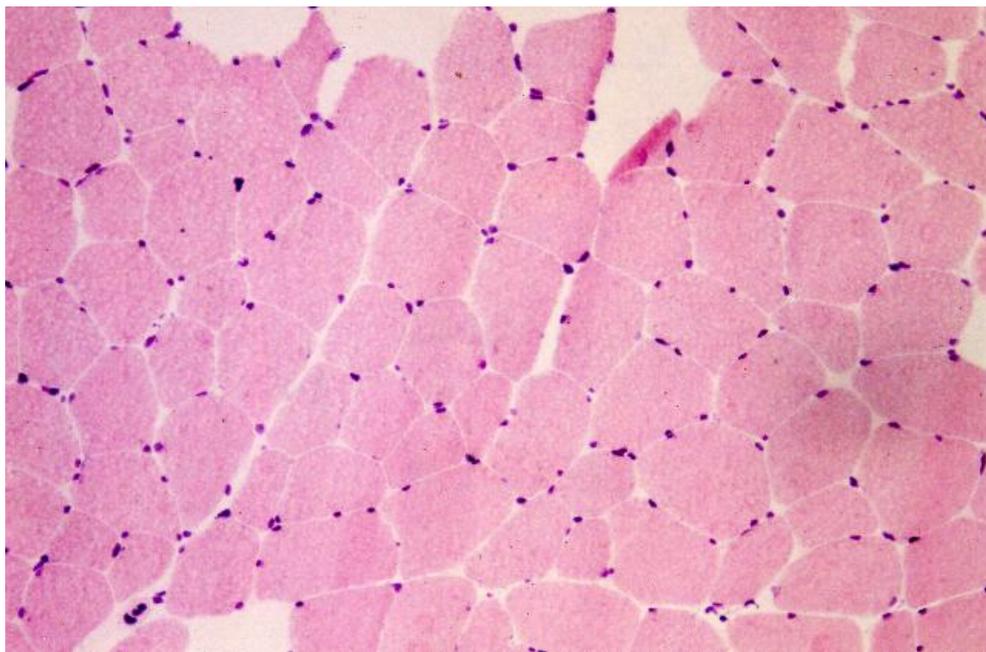


Abb.2b: normale Kontrolle, MMP-1-mRNA-Sense (Vergrößerung 200fach)

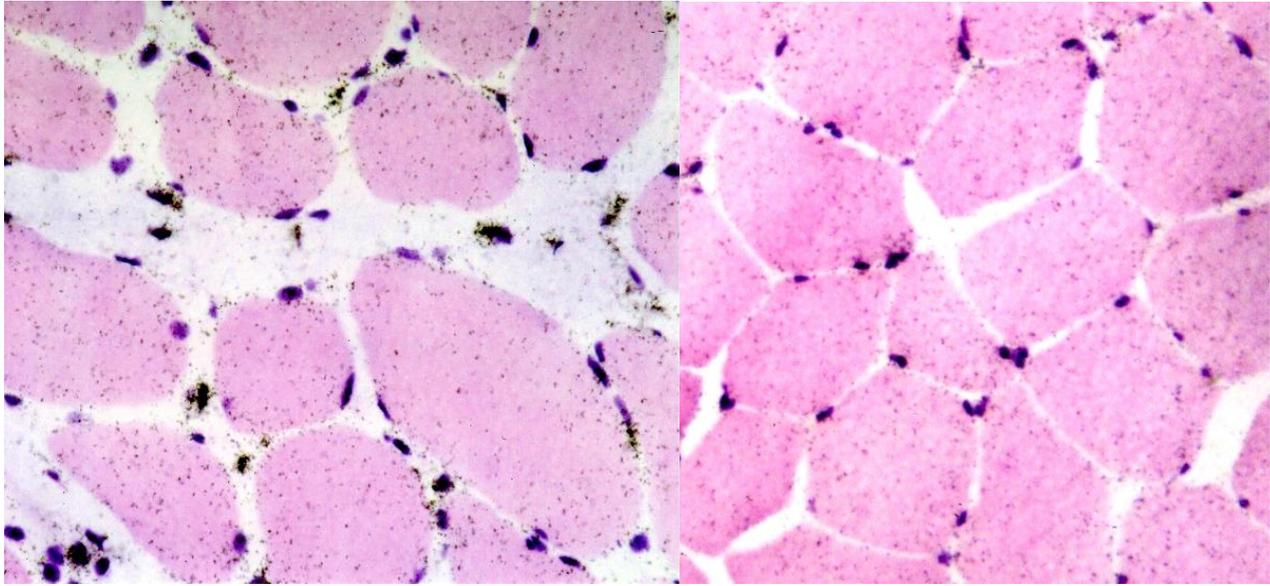


Abb.3a und b : links DMD, rechts normale Kontrolle, MMP-1-mRNA-Antisense
Vergrößerung 400fach

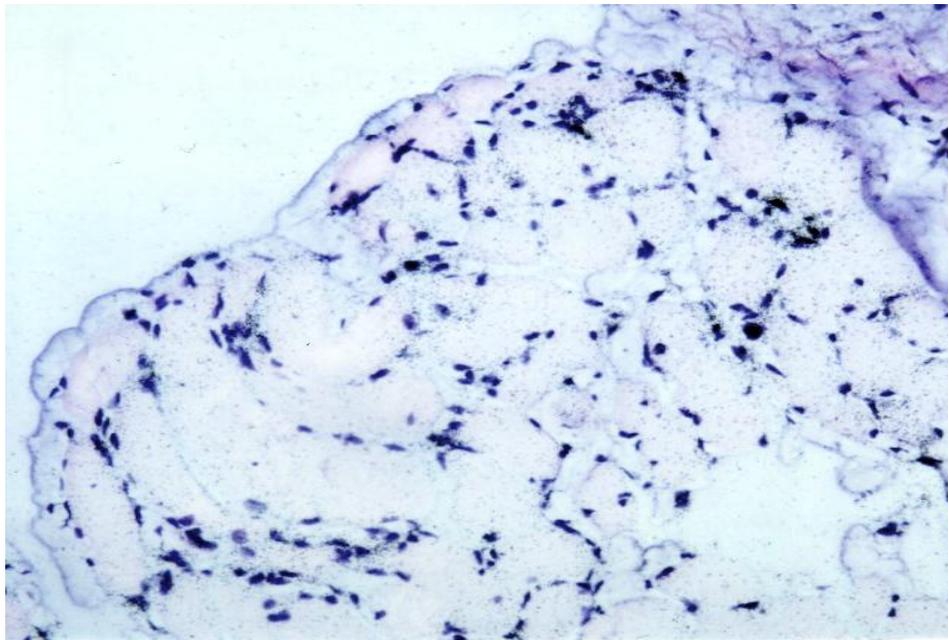


Abb.3c: pathologische Kontrolle, MMP-1-mRNA-Antisense (Vergrößerung 200fach)

3.2 Expression von TIMP-1-mRNA

Die Gesamtexpression von TIMP-1-mRNA war sowohl in der Gruppe "DMD" ($p < 0,000001$) als auch in der Gruppe "pathologische Kontrolle" ($p < 0,00005$) gegenüber der normalen Kontrollgruppe signifikant erhöht, zwischen der DMD-Gruppe und der pathologischen Kontrollgruppe ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Diagramm 4).

Gesamtexpression von TIMP-1-mRNA

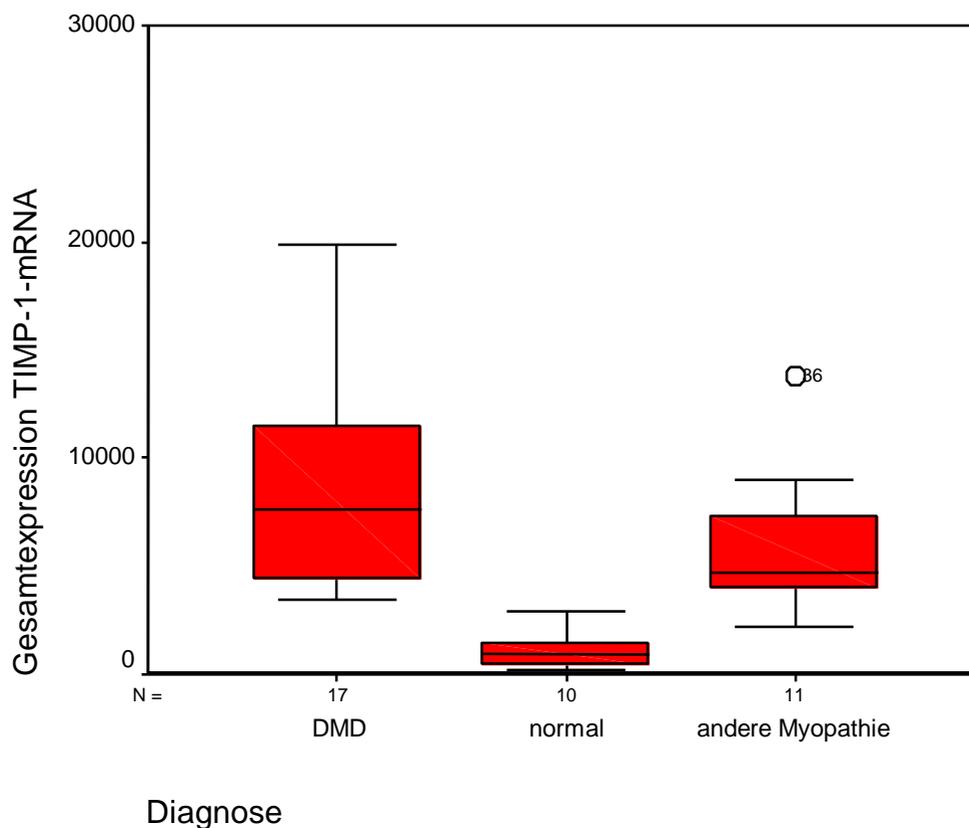


Diagramm 4: Gesamtexpression von TIMP-1-mRNA
(Erläuterung zur Darstellung unter Diagramm 1)

Hinsichtlich der durchschnittlichen Expression der exprimierenden Zellen ergab sich eine signifikante Erhöhung bei DMD ($p < 0,000001$) und pathologischer Kontrolle ($p < 0,001$) gegenüber normalen Kontrollen. Die DMD-Gruppe zeigte auch gegenüber den pathologischen Kontrollen eine signifikant ($p < 0,001$) höhere durchschnittliche Expression (Diagramm 5).

Durchschnittliche Expression von TIMP-1-mRNA

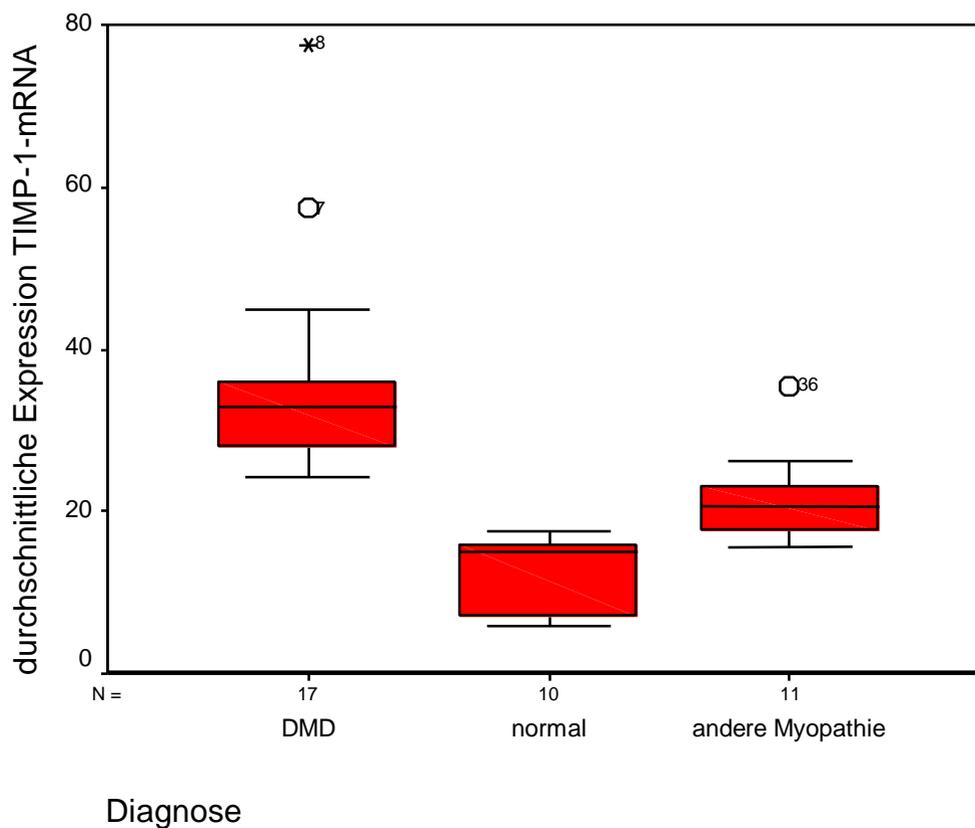


Diagramm 5: durchschnittliche Expression von TIMP-1-mRNA
(Erläuterung zur Darstellung unter Diagramm 1)

In der DMD-Gruppe zeigte sich, daß der Anteil TIMP-1-mRNA exprimierender Zellen an der Gesamtzahl nicht muskulärer Zellen im Vergleich zu den anderen Gruppen am niedrigsten war, obwohl bei der DMD-Gruppe die Gesamtexpression am höchsten war. Die

Unterschiede waren lediglich gegenüber der pathologischen Kontrollgruppe ($p < 0,05$) statistisch signifikant (Diagramm 6).

Anteil TIMP-1-mRNA positiver Zellen an nicht muskulären Zellen

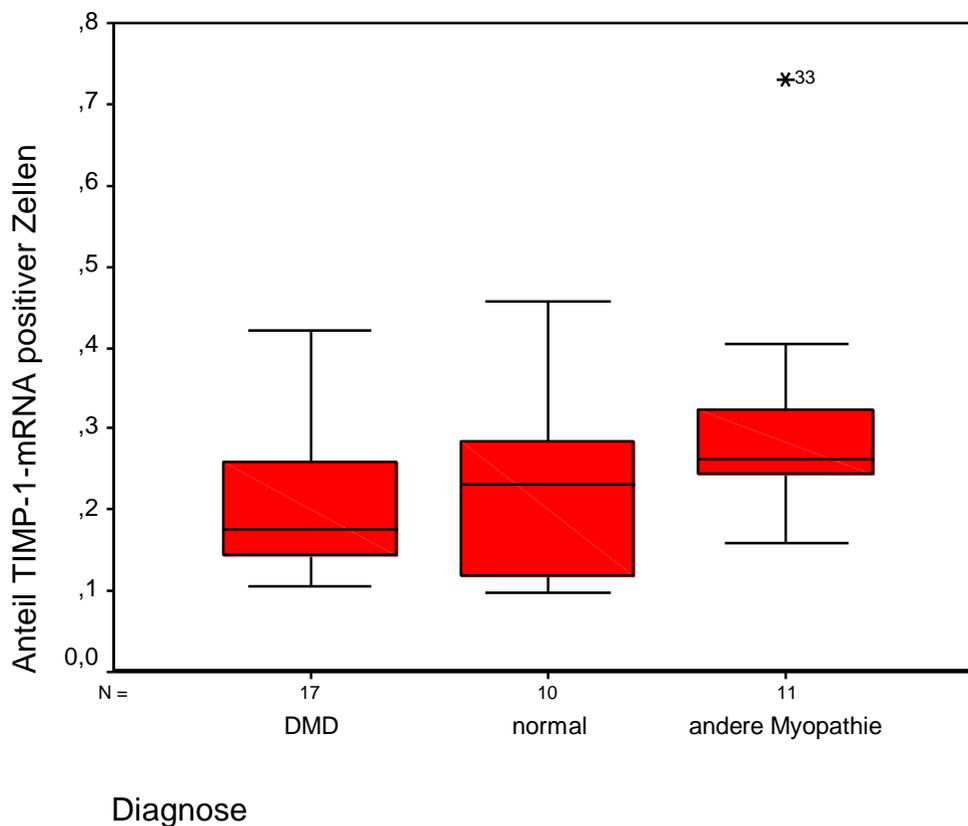


Diagramm 6: Anteil TIMP-1-mRNA exprimierender Zellen an der Gesamtzahl nicht muskulärer Zellen. (Erläuterung zur Darstellung unter Diagramm 1)

Auf den folgenden Seiten sind einige mit der TIMP-1-mRNA-Sonde hybridisierte Präparate in "Antisense" und "Sense" gegenüber gestellt. Auffallend war besonders die lokale Häufung von stark exprimierenden Zellen (Abb. 4a und 4b).

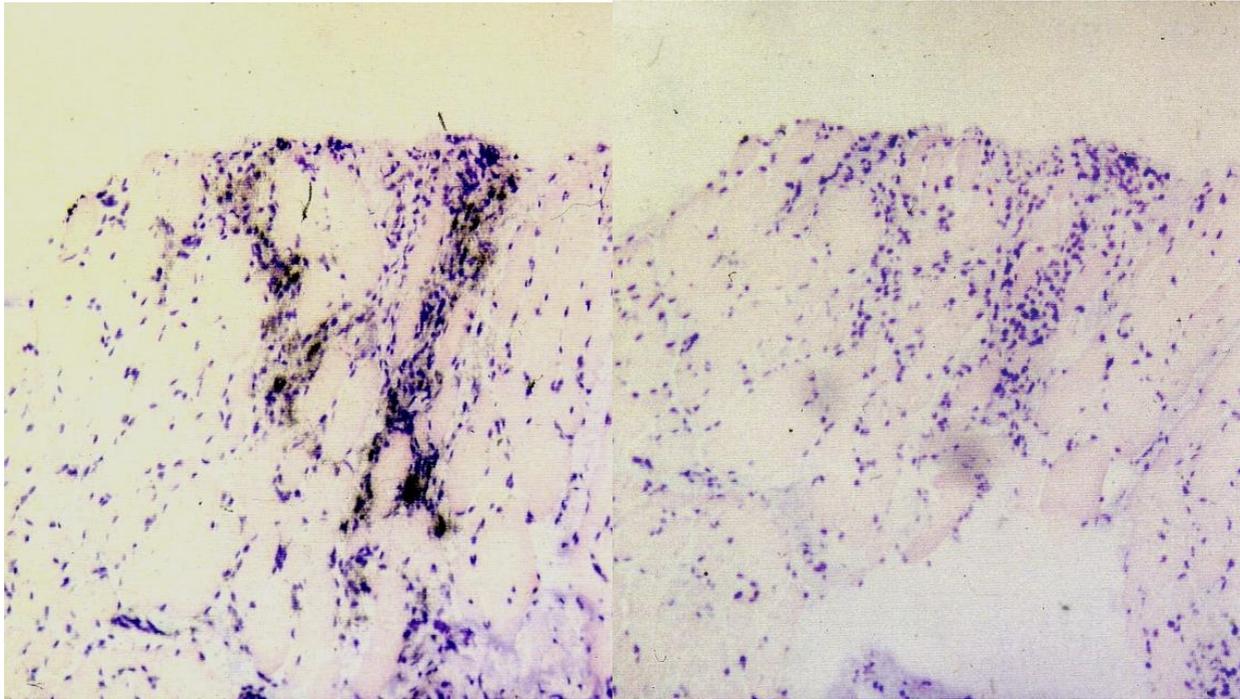


Abb.4a und b: DMD (100fach), links TIMP-1-mRNA-Antisense, rechts TIMP-1-mRNA-Sense

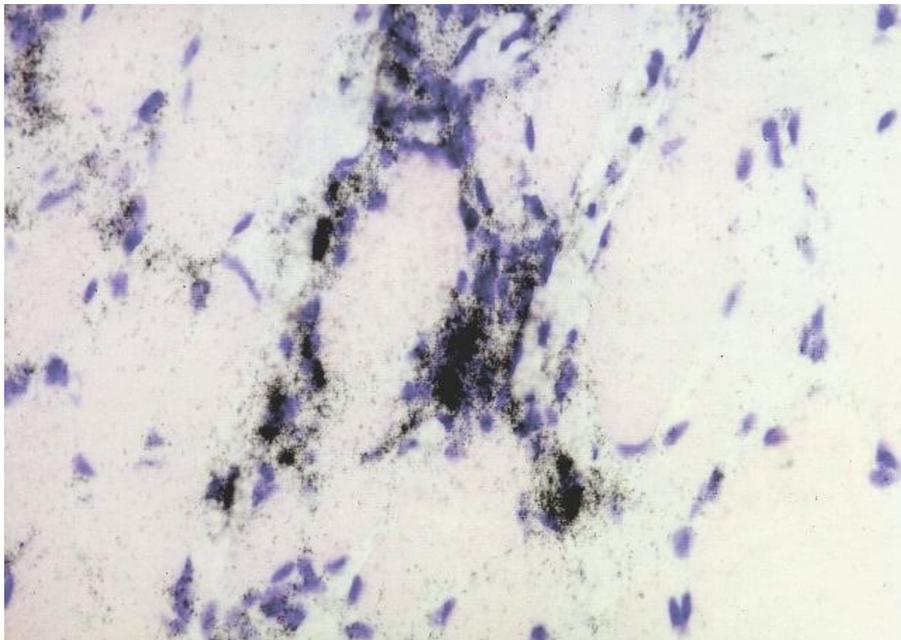


Abb.4c: wie 4a, Vergrößerung 400fach

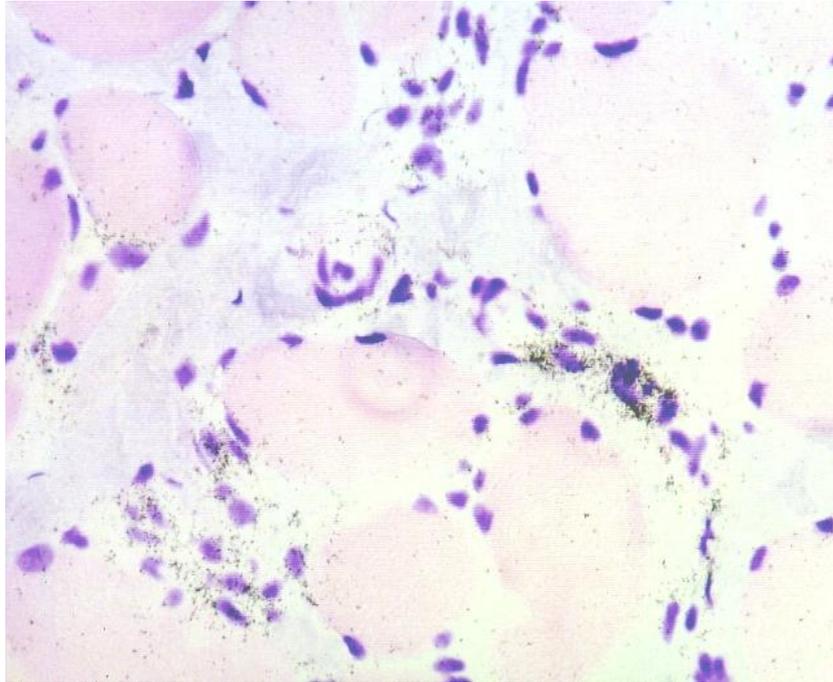


Abb. 5a: DMD, TIMP-1-mRNA-Antisense, (400fach)

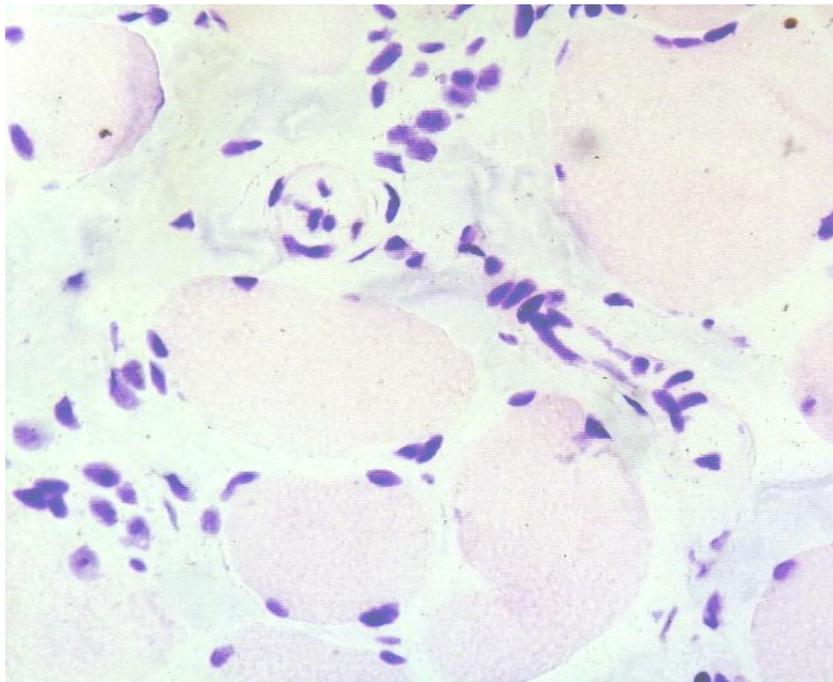


Abb.5b: DMD, TIMP-1-mRNA-Sense (400fach)

Im folgenden werden Antisense-Präparate aus den Gruppen "DMD", "normale Kontrolle" und "pathologische Kontrolle" einander gegenübergestellt, um die schon statistisch beschriebene unterschiedlich hohe Expression in den verschiedenen Gruppen zu demonstrieren.

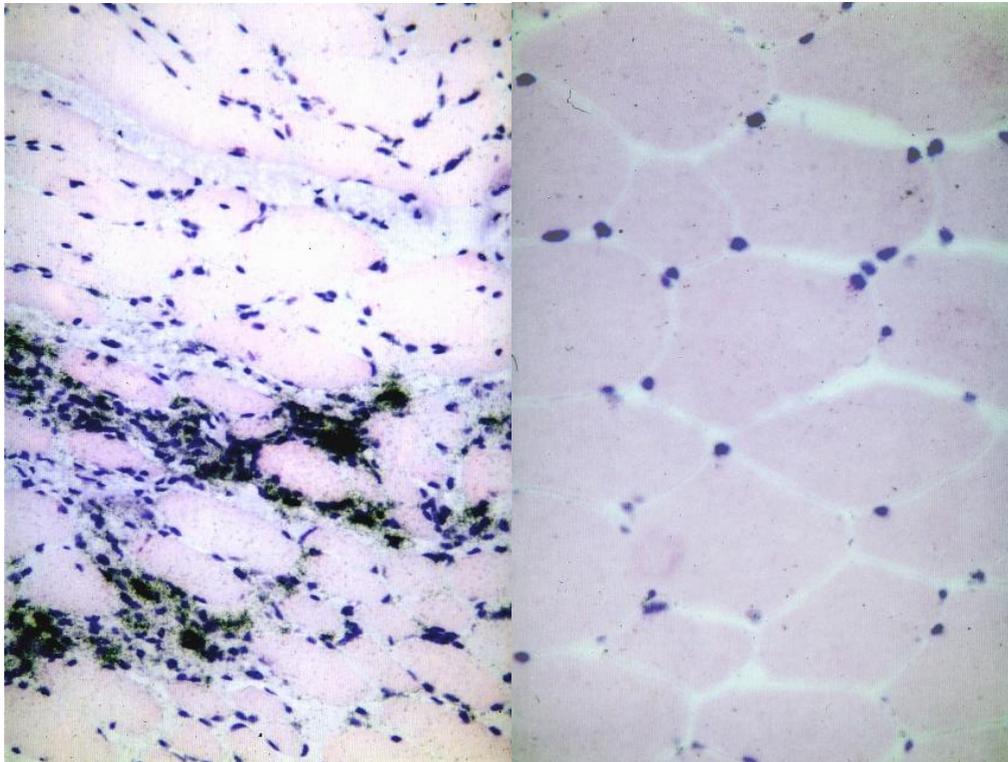


Abb. 6a und b: links DMD (200fach), rechts normal (400fach), TIMP-1-mRNA-Antisense

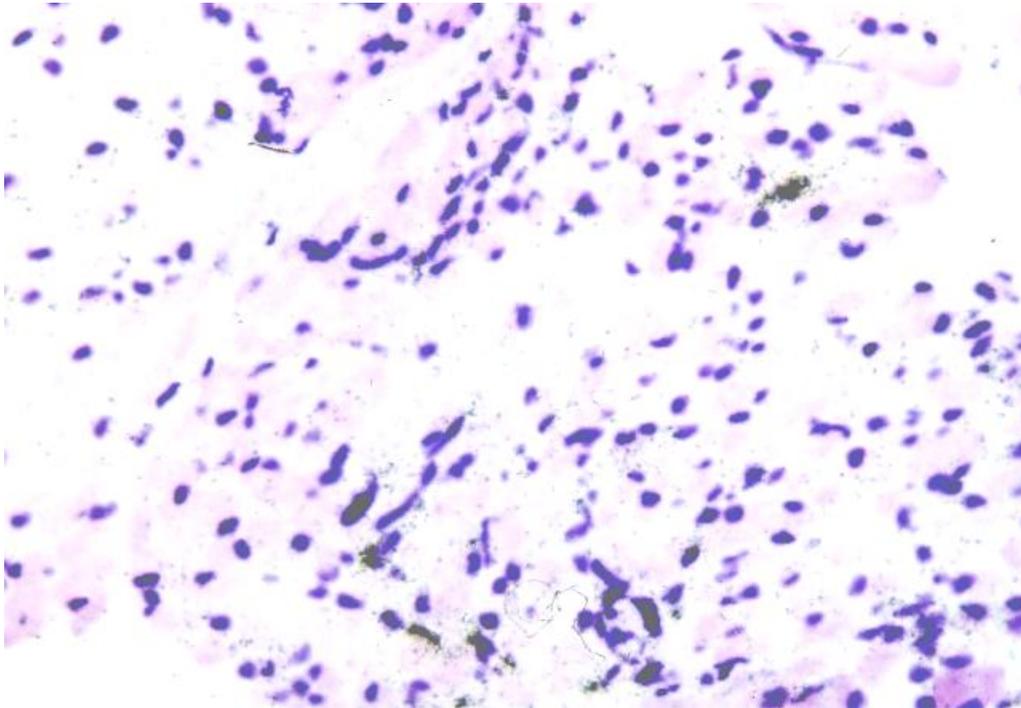


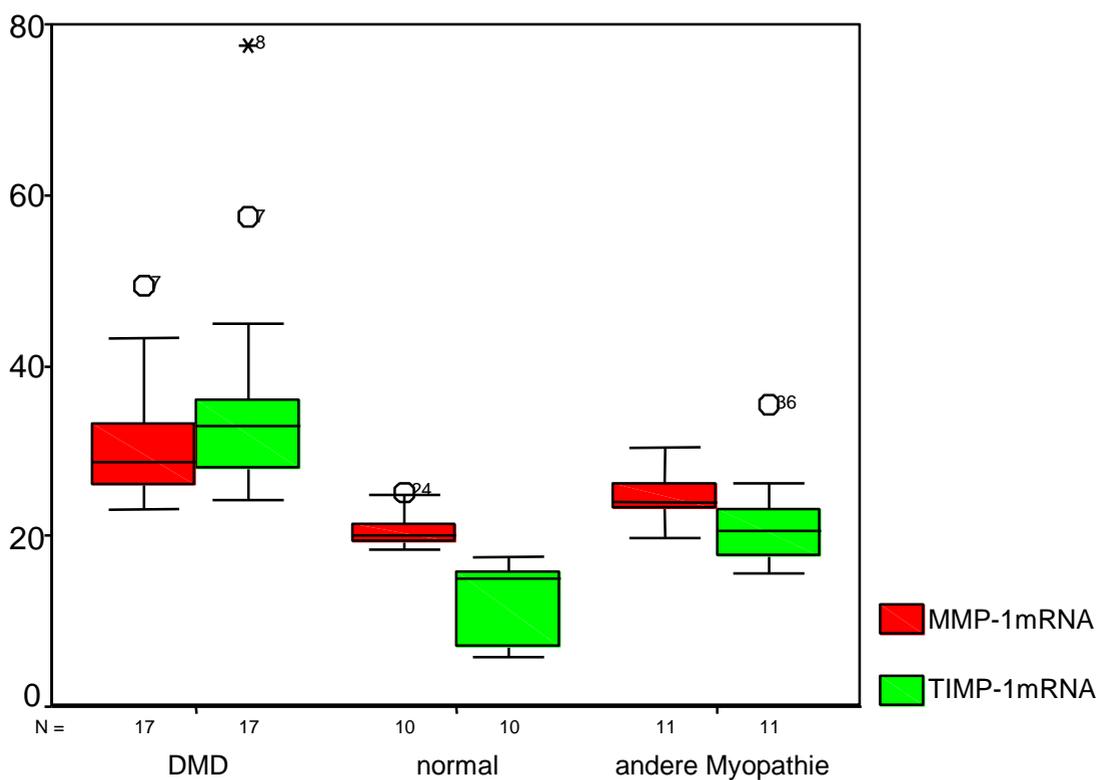
Abb. 6c: pathologische Kontrolle TIMP-1-mRNA-Antisense (200fach)

3.3 Vergleich der Expression von MMP-1- und TIMP-1-mRNA

Da sich in der Gruppe der DMD-Patienten sowohl für MMP-1-mRNA als auch für die TIMP-1-mRNA eine Erhöhung gegenüber der normalen Kontrollgruppe ergeben hatte, war es notwendig, diese beiden Erhöhungen in Relation zueinander zu setzen, da nur aus einem Ungleichgewicht der beiden Gegenspieler eine entsprechende Veränderung des Kollagenabbaus resultieren kann. Ein Vergleich zeigt, daß die durchschnittliche Expression von MMP-1-mRNA in der DMD-Gruppe (Median=28,70) im Vergleich zur normalen Kontrollgruppe (Median=20,11) um den Faktor 1,4 höher lag. Bei TIMP-1 war die durchschnittliche mRNA-Expression in der DMD-Gruppe (Median=32,90) im Vergleich zur normalen Kontrollgruppe (Median=15,03) jedoch um den Faktor 2,2 und damit überproportional erhöht (Diagramm 7). In der Gruppe der pathologischen Kontrollen war die durchschnittliche MMP-1-mRNA-Expression (Median=24,11) um das 1,2-fache gegenüber

Normal erhöht. Für TIMP-1-mRNA ergaben sich bei den pathologischen Kontrollen (Median=20,58) eine Erhöhung um den Faktor 1,4 gegenüber der normalen Kontrollgruppe. Damit war das Ungleichgewicht zwischen MMP-1-mRNA und TIMP-1-mRNA in der Gruppe "DMD" am größten (Diagramm 7).

Durchschnittliche Expression von MMP-1- und TIMP-1-mRNA



Diagnose

Diagramm 7: Durchschnittliche Expression von MMP-1- und TIMP-1-mRNA
(Erläuterung zur Darstellung unter Diagramm 1)

Gesamtexpression von MMP-1- und TIMP-1-mRNA

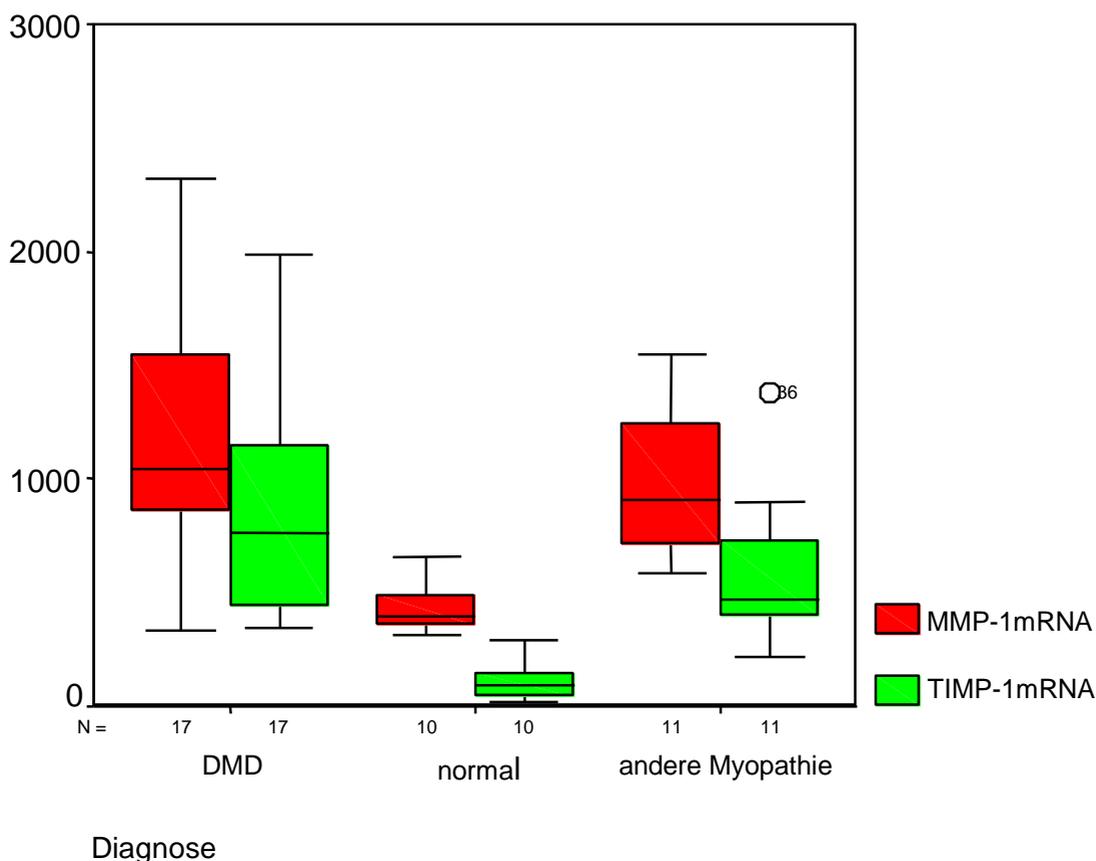


Diagramm 8: Gesamtexpression von MMP-1- und TIMP-1-mRNA
(Erläuterung zur Darstellung unter Diagramm 1)

3.4 Alterskorrelation der MMP-1- und TIMP-1-mRNA-Expression

Die Gruppe der DMD-Patienten wurde in zwei Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe waren acht DMD-Patienten, die nicht älter als sechs Jahre alt waren. Die zweite Gruppe bildeten neun DMD-Patienten, die mindestens sieben Jahre alt waren. Diese Einteilung erschien auf Grund der Ergebnisse von Bernasconi et al. (1996), die ab einem Alter von 6 Jahren abfallende TGF β 1- Level bei DMD nachwies, sinnvoll. Die statistische Auswertung zeigte weder für die MMP-1- noch für die TIMP-1-mRNA-Expression statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen.

3.5 Verteilung MMP-1- und TIMP-1-mRNA exprimierender Zellen

Bei der Verteilung der exprimierenden Zellen fiel auf, daß MMP-1-mRNA exprimierende Zellen relativ homogen über den gesamten Schnitt verteilt waren und daß eine größere Anzahl Zellen MMP-1-mRNA zu exprimieren schienen. Dagegen gab es bei den mit der TIMP-1-Sonde hybridisierten Schnitten Häufungen auffallend stark exprimierender Zellen neben Arealen mit schwacher Expression (Abb. 6a). Diese Beobachtung spiegelt sich nur teilweise in der Statistik wider: In der Gruppe "DMD" exprimieren lediglich 17,4% der Zellen TIMP-1-mRNA (Diagramm 4), jedoch 36,1% der Zellen exprimieren MMP-1-mRNA. Bei stark erhöhter TIMP-1-mRNA Gesamtexpression müssen also wenige Zellen besonders stark exprimieren. Stark exprimierende Zellen fanden sich vorwiegend innerhalb oder am Rand von Zellinfiltraten oder nekrotischen Muskelzellen. Dies traf auf alle untersuchten Gruppen mit Ausnahme der normalen Kontrollgruppe zu.

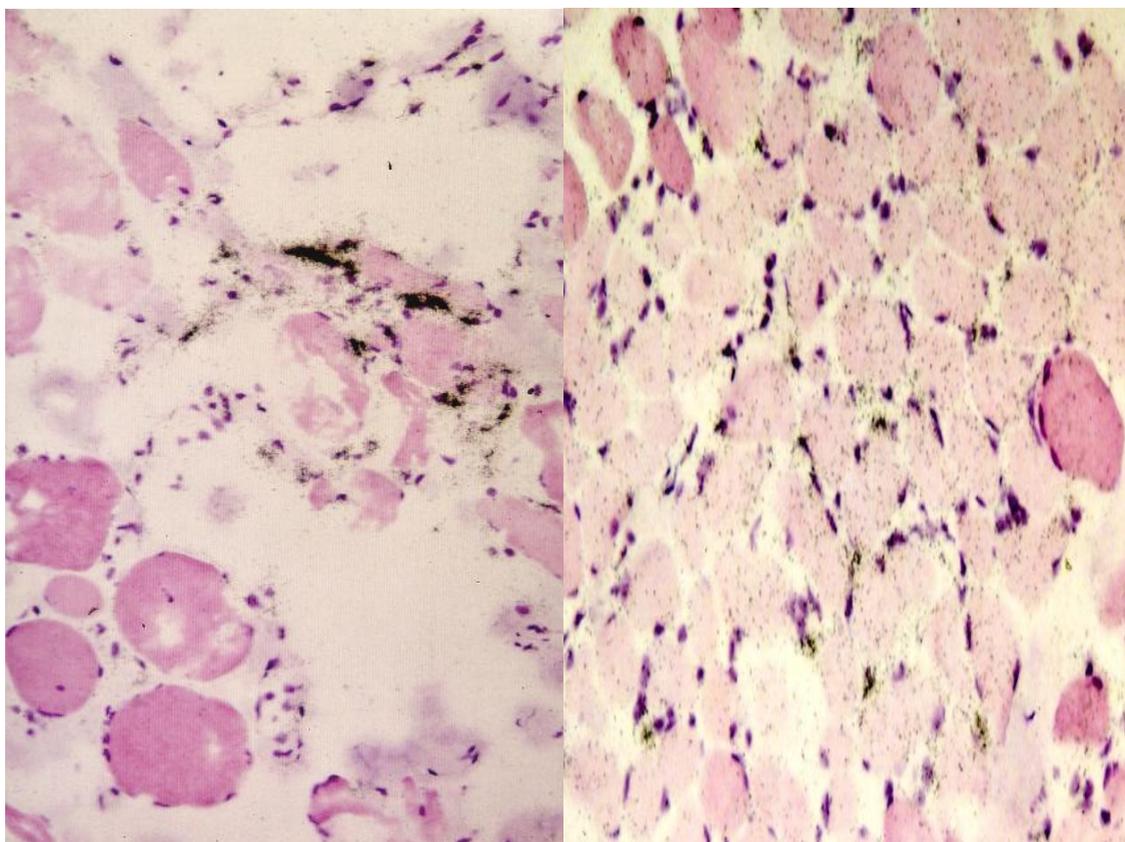


Abb. 7a und b: DMD (200fach); links TIMP-1-mRNA-Antisense, rechts MMP-1-mRNA-Antisense

3.6 Charakterisierung der exprimierenden Zellen

Zur Charakterisierung der exprimierenden Zellen wurde - wie unter 2.2.3 beschrieben - eine sequentielle Doppelmarkierung durchgeführt. Nur für Vimentin-positive Zellen konnten sowohl MMP-1- als auch TIMP-1-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abb.8 und 9). Somit konnten die MMP-1- und die TIMP-1-Produktion Fibroblasten zugeordnet werden.

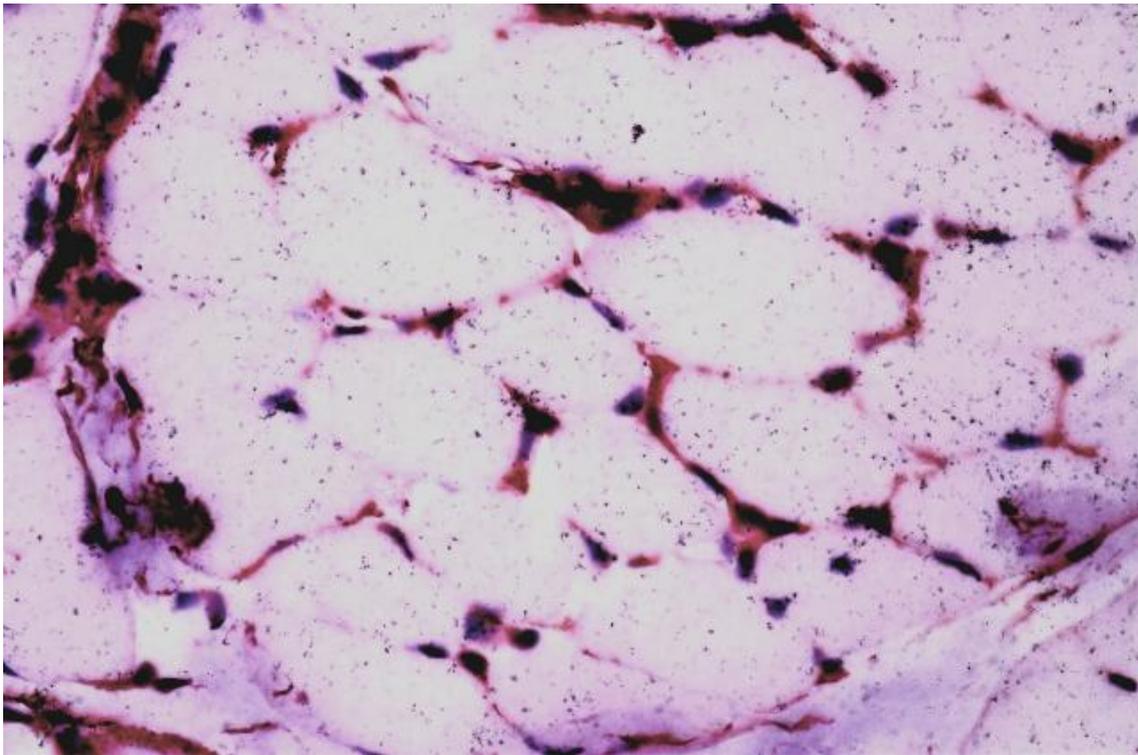


Abb.8: DMD (400fach), Doppelmarkierung Vimentin und MMP-1-mRNA-Antisense

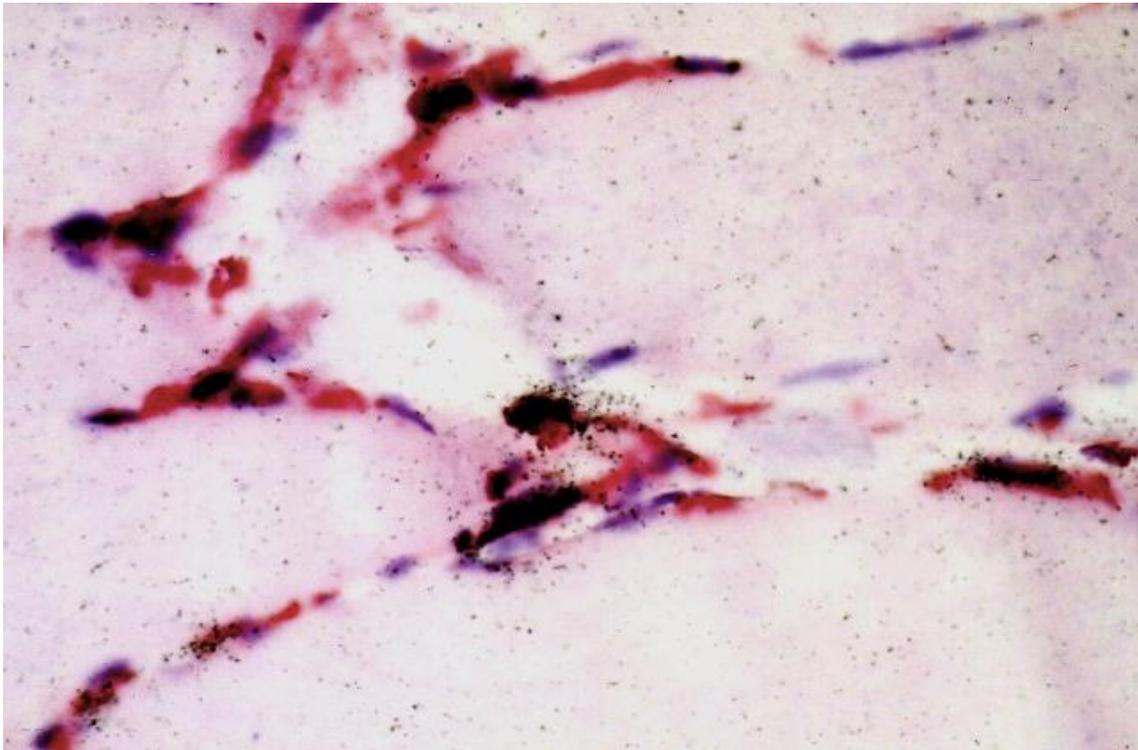


Abb.9: DMD (400fach), Doppelmarkierung Vimentin und TIMP-1-mRNA-Antisense

4. Diskussion

Die Pathophysiologie der Muskeldystrophie Duchenne (DMD) ist im einzelnen immer noch unklar. Histologisch ist die DMD durch gruppenförmige Muskelfasernekrosen und eine starke Fibrosierung gekennzeichnet. Ein Vergleich verschiedener Spezies mit Dystrophindefizienz zeigt trotz gleichen genetischen Defektes wesentliche Unterschiede in Regenerationsfähigkeit, Fibrosierung und klinischem Verlauf. Durch die Entdeckung des Dystrophingens durch Koenig et al. (1987) sowie die Charakterisierung des Genproduktes, konnten X-chromosomal rezessiv vererbte Muskelerkrankungen bei der Maus (mdx-Maus = X-linked mouse dystrophy; Bulfield et al., 1984), der Katze (HFMD= hypertrophic feline muscular dystrophy; Carpenter et al. 1989) und dem Hund (GRMD= golden retriever muscular dystrophy; Cooper et al. 1988) als "Tiermodelle" der DMD identifiziert werden. In der Skelettmuskulatur dieser Tiere ist kein Dystrophin nachweisbar, und Muskelfasern werden spontan nekrotisch. Dagegen bestehen zwischen GRMD und DMD auf der einen Seite und mdx-Maus und HFMD-Katze auf der anderen Seite gravierende Unterschiede. Sowohl bei der mdx-Maus als auch beim Katzenmodell kommt es zu ausgedehnten fokalen Muskelfasernekrosen, die histologisch einer DMD im Anfangsstadium gleichen. Durch Regeneration von Muskelzellen und durch muskuläre Hypertrophie erscheinen die Tiere nach vorübergehend auftretender Muskelschwäche zunächst jedoch klinisch gesund. Eine ausgeprägte Fibrose tritt nicht auf (Anderson et al. 1988; Coulton et al. 1988). Bei der HFMD-Katze ist die muskuläre Hypertrophie lebensbedrohend (Gaschen et al. 1992). Bei der mdx-Maus ist eine progrediente Muskelschwäche nachweisbar (Pastoret et al. 1995; Hübner et al. 1996), die Lebenserwartung ist kaum beeinträchtigt (Übersicht bei Partridge 1991). Dagegen kann die Muskelfasernekrose bei GRMD und DMD durch Regeneration nicht adäquat kompensiert werden, es resultiert ein Verlust an Muskelmasse, begleitet von fettiger Degeneration und massiver progredienter Fibrosierung. Bei DMD nimmt die Regenerationsfähigkeit ab einem Alter von fünf Jahren deutlich ab (Lipton 1979). Die Folge sind eine progrediente Muskelschwäche und eine stark verkürzte Lebenserwartung. Da der Primärdefekt dieser Tiermodelle und der DMD ein Defekt im Dystrophingen ist, der mit Dystrophindefizienz einhergeht, können nur Veränderungen, die bei allen vier Spezies

auftreten, unmittelbare Folgen des Dystrophinmangels sein.

Die unzureichende Regeneration, die massive Fibrosierung sowie der ungünstige Krankheitsverlauf, die nur bei GRMD und DMD beobachtet werden, scheinen deshalb keine zwangsläufige Folge des Dystrophinmangels zu sein (Partridge 1991). Mit dieser Überlegung stimmen die Ergebnisse einer Arbeit von Massa et al. (1994) überein. Verteilung und Menge von Strukturproteinen, die zusammen mit Dystrophin die komplexe Verbindung von Sarkolemm, Myofibrillen und extrazellulärer Matrix herstellen, wurden untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß der Dystrophinmangel als solcher keine Veränderungen der Strukturen herbeiführt, die Sarkolemm und kontraktilem Apparat verbinden. Die Autoren schließen daraus, daß sekundäre, nicht genauer bekannte Faktoren zu mangelhafter Regenerationsfähigkeit und Fibrosierung führen.

Bei den verschiedenen dystrophindefizienten Spezies fällt auf, daß eine progrediente Fibrosierung mit einem ungünstigen klinischen Verlauf einhergeht. Deshalb erscheint es sinnvoll, die Fibrose bei DMD genauer zu betrachten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Abbau von Kollagen I und III auf RNA-Ebene zu untersuchen, um zu beurteilen ob der erheblichen Fibrosierung der Muskulatur neben der bereits bekannten gesteigerten Kollagensynthese auch ein verminderter Kollagenabbau zugrunde liegt. Es ergab sich auf RNA-Ebene eine Erhöhung sowohl von MMP-1 als auch von TIMP-1, wobei TIMP-1-mRNA überproportional erhöht war. Damit ist das Gleichgewicht zwischen MMP-1 und TIMP-1 auf RNA-Ebene in Richtung TIMP-1 verschoben. Mit diesen Ergebnissen wird deutlich, daß eine gehemmte Fibrolyse zur Fibrosierung der Muskulatur bei DMD beiträgt. Ein gestörtes proteolytisches Gleichgewicht wird auch bei anderen fibrosierenden Erkrankungen wie beispielsweise der Blasenfibrose (Peters et al. 1997), der Leberfibrose (Herbst et al. 1997) oder der Lungenfibrose (Swiderski et al. 1998) als wesentliches Merkmal beobachtet.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich auf RNA-Ebene durchgeführt, so daß über die Proteinebene und die Aktivität der Enzyme keine definitiven Aussagen gemacht werden können. Jedoch werden MMPs nur auf ein klares Signal hin gebildet und in den extrazellulären Raum abgegeben, eine intrazelluläre Speicherung findet nicht statt (einzige Ausnahmen sind Makrophagen und neutrophile Granulozyten). Diese steuernden Signale oder Stoffe wirken nahezu ausschließlich auf der Ebene der

Gentranskription (Woessner 1991). Da das Enzym MMP-1 von TIMP-1 gehemmt wird, müßte für MMP-1 eine Aktivitätsbestimmung mittels Zymographie durchgeführt werden, um die Frage nach einer Restaktivität beantworten zu können. Eine Diskrepanz zwischen Enzymaktivität und Genexpression konnte am Beispiel der Blasenfibrose gezeigt werden: trotz unveränderter Expressionsstärke von MMP-1 konnte eine um 50% verminderte Enzymaktivität nachgewiesen werden (Peters et al. 1997). Unter Berücksichtigung dieser Arbeiten kann man postulieren, daß die Fibrolyse bei DMD mindestens so schwer beeinträchtigt ist, wie es die Untersuchung auf RNA-Ebene widerspiegelt. Zumindest für TIMP-1 konnte in einer in vivo- Untersuchung auch auf Proteinebene bei DMD-Patienten eine stark erhöhte Expression nachgewiesen werden (Sun et al. 2006).

Durch eine sequentielle Doppelmarkierung mit immunhistochemischer Zelltypisierung (APAAP-Methode) und anschließender in situ-Hybridisierung konnten vimentinpositive Zellen sowohl als MMP-1-mRNA als auch TIMP-1-mRNA exprimierende Zellen nachgewiesen werden. Vimentin ist ein Marker für mesenchymale Zellen (Steinert et al. 1988), anhand morphologischer Charakteristika konnten Fibroblasten als exprimierende Zellen identifiziert werden. Für TIMP-1 stimmen diese Ergebnisse mit in vivo- Untersuchungen an fibrotischen Lebern überein: die TIMP-1 exprimierenden Zellen waren ganz überwiegend Vimentin-positiv (Herbst et al. 1997). MMP-1-Transkripte dagegen konnten über Epithelzellen von Gallengängen, aber weder über mesenchymalen noch über Parenchymzellen nachgewiesen werden (Milani et al. 1994).

Bei der Duchenne'schen Muskeldystrophie kommt es im Rahmen der Fibrosierung zu einer starken Vermehrung vor allem der interstitiellen Kollagene I und III (Stephens et al. 1982). Dieser immunhistologische Befund konnte durch v. Moers et al. (1996) mittels RNA/RNA- in situ- Hybridisierung bestätigt werden: Es wurde eine gesteigerte Genexpression für Prokollagen I und IV nachgewiesen, die exprimierenden Zellen waren Fibroblasten. Es ist anzunehmen, daß es durch permanente Zellschädigung, die bei der DMD durch die Dystrophindefizienz bedingt ist, zur gesteigerten Produktion sowie zum verminderten Abbau von Kollagen kommt. Auch bei verschiedenen Formen der Leberfibrose liegen ähnliche Verhältnisse vor. Bei der alkoholinduzierten Leberzirrhose werden die Hepatozyten durch toxische Abbauprodukte des Ethanol, wie z.B. Acetaldehyd, kontinuierlich geschädigt. Daraufhin werden die Vitamin A speichernden Zellen (= Itozellen, Lipozyt oder

fettspeichernde Zelle) und portale Fibroblasten aktiviert. Dabei wandeln sich die Vitamin A speichernden Zellen in Myofibroblasten (Übersicht bei Powell et al.1999) um, und es kommt zur starken Vermehrung von Kollagen I, III und IV (Schuppan 1990; Iredale 1997). Mittels in situ-Hybridisierung konnte Milani et al. 1990 eine gesteigerte Synthese dieser Kollagentypen auf RNA-Ebene nachweisen, exprimierende Zellen waren hauptsächlich mesenchymale Zellen, aber auch Endothelzellen der Gallengänge. In weiteren Arbeiten wurden Matrixkomponenten der Leber und der Kollagenabbau in Leberzellen untersucht. Während in Zellkulturen fettspeichernder Zellen hohe "steady state" Level für MMP-1-mRNA gefunden wurden, zeigte sich in in vivo-Untersuchungen, daß sowohl bei normalen als auch bei zirrhotischen Lebern MMP-1-mRNA mittels in situ-Hybridisierung nicht nachweisbar war (Milani et al. 1994). Arthur beschrieb 1995 eine relativ niedrige MMP-1 mRNA Expression bei gesunden menschlichen Lebern sowie im Vergleich dazu keine statistisch signifikanten Veränderungen bei verschiedenen Formen der Leberfibrose. Eine leicht erhöhte MMP-1-mRNA Expression konnte in einer Studie, in der zirrhotische Lebern im Endstadium untersucht wurden, nachgewiesen werden, wobei auch eine stark erhöhte TIMP-1-mRNA Expression zu beobachten war. Auffallend war trotz der erhöhten MMP-1-mRNA Expression ein um 30-40% vermindertes MMP-1-Proenzym (inaktive Vorstufe). Da aus dem "Pool" an Proenzym unmittelbar die aktiven, Kollagen spaltenden Enzyme gebildet werden, schlossen die Autoren auf einen erhöhten Umsatz an Proenzym, der durch eine nur gering erhöhte MMP-1 Transkription nicht auszureichend gedeckt werden kann (Lichtinghagen et al. 1998). Auch hier scheint durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen MMP-1 und TIMP-1, der Kollagenabbau trotz erhöhter Expression von MMP-1-mRNA herabgesetzt zu sein.

Die Expression von TIMP-1-mRNA wird durch verschiedene fibrogene Zytokine reguliert. TGF β 1 (tissue derived growth factor β 1) ist eines der am stärksten fibrogen wirkenden Zytokine. Es kommt zu einer Anhäufung von Bestandteilen extrazellulärer Matrix, indem Zellen stimuliert werden, die Produktion von Matrixmolekülen um ein Vielfaches zu erhöhen. Gleichzeitig wird der Abbau von EZM herabgesetzt, indem die Synthese Matrixabbauender Proteasen (z.B. MMP-1) reduziert wird und deren Inhibitoren (z.B. TIMP-1) vermehrt gebildet werden. Im Rahmen eines physiologischen Wundheilungsprozesses wird vorübergehend vermehrt TGF β 1 gebildet, ohne daß es zu einer irreversiblen Fibrose kommt.

Erst bei anhaltend erhöhter TGFβ1-Produktion, wie am Beispiel der Niere (Yoshioka et al. 1993), Leber (Bataller et al. 2005) und Lunge (Strieter et al. 2007) gezeigt, kommt es zu einer irreversiblen Organfibrose. Damit TGFβ1 wirksam werden kann, sind eine Reihe posttranslativ Modifikationen notwendig. Eine inaktive Proform wird in einem Komplex mit LAP (latency-associated peptide) und LTBP (latent TGFβ1 binding protein) in den extrazellulären Raum sezerniert. Die Aktivierung kann über limitierte Proteolyse durch MMP-2, MMP-9, Plasmin oder durch Bindung an Thrombospondin oder Integrine erfolgen (Übersicht bei Kisseleva et Brenner 2009).

Unter dem Einfluß von HGF (hepatocyte growth factor) konnte eine Erhöhung von MMP-1 und ein Abfall von TGFβ1 beobachtet werden (Taniyama et al. 2000). HGF läßt sich in vielen verschiedenen Organen nachweisen und wird ebenfalls unter dem Einfluß von TGFβ1 gebildet. HGF besitzt antifibrogene, antientzündliche und regenerative Eigenschaften (Ichihara 1999, Esposito et al. 2009)) und wirkt stark hemmend auf die Differenzierung von Myofibroblasten (Liu et Yang 2006).

Yamazaki et al. (1994) vermuteten eine wichtige Rolle von TGFβ1 bei der Synthese und Anhäufung extrazellulärer Matrix auch bei DMD: Immunhistologisch ließ sich TGFβ1 bei DMD verstärkt nachweisen, bei anderen Myopathien mit endomysialer Fibrose jedoch konnte TGFβ1 nur selten oder schwach nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten von Bernasconi et al. (1995) mit einer Untersuchung auf RNA-Ebene mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (Q-PCR) bestätigt werden: Es konnte bei DMD im Gegensatz zu BMD, SMA (spinale Muskelatrophie) und gesunden Kontrollen eine signifikante Erhöhung der TGFβ1-mRNA-Expression gezeigt werden. Somit könnte TGFβ1 bei DMD das entscheidende fibrogene Zytokin sein. Jedoch gab es zwischen der Expression von TGFβ1-mRNA und der Entwicklung der muskulären Fibrosierung keine schlüssige Übereinstimmung. Während mit fortschreitendem Alter eine kontinuierlich zunehmende Fibrosierung beobachtet wurde, erreichte die Expression von TGFβ1 im Alter von 2 bis 6 Jahren ein Maximum. Ab einem Alter von 6 Jahren nahm die TGFβ1-Expression kontinuierlich ab, war aber gegenüber BMD und SMA stets erhöht. In gesunder Muskulatur war TGFβ1 nicht nachweisbar. Der Abfall von TGFβ1 wurde von den Autoren dahingehend interpretiert, daß die Fibrogenese zu einem frühen Zeitpunkt unter dem Einfluß von TGFβ1

einsetzt, im späteren Verlauf aber TGF β 1 unabhängig entweder unter dem Einfluß anderer Zytokine wie bFGF oder PDGF oder autokrin aufrechterhalten wird. Falls die TIMP-1-Expression bei DMD durch TGF β 1 gesteuert würde, wäre ab einem Alter von 6 Jahren eine rückläufige TIMP-1-Gentranskription zu erwarten. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben jedoch, daß es zwischen DMD-Patienten, die höchstens sechs Jahre alt waren, und DMD-Patienten, die älter als sechs Jahre waren, keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der TIMP-1-mRNA-Expression gab. Eine Untersuchung an Fibroblasten von Sclerodermie-Patienten ergab, daß TIMP-1 auch als autokriner Wachstumsfaktor wirksam werden kann. Durch diesen Mechanismus kann sich eine TIMP-1-Überexpression autokrin aufrechterhalten und eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sclerodermie spielen (Kikuchi et al. 1997). Dadurch könnte die hohe Expression von TIMP-1 bei DMD zytokinunabhängig erklärt werden. TIMP-1 als Teil des Systems der Fibrolyse könnte durch Stimulation von Fibroblasten nicht nur seine eigene Synthese stimulieren, sondern auch auf die Fibrogenese Einfluß nehmen. Der Überexpression von TIMP-1 käme eine Schlüsselstellung innerhalb der Pathogenese fibrosierender Krankheitsprozesse zu.

Auch bei verschiedenen Formen der Leberfibrose ist neben einer gesteigerten Fibrogenese (Kisseleva et Brenner 2008) auch die Fibrolyse deutlich vermindert, TIMP-1 ist stark hoch reguliert (Herbst et al. 1997). Als weiterer Mechanismus, der eine bereits fortgeschrittene Fibrosierung aufrechterhalten könnte, wird Hypoxie diskutiert (Orphanides et al. 1997). Eine Fibrose kann Zellen isolieren und sie so von der Blutversorgung abschneiden (Lipton 1979; Innaccone et al. 1995). Über eine Zytokinerhöhung von TGF β 1, PDGF, TNF α , FGF und Interleukinen wird eine zunehmende Bindegewebsvermehrung generiert (Otrock et al. 2007). Durch in vitro-Untersuchungen an Epithelzellen der proximalen Nierentubuli konnte gezeigt werden, daß Hypoxie eine gesteigerte Expression sowohl von TIMP-1-mRNA, als auch von Prokollagen-I-mRNA bewirkt.

In der bereits zitierten Arbeit von Bernasconi (1995) konnte TGF β 1 mittels Immunhistologie vor allem im Perimysium im Bereich starker Fibrosierung und endomysial im Bereich fokaler Fibrosierung nachgewiesen werden. Diese Lokalisation stimmt gut mit den Regionen starker TIMP-1-mRNA Expression bei DMD-Patienten (siehe Abb. 4a und c) überein und ist möglicherweise ein Hinweis auf die Relevanz der stark erhöhten TIMP-1-Expression in der Pathogenese der DMD. Bei der Auswertung der MMP-1- und TIMP-1-Expression fiel auf,

daß von relativ wenigen Zellen lokal TIMP-1-mRNA sehr stark exprimiert wird, während das Expressionsmuster für MMP-1-mRNA homogen verteilt war (Abb.7a und b). Daraus ergibt sich, daß der Quotient TIMP-1/MMP-1 lokal zunimmt und an Stellen muskulärer Fibrosierung ein noch größeres Ungleichgewicht zwischen MMP-1 und TIMP-1 besteht, als es das Diagramm „MMP-1- und TIMP-1-mRNA-Gesamtexpression“ (Diagramm 8) vermuten läßt.

Aus der statistischen Auswertung geht hervor, daß weniger Zellen mehr TIMP-1-mRNA exprimieren, als eine größere Zahl Zellen MMP-1-mRNA (Diagramme 3, 6, 7 und 8). Durch die lichtmikroskopische Auswertung läßt sich eindrucksvoll die lokal erhöhte TIMP-1-mRNA-Expression im Bereich endomysialer Fibrose und Muskelzellnekrosen darstellen (Abb. 4, 5, 6). Damit besteht eine enge Korrelation zwischen fokaler Muskelzellnekrose, endomysialer Fibrose und lokal erhöhter TIMP-1-mRNA-Expression. Sun et al. (2006) konnten bei DMD-Patienten eine lokal stark erhöhte Häufung von TIMP-1 in Regionen endomysialer Fibrose und fokaler Muskelzellnekrose auch auf Proteinebene nachweisen.

Als mögliche Ursache der TGF β 1-Erhöhung bei DMD könnte die Dystrophindefizienz selbst eine Rolle spielen. In einer in vitro-Untersuchung konnte gezeigt werden, daß eine Störung des Zytoskeletts, die auch bei fehlendem Dystrophin als Zytoskelettprotein besteht, über eine Erhöhung der Onkogene c-Jun und c-Fos zu einer signifikanten Erhöhung von TGF β 1, Kollagenase und TIMP-1 führt (Varedi et al. 1997). Medina et al. (2007) konnten an dermalen Fibroblasten, ebenfalls durch erhöhte c-Jun- und c-Fos-Aktivität eine erhöhte Expression von MMP-1 nachweisen. In der vorliegenden Arbeit war die Expression von MMP-1-mRNA bei DMD gegenüber normalen Kontrollen ebenfalls signifikant erhöht.

Die TGF β 1-Erhöhung ist für die Fibrogenese eine notwendige, aber allein nicht ausreichende Bedingung. Die biologischen Effekte werden über Bindung an TGF β 1-Rezeptoren (T β R Typ I bis III) und über eine „Smad“ genannte Molekülgruppe vermittelt. Smad3 scheint eine besondere Bedeutung bei der Fibrosierung von Leber, Niere und Lunge zu haben (Kisseleva et Brenner 2008). Ein weiterer wichtiger Smad3 abhängiger Wachstumsfaktor ist CTGF (connective tissue growth factor). Ein synergistischer Effekt mit TGF β 1 besteht in einer Erhöhung der Rezeptoraffinität und in der Blockierung der negativen Rückkopplung von TGF β 1 (Ruiz-Ortega et al. 2007). Im DMD-Muskel ist eine CTGF-Erhöhung und Kollokalisierung mit TGF β 1 nachgewiesen (Sun et al. 2008).

Das Zytokin bFGF (basic fibroblast growth factor), das vor allem bei fortschreitender Fibrosierung eine wichtige Rolle spielt (Bernasconi et al. 1995), kann sowohl eine gesteigerte MMP-1- als auch TIMP-1- Expression bewirken (Woessner 1991; Arthur 1995), spielt auch bei der Regeneration des Muskels eine wichtige Rolle. Es konnte an ruhenden Satellitenzellen von Ratten gezeigt werden, daß diese unter dem Einfluß von bFGF und nach Ausbildung entsprechender Rezeptoren wieder in den Zellzyklus eintreten und zu proliferieren beginnen (Johnson et al. 1995). Bereits 1989 konnte bei mdx-Mäusen im Bereich der Basallamina der quergesteiften Muskulatur bFGF vermehrt nachgewiesen werden, und die Autoren vermuteten einen Zusammenhang mit einer guten Regenerationsfähigkeit der mdx-Maus. Auffallend war dabei, daß die Erhöhung von bFGF dem Untergang und der Regeneration von Muskelzellen zeitlich vorausging, also nicht als Folge von Degeneration und Regeneration erklärbar war. Eine mögliche Ursache für die Zytokinerrhöhung könnte ein früheres Ereignis sein, das mit dem Fehlen von Dystrophin selbst assoziiert ist. (Di Mario et al. 1989). D`Amore et al. (1994) ermittelten bei 11 von 18 DMD-Patienten erhöhte Serumwerte für bFGF. Die Patienten ohne bFGF-Erhöhung wiesen auch alle relativ niedrige Kreatinkinasewerte auf, tendenziell verhielten sich die bFGF-Werte umgekehrt proportional zum Alter der Patienten. Die Autoren stellten die Hypothese auf, daß die Dystrophindefizienz Ursache einer Sarkolemminstabilität sei, die zur kontinuierlichen Ausschüttung von bFGF führe. Folge sei eine Stimulation extrazellulärer Matrix und eine Beeinträchtigung der Regenerationsfähigkeit, indem die Differenzierung muskulärer Vorläuferzellen unterdrückt würde. Im Gegensatz zu DMD-Patienten konnten die Autoren bei der mdx-Maus keine erhöhten bFGF-Werte im Serum ermitteln. Allerdings gaben die Autoren keine Normalwerte für diese Spezies an und verwendeten dieselbe Meßmethode, mit der schon bei 7 von 18 DMD-Patienten Werte unterhalb des minimal meßbaren Wertes von 30ng/l ermittelt wurden. Di Mario et al. (1998) konnten zeigen, daß Fibroblasten von mdx-Mäusen schon auf sehr viel niedrigere Konzentrationen bFGF reagieren als Fibroblasten von DMD-Patienten. Diese Beobachtung zeigt, daß neben der Zytokinkonzentration auch die Sensibilität der Zielzellen berücksichtigt werden muß. Außerdem legt das Ansprechen auf niedrigere Konzentrationen bFGF die Vermutung nahe, es könnten bei Mäusen speziesspezifisch und nicht erkrankungsspezifisch niedrigere bFGF steady state Level vorliegen. Zusammenfassend könnte bFGF lokal an Wundheilung und

Regeneration im Muskel beteiligt sein, die kontinuierliche Ausschüttung im dystrophinnegativen Muskel dagegen könnte zu exzessiver Fibrose und Vernarbung führen.

In einer Untersuchung an dystrophinnegativen Katzen mit HFMD (hypertrophic feline muscular dystrophy) konnte ebenfalls nur im Muskel, nicht aber im Serum, bFGF vermehrt nachgewiesen werden (Seiler et al. 2001). Die Histopathologie bei HFMD ist durch Muskelfaserhypertrophie und Regeneration, aber nicht durch entzündliche Infiltrate oder Fibrose gekennzeichnet (Carpenter et al. 1989). Innaccone et al. (1995) untersuchten immunhistologisch bFGF, EGF (epidermal growth factor) und TGF β 1 an mdx-Mäusen und dy-Mäusen chronologisch. Die dy-Maus ist durch eine Laminin- α 2-Defizienz charakterisiert und zeigt hinsichtlich Krankheitsverlauf und Histopathologie der quergestreiften Muskulatur größere Übereinstimmung mit der DMD als die mdx-Maus (Xu et al. 1994; Übersicht bei Connolly et al. 2001). In den Muskelfasern konnten zwischen mdx- und dy-Maus keine Unterschiede hinsichtlich bFGF gefunden werden, jedoch korrelierte die Expression des Rezeptors bFGF2R mit dem Regenerationsprozeß der mdx-Mäuse. Dieser Rezeptor konnte bei den dy-Mäusen zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Dagegen konnte TGF β 1 und EGF im Endomysium lediglich bei der dy-Maus nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß bFGF eine Rolle sowohl bei der Degeneration als auch der Regeneration quergestreifter Muskulatur spielt, und daß eine Abhängigkeit von der Sensibilität der beteiligten Zellen durch Expression von Rezeptoren besteht. TGF β 1 und EGF scheinen bei der Entstehung und dem Fortschreiten der endomysialen Fibrose eine wichtige Rolle zu spielen (Innaccone et al. 1995). Ähnlich wie für TGF β 1 konnte gezeigt werden, daß Zellen in unmittelbarer Umgebung eines ischämischen Bezirkes vermehrt bFGF bilden (Walgenbach et al. 1995). Ein weiteres Zytokin aus der FGF-Familie ist FGF-6 (fibroblast growth factor 6). Es spielt bei Embryogenese, Zellteilung, Zelldifferenzierung, Regeneration und Wundheilung im Skelettmuskel eine wichtige Rolle. Nach Verletzungen der Skelettmuskulatur wird bei gesunden Wildtyp-Mäusen vermehrt FGF-6 gebildet, und der Defekt kann durch Regeneration vollständig ausgeglichen werden. Damit korreliert eine gesteigerte Expression der MRF (Myogenese regulierende Faktoren) MyoD und Myogenin. Dagegen zeigen FGF-6 (-/-) Mäuse ein stark vermindertes Expressionsmuster für MyoD und Myogenin, und die Wundheilung ist durch eine schwer beeinträchtigte Regeneration mit Fibrose und Untergang von Muskelzellen gekennzeichnet. Bei gesunden Mäusen scheint

FGF-6 Satellitenzellen zu stimulieren, die daraufhin vermehrt MyoD und Myogenin exprimieren. Bei mdx-Mäusen ist die Fähigkeit, MyoD hochzuregulieren, erhalten. Die Autoren schließen auf eine entscheidende Rolle von FGF-6 bei der Regeneration quergestreifter Muskulatur durch Aktivierung von Satellitenzellen (Floss et al. 1997). In einer Untersuchung an mdx-Mäusen ließen sich die MRF Myogenin, Myf-5 und Myf-6 lediglich während der embryonalen Myogenese in einigen unreifen Muskelzellen nachweisen, nicht aber im reifen Muskel. Dagegen war mittels *in situ*-Hybridisierung MyoD, exprimiert von Satellitenzellen und regenerierenden Muskelfasern in unmittelbarer Nähe nekrotischer Muskelfasern, auch im reifen Muskel nachweisbar (Bhagwati et al. 1996). Mdx:MyoD(-/-)-Doppel-knock-out-Mutanten (mdx-Mäuse, die kein MyoD bilden können) zeigen eine stark beeinträchtigte Regeneration, einen der DMD klinisch ähnlichen Verlauf und eine verminderte Lebenserwartung. Damit wird die Rolle der MyoD-Expression für eine erfolgreiche Regeneration der reifen quergestreiften Muskulatur der mdx-Maus belegt (Megeney et al. 1996). Bei mdx-Mäusen konnte eine muskuläre Dystrophin-Expression durch Implantation von humanen multipotenten Stammzellen mit verstärkter MyoD Expression wiederhergestellt werden (Goudenege et al. 2009).

Es wird ein Zusammenhang zwischen den Zytokinen bFGF und TGF β 1 und erhöhter Mastzellzahl in dystrophindefizienter quergestreifter Muskulatur diskutiert: Gruber et al. (1994) konnten *in vitro* zeigen, daß TGF β 1 schon in äußerst geringen Konzentrationen auf Mastzellen stark chemotaktisch wirkt. Am Beispiel der HFMD-Katze konnte die lokale Häufung von bFGF und Mastzellen im Bereich der gruppenförmigen Fasernekrosen gezeigt werden (Seiler et al. 2001). Gorospe et al. (1994) stellten die Hypothese auf, daß eine lokale Erhöhung von Mastzellen zu dem ungünstigen klinischen Verlauf bei DMD-Patienten und GRMD führen könnte. Ausgehend von der Tatsache, daß Mastzellen auch bei anderen Erkrankungen, die mit einer Fibrose einhergehen, vermehrt beobachtet werden, beispielsweise bei progressiver systemischer Sclerodermie (Hawkins et al. 1985) oder bei Lungenfibrose (Aldenborg et al. 1993; Tomioka et al. 1989) wurde bei DMD-Patienten, mdx-Mäusen, GRMD-Hunden und gesunden Kontrollen die Häufigkeit und Lokalisation von Mastzellen untersucht. Bei DMD-Patienten und den dystrophindefizienten Tiermodellen wurden jeweils gegenüber normalen Kontrollen signifikant erhöhte Mastzellzahlen gefunden. Die Mastzellen waren in der Gruppe DMD vorwiegend endomysial lokalisiert,

und es konnten Zeichen für eine aktive Degranulation nachgewiesen werden. Bei DMD-Patienten, mdx-Maus und GRMD-Hund konnte ein enger Zusammenhang zwischen der Lokalisation von Mastzellen und gruppierten Fasernekrosen gezeigt werden. Darüber hinaus konnten die Autoren zeigen, daß Muskelzellen von mdx-Mäusen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Mastzellgranula aufweisen. Im mdx-Muskel ließen sich durch Injektion von Mastzellgranula gruppierte Fasernekrosen induzieren, im Muskel von gesunden Mäusen jedoch nicht. Zusätzlich vermuten die Autoren einen Zusammenhang zwischen Mastzellgranula und der fortschreitenden Fibrosierung bei der DMD und dem GRMD-Hund. Der Mastzellmediator Heparin könnte an die EZM gebundenes bFGF aktivieren und so zur Entstehung der massiven Fibrose führen. In der fehlenden Mastzellproliferation im späteren Krankheitsverlauf bei mdx-Mäusen sei die Ursache für die fehlende Fibrosierung und für den günstigeren klinischen Verlauf zu sehen (Gorospe et al. 1994). Das Phänomen, daß Muskelzellen bei DMD lokalisiert und gruppiert nekrotisch werden, obwohl in jeder einzelnen Zelle das Strukturprotein Dystrophin fehlt, könnte ein weiterer Hinweis auf die Rolle der Mastzellen in der Pathophysiologie der DMD (Gorospe et al. 1996). In Einklang mit der Erhöhung der Mastzellzahl steht die von Lindahl et al. (1994) beschriebene Erhöhung der Phospholipase A₂ (PLA₂). Die PLA₂ ist ein Enzym, das über Aktivierung von Entzündungsmediatoren wie Leukotrienen, Prostaglandinen und Phospholipiden bei Entzündungsreaktionen und Nekrose eine wichtige Rolle spielt. Die Autoren diskutieren die erhöhte PLA₂-Aktivität als Ursache für die Muskelzellnekrose (Lindahl et al. 1994).

Zur Klärung der Frage, ob die dargestellten Untersuchungsergebnisse einen für DMD spezifischen Befund darstellen, wurde eine Kontrollgruppe „pathologische Kontrolle“ untersucht. Die Gruppe war in ihrer Zusammensetzung sehr heterogen und setzte sich aus unterschiedlichen Strukturmyopathien und metabolischen Myopathien zusammen. Hinsichtlich der TIMP-1-mRNA Expression fiel besonders Patientin Nr. 36 durch extrem hohe Werte sowohl in der Gesamtexpression als auch in der durchschnittlichen Expression auf. Die Werte lagen im Vergleich mit der DMD-Gruppe oberhalb der 75. Perzentile (siehe Diagramm 4 und 5). Die Patientin leidet an einer primären Merosinopathie, einer schweren Form der kongenitalen Muskeldystrophie mit komplettem Merosinmangel. Merosin ist ein Strukturprotein des Dystrophin-assoziierten-Glykoproteinkomplexes (DAG). Für diese Form

der Myopathie ist eine stark erhöhte Expression von TGF β 1 beschrieben worden (Bernasconi et al. 1999). Als eines der am stärksten fibrogen wirkenden Zytokine bewirkt TGF β 1 eine massive Erhöhung der TIMP-1-mRNA-Expression. Somit kann die starke TIMP-1-mRNA- Erhöhung bei Patientin Nr. 36 durch die bekannte TGF β 1-Erhöhung erklärt werden. Insgesamt zeigen sich in der Gruppe „pathologische Kontrolle“ bezüglich der Gesamtexpression von MMP-1- und TIMP-1mRNA tendenziell ähnliche Veränderungen wie in der DMD-Gruppe (siehe Abb. 3c, 6c). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen dar, daß die TIMP-1-mRNA-Erhöhung und die Veränderungen von MMP-1-mRNA kein für DMD spezifischer Befund sind, sondern sich auch bei anderen Myopathien nachweisen lassen. Diese Veränderungen sind vergleichbar mit Fibrosen der Leber, Niere und Haut, über die es zahlreiche Untersuchungen gibt.

Wichtige Gründe sprechen für die Notwendigkeit einer antifibrotischen Therapie, unter anderem eine enge Korrelation zwischen Fibrose und muskulärer Funktion (Desguerre et al. 2009). An der mdx-Maus führte eine Behandlung mit Imatinib zu einer klinischen Verbesserung. Durch diese antineoplastische Substanz konnte über eine Suppression der Zytokine Il-1 und TNF α eine reduzierte Muskelzellnekrose, geringere Fibrosierung und verbesserte muskuläre Funktion erreicht werden (Huang et al. 2009).

5. Zusammenfassung

Die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (DMD) ist durch Untergang von Muskelzellen und eine progrediente Fibrosierung der Muskulatur gekennzeichnet. Immobilität und eine stark verkürzte Lebenserwartung sind die Folge. Die mdx-Maus dagegen, ein Tiermodell der DMD mit Dystrophindefizienz, besitzt eine nahezu normale Lebenserwartung. Auffallend ist die fehlende Fibrose in der Muskulatur der mdx-Maus. Daraus folgt, daß die Fibrose der Muskulatur und der ungünstige klinische Verlauf bei DMD keine unmittelbare und zwangsläufige Folge des Dystrophinmangels sein können. Diese Überlegung und neuere Erkenntnisse über die Funktion der extrazellulären Matrix im Zusammenhang mit fibrosierenden Erkrankungen gaben Anlaß, sich mit der Fibrosierung bei DMD auseinanderzusetzen. Bereits bekannt ist, daß die Synthese von Kollagen I und III gesteigert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der progredienten Fibrose bei DMD auch ein verminderter Abbau von Kollagen I und III zugrunde liegen könnte. Dazu wurden Muskelgewebeschnitte von 17 DMD-Patienten, 10 Gesunden und 11 Patienten mit anderen Myopathien untersucht. Mittels RNA/RNA-in situ-Hybridisierung wurden das Kollagen I und III abbauende Enzym Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) und dessen Inhibitor Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase-1 (TIMP-1) auf RNA-Ebene nachgewiesen und durch ein Auszählverfahren semiquantitativ bestimmt. Es ergab sich in der DMD-Gruppe gegenüber der normalen Kontrollgruppe eine Erhöhung sowohl von MMP-1-mRNA als auch von TIMP-1-mRNA, wobei TIMP-1-mRNA überproportional erhöht war. Da TIMP-1 auf MMP-1 im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 wirkt, sind auf RNA-Ebene durch den TIMP-1 Überschuß die Voraussetzungen für einen verminderten Abbau von Kollagen I und III gegeben.

Die Ergebnisse stimmen bezüglich TIMP-1 mit einer Untersuchung an DMD-Patienten auf Proteinebene überein. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse mit Untersuchungen über Leber-, Lungen- und Blasenfibrose verglichen. Gute Übereinstimmung bestand in der starken TIMP-1 Erhöhung, MMP-1 verhielt sich unterschiedlich (beispielsweise war MMP-1 weder bei gesunden noch bei zirrhotischen Lebern nachweisbar), bei allen fibrosierenden Erkrankungen war jedoch das Verhältnis TIMP-1/MMP-1 in Richtung TIMP-1 verschoben.

Es zeigte sich eine Häufung sehr stark TIMP-1 exprimierender Zellen in Regionen gruppenförmiger Muskelfaserdegeneration – ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der TIMP-1-Erhöhung für die Entstehung der Fibrose und der eingeschränkten muskulären Regenerationsfähigkeit.

Als steuernde Zytokine im System der Fibrolyse/Fibrogenese kommen vor allem TGF β -1 und bFGF in Frage. Die Serumkonzentrationen von TGF β -1 sinken bei DMD mit zunehmendem Alter, ein entsprechendes Absinken von TIMP-1-mRNA konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist, daß TIMP-1 als autokriner Wachstumsfaktor zytokinunabhängig wirksam werden kann.

Durch eine sequentielle Doppelmarkierung mit immunhistologischer Zelltypisierung (APAAP-Methode) und anschließender in situ- Hybridisierung konnten Fibroblasten sowohl als MMP-1-mRNA als auch TIMP-1-mRNA exprimierende Zellen identifiziert werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungsergebnissen anderer Organfibrosen. Im Vergleich mit anderen Myopathien stellt die Erhöhung der TIMP-1-mRNA keinen für die DMD spezifischen Befund dar, sie war jedoch in der DMD-Gruppe am stärksten ausgeprägt.

Es konnte gezeigt werden, daß bei der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne über eine TIMP-1-Erhöhung auf RNA-Ebene die Voraussetzungen für einen verminderten Kollagenabbau im DMD-Muskel gegeben sind. Weitere Untersuchungen auf Proteinebene sowie Funktionsuntersuchungen mittels Zymographie sind wegen der komplexen Steuerungsmechanismen notwendig.

6. Literaturverzeichnis

- Aldenberg F., Nilsson K., Jarlshammar B., Bjermer L., Enerbäck L.:
Mast cells and biogenic amines in radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8 (1993): 112-117
- Alter J., Lou F., Rabinowitz A., Yin H., Rosenfeld J., Wilton S.D., Partridge T.A., Lu Q.L.:
Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nature Med* 12 (2006): 175-177
- D'Amore P.A., Brown R.H., Ku P.-T., Hoffman E.P., Watanabe H., Arahata K., Ishihara T., Folkman J.:
Elevated basic fibroblast growth factor in the serum of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 35 (1994): 362-365
- Anderson J.E., Bressler B.H., Ovalle W.K.:
Functional regeneration in the hindlimb skeletal muscle of the *mdx*-mouse. *J Musc Res Cell Mot* 9 (1988): 499-515
- Arahata K., Ishiura S., Shiguro T.:
Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* 333 (1988): 861-863
- Arthur M.J.P.: Collagenases and liver fibrosis. *J Hepathol* 22 (1995): 43-48
- Banks G.B., Chamberlain J.S.: The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. *Curr Top Dev Biol* 84 (2008): 431-453
- Battaller R., Brenner D.A.:
Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115 (2005): 209-218
- Baydur A., Layne E., Aral H., Krishnareddy N., Topacio R., Frederick G., Boden W.:
Long term non-invasive ventilation in the community for patients with musculoskeletal disorders: 46 years experience and review. *Thorax* 55 (2000): 4-11(Jan)
- Belluci C., Lilli C., Baroni T., Pametti L., Sorbi S., Emiliani C., Lumare E., Calabresi P., Balloni S., Bodo M.:
Differences in extracellular matrix production and basic fibroblast growth factor response in skin fibroblasts from sporadic and familial Alzheimer disease. *Mol Med* 13/9-10 (2007): 542-550
- Bhagwati S., Ghatpande A., Shafiq S.A., Leung B.:
In situ hybridisation analysis for expression of myogenic regulatory factors in regenerating muscle of *mdx* mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 55 (1996): 509-514
- Bernasconi P., Torchiana E., Confalonieri P., Brugnoli R., Barresi R., Mora M., Cornelio F., Morandi L., Mantegazza R.:
Expression of transforming growth factor- β 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. *J Clin Invest* 96 (1995): 1137-1144

- Bernasconi P., Di Blasi C., Mora M., Morandi L., Galbiati S., Confalonieri P., Cornelio F., Mantegazza R.:
Transforming growth factor- β 1 and fibrosis in congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 9 (1999): 28-33
- Billard C., Gillet P., Barthez M., Hommet C., Bertrand P.:
Reading ability and processing in Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Dev Med Child Neurol* 40-1 (1998): 12-20
- Boachie A.O., Lonstein J.E., Winter R.B.:
Management of neuromuscular spinal deformities with Luque segmental instrumentation. *J Bone Joint Surg (Am)* 71 (1989): 548-562
- Brook M.H., Fenichel G.M., Griggs R.C., Mendell J.R.:
Clinical investigation of Duchenne muscular dystrophy. Interesting results in a trial of prednisone. *Arch Neurol* 44 (1987): 812-817
- Bulfield G., Siller W.G., Wight P.A.L., Moore K.J.:
X-Chromosome linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (1984): 1189-1192
- Burt A.D.: C.L. Oacley lecture (1993)
Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *J Pathol* 170 (1993): 105-114
- Bushby K.M., Thambyayah D., Gardner-Medwin:
Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet* 337 (1991): 1022-1024
- 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* 135 (1989): 909-919
- Campbell K.P., Crosbie R.H.:
Utrophin to the rescue. *Nature* 384 (1996): 308-309
- Clark S.D., Kobayashi D.K., Welgus H.G.:
Regulation of the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and collagenase by retinoids and glucocorticoids in human fibroblasts. *J Clin Invest* 80 (1987): 1280-1288
- Connolly A.M., Keeling R.M., Mehta S., Pestronk A., Sanes J.R.:
Three mouse models of muscular dystrophy: the natural history of strength and fatigue in dystrophin-, dystrophin/utrophin- and laminin α 2-deficient mice. *Neuromuscul Disord* 11 (2001): 703-712
- Cooper B.J., Winand N.J., Stedman H., Valentine B.A., Hoffman E.P., Kunkel L.M., Scxott M.O., Fishbeck K.H., Kornegay J.N., Avery R.J., Williams J.R., Schmickel R.D., Sylvester J.E.:
The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334 (1988): 154-156

- Cordell J.L., Falini B., Erber W.N., Ghosh A.K., Abdulaziz Z., Macdonald S., Pulford K.A.F., Stein H., Mason D.Y.:
 Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem.*32, No.2 (1984): 219-229
- Coulton R.G., Curtin N.A., Morgan J.E., Partridge T.A.:
 The mdx -mouse muscle myopathy: II, contractile properties. *Neuropath Appl Neurobiol* 14 (1988): 299-314
- Deconinck A.E., Rafael J.A., Skinner J.A., Brown S.C., Potter A.C., Metzinger L., Watt D.J., Dickson J.G., Tinsley J.M., Davies K.E.:
 Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90 (1997): 717-727
- Desguerres I., Mayer M., Leturcq F., Barbet J.P., Gherardi J.K., Christov C.:
 Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 68/7(2009): 762-773
- Docherty A.J.P., Lyons A., Smith B.J., Wright E.M., Stephens P.E., Harris T.J.R.:
 Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318 (1985): 66-69
- Dreher M., Rauter I., Storre J.H., Geiseler J., Windisch W.:
 When should home mechanical ventilation be started in patients with different neuromuscular disorders? *Resp* 12/5 (2007): 749-53
- Drenckhahn D., Holbach M., Ness W., Schmitz F., Anderson L.V.B.:
 Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein dystroglycan co-localize in photoreceptor synaptic complexes of the human retina. *Neurosci* 73 (1996): 605-612
- Dubowitz V.:
 Muscle disorders in childhood. Second edition 1995
 W.B.Saunders Company LTD London, Philadelphia, Toronto.
- Duchenne G.B.:
 De l'électrisation localisée et de son application à la pathologie et à la thérapeutique. 2.Aufl.Baillière, Paris 1861
- Dunnen, den J.T., Beggs A.H. :
 Multiplex PCR for identifying DMD gene deletions. *Curr Protoc Hum Genet* (2006): Chapter 9 U9.3
- Eckes B., Kessler D., Aumailley M., Krieg T.:
 Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. *Spr Sem Immunopathol* 21 (2000): 415-429
- Emery A.E.H.:
 Abnormalities of the electrocardiogram in hereditary myopathies. *J Med Genetics* 9 (1972): 8-12

- Emery A.E.H.:
Duchenne muscular dystrophy: Genetic aspects, carrier detection and antenatal diagnosis. *Br Med Bull* 36 (1980): 117
- Emery A.E.H.:
Population frequencies of inherited neuromuscular diseases - a world survey. *Neuromusc Disord* 1 (1991): 19-29
- Engel A.G., Yamamoto M., Fischbeck K.H.:
Dystrophinopathies. In: Engel A.G. and Franzini-Armstrong, Editors, *Myology*, McGraw-Hill, New York (1994): 1133-1187
- Endesfelder S., Kliche A., Lochmüller H., von Moers A., Speer A.:
Antisense oligonucleotides and short interfering RNAs silencing the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 improve proliferation of Duchenne muscular dystrophy patients' primary skeletal myoblasts. *J Mol Med* 83/1 (2005): 64-71
- Ervasti J.M., Campbell K.P.:
Dystrophin and the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol* 5 (1993): 82-87
- Esposito C., Parilla B., Cornacchia F., Grosjean F., Mangione F., Serpieri N., Valentino R., Villa L., Arra M., Esposito V., Dal Canton A.:
The antifibrotic effect of hepatocyte growth factor (HGF) on renal tubular (HK-2) cells is dependent on cell growth. *Growth factors* 27/3 (2009): 173-180
- Fadic R., Waclawik A.J., Lewandoski P.J., Lotz B.P.:
Muscle pathology and clinical features of the sarcolemmopathies. *Pediatr Neurol* 16 (1997): 79-82
- Farini A., Razini P., Erratico S., Torrente Y., Meregalli M.:
Cell based therapy for Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol* 2009 Aug 17
Epub ahead of print
- Ferri G., De Angelis G.C., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cosso G., Mavilio F.:
Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279 (1998): 1528-1530
- Figarella-Branger D., Machado A.M.B., Putzu G.A., Malzac P., Völckel M.A., Pellissier J.F.:
Exertional rhabdomyolysis and exercise intolerance revealing dystrophinopathies. *Acta Neuropathol* 94 (1997): 48-53
- Firth M., Gardner-Medwin G., Hosking G.:
Interviews with parents of boys suffering from Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 25 (1983): 466
- Floss Th., Arnold H.-H., Braun Th.:
A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes & Dev* 11 (1997): 2040-2051
- Forst R., Mortier W.:
Zur medizinischen Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie. *Kinderarzt* 21 (1990): 1256-1261
- Freund A.A., Scola R.H., Arndt R.C., Lorenzoni P.J., Kay C.K., Werneck L.C.:
Duchenne and Becker muscular dystrophy: a molecular and immunohistochemical approach. *Arq Neuropsiquiatr* 65/1 (2007): 73-76

- Gall J.G., Pardue M.L.:
Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Genetics* 63 (1969): 378-383
- Gangopadhyay S.B., Sherratt T.G., Heckmatt J.Z., Dubowitz V., Miller G., Shokeir M., Ray P.N., Strong P.N., Worton R.G.:
Dystrophin in frameshift deletion patients with Becker muscular dystrophy. *Am J Hum Pathol* 51 (1992): 562-570
- Gaschen F.P., Hoffman E.P., Gorospe J.R., Uhl E.W., Senior E.F., Cardinet G.H., Pearce L.K.:
Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J Neurol Sci* 110 (1992): 149-159
- Gilchrist S.C., Ontell M.P., Kochanek S., Clemens P.R.:
Immun response to full-length dystrophin delivered to DMD muscle by a high-capacity adenoviral vector. *Mol Ther* 6/3 (2002): 359-368
- Girlanda P., Quartarone A., Buceti R., Sinicropi R., Macaione V., Saad F.A., Messina L., Danieli G.A., Ferreri G., Vita G.:
Extra-muscle involvement in dystrophinopathies: an electroretinography and evoked potential study. *J Neurol Sci* 146 (1997): 127-132
- Gordon M.K., Hahn R.A.:
Collagens Cell Tissue Res (2009): Epub PMID 19693541
- Gorospe J.R.M., Tharp M.D., Hinckley J., Kornegay J.N., Hoffman E.P.:
A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs, and mice. *J Neurol Sci* 122 (1994): 44-56
- Gorospe J.R.M., Nishikawa B.K., Hoffman E.P.:
Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *J Neurol Sci* 135 (1996): 10-17
- Goudenege S., Pisani D.V., Wdziekonski B., di Santo J.P., Bagnis C., Dani C., Dechesne C.A.:
Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD. *Mol Ther* 17/6 (2009): 1064-1072
- Gowers W.R.: *A manual of diseases of the nervous system*. London: Churchill, 1886.
- Goyenvalle A., Babbs A., van Ommen G.J., Garcia L., Davies K.E.:
Enhanced exon-skipping induced by U7 snRNA carrying a splicing silencer sequence: Promising tool for DMD therapy. *Mol Ther.* 17/7 (2009): 1234-1240
- Grady R.M., Teng H., Nichol M.C., Cunningham J.C., Wilkinson R.S., Sanes J.R.:
Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90 (1997): 729-738
- Gressner A.M., Bachem M.G.:
Parasinusoidal lipocytes: their contribution to hepatic connective tissue synthesis and to the mechanism of matrix amplification in fibrogenesis. In: Clement B., Guillouzo A., eds. *Cellular and molecular aspects of cirrhosis*. INSERM/J Libbey, 1992: 219-222
- Griggs R.C., Forbes G., Moxley R.T., Herr B.E.:
The assessment of muscle mass in progressive neuromuscular disease. *Neurology* 33 (1983): 158-169

- Griggs R.C., Moxley R.T., Mendell J.R., Fenichel G.M.:
Duchenne dystrophy: Randomized, controlled trial of prednisone (18 months) and azathioprine (12 months). *Neurology* 43 (1993): 520-527
- Grimm T.: Becker dystrophy. In Engel A.G., Banker B.Q.:
Myology - Basic and clinical. McGraw-Hill, New York 1986: 1241-1250
- Gruber B.L., Marchese M.J., Kew R.R.:
Transforming growth factor- β 1 mediates mast cell chemotaxis. *J Immunol* 152 (1994): 5860-5867
- Gulati S., Saxena A., Kumar V., Kalra V.:
Duchenne muscular dystrophy: prevalence and patterns of cardiac involvement. *Indian J Ped* 72(5) (2005): 389-393
- Han Y.P.: Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 21/Suppl 3 (2006): 88-91
- Harper M.E., Sauders G.F.:
Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridisation. *Chromosoma* 83/3 (1981): 431-439
- Hawkins R.A., Claman H.N., Clark R.A.F., Steigerwald J.C.:
Increased dermal mast cell populations in progressive systemic sclerosis: a link in chronic fibrosis? *Ann Intern Med* 102 (1985): 182-186
- He C., Wilhelm S.M., Pentland A.P., Marmer B.L., Grant G.A., Eisen A.Z., Goldberg G.I.:
Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989):2632-2636
- Heckmatt J.Z., Dubowitz V., Hyde S.A., Florence J., Gabain A.C., Thompson N.:
Prolongation of walking in Duchenne muscular dystrophy with lightweight orthoses: review of 57 cases. *Dev med child neurol* 27 (1985): 149-154
- Herbst H., Wege T., Milani S., Pellegrini G., Orzechowski H.-D., Bechstein W.O., Neuhaus P., Gressner A.M., Schuppan D.:
Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 150 (1997): 1647-1659
- Hoffman E.P., Brown R.H., Kunkel L.M.:
Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51 (1987): 919-928
- Howell J.McC., Fletcher S., Kakulas B.A., O'Hara M., Lochmuller H., Karpati G.:
Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. *Neuromuscul Disord* 7 (1997): 325-328
- Huang P., Zhao X.S., Fields M., Ransohoff R.M., Zhou L.:
Imatinib attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice. *FASEB J.*23/8(2009): 2539-2548
- Huang W.Y., Hung C.C., Lee C.N., Su Y.N., Chen C.P.:
Rapid prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy with gene duplications by ion-pair reverse phase high performance liquid chromatography coupled with competitive multiplex polymerase chain reaction strategy. *Prenat Diagn* 27/7 (2007): 653-656

- Hübner C., Lehr H.-A., Bodlaj R., Finckh B., Oexle K., Marklund S.L., Freudenberg K., Kontush A., Speer A., Terwolbeck K., Kohlschütter A.:
Wheat kernel ingestion protects from progression of muscle weakness in *mdx* mice, an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 40 (1996): 444-449
- Ibraghimov-Breskrovnaya O., Ervasti J.M., Leveille C.J., Slaughter C.A., Sernett S.W., Campbell K.P.:
Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355 (1992): 696-702
- Ichihara A.: BCA, HGF and proteasomes. *Biochem Biophys Res Commun* 266 (1999): 647-65
- Innaccone S., Quattrini A., Smirne M.:
Connective tissue proliferation and growth factors in animal models of Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 128 (1995): 36-44
- Iredale J.P.: Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 29 (1997): 43-53
- Iredal J.P.: Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 21 (2001): 427-436
- Jay V., Becker L.E., Cameron A.:
Dystrophin analysis in the diagnosis of childhood muscular dystrophy: an immunohistochemical study of 75 cases. *Pediatr Pathol* 13 (1993): 635-657
- John H.A., Birnstiel M.L., Jones K.W.:
RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223 (1969): 582-587
- Johnson S.E., Allen R.E.: Activation of skeletal muscle satellite cells and the role of fibroblast growth factor receptor. *Exp Cell Res* 219 (1995): 449-453
- Kakulas B.A.:
Problems and potential for gene therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 7 (1997): 319-324
- Kakulas B.A.:
The differential diagnosis of the human dystrophinopathies and related disorders. *Curr Opin Neurol* 9 (1996): 380-388
- Kaminski H.J., al-Hakim M., Leigh R.J., Katirji M.B., Ruff R.L.:
Extraocular muscles are spared in advanced Duchenne dystrophy. *Ann Neurol* 32/4 (1992). 586-588
- Kikuchi K., Kadono T., Furue M., Tamaki K.:
Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) may be an autocrine growth factor in scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 108 (1997): 281-284
- Kisseleva T., Brenner D.A.:
Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med* 233 (2008): 109-122
- Koenig M., Hoffman E.P., Bertelson C.J., Monaco A.P., Feener C., Kunkel L.M.:
Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50 (1987): 509-517

- Koenig M., Monaco A.P., Kunkel L.M.:
The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53/2(1988): 219-228
- Koenig M., Beggs A.H., Moyer M.:
The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45 (1989): 498-506
- Kolb C., Mauch S., Krawinkel U., Sedlacek R.:
Matrix Metalloproteinase-19 in capillary endothelial cells: expression in acutely, but not in chronically, inflamed synovium. *Exp Cell Res* 250 (1999): 122-130
- Kordula T., Güttgemann I., Rose-John S., Roeb E., Osthues A., Tschesche H., Koj A., Heinrich P.C., Graeve L.:
Synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in human hepatoma cells (HepG2). Up-regulation by interleukin-6 and transforming growth factor α 1. *FEBS Letters* 313 (1992): 143-147
- Leibowitz D., Dubowitz V.:
Intellect and behaviour in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 23 (1981): 577-590
- Leitch A.R., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I J.:
In situ -Hybridisierung. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1994)
- Lichtinghagen R., Breitenstein K., Arndt B., Kühbacher T., Böker K.H.W.:
Comparison of matrix metalloproteinase expression in normal and cirrhotic human liver. *Virchows Arch* 432 (1998): 153-158
- Lindahl M., Bäckman E., Henriksson K.G., Gorospe J.R., Hoffman E.P.:
Phospholipase A2 activity in dystrophinopathies. *Neuromusc Disord* 5/3 (1995): 193-199
- Lipton B.H.: Skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. In Mauro (Hrsg): *Muscle regeneration*, New York, Raven Press (1979): 31-40
- Liu Y., Yang J.:
Hepatocyte growth factor : new arsenal in the fights against renal fibrosis? *Kidney Int* 70 (2006): 238-240
- Manzur A.Y., Muntoni F.:
Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies. *J Neuro Neurosurg Psych* 80/7(2009): 706-714
- Manzur A.Y., Kinali M., Muntoni F.:
Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child* 3/11 (2008): 986-990
- Di Mario J., Buffinger N., Yamada S., Strohman R.C.:
Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science* 244 (1989): 688-690
- Massa R., Castellani L., Silvestri G., Sancesario G., Bernhardt G.:
Dystrophin is not essential for the integrity of the cytoskeleton. *Acta Neuropathol* 87 (1994): 377-384

- Matrisian L.:
Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *TIG* 6 No4 (1990): 121-125
- Matsumura K., Ervasti J.M., Ohlendieck K., Kahl S.D., Campbell K.P.:
Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in *mdx*-mouse muscle. *Nature* 360 (1992): 588-591
- Matsumura K., Nonaka I., Tomé F.M.S., Arahata K., Collin H., Leturcq F., Récan D., Kaplan J.-C., Fardeau M., Campbell K.P.:
Mild deficiency of dystrophin-associated proteins in Becker muscular dystrophy patients having in-frame deletions in the rod domain of dystrophin. *Am J Hum Genet* 53 (1993): 409-416
- Medina A., Ghaffari A., Kilani R.T., Ghahary A.:
The role of Stratefin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Mol Cell Biochem* 305/1-2(2007): 255-264
- Megency L.A., Kablar B., Garrett K.:
MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Gene Dev* 10 (1996): 1173-1183
- Mendell J.R., Griggs R.C., Moxley R.T., Fenichel G.M., Brook M.H.:
Randomized, double-blind six-months trial of prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *N Engl J Med* 320 (1989): 1592-1597
- Milani S., Herbst H., Schuppan D., Surrenti C., Riecken R.O., Stein H.:
Cellular localization of type I, III and IV procollagen gene transcripts in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 137 (1990): 59-70
- Milani S., Herbst H., Schuppan D., Grappone C., Pellegrini G., Pinzani M., Casini A., Calabro A., Ciancio G., Stefanini F., Burroughs A.K., Surrenti C.:
Differential expression of Matrix- metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 144 No3 (1994): 528-537
- Miller R.G., Sharma K.R., Pavlath G.K., Gussoni E., Mynhier M., Yu P., Lanctot A.M., Greco C.M., Steinman L., Blau H.M.:
Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco Study. *Muscle Nerve* 20 (1997): 469-478
- Miller R.G., Chalmers A.C., Dao H.:
The effect of spine fusion on respiratory function in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 41 (1991): 38-40
- Mokri B., Engel A.G.:
Duchenne dystrophy: Electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* 25 (1975): 1111
- von Moers A., Möller P., Herbst H., Schuppan D., Stoltenburg-Didinger G.:
Expression of mRNA of procollagen type I and procollagen type IV and its cellular localisation in spinal muscular atrophy and Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 34 (1996): Suppl.1: 34
- Mortier W.: *Muskel- und Nervenerkrankungen im Kindesalter*. Thieme Verlag Stuttgart-New York 1994: 271-277

- Moser H.: Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet* 66 (1984): 17
- Muntoni F., Wilson L., Marrosu G., Marrosu M.G., Cianchetti C., Mestroni L., Ganau A., Dubowitz V., Sewry C.:
A mutation in the dystrophin gene selectively affecting dystrophin expression in the heart. *J Clin Invest* 96 (1995): 693-699
- Nakamura A., Takeda S.:
Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathology* 29/4 (2009): 494-501
- Niemann-Seyde S., Slomski R., Rininsland F., Ellermeyer Kwiatkowska J., Reiss J.:
Molecular genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Genet* 90 (1992): 65-70
- Orphanides C., Fine L.G., Norman J.T.:
Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF β -1-independent mechanism. *Kidney Int* 52 (1997): 637-647
- Otrock Z.K., Mahfouz R.A., Makarem J.A., Shamseddine A.I.:
Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis* 39/2 (2007): 1237-1241
- Partridge T.:
Animal models of muscular dystrophy-what can they teach us? *Neuropathology and applied Neurobiology* 17 (1991): 353-363
- Pastoret C., Sebille A.:
mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* 129 (1995): 97-105
- Peters C.A., Freeman M.R., Fernandez C.A., Shepard J., Wiederschain D.G., Moses M.A.:
Dysregulated proteolytic balance as the basis of extracellular matrix in fibrotic disease. *Am J Physiol* 272 (1997): R1969-R1965
- Ponder B.A., Wilkinson M.M.:
Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem.* 29 (1981): 981-984
- Porschke H.:
Neuere Entwicklungen in der Therapie der Myopathien. *Nervenheilkunde* 13 (1994): 257-63
- Powell D.W., Mifflin R.C., Valentich J.D., Crowe S.E., Saada I., West A.B.:
Myofibroblasts.I.Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277 (Cell Physiol 46), 1999: C1-C19
- Powell D.W., Mifflin R.C., Valentich J.D., Crowe S.E., Saada I., West A.B.:
Myofibroblasts.II.Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 277 (Cell Physiol 46), 1999: C183-C201
- Rideau Y., Duport G., Delaubier A. :
Premiers remissions reproductibles dans l'évolution de la dystrophie musculaire de Duchenne. *Bull Acad Nat Med* 170 (1986) : 605-610

- Ried T., Mahler V., Blonden L., van Ommen G.J.B., Cremmer T., Cremmer M.:
Direct carrier detection by *in situ* suppression hybridization with cosmid clones of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus. *Hum Genet* 85 (1990): 581-586
- Rodgers U.R., Kevorkian L., SurrIDGE A.K., Waters J.G., Swingler T.E., Culley K., Illman S., Lohi J., Parker A.E., Clark I.M.:
Expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-28. *Matrix Biol* 28/5 (2009): 263-272
- Ruiz-Ortega M., Rodriguez-Vita J., Sanchez-Lopez E., Carvajal G., Egidio J.:
TGF-beta signalling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 74 (2007): 196-206
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.:
Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)
- Sato H., Takino T., Okada Y., Cao J., Shinagawa A., Yamamoto E., Seiki M.:
A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370 (1994): 61-65
- Schuppan D.:
Localization of extracellular matrix components in normal and fibrotic liver-collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 10 (1990): 1-10
- Schuppan D.:
Molekulare Mechanismen der Leberfibrose und Entwicklung neuer Therapiestrategien. *Habil.-Schrift 1995, UKBF Berlin*
- Schuppan D., Hahn E.G.:
Components of the extracellular matrix (collagens, elasti, glycoproteins and proteoglycans). *NATO ASI Series Vol.H5*
In: *Mesenchymal-Epithelial Interactions in Neural Development*
Hrsg.: J.R.Wolff et al., Berlin, Heidelberg 1987
- Schuppan D., Ruehl M., Somasundaram R., Hahn R.G.:
Matrix as a modulator of hepatic fibrosis. *Semin Liver Dis* 21/3 (2001): 351-372
- Seiler G., Welle M., Busato A., Lin S., Gaschen F.P.: Mast cell proliferation and alterations in bFGF amount and localization are involved in the response of muscle to dystrophin deficiency in hypertrophic feline dystrophy. *Neuromuscul Disord* 11 No1(2001): 56-71
- DeSilva S., Drachman D.B., Mellits D., Kunel R.W.:
Prednison treatment in Duchenne muscular dystrophy. Long-term benefit. *Arch Neurol* 44 (1987): 818-822
- Smith A.D., Koreska J., Moseley C.F.:
Progression of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Bone Jt Surg* 71 (1989): 1066-1074
- Steinert P.M., Roop D.R.:
Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann Rev Biochem* 57 (1988): 593-625
- Stephens R.H., Duance V.C., Dunn M.J., Bailey A.J., Dubowitz V.:
Collagen types in neuromuscular diseases. *J Neurol Sci* 53 (1982): 45-62

- Stevenson S., Rothery S., Cullen M.J., Severs N.J.:
Dystrophin is not a specific component of the cardiac costamere. *Circ Res* 80 (1997): 269-280
- Stockley T.L., Akber S., Bulgin N., Ray P.N.:
Strategy for comprehensive molecular testing for Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genet Test* 10/4 (2006): 229-243
- Straathof C.S., Overweg-Plandsoen W.C., van den Burg G.J., van der Kooi A.J., Verschuuren J.J., de Groot I.J.:
Prednison 10 days on/ 10 days off in patients with Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol* 256/5 (2009): 768-773
- Strieter R.M., Gomperts B.N., Keane M.P.:
The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 117 (2007): 731-739
- Suhr F., Brixius K., Bloch W.:
Angiogenic and vascular modulation by extracellular matrix cleavage products. *Curr Pharm Des* 15/4 (2009) : 389-410
- Sun G., Haginoya K., Wu Y., Chiba Y., Nakanishi T., Onuma A., Sato Y., Takigawa M., Inuma K., Tsuchiya S. :
Connective tissue growth factor is overexpressed in muscles of human muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 267/1-2 (2008): 48-56
- Sun G.L., Zhao S., Li P., Jiang H.K.:
Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in progression muscular dystrophy. *Neurosci Bull* 22/2(2006): 85-90
- Swiderski R.E., Dencoff J.E., Floerchinger C.S., Shapiro S.D., Hunninghake G.W.:
Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin- induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 152 (1998): 821-828
- Taniyama Y., Morishita R., Nakagami H., Moriguchi A., Sakonjo H., Kim S., Matsumoto K., Nakamura T., Higaki J., Ogihara T.:
Potential contribution of a novel antifibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamsters. *Circulation* 102 (2000): 246-259
- Tanveer N., Sharma M.C., Sarkar C., Gulati S., Kalra V., Singh S., Bhatia R.:
Diagnostic utility of skin biopsy in dystrophinopathies. *Clin Neurol Neurosurg* 111/6(2009): 496-502
- Tinsley J.M., Potter A.C., Phelps S.R., Fisher R., Trickett J.I., Davies K.E.:
Amelioration of the dystrophic phenotype of *mdx* mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 384 (1996): 349-353
- Tomioka M., Goto T., Lee T.D.G., Bienenstock J., Befus D.:
Isolation and characterization of lung mast cells from rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Immunology* 66 (1989): 439-444

- Townsend D., Yasuda S, Chamberlain J., Metzger J.M.:
Cardiac consequences to skeletal muscle-centric therapeutics for Duchenne muscular dystrophy. *Trends Cardiovasc Med* 19/2(2009): 50-55
- Turner P.R., Westwood T., Regan C.M., Steinhardt R.A.:
Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from *mdx* mice. *Nature* 335 (1988): 735-738
- Tyagi S.C., Kumar S., Katwa L.:
Differential regulation of extracellular matrix metalloproteinase and tissue inhibitor by heparin and cholesterol in fibroblast cells. *J Mol Cell Cardiol* 29 (1997): 391-404
- Utsunomiya T., Mori H., Shibuya N.:
Longterm observation of cardiac function in Duchenne's muscular dystrophy: evaluation using systolic time intervals and echocardiography. *Japan. Heart J.* 31(1990): 585-597
- Varedi M., Ghahary A., Scott P.G., Tredget E.E.:
Cytoskeleton regulates expression of genes for transforming growth factor- β 1 and extracellular matrix proteins in dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* 172 (1997): 192-199
- Velázquez-Wong A. C., Hernández-Huerta C., Mairquez-Calixt A., Neriández-Aguilar F.O., Rodríguez-Cruz M., Salamanca Gamez F., Coral-Vázquez R.:
Identification of Duchenne muscular dystrophy female carriers by fluorescence in situ hybridization and RT-PCR. *Genet Test* 12/2 (2008): 221-223
- Vetrone S.A., Montecino-Rodriguez E., Kudryashova E., Kramerova I, Hoffman E.P., Liu S.D., Miceli M.C., Spencer M.J.:
Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF- β . *J Clin Invest* 119/6 (2009): 1583-1594
- Voskova-Goldman A., Peier A., Caskey C.T., Richards C.S., Shaffer L.G.:
DMD-specific FISH probes are diagnostically useful in the detection of female carriers of DMD gene deletions. *Neurol* 48/6(1997): 1633-1638
- Wagner K.R.:
Approaching a new age in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Neurotherapeutics* 5/4(2008): 583-591
- Walgenbach K.J., Gratas C., Shestak K.C., Becker D.:
Ischaemia-induced expression of bFGF in normal skeletal muscle: a potential paracrine mechanism for mediating angiogenesis in ischaemic skeletal muscle. *Nature medicine* 1 No 5 (1995): 453-459
- Wang B., Li J., Fu F.H., Xiao X.:
Systemic human minidystrophin gene transfer improves functions and lifespan of dystrophin and dystrophin/utrophin deficient mice. *J Orthop Res* 27/4 (2009): 421-426
- Wang Z., Chamberlain J.S., Tapscott S.J., Storb R.:
Gene therapy in large animal models of muscular dystrophy. *ILAR J* 50/2 (2009): 187-198

- Wheelan T.B.:
Neuropsychological performance of children with Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 29 (1987): 212-220
- Wiesen M.H., Bogdanovich S., Agarkova I., Perriard J.C., Khurana A.:
Identification and characterization of layer-specific differences in muscular m-bands. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48/3 (2007): 1119-1127
- Woessner J. F.:
Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5 (1991): 2145-2154
- Woessner J.F., Nagase H.:
Matrix metalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press, Miami, London 2000.
- Woessner J.F. Jr.:
MMPs and TIMPs—an historical perspective. *Mol Biotechnol.* 22/1 (2002): 33-49
- Wojtowicz-Praga S. M., Dickson R. B., Hawkins M. J.:
Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs* 15 (1997): 61-75
- Wollbold J., Huber R., Pohlers D., Koczan D., Guthke R., Kinne R.W., Gausmann U.:
Adapted Boolean network models for extracellular matrix formation. *BCM Sys Biol* 3 (2009): 77
- Xu H., Wu X.R., Wewer U.M., Engvall E.:
Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin $\alpha 2$ (Lama2) gene. *Nature Gene* 8 (1994): 297-301
- Yamazaki M., Minota S., Sakurai H., Miyazono K., Yamada A., Kanazawa I., Kawai M.:
Expression of transforming growth factor β -1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am J Pathol* 144 (1994): 221-226
- Yeung D., Zablocki, K., Lien C.F., Jiang T., Arkle S., Brutkowski W., Brown J., Lochmuller H., Simon J., Barnard E.A., Gorecki D.C.:
Increased susceptibility to ATP via alteration of P2X receptor function in dystrophis *mdx* – mouse muscle cells. *FASEB-J* 20/6(2006): 610-620 (Apr)
- Yilmaz Ö., Karaduman A., Topaloglu H.:
Prednisolon therapy in Duchenne muscular dystrophy prolongs ambulation and prevents scoliosis. *Eur J Neurol*, Vol 11/8 (2004): 541-544
- Yokota T., Takeda S., Lu Q.L., Partridge T.A., Nakamura A., Hoffman E.P.:
A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: *Arch Neurol* 66/1(2009): 32-38
- Yoshioka K., Takemura T., Murakami K.:
Transforming growth factor- β protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys. *Lab Invest* 52 (1993): 154-163
- Zentella A., Massague J.:
Transforming growth factor β induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992): 5176-5180

Zhou L., Rafael.Fortney J.A., Huang P., Zhao X.S., Cheng G., Liu L., Ransohoff R.M.:
Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and
muscular fibrosis in mdx mice. *J Neurol Sci* 264/1-2 (2008): 106-111

7. Abkürzungen

| | |
|----------------------------|---|
| ASO | Antisense Oligoribonukleotide |
| APAAP | alkalische Phosphatase antialkalische Phosphatase |
| bFGF | basischer Fibroblastenwachstumsfaktor |
| BMD | Muskeldystrophie vom Typ Becker |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CK | Kreatinkinase |
| CMD | kongenitale Muskeldystrophie |
| CsA | Ciclosporin A |
| CTGF | connective tissue growth factor |
| cRNA | komplementäre RNA |
| DAG | Dystrophin assoziierter Glycoproteinkomplex |
| DMD | Muskeldystrophie vom Typ Duchenne |
| EGF | epidermal growth factor |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FISH | Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung |
| GAG | Glycosaminoglykane |
| GRMD | golden retriever muscular dystrophy |
| HFMD | hypertrophic feline muscular dystrophy |
| HGF | hepatocyte growth factor |
| IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ | Interferon- $\alpha/\beta/\gamma$ |
| Il-1,-2,-3... | Interleukin-1, -2, -3... |
| IPPV | Beatmung mit intermittierendem positiven Druck |
| IQR | Interquartilsbereich |
| LIMP | large inhibitor of metalloproteinase |
| mdx-(Maus) | x-linked mouse dystrophy |

| | |
|---------------|---|
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| MPS | multiple Klonierungsstelle |
| MRF | Myogenese regulierende Faktoren |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PDGF | platelet derived growth factor |
| RGD | Arginin-Glycin-Asparaginsäure (Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren) |
| SMA | spinale Muskelatrophie |
| TGF β 1 | transforming growth factor β 1 |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| TIMP | tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases |
| XLDC | X-chromosomale dilatative Kardiomyopathie |

8. Chemikalien

APAAP Entwicklungspuffer
APAAP-Komplex (Dako D651, Hamburg)
Aceton
Adenosintriphosphat (ATP)
Ammoniumacetat (NH₄-Acetat)
Aminopropyltriethoxysilan (APES)
Antikörper CD 68, CD 31, Vimentin, Desmin, Merosin/Laminin (Dako, Hamburg)
Antikörperverdünnungspuffer RPMI-1640 (Seromed, Berlin)
Brückenantikörper Rabbit-ant-mouse (Dako Z259, Hamburg)
Calciumchlorid (CaCl₂)
Cytosintriphosphat (CTP)
Denhardts-Lösung (Ficoll, Polyvinylpyrrolidone, Rinderserumalbumin, DEPC-H₂O)
Dextransulfat
Diethylpyrocarbonat (DEPC)
Dimethylformamid
Dithiothreitol (DTT)
Entwickler Kodak D19 (Kodak, UK)
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)
Essigsäure 100%/1%
Essigsäureanhydrid
Ethanol 100% und diverse Verdünnungen
Ficoll
Fixierer 3000 (Kodak, UK)
Formamid
Guanosintriphosphat (GTP)
Hämatoxylin/Eosin (HE)
Heparin (Sigma, München)
Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt)
Levamisol

Naphtol-As-Bi-Phosphat
Natriumacetat (NaAc)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
Natriumnitrit (NaNO_2)
Natriumphosphat (Na_3PO_4)
Neufuchsin (Merck Darmstadt)
Hefe-tRNA (Gibco-BRL, Karlsruhe)
Paraformaldehyd/PBS (4% PFA/PBS)
Phosphate Buffered Saline (PBS: NaCl; Na_2HPO_4 ; NaH_2PO_4)
Photoemulsion LM-1/RPN 40 (Amersham international, UK)
Polyvinylpyrrolidone
Pronase
Propandiol
Rinderserumalbumin (Sigma, München)
Rnase A
Rnase-Inhibitor
SCC-Lösung (NaCl, Na_3 -Citrat)
Salzsäure (HCl)
Triethanolamin
TrisHCl
Uridintriphosphat (UTP)

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Für die Überlassung des interessanten Themas danke ich Herrn Dr.von Moers, der auch trotz Zeitnot immer ansprechbar war und mich während meiner Arbeit stetig und freundschaftlich unterstützt hat. Mein Dank gilt außerdem Frau Zwirner für wertvollen Rat und Tat bei der Laborarbeit.

Bei den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie des Virchowklinikums möchte ich mich für die freundliche Unterstützung bedanken.

Zuletzt möchte ich diese Arbeit meinen Kindern Lisa und Luca und meiner Frau Anette widmen, die mich nach Kräften unterstützt haben und mich viele Stunden entbehren mußten.

Veröffentlichung:

A.v.Moers, O.Brückmann, M.Kramer et al.:

Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 und -2mRNA in
Duchenne Muscular Dystrophy. Jahrestagung der Gesellschaft
für Neuropädiatrie, Hamburg 15.–17.10.1998

A.v.Moers, A.Zwirner, A.Reinhold, O.Brückmann, F.Landeghem, G.Stoltenburg-
Didinger, D.Schuppan, H.Herbst und M.Schuelke:

Increased mRNA expression of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 and -2 in
Duchenne muscular dystrophy. Acta Neuropathologica Vol 109 No 3, April 2005

Erklärung

„Ich, Olaf Brückmann, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Expression von MMP-1- und TIMP-1-mRNA bei Muskeldystrophie vom Typ Duchenne selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 18.1.2010