

Aus der Klinik für Neuropädiatrie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
und den DRK Kliniken Berlin | Westend, Klinik für Kinder-und
Jugendmedizin

DISSERTATION

„Bestimmung der Proteinexpression von MMP-1, MMP-2,
TIMP-1 und TIMP-2 mittels Immunhistochemie und Western-
Blot bei Muskeldystrophie Duchenne“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marion Kramer

aus Düsseldorf

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. A. von Moers
 2. Prof. Dr. med. Stenzel
 3. Prof. Dr. med. W. Müller-Felber

Datum der Promotion: 25.10.2013

Meiner Familie

Abkürzungen

1.	Einleitung	1
1.1	Muskeldystrophien	1
1.2	Muskeldystrophie Duchenne	3
1.2.1	Häufigkeit und Vererbung	3
1.2.2	Klinik	3
1.2.3	Konduktorinnen	5
1.2.4	Diagnostik	5
1.2.5	Therapie	6
1.2.6	Histologie	9
1.2.7	Dystrophin-Gen und sein Genprodukt	10
1.2.8	Mutationen im Dystrophin-Gen	13
1.2.9	Tiermodelle von Dystrophinopathien	14
1.3	Mögliche Pathomechanismen der DMD	15
1.4	Extrazelluläre Matrix	19
1.5	Charakterisierung der MMP und TIMP	20
2.	Fragestellung	24
3.	Patienten, Gewebeproben, Material und Methoden	25
3.1	Patienten	25
3.2	Gewebeproben	27
3.3	Antikörper	28
3.4	Lösungen	29
3.4.1	APAAP-Methode	29
3.4.2	Western-Blot	30
3.5	Geräte und Chemikalien	31
3.5.1	Geräte	31
3.5.2	Chemikalien	31
3.6	Methoden	33
3.6.1	Immunhistochemische Untersuchungen	33
3.6.1.1	Lichtmikroskopische Auswertung und Dokumentation	36
3.6.2	Western-Blot	37

3.6.2.1	Homogenisation der Biopsien	37
3.6.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	38
3.6.2.3	SDS-Page Gel Elektrophorese nach Laemmli	38
3.6.2.4	Semidry-Elektroblotting nach Khyse-Andersen	38
3.6.2.5	Immunmarkierung der nitrocellulosemembran-gebundenen Proteine..	39
3.6.2.6	Chemilumineszenz-Entwicklung	39
4.	Ergebnisse	40
4.1	Ergebnisse der Immunhistochemie	40
4.1.1	Histologische Merkmale der untersuchten Muskeln	40
4.1.2	MMP-1	42
4.1.3	MMP-2	45
4.1.4	TIMP-1	47
4.1.5	TIMP-2	49
4.1.6	Zusammenfassung der visuellen Auswertung	51
4.2	Ergebnisse der Western-Blot-Analyse	52
5.	Diskussion	55
5.1	Die Rolle von MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 bei der DMD	55
5.1.1	MMP-1 bei DMD	55
5.1.2	MMP-2 bei DMD	58
5.1.3	TIMP-1 bei DMD	60
5.1.4	TIMP-2 bei DMD	61
5.2	Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteinexpression	62
5.3	Schlussfolgerung	63
5.4	Aussichten	64
6.	Zusammenfassung	66
7.	Literatur	68
	Erklärung an Eides Statt	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungen

γ -GT	Gammaglutamyltransferase
Abb.	Abbildung
ACE	angiotensin converting enzyme
AD	autosomal dominant
AG	Antigen
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase
APS	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Aqua dest.	Aqua destillata
AR	autosomal rezessiv
AT	Antitrypsin
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMD	Muskeldystrophie Becker
cDNA	kodierende Desoxyribonukleinsäure
CK	Kreatininkinase
CMD	Kongenitale Muskeldystrophie
CYS	Cysteinreiche Domäne
DAGC	Dystrophin associated glycoprotein-complex
DAP	Dystrophin associated protein
DMD	Muskeldystrophie Duchenne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Dystrophinprodukt
DTT	1,4 Dithiothreitol
Dy-Maus	Dystrophia muscularis-Maus
EGF	Epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked immunosorbend assay
EMG	Elektromyogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ex	Exon
EZM	extrazelluläre Matrix

EZR	Extrazellulärraum
FSHD	facioscapulohumorale Muskeldystrophie
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GRMD	Golden Retriever Muskeldystrophie
GTP	Green tea polyphenole
HE-Färbung	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
IGF	insulin growth factor
IGFBP	insulin growth factor binding protein
IQ	Intelligenzquotient
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LGMD	Gliedergürtelmuskeldystropie
LIMP	large inhibitor of metalloproteinases
LSAB	enzymmarkierte Streptavidin-Biotin-Technik
M. deltoideus	Musculus deltoideus
M. obl. int.	Musculus obliquus internus abdominis
M. quad. fem.	Musculus quadriceps femoris
M. rect. abd.	Musculus rectus abdominis
M. tensor	Musculus tensor fasciae latae
M. triceps	Musculus triceps surae
M. vast. lat.	Musculus vastus lateralis
MD	Muskeldystrophie
mdx-Maus	x-chromosomale Muskeldystrophie der Maus
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MT-MMP	membranständige Matrix-Metalloproteinasen
nNOS	Neuronale Stickoxid Synthase
o.g.	oben genannt
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RT	Raumtemperatur
SDS	Laurylsulfat
SHD	scapulohumorale Muskeldystrophie
SMA	spinale Muskelatrophie
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
Tween 20	Polyoxyethylene-Sorbitan-Monolaurate
xmd	canine muscular dystrophy
XR	x-chromosomal rezessiv
Zn	Zink
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Muskeldystrophien

Die progressiven Muskeldystrophien bilden eine Gruppe von klinisch und genetisch heterogenen Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal ein degenerativer Abbau der quergestreiften Muskulatur mit einer fortschreitenden Muskelschwäche ist. Die Muskeldystrophien lassen sich hinsichtlich des Erbganges, der Proteindefizienz, des Manifestationsalters, der primären Lokalisation der Muskelschwäche und der Progredienz des Muskelschwundes einteilen (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Klassifikation wichtiger Muskeldystrophien (modifiziert nach 121):

Erkrankung	Erbgang	Genort	Protein	Manifestationsalter	Lokalisation
Dystrophinopathien					
Duchenne	XR	Xp21.2	Dystrophin	1-5 J.	Beckengürtel
Becker	XR	Xp21.2	Dystrophin	5- 15 J.	Beckengürtel
Kongenitale MD					
CMD Merosinopathie	AR	6q2	Laminin- α 2	kongenital	generalisiert
CMD Fukuyama	AR	9q31-33	Fukutin		
CMD Walker- Warburg	AR	9q34	WWS		
CMD mit "rigid spine"	AR	1p36	RSMD1		
Muscle-Eye-Brain	AR	1p3	MEB		
Integrin α 7 deficiency	AR	12q13	ITGA7		
Ullrich Syndrom	AR	21q22	UCMD		
Ullrich Syndrom	AR	2q37	COL6A4		
Emery- Dreifuss- MD					
XR-EDMD	XR	Xq28	Emerin	4- 10 J.	Oberarm, Unterschenkel,
AD-EDMD	AD	1q11-23	Laminin A/C		Herz
Distale MD					
Welander	AD	2p	unbekannt	10- 30 J.	distale
Miyoshi	AR	2p12-14	Dysferlin		Extremitäten- abschnitte
Nonaka	AR	9p1-q1	IBM2		
Tibial (UDD/ TMD)	AD	2q31-33	TTN		
Autosomal- dominant	AD	14q11.2	MYH7		
Adult onset	AD	8p22-q11	Unbekannt		
	AD	12q13-22	unbekannt		

Erkrankung	Erbgang	Genort	Protein	Manifestationsalter	Lokalisation
<i>Facioscapulohumorale MD</i> FSHD	AD	4q35	FSHD	10- 20 J.	Schultergürtel, Gesicht, Oberarme
<i>Scapulohumorale MD</i> SHD				30- 50 J.	Schultergürtel, Unterschenkel- muskulatur
<i>Gliedergürtelformen</i>					
LGMD 1A	AD	5q22-34	Myotilin	5- 60 J.	Beckengürtel, Schultergürtel
LGMD 1B	AD	1q11-21	Laminin A/ C		
LGMD 1C	AD	3p25	Caveolin- 3		
LGMD 1D	AD	6q23	LGMD1D		
LGMD 1E	AD	7q	LGMD1E		
LGMD 2A	AR	15q15.1	Calpain-3		
LGMD 2B	AR	2p13	Dysferlin		
LGMD 2C	AR	13q12	γ -Sarkoglykan		
LGMD 2D	AR	17q12-21.33	α -Sarkoglykan		
LGMD 2E	AR	4q12	β -Sarkoglykan		
LGMD 2F	AR	5q33-34	δ -Sarkoglykan		
LGMD 2G	AR	17q11-12	Telethonin		
LGMD 2H	AR	9q31-34.1	LGMD 2H		
LGMD 2I	AR	19q13.3	LGMD 2I		
LGMD 2J	AR	2q31	LGMD 2J		

(XR= x- chromosomal rezessiv, AD= autosomal dominant, AR= autosomal rezessiv)

In der vorliegenden Arbeit wird die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (DMD) behandelt.

1.2 Muskeldystrophie Duchenne

1.2.1 Häufigkeit und Vererbung

Mit einer Inzidenz von 1:3500 männlichen Lebendgeborenen ist die Muskeldystrophie Duchenne (DMD) die häufigste Form der Muskeldystrophien (37) und gehört gleichzeitig zu den häufigsten Erbkrankheiten im Kindesalter (113). Durch genetische Beratung, Heterozygotendiagnostik und Pränatalmaßnahmen ist ein Absinken der Inzidenzrate erkennbar (37). Die zur DMD allele, in ihrem Verlauf aber deutlich mildere, Becker Muskeldystrophie (BMD) hat eine Inzidenz von 1:18.000 männlichen Neugeborenen (15). Die Dystrophinopathien werden x-chromosomal rezessiv vererbt und betreffen somit fast ausnahmslos Jungen, wobei die Mütter als Konduktorinnen fungieren. Bei den heterozygoten Frauen lassen sich in bis zu >10% der Fälle klinische Symptome nachweisen (67). Das Risiko für Söhne von Konduktorinnen an DMD zu erkranken, sowie die Wahrscheinlichkeit der Töchter ebenfalls Überträgerin zu sein, beträgt jeweils 50%.

Klinik

Die DMD ist zum Zeitpunkt der Geburt lediglich durch Laboruntersuchungen nachweisbar. Die Entwicklung im Säuglingsalter verläuft in der Regel unauffällig. Jenseits des ersten Lebensjahres fallen die Kinder durch eine verzögerte Entwicklung der groben Motorik auf. Die Muskeleigenreflexe können früh abgeschwächt sein und erlöschen im Verlauf. Etwa die Hälfte der Jungen kann mit 18 Monaten noch nicht laufen. In den frühen Stadien der Muskelerkrankung sind vorwiegend die Beckengürtel- und Oberschenkelmuskulatur betroffen. Die Jungen haben einen unbeholfenen und unsicheren Gang mit häufigem Stolpern und Stürzen, sind beim Spielen und Laufen rasch ermüdbar und haben eine zunehmende Schwäche beim Treppen steigen und Aufrichten aus der Hocke (Gowers-Zeichen). Sie entwickeln einen Pendelgang und durch die Insuffizienz der Hüftstrecker bildet sich zusätzlich eine ausgeprägte Lendenlordose aus. Die Muskelschwäche im Schultergürtel wird durch Abstehen der Schulterblätter vom Thorax (Scapulae alatae) deutlich. Durch Vakutfettbildung und Bindegewebsproliferation kommt es zu Pseudohypertrophien besonders der Wadenmuskulatur (*siehe Abb. 1*). Kontrakturen an den Wadenmuskeln, am Tractus iliotibialis und den Hüftbeugern treten früh und regelmäßig auf. Dies führt ab etwa dem 4. Lebensjahr zunehmend zum Gang auf Zehenspitzen und später zu Spitzfüßen. Zum Auftreten einer Skoliose wegen der

seitenungleichen Schwäche der paravertebralen Muskulatur kommt es meist erst, wenn die Patienten gehunfähig geworden sind.

Ohne Behandlung werden die Patienten zwischen dem zehnten bis zwölften Lebensjahr gehunfähig.

Bei etwa einem Drittel der Patienten liegt eine nicht progrediente mentale Retardierung mit einem Intelligenzquotienten (IQ) unter 70 vor, die überwiegend die Sprachentwicklung betrifft. Die Intelligenzminderung korreliert nicht mit dem Krankheitsstadium, sondern scheint vielmehr von der Art der Mutation im Dystrophingen abhängig zu sein (155).

Bei zunehmender Krankheitsdauer kommt es in den meisten Fällen zu einer kardialen Beteiligung, da auch die Herzmuskulatur von der Degeneration der Muskelfasern betroffen ist. Häufig lassen sich unten genannte EKG-Veränderungen nachweisen, jedoch treten Zeichen und Symptome einer dilatativen Kardiomyopathie wegen fehlender körperlicher Belastung selten klinisch in Erscheinung.

Die Mehrheit der Patienten verstirbt um das 20. Lebensjahr meist in Folge einer Lungeninfektion und einer zunehmenden Ateminsuffizienz (restriktive Ventilationsstörung), seltener aufgrund kardialer Dekompensation (Übersicht bei 41,60,112).



Abb.1: DMD- Patient mit Pseudohypertrophie der Wadenmuskulatur und Lendenhyperlordose.

1.2.3 Konduktorinnen

Ca. 15% der manifesten Konduktorinnen zeigen Symptome wie Wadenhypertrophie, Muskelschmerzen, langsam progrediente Muskelschwäche und EKG-Veränderungen (54). Etwa 2/3 der Überträgerinnen weisen erhöhte CK-Werte im Kindes- und Jugendalter auf, die mit zunehmendem Lebensalter auf Werte im Normbereich abfallen (112).

Heute stehen molekulare Techniken zur Verfügung, die eine Detektion von Konduktorinnen bis zu 99% erlauben. Ist kein Gendefekt nachweisbar, kann die Dystrophinfärbung im Muskel hilfreich sein (55). Auch bei den Konduktorinnen liegt häufiger eine Verminderung oder Unterbrechung der histochemischen Dystrophinfärbung vor (4).

1.2.4 Diagnostik

Die Verdachtsdiagnose der DMD kann auf Grund der Familienanamnese, dem klinischen Bild und der Erhöhung der Kreatinkinase (CK) gestellt werden. Durch immunhistochemische und molekulargenetische Untersuchungen wird die Diagnose gesichert.

Bereits bei Neugeborenen findet sich häufig eine 50-100 fach erhöhte Aktivität der CK. Auch die GOT, GPT, LDH, Aldolase und Pyruvatkinase können erhöht sein. Im Gegensatz zu einer Hepatopathie liegt hier die leberspezifische γ -GT jedoch im Normbereich (112).

Durch das Screening von nur 19 der 79 Exons können etwa 98% aller Deletionen im Dystrophin-Gen mit Hilfe der Multiplex-PCR-Technik nachgewiesen werden. Die übrigen 2% werden mit der Southern-Blot-Technik erfasst (115). Duplikationen sind mittels quantitativer Multiplex-PCR nachweisbar, während Punktmutationen eine aufwendigere Sequenzierung erfordern.

Durch eine Muskelbiopsie kann mit Hilfe der Immunhistochemie und des Western-Blots das Dystrophin qualitativ und quantitativ untersucht werden, wobei DMD-Patienten keine oder eine nur geringe membranständige Dystrophin-Expression in der Muskulatur aufweisen (41,4,65). Eine Muskelbiopsie ist erforderlich wenn bei Ausnahmen der Leserastertheorie (*siehe unten*) das klinische Bild nicht mit der Molekulargenetik übereinstimmt oder keine Mutation nachgewiesen werden konnte.

Bei bekannter Mutation kann eine vorgeburtliche Diagnostik durchgeführt werden.

Im Elektromyogramm (EMG) sieht man ein uncharakteristisches Bild mit einer niedrigen Amplitude der einzelnen Aktionspotentiale, einer Verkürzung der

Potentialdauer und vermehrten Polyphasien mit Spontanaktivität. Da dies eine von Kindern schlecht tolerierte Untersuchung ist, die auf Grund der unspezifischen Befunde keine wertvollen Zusatzinformationen liefert, wird das EMG in der Regel nicht zur Diagnosefindung der DMD angewandt.

Zur Verlaufsdagnostik gehören die Elektrokardiographie (EKG), die Herzechokardiographie und die Lungenfunktion.

Im EKG finden sich bei über 80% der Patienten bereits im Frühstadium überhöhte rechts präkordiale R-Zacken, ein vergrößerter R/S-Quotient und Q-Zacken in den präkordialen Ableitungen. Bei zunehmender Krankheitsdauer sind bei etwa einem Drittel der Jungen echokardiographisch Zeichen einer dilatativen Kardiomyopathie nachweisbar (43).

Die zunehmende Schwäche der Atemmuskulatur und die meist progrediente Skoliose führt zu einer fortschreitenden restriktiven Ventilationsstörung mit Verminderung der Vitalkapazität und Entwicklung einer Hyperkapnie und im weiteren Verlauf einer Hypoxie. Daneben können auch, selbst bei noch unveränderter Lungenfunktion, nächtliche Hypoventilationen vorhanden sein (106) (Übersicht bei 41,112).

1.2.5 Therapie

Da eine kausale Therapie der DMD noch nicht zur Verfügung steht, zielt die Behandlung auf den Erhalt der Selbständigkeit und eine Verbesserung der Lebensqualität mit Behandlung der Sekundärschäden ab. In der symptomatischen Therapie nehmen die Physiotherapie zur Behandlung von Kontrakturen und die Atemtherapie eine zentrale Stellung ein. Eine frühzeitige operative Behandlung von Kontrakturen der unteren Extremitäten kann die Geh- und Stehfähigkeit der Patienten signifikant verlängern (102,44).

Bei Zeichen von nächtlichen Hypoventilationen kann die Symptomatik durch eine nächtliche nichtinvasive Beatmung über eine Atemmaske verbessert werden. Diese hat jedoch keinen Einfluss auf die Muskelschwäche, so dass längerfristig eine kontinuierliche Ventilation notwendig wird (106). Nur aufgrund der Fortschritte in der Atemtherapie wurde in den letzten 20 Jahren eine Verlängerung der Lebenserwartung der DMD-Patienten erzielt (7).

In der medikamentösen Behandlung der DMD konnte bisher nur für Steroide eine therapeutische Wirksamkeit nachgewiesen werden. Prospektive, plazebokontrollierte

Doppelblindstudien ergaben einen über zwei bis vier Jahre anhaltenden Positiveffekt mit einem Anstieg der Muskelkraft und Verbesserung der Lungenfunktion (101,165). Die Behandlung der Kardiomyopathie bei DMD-Patienten erfolgt entsprechend den Therapieempfehlungen dilatativer Kardiomyopathien anderer Genese mit ACE-Hemmern, Beta-Blockern und Diuretika (74). Ob durch eine frühzeitige medikamentöse Therapie der Kardiomyopathie eine Verbesserung der Prognose oder der Lebensqualität bei DMD-Patienten erzielt werden kann, wird derzeit in einer Studie überprüft.

Neue Ansätze für eine kausale Therapie bietet die Gentherapie mit der Übertragung eines intakten Dystrophin-Gens in die Zellkerne der dystrophischen Muskelzellen. Hierbei bieten Plasmidvektoren eine Möglichkeit, das Dystrophin-Gen in die Muskelzelle einzubringen. Bei der mdx-Maus führte die intramuskuläre Injektion des Plasmidvektors zu einer deutlichen Expression von Dystrophin, so dass in Frankreich diese Methode in einer ersten klinischen Studie eingesetzt wurde (138). Der Gentransfer mittels Plasmidvektoren ist jedoch durch die schlechte Verteilung im Muskel und eine antikörpervermittelte Immunantwort gegen das neu entstandene Dystrophin limitiert.

Eine anderes System ist der Einsatz von viralen Vektorsystemen. Dabei werden hauptsächlich die Adenoviren und adeno-assoziierten Viren als Genvektor verwendet. Nachteilig hierbei ist neben der Immunantwort auf virale Proteine auch die geringe Kapazität der adeno-assoziierten Viren (3).

Mittels Myoblastentransfer, der bei neugeborenen mdx-Mäusen ohne Immunsystem zu einem deutlichen Anstieg des Dystrophins führte (131), versuchte man die Dystrophinproduktion in kranker DMD-Muskulatur zu erhöhen. Dabei wurden den DMD-Patienten Myoblasten gesunder Spender (meistens der Väter) intramuskulär injiziert. Jedoch konnten auf Grund einer Immunreaktion gegen die Spenderzellen und das Dystrophin keine signifikanten histologischen und funktionellen Veränderungen innerhalb eines Jahres erfaßt werden (76).

Um diese Immunreaktionen zu vermeiden, wird die Verwendung von autologen Myoblasten, die in Zellkulturen mit einem intakten Dystrophin-Gen versehen werden, angestrebt (114).

Ein weiterer Ansatz der Gentherapie ist die genomische Korrektur durch Oligonukleotide. Oligonukleotide sind kurze spezifische DNA-oder RNA-Sequenzen, mit denen bereits im Tierversuch an GRMD-Hunden und an der mdx-Maus Punktmutationen erfolgreich korrigiert werden konnten (132).

Mit Antisense-Oligonukleotide versucht man auf der *mRNA*-Ebene deletierte Exons, die eine Verschiebung des Leserasters und ein vorzeitiges Stoppcodon verursachen, auszuschalten (Exon-Skipping). Dies führt zur Translation eines verkürzten, aber noch funktionsfähigen Dystrophins. Das Ergebnis wäre eine Änderung der Duchenne-Dystrophie in die milder verlaufende Becker-Dystrophie (97). Nach erfolgreichen klinischen Studien der Phase-I+II, bei der die Patienten mit dem 2'-O-Methyl-Antisense-Oligoribonukleotid *PRO051* gegen Exon 51 behandelt wurden, konnte kürzlich mit einer multizentrischen Phase III-Studie begonnen werden (132,48). Mittels Antisense-Oligonukleotiden könnten auch Sekundärphänomene der DMD, wie Proliferations-und Differenzierungs-veränderungen der Skelettmuskulatur, beeinflusst werden. Im humanen und im murinen Dystrophin-defizienten Muskel ist das Zellzyklusprotein p21, das die Zellproliferation hemmt, hochreguliert (40). Durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden kann p21 auf *mRNA*-und Proteinebene verringert und damit die Proliferation von humanen Dystrophin-defizienten Myoblasten erhöht werden (38,39).

Liegt der DMD eine Punktmutation zugrunde, die zu einem vorzeitigen Stoppcodon führt, stellen Aminoglykosid-Antibiotika eine Therapiemöglichkeit dar.

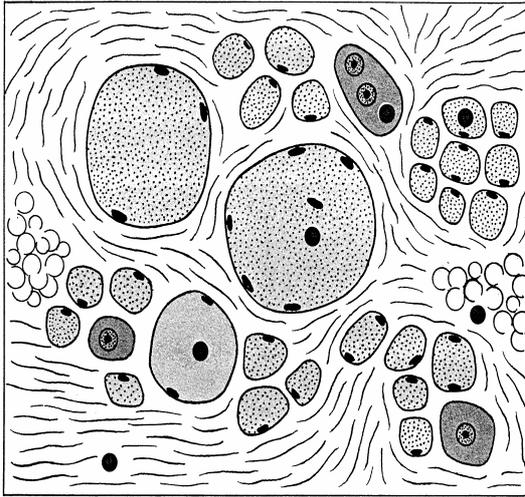
Mit Gentamycin konnte in Experimenten an Zellkulturen und mdx-Mäusen ein vorzeitiges Stoppcodon auf ribosomaler Ebene ignoriert werden. Bei den mdx-Mäusen konnte so die Dystrophinexpression und die klinischen Symptome verbessert werden. Dieses Wirkprinzip lag der PTC 124-Studie zugrunde (42,100).

Ein weiterer Ansatz ist, Dystrophin durch verwandte Proteine zu ersetzen. Dabei ist Utrophin, ein Muskelprotein, welches ebenfalls mit dem Dytrophin-assoziierten Proteinkomplex interagieren kann und eine Verbindung zwischen den Aktinfilamenten und der extrazellulären Matrix herstellt, von besonderem Interesse. Bei der Überexpression von Utrophin in mdx-Mäusen konnte die Muskelfunktion dieser Mäuse signifikant verbessert werden (6).

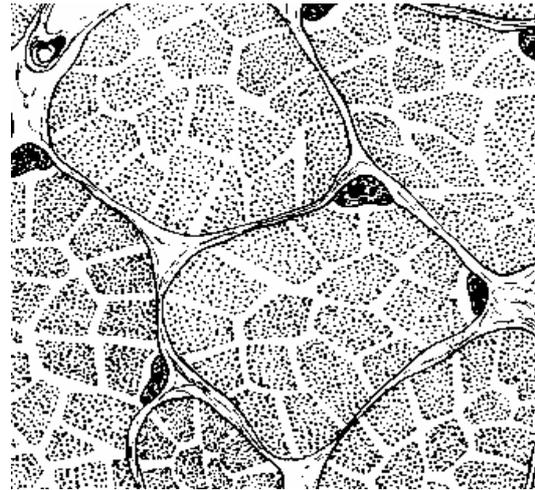
Eine sichere und wirksame Therapie für DMD-Patienten ist jedoch von der Anwendung in der Routine noch entfernt.

1.2.6 Histologie

Die Muskulatur ist sowohl bei der DMD als auch bei der BMD histopathologisch durch Nekrosen, Regeneration, endomysiale Fibrose, gesplittete Muskelfasern und variierende Faserdurchmesser gekennzeichnet. Bereits in den frühen Stadien der Erkrankung finden sich vereinzelt nekrotische Fasern, die im Krankheitsverlauf vermehrt in Gruppen auftreten. Die Nekrose ist durch hyaline, helle (HE-Färbung) bzw. hyporeaktive (oxidative Enzyme, myofibrilläre ATPase Reaktion) Fasern gekennzeichnet. Das nekrotische Sarkoplasma und Sarkolemm wird von mononukleären Zellen abgebaut. Die Nekrose ruft einen regenerativen Prozess hervor. Die regenerativen Fasern weisen große vesikuläre Kerne mit prominenten Nukleoli, ein basophiles Zytoplasma und einen Verlust der Querstreifung auf. In der myofibrillären ATPase-Reaktion stellen sie sich als Typ 2c- Fasern dar, welche im DMD- Muskel zu etwa 16% zu finden sind (75). Mit zunehmender Schwere der Erkrankung nimmt die Größenvariabilität der Muskelfasern mit Hypertrophie und runden atrophischen Elementen zu. In 2-4% der Fasern sind die normalerweise randständigen Kerne, als Ausdruck der ständigen Regeneration und Fasersplitterung, zentralständig gelegen. Als Sekundärveränderungen sind die extensive Proliferation des endo-und perimysialen Bindegewebes, die Zunahme von Lipozyten und die Verdickung der Blutgefäßwände zu werten, die ab einem Alter von 4 Jahren deutlich zu erkennen sind. Im terminalen Stadium ist der Muskel zu großen Teilen durch Fettgewebe und Bindegewebe ersetzt (*siehe Abb. 2a*). Der Grad der Veränderungen variiert von Patient zu Patient und korreliert nicht immer mit dem klinischen Bild. Enzymhistochemisch findet man überwiegend Typ-1 Muskelfasern bei oft stark verminderten Typ-2B-Fasern (Übersicht bei 41).



a)



b)

Abb.2: a) Progressive Muskeldystrophie Typ Duchenne (schematische Histologie): atrophische Fasern, hypertrophierte Fasern, Regeneratfasern, hyalinisierte Fasern, endomysiale Fibrose und fettgewebige Transformation (aus 136).

b) Quergestreifte gesunde Skelettmuskulatur: Muskelfaser, Kerne randständig unter dem Sarkolemm, Die punktförmigen Myofibrillenquerschnitte zeigen innerhalb der Muskelfaser Cohnheimsche Felderung (aus 93).

1.2.7 Dystrophin-Gen und sein Genprodukt

Erste Hinweise auf den Genlocus gaben Patientinnen mit DMD- Phänotyp, bei denen eine balancierte X-autosomalen Translokation vorlag (56). Durch Kopplungsanalysen konnte 1982/ 83 das Dystrophin-Gen auf dem kurzen Arm des x-Chromosoms lokalisiert (Xp21) (118) und das Genprodukt 1987 charakterisiert werden (65). Das Dystrophin-Gen erstreckt sich über 2,3 Millionen Basenpaare und ist damit eines der größten, bisher bekannten menschlichen Gene. Die codierenden Sequenzen sind in 79 Exons unterteilt (86). Das 14 kB lange Transkript (mRNA) wird in ein großes Protein, das Dystrophin übersetzt, welches aus 3685 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 427kD besteht (65).

Immunhistochemisch konnte das Dystrophin beim Menschen in der Muskelzelle an der zytoplasmatischen Seite des Sarkolemm lokalisiert werden (14).

Innerhalb der gesunden Zellen der quergestreiften Muskeln bindet Dystrophin mit seinem N-Terminus an Aktinfilamente und bildet am C-terminalen Molekülende zusammen mit Glykoproteinen (Sarkoglykane, Dystroglykane) einen Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (siehe Abb.3). Diese „dystrophin associated proteins“ (DAP) (16), die das Zytoskelett mit einem Laminin-bindendenden Glykoprotein der extrazellulären Matrix (EZM) verbinden (69), haben vermutlich während der Muskelkontraktion eine stabilisierende Wirkung auf die Zellmembran (126). Weiterhin

wird angenommen, daß Dystrophin bei der Signalübertragung und bei der Organisation von Membraneigenschaften eine wichtige Rolle spielt (11,133). Charakteristisch für die DMD ist das praktisch vollständige Fehlen des Dystrophins (14), welches einen unvollständigen DAP bewirkt. Defekte in Genen, die für die Dystrophin-assoziierten Proteine α -Sarcoglykan, β -Sarcoglykan, γ -Sarcoglykan, ε -Sarcoglykan und Merosin kodieren, münden auch in eine Dystrophinopathie (129).

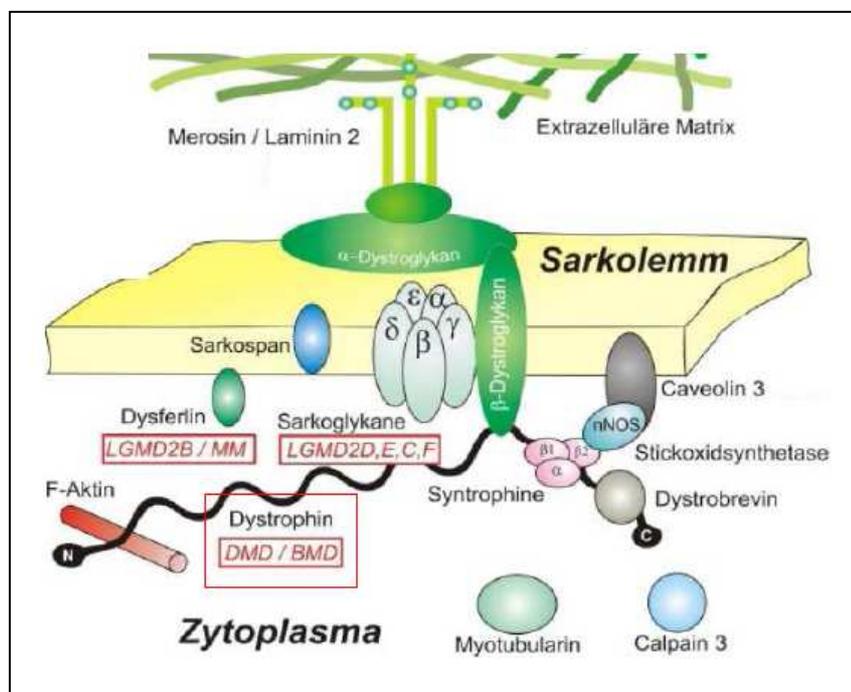


Abb. 3: Schematische Darstellung des Dystrophin-Komplexes mit den beteiligten Proteinen und die Bezeichnung der Dystrophinopathie bei funktionellem Ausfall des betreffenden Proteins. Über das N-terminale Ende ist Dystrophin mit den Aktinfilamenten verbunden. Mit dem C-terminalen Ende ist Dystrophin mit dem β -Dystroglykan verbunden, welches über α -Dystroglykan und Laminin-2 eine Verbindung zur Extrazellulären Matrix herstellt.

Abkürzungen: LGMD: Limb Girdle Muskeldystrophie, BMD: Becker Muskeldystrophie, DMD: Muskeldystrophie Duchenne (Abbildung aus: www.humangenetik.uniklinik-freiburg.de/X-chromosomal%20FRAXA%20DMD%2011_2006b.pdf)

Das Dystrophinmolekül besteht aus 4 funktionellen Einheiten (Domänen) (86):

- der N-terminalen, Aktin bindenden Domäne
- den sich 25-fach wiederholenden tripelhelikalen Abschnitten
- einer zysteinreichen Region
- und dem C-terminalen Ende

Der Anteil des Dystrophins am Gesamtprotein im normalen Muskel beträgt ca. 0,002% und in der Zytoskelettmembran bis zu 5% (127,65). Die ersten drei Domänen haben eine große Ähnlichkeiten mit α -Aktinin; das C-terminale Ende besitzt große Homologie (83%) zu einem 400 kDa großen Protein, dem Utrophin, welches bei der DMD hochreguliert ist (96).

Es existieren mindestens 8 Promotoren im Dystrophin-Gen, wodurch weitere verkürzte Dystrophin-Isoformen u. a. in der Herzmuskulatur, der glatten Muskulatur, der Netzhaut, der peripheren Nerven und im Gehirn exprimiert werden (*siehe Abb.4*). Die Isoform Dp260 findet sich zum Beispiel in den Synapsen der Retina, Dp116 in den Schwannschen Zellen des peripheren Nervensystems (ZNS) und Dp140 im ZNS und der Niere. Dp71 wird mit Ausnahme der Skelettmuskulatur ubiquitär exprimiert. (Übersicht bei 115,112,41,1).

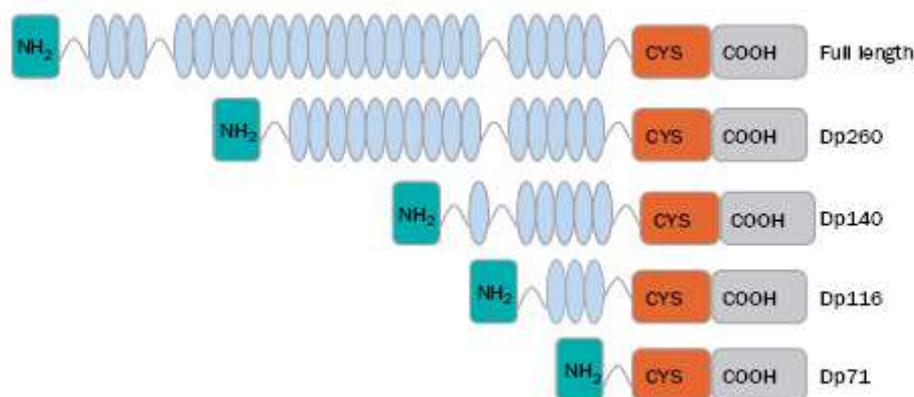


Abb. 4: Schematische Darstellung der Dystrophin-Isoformen. Alle Dystrophinprodukte (DP) besitzen eine aminoternale-(NH₂) und carboxyterminale (COOH)-Region, sowie eine zysteinreiche Domäne (CYS) (aus 115).

1.2.8 Mutationen im Dystrophin-Gen

Mit Hilfe der cDNA-Hybridisierung von Southern-Blots konnte bei etwa 60% der Patienten eine partielle Deletion (134) und bei 5-10% eine Duplikation nachgewiesen werden (33). Punktmutationen bzw. Translokationen werden bei 25-30% gefunden (137). Ein Drittel dieser Mutationen sind Neumutationen (113). Deletionen bilden zwei „hot spots“ im Bereich der Exons 3-19 und 44-52. In der Regel hat die Größe der Deletion keinen Einfluss auf die Schwere der Erkrankung (64). Den unterschiedlichen klinischen Verlauf erklären Monaco und Mitarbeiter (111) mit der sogenannten Frame-Shift-Theorie. Durch den Verlust von ein oder zwei Nukleotiden entsteht eine Veränderung der Codon-Folge (*siehe Abb.5*). Der Triplet-Takt, mit dem die Information bei der Proteinsynthese übersetzt wird, bekommt eine andere Bedeutung. Das normale Leseraster wird verändert (out-frame), es resultiert in der Regel ein verfrühter Translationsabbruch (meist DMD). Eine Deletion von drei Nukleotid-Paaren führt zu einem Verlust einer Aminosäure ohne die gesamte Primärstruktur des entstehenden Proteins zu verändern (in-frame) (meist BMD) (84). Deletionen, die, unabhängig von ihrer Größe, das Leseraster verändern und unterbrechen, erzeugen ein nur noch instabiles funktionsloses Protein. Bei DMD-Patienten ist daher nur noch wenig oder überhaupt kein Dystrophin in der Skelettmuskulatur nachweisbar, wohingegen bei BMD-Patienten das Leseraster erhalten bleibt und ein modifiziertes oder verkürztes Protein entsteht, welches noch Restfunktionen wahrnehmen kann. Es gibt jedoch Ausnahmen, die durch alternatives Splicing erklärt werden können (98).

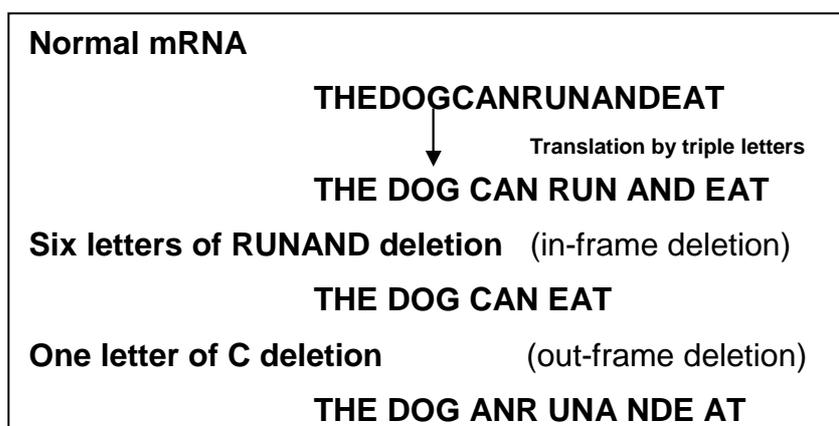


Abb.5: Out-Frame und In-Frame- Deletion (aus 104).

Neben der Leserastertheorie scheint aber auch die Lokalisation der Mutation von Bedeutung zu sein. Mutationen, die die Expression der gewebespezifischen Isoformen beeinträchtigen, wurden mit den zentralnervösen, kardialen und retinalen Veränderungen in Zusammenhang gebracht. Abhängig vom Genotyp können auch hier unterschiedliche Phänotypen resultieren.

So ist z. B. die Muskeldystrophie Duchenne mit einem abnormen Elektoretinogramm mit verminderter b-Wellen-Amplitude assoziiert, wenn die Mutation die Translation des retinalen Dystrophins (Dp 260) unterbricht. Eine sehr schwere mentale Retardierung haben vor allem Patienten, deren Mutation die Isoform Dp 71 betrifft (Übersicht bei 115).

1.2.9 Tiermodelle von Dystrophinopathien

Die Muskeldystrophie Duchenne wurde in den letzten Jahren an unterschiedlichen Tiermodellen (Hund, Katze, Maus) untersucht.

Eine x-chromosomal vererbte Muskeldystrophie fand man 1986 bei einem Golden Retriever (canine muscular dystrophy). Bei diesen Hunden manifestiert sich eine schwere progressive Muskelschwäche mit einer ausgeprägten endomysialen Fibrose. Sie sind damit genetisch und phänotypisch der DMD beim Menschen am ähnlichsten (24).

Ein weiteres dystrophin-defizientes Tiermodell stellt die x-gebundene Muskeldystrophie der Katze dar. Klinisch fallen die betroffenen Tiere in den ersten zwei Lebensjahren durch eine massive echte symmetrische Hypertrophie der Muskeln, insbesondere von Nacken, Schultergürtel, Zwerchfell und Zunge, auf. Histologisch finden sich zwar Muskelfasernekrosen und-regenerate, jedoch nur eine gering ausgeprägte Fibrose, so dass sie nur wenige Ähnlichkeiten mit der DMD aufweist (47,19).

Die mdx-Maus wurde erstmals 1984 von Bulfield beschrieben und ist mit Abstand das wichtigste Tiermodell der DMD mit einer Punktmutation an Base 3185 (148). Wie der dystrophe Muskel bei DMD-Patienten weist die mdx-Maus einen Dystrophinverlust auf (66). Nach ungefähr drei Lebenswochen kommt es bei der mdx-Maus zu Muskelfasernekrosen mit aktiver Regeneration und einer guten Wiederherstellung von Muskelstruktur, -histochemie und -funktion. In den meisten Muskeln werden die nekrotischen Fasern weniger durch Bindegewebe als durch sich regenerierende Fasern ersetzt. Lediglich das Zwerchfell zeigt einen schwereren Muskelfaserverlust mit Fibrose und funktionellen Veränderungen, ohne aber zu einer

respiratorischen Beeinträchtigung zu führen (27). Im Gegensatz zum DMD-Patienten ist die mdx-Maus also in der Lage, den pathologisch degenerierten Muskel funktionsfähig zu regenerieren.

Einen protektiven Effekt sehen Infante et al. (70) in den zentronukleären, weniger ausgereiften Muskelfasern, wie sie bei den mdx-Mäusen, nicht aber in der DMD-Muskulatur, vorkommen. Die Autoren vermuten, dass die zentronukleären Myozyten dem dystrophischen Prozess gegenüber widerstandsfähiger sind, da sie eine größere Mitochondrienpopulation und vermehrtes Endoplasmatisches Retikulum (ER) enthalten. Da Mitochondrien in der Lage sind, große Mengen an Kalzium aus der Muskelzelle zu entfernen, könnten sie somit dem kalziumaktivierten Muskelschaden vorbeugen. Dies würde auch erklären, dass die mitochondrienreichen äußeren Augenmuskeln fähig sind, die intrazelluläre Kalziumhomöostase bei der DMD aufrecht zu erhalten und so von dem dystrophischen Prozeß verschont bleiben (77).

Es ist davon auszugehen, dass weitere, bisher unbekannte protektive Faktoren zu der Stabilisierung der mdx-Muskulatur beitragen.

1.3 Mögliche Pathomechanismen der DMD

Unterschiedliche Theorien versuchen den Zusammenhang zwischen dem Dystrophinverlust und der folgenden Muskelfaserschädigung zu erklären (Übersicht bei 31,105):

Ausgehend von der Struktur und Lokalisation des Dystrophins sehen Karpati (77) und Carpenter (19) die Rolle des Dystrophins darin, daß es zusammen mit anderen Zytoskelettproteinen und dem DAP-Komplex eine Stabilisierung des Sarkolemms während der Muskelkontraktion bewirkt und so das Sarkolemm vor der dabei entstehenden Belastung schützt (105). Das Fehlen, bzw. die qualitative Veränderung des Dystrophins habe eine Membranstabilität zur Folge, die unter direkter mechanischer Belastung zu einer Ruptur des Sarkolemms führe und so einen unkontrollierten Einstrom extrazellulärer Flüssigkeit, insbesondere Kalzium, entlang des Konzentrationsgradienten erlaube (41).

Es wird angenommen, daß die erhöhte intrazelluläre Kalziumionenkonzentration oberhalb einer Regulationskapazität eine Aktivierung intrazellulärer kalziumabhängiger Proteasen und Lipasen bewirkt, die für den Abbau von Zellstrukturen verantwortlich sind und schließlich zu einer Zellnekrose führen (124).

Da der sarkolemmale Defekt der Muskelfasern ohne weitere strukturelle Veränderungen zu finden ist, deuten Engel et al. (41) dies als einen sehr frühen Ausdruck der Muskelfaserzerstörung.

Neben der Stabilisierung der Muskelzellmembran verbindet Dystrophin auch die membranständige neuronale NO-Synthase (nNOS) über α 1-Syntrophin an das Sarcolemma. Die nNOS schützt u.a. den Muskel durch eine Vasodilatation während der Muskelkontraktion vor einer funktionellen Ischämie und durch den Abbau von Sauerstoffradikalen vor oxidativen Stress. Es wird daher angenommen, dass die Reduktion der nNOS im dystrophindefizienten Muskel zu den Entzündungsreaktionen im DMD-Muskel beiträgt (159).

Da Dystrophin nicht nur ein essentielles Zytoskelettprotein ist, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung zwischen der EZM und dem intrazellulären Raum spielt, ist von einem sehr vielschichtigen Schädigungsmechanismus auszugehen (59).

Die pathophysiologischen Mechanismen, die die erhebliche interstitielle Fibrosierung bei der DMD bewirken, sind bis heute nur unvollständig geklärt.

In unterschiedlichen Studien konnte ein enger Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktoren, der Satellitenzellendifferenzierung und der Bindegewebsproliferation dargestellt werden.

Als wesentlicher fibrogener Mediator wird TGF- β 1 aus der Gruppe der Transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF)- β angesehen. Da er die Kollagensynthese in mesenchymalen Zellen stimuliert, gilt er als zentraler Faktor der Fibrogenese. TGF- β kommt in mehreren Formen (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) in der menschlichen Zelle vor und besitzt ein breites Wirkungsspektrum. TGF- β wird in latenter Form sezerniert und proteolytisch aktiviert (62). Er wird durch Thrombozyten, Lymphozyten und Makrophagen als eine Antwort auf Gewebeschädigung freigesetzt und ist an Wundheilungen, Entzündungsreaktionen und Fibrose beteiligt. Bei DMD-Patienten konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 eine aktive Rolle bei der Fibroseproliferation spielt. Bernasconi et al. (12) fanden erhöhte Werte für TGF- β 1 in dystrophischer DMD-Muskulatur, die bis zum sechsten Lebensjahr deutlich anstiegen, um dann wieder auf niedrige Ausgangswerte zu fallen, während die Bindegewebsproliferation weiter voranschreitet. Bernasconi et al. (12) formulierten die Hypothese, dass die Muskeldegeneration durch TGF- β 1 vermittelt wird. Eine

Entzündungsreaktion könne zu einer fokalen TGF- β 1- Freisetzung führen, die eine Bindegewebsproliferation in den frühen Stadien zur Folge habe. In den späteren Stadien werde die Fibrose anscheinend durch andere Mediatoren aufrechterhalten. Auch Iannaccone et al. (68) stellten einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von TGF- β 1 und einer veränderten Kollagen-Typ I-Faserverteilung fest und vermuten, dass TGF- β 1 eine aktive Rolle bei der Bindegewebsproliferation spielt. Gestützt wurde diese These auch von Melone et al. (108), die TGF- β 1 in vitro an Myoblastenkulturen untersuchten. In ihren Studien konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 bei DMD-Myoblasten vor allem in den frühen Stadien der Erkrankung vermehrt exprimiert wird und das Myoblastenwachstum durch Reduktion von Fusion und Differenzierung der Satellitenzellen hemmt.

bFGF ist ein zytoplasmatisches Polypeptid, welches die Bindegewebssynthese stimuliert, die Satellitenzellproliferation induziert und die myogene Differenzierung in vitro unterdrückt. Es wird u. a. durch die Skelettmuskulatur gebildet und spielt eine große Rolle bei regenerativen Prozessen und der Wundheilung (28). D'Amore et al. (28) nehmen an, daß eine lokale Freisetzung von bFGF eine normale Regeneration zur Folge habe, jedoch eine chronische Freisetzung in der dystrophindefizienten Muskulatur eine Ursache der exzessiven Fibrose sei. Die Autoren konnten bei DMD-Patienten erhöhte bFGF-Serumspiegel messen, welche sich bei Kontrollpatienten und mdx-Mäusen im Normbereich befanden. Auch hier zeigten sich die höchsten bFGF-Serumwerte, ähnlich wie bei TGF- β 1, in der Gruppe der unter zehnjährigen DMD-Patienten.

Die Ergebnisse von Iannaccone et al. (68), die bFGF sowohl in der Skelettmuskulatur der dy-Maus, als auch bei der mdx-Maus nachweisen konnten, zeigten, dass bFGF unabhängig vom Phänotyp und Genotyp der Muskeldystrophie bei degenerativen Prozessen mitwirkt.

Es gibt Hinweise darauf, dass auch die Proliferation und Degranulation von Mastzellen an der Pathogenese der Fibrose beteiligt ist (94). Mastzellen kommen auch unter physiologischen Bedingungen im Bindegewebe vor. Eine große Anzahl von chemischen Substanzen wie Enzyme, Polysaccharide, Lektin, Anaphylatoxine und Kalzium sind in der Lage, eine Mastzellaktivierung zu bewirken (91). Bei der Mastzelldegranulation werden viele potente Substanzen freigesetzt, die regulierend

in unterschiedliche physiologische und immunologische Prozesse eingreifen können (61,156) und so auch das Fibroblastenwachstum stimulieren.

Gorospe et al. (51) untersuchten den Gehalt und das Verteilungsmuster der Mastzellen an dystrophindefizienter Muskulatur. Sie konnten nachweisen, daß die Mastzellzahl positiv mit der klinischen Manifestation der Erkrankung korreliert. Gorospe et al. vermuten, daß Proteasen wie Phospholipase A₂, die in beträchtlichen Mengen bei der Mastzelldegranulation freigesetzt werden, eine Proteolyse des Sarkolemm bewirken, wodurch der bereits bestehende Membrandefekt verstärkt wird. Dieses könnte die immunhistologisch nachweisbaren gruppenförmigen Nekrosen erklären.

Weiterhin ist bekannt, dass Mastzellmediatoren wie Heparin den bFGF aktivieren und somit eine zunehmende interstitielle Fibrosierung stimulieren. Dieses lässt die o.g. Autoren einen engen Zusammenhang zwischen der Mastzellakkumulation, der erhöhten Serum-bFGF-Werte bei DMD-Patienten, der progressiven Bindegewebsproliferation und dem Verlust der Muskelregeneration annehmen (50).

Auch in anderen Organfibrosen wie der Leberzirrhose, Lungenfibrose, Glomerulonephritis und der rheumatoiden Arthritis wurde ein Anstieg der Mastzellenzahl festgestellt und Hinweise für eine erhöhte Bereitschaft von Mastzellen, Mediatoren freizusetzen, gefunden (46,52,103).

Auch hat das Utrophin eine besondere Bedeutung bei einem Dystrophinmangel. Utrophin ist ein autosomales Homolog zu Dystrophin, dessen Expression in der gesunden quergestreiften Muskulatur auf die neuromuskulären Synapsen beschränkt ist (96). In regenerierender Muskulatur wird die Utrophinexpression gesteigert und auf die gesamte sarkolemmale Region ausgeweitet. So ist Utrophin sowohl bei den DMD-Patienten als auch bei der mdx-Maus hochreguliert, wird jedoch bei der mdx-Maus stärker exprimiert als beim Menschen.

Unter der Annahme, Utrophin könne Dystrophin auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit ersetzen, beobachteten Tinsley (157) und Deconinck (30) eine deutliche Abnahme der dystrophischen Veränderungen mit Zunahme der zentronukleären Fasern durch Überexpression eines veränderten Utrophin-Transgens in der mdx-Maus. Die Hypothese, eine erhöhte Utrophinexpression könne den dystrophindefizienten Muskel schützen, wird ebenfalls durch die Beobachtung unterstützt, dass die ersten Muskelfasernekrosen bei mdx-Mäusen frühestens dann

auftreten, wenn die hohe perinatale Utrophinexpression in adulter Muskulatur auf niedrige Werte sinkt (80). Auch den verzögerten Beginn der DMD sehen Krag et al. (88) in diesem Zusammenhang.

In zwei Follow-up-Studien konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen sowohl Dystrophin als auch Utrophin fehlt, einen Phänotyp entwickeln, der dem der DMD sehr ähnelt (29,53).

1.4 Extrazelluläre Matrix

Eukariotische Zellen werden von Makromolekülen umgeben, die als Bindegewebe oder extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet werden. Diese regulieren und reorganisieren Zellfunktionen als Antwort auf endogene oder exogene Stimuli (145,149). Die EZM besitzt Stützfunktion und ist für die Aufrechterhaltung der Elastizität der einzelnen Organe von elementarer Bedeutung. Des Weiteren können durch Modulation der Genexpression Signale der EZM über transmembranöse Matrixrezeptoren an die Zelle übermittelt werden, um Prozesse wie Migration, Proliferation und Differenzierung benachbarter Zellen zu steuern. Die EZM besteht im engeren Sinne aus Kollagenen, nicht-kollagenen Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen/ Proteoglykanen, Elastin, sowie den zellulären Rezeptoren. Zusätzlich sind Zytokine, Proteasen, Proteaseinhibitoren, Wachstumsfaktoren und spezifische transmembranöse Rezeptoren mit der EZM assoziiert. Zu den Wachstumsfaktoren zählen u.a. der transformierende Wachstumsfaktor (TGF)- α und - β , der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der Insulin Wachstumsfaktor (IGF) I und II und das IGF-bindende Protein (IGFBP) (62,145,149).

Die EZM unterliegt einer stringenten und hochkomplizierten Regulation auf der Ebene der Transkription, der posttranslationalen Modifikation und des Abbaus durch spezifische Proteinasen, den Matrixmetalloproteinasen (MMP). Beim gesunden Menschen besteht daher ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung, Synthese von Matrixkomponenten und Matrixabbau. Chronische Entzündungsvorgänge, toxische Zellschädigung oder Tumorwachstum führen v. a. durch eine anhaltende erhöhte TGF- β 1-Produktion zu einer Störung innerhalb dieses Regelkreises mit nachfolgenden morphologischen Veränderungen wie der Fibrose (146). Auch bei der DMD ist die progrediente endo-und perimysiale Fibrose ein dominierendes histologisches Merkmal (41). In Untersuchungen an anderen Organfibrosen wurde

ersichtlich, dass die Matrixdegradation, in Relation zur gesteigerten Matrixsynthese, vermindert ist (85).

1.5 Charakterisierung der MMP und TIMP

Matrixmetalloproteinasen (MMP) bilden eine Familie von Zink- und Kalzium-abhängigen Endopeptidasen, die für den Abbau extrazellulärer Matrixproteine eine wichtige Rolle spielen. Sie werden als Zymogene (Pro-MMP) aus Bindegewebszellen wie Fibroblasten oder Osteoblasten, aber auch von verschiedenen Tumorzellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sezerniert, mittels Proteolyse durch zahlreiche Proteasen aktiviert und sind bei neutralem pH wirksam (160). Mit Ausnahme von MMP-8, MMP-9 und den vier bekannten membranständigen MMP (MT-MMP) werden die MMP nicht intrazellulär gespeichert, sondern sofort in den Extrazellulärraum (EZR) sezerniert (62). MMP besitzen eine ähnliche Molekularstruktur (*siehe Abb.6*) und werden durch spezifische „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases“ (TIMP) gehemmt (120).

Seit Anfang der 60er Jahre konnten bisher mehr als 20 verschiedene Matrixmetalloproteinasen unter Beachtung ihrer Substratspezifität und Struktur in fünf Subgruppen unterteilt werden. Eine Übersicht zeigt Tabelle 2.

Die Endopeptidasen bestehen aus unterschiedlichen funktionellen Einheiten: Das Signalpeptid lenkt das Translationsprodukt zum Endoplasmatischen Retikulum und ist nur in intrazellulärer Form präsent. Durch exogene oder endogene proteolytische Spaltung des N-terminalen Propeptids wird die Cystein-Zn(II)-Interaktion destabilisiert, die Enzymkonformation modifiziert und das Enzym aktiviert (sog. „cystein-switch“). Das katalytische Zentrum enthält die thermolysin-ähnliche Zink-Bindungsregion. Die carboxyterminale, hemopexinähnliche regulatorische Domäne ist in den meisten MMPs vorhanden und hilft vermutlich bei der spezifischen Determinierung der Substrate. Deletionen in dieser Region führen sowohl zu einer Änderung der Substrat-Spezifität als auch zu einer veränderten Interaktion mit den spezifischen TIMP-1 und TIMP-2. Die Fibronectin- und Kollagenomäne erleichtert den Metalloproteinasen die Bindung an ihr spezifisches Substrat. Die membranständigen MMP (MT-MMP) besitzen eine hydrophobe Membranverankerungsdomäne und spielen bei der Zymogenaktivierung eine große Rolle (Übersicht bei 120).

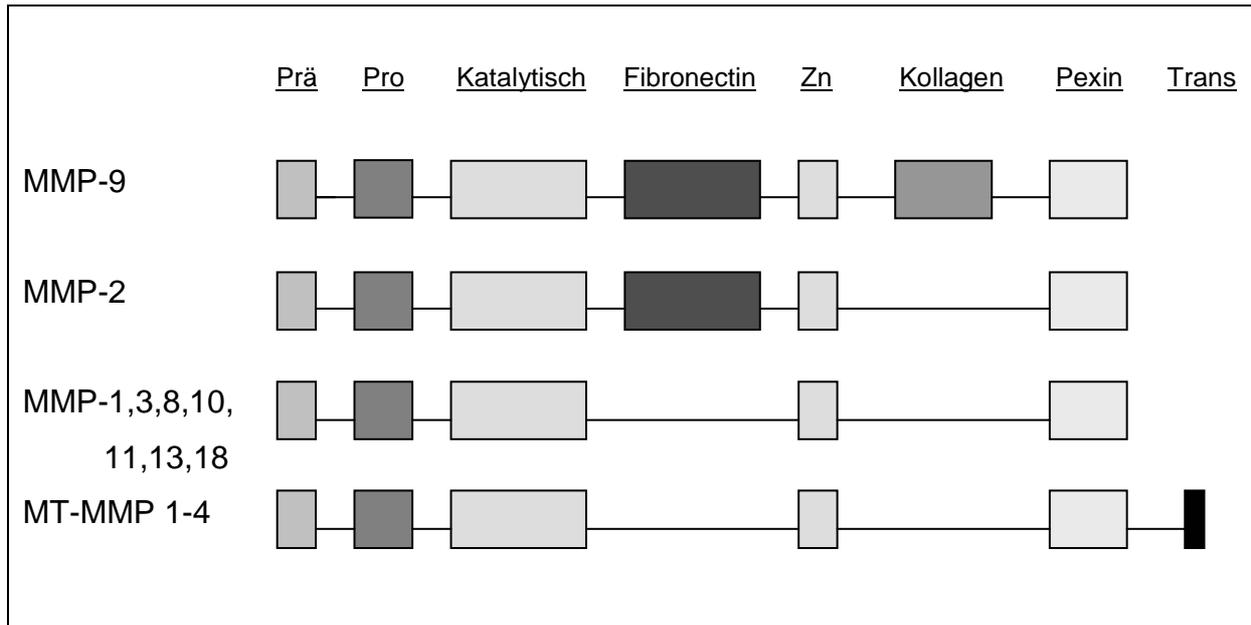


Abb. 6: Klassifikation der Metalloproteinasen nach ihrer Molekularstruktur (aus 160)

Die Metalloproteinasen sind am physiologischen Gewebeumbau wie der Embryogenese, der Gefäßbildung und der Wundheilung beteiligt, spielen aber auch bei destruirenden pathologischen Prozessen im Rahmen der Fibrose, der rheumatoiden Arthritis, der Glomerulonephritis oder dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren eine bedeutende Rolle (120,160). Ihre Regulation muß kontrolliert werden, da ein Überschuß an aktiven MMP unmittelbar zur Gewebszerstörung führen müßte (62). Dies kann sowohl auf der Transkriptionsebene, als auch auf zellulärer Ebene durch Kontrolle der proteolytischen Aktivität des Proteinprodukts erfolgen (164). Die Aktivierung aller MMP in vivo benötigt bereits aktivierte Proteasen wie Plasmin, Trypsin, Kallikrein, Cathepsin G, Urokinase oder Autokatalyse (36). In den meisten Zellen wird die mRNA nicht konstant exprimiert, sondern durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Tumorpromotoren und Glukokortikoide beeinflusst. Die Expression von MMP-1 und MMP-3 wird durch Zytokine wie dem EGF, dem Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) und Tumornekrosefaktor (TNF)- α stimuliert und von Faktoren wie z.B. dem TGF- β 1 inhibiert. Auf der anderen Seite wird die Expression von MMP-2 durch TGF- β 1 positiv beeinflusst (144). MMP-1 wird zusätzlich von MMP-3 aktiviert, MMP-2 und -9 von den membranständigen MT- MMPs (154,142).

	Enzymname	Molekulargewicht, kDa		Matrixsubstrate
		latent	aktiv	
Kollagenasen	Interstitielle Kollagenase MMP-1	55000	45000	Kollagen III>I>II,VII, VIII, X; Gelatine;Tenascin; Aggrekan; Entaktin; BP; α_1 -AT; MMP-2, -9
	Neutrophilenkollagenase MMP-8	75000	58000	Kollagen I> II> III, V, VIII, X; Gelatine; Aggrekan; α_1 -AT;Proteoglykan; BP; MMP-2,-13
	Kollagenase- 3 MMP-13	60000	48000	Kollagen II>I, III, IV, IX, X, XIV; Gelatin; Aggrekan, Fibronektin, Proteoglykan; Tenascin; MMP-9
	Kollagenase- 4 MMP-18	55000	Unbekannt	Kollagen I
Gelatinasen	72-kDa Gelatinase (A) MMP-2	72000	66000	Gelatine; Kollagen IV, V, VII, X, XI, I,II, III, XIV; BP; Laminin; Fibronektin; Elastin; Aggrekan; Proteoglykan
	92- kDa Gelatinase (B) MMP-9	92000	86000	Gelatine; Kollagen III, IV, V, VI, X, XIV; Elastin; BP; Aggrekan; Fibronektin; α_1 -AT; Vitronektin; Proteoglykan
Stromelysine	Stromelysin 1 MMP-3	57000	45000	Kollagen III, IV, V, X, IX; Gelatine; Fibronektin; Vitronektin; Laminin; Aggrekan; α_1 -AT; LIMP; BP; Proteoglykan; Tenascin; MMP-7, -8, -9, -13
	Stromelysin 2 MMP-10	57000	44000	Kollagen III, IV, V; Gelatin; Aggrekan; Elastin; Fibrogen; Fibronektin; MMP-1, -8
	Stromelysin 3 MMP-11	51000	44000	Kollagen II, IV, V; Gelatine; Elastin; Fibronektin; α_1 -AT; Proteoglykan; Laminin
Matrilysine	Matrilysin (PUMP-1) MMP-7	28000	19000	Kollagen IV, X; Gelatine; Fibronektin; Vitronektin; Laminin; Elastin; Aggrekan; Kasein; α_1 -AT; BP; Proteoglykan; Entaktin; Tenaszin; MMP-1, -2, -9
	Matrilysin- 2 MMP-26			Kollagen IV, gelatin, Fibronektin
	Metalloelastase MMP-12	54000	45000/ 22000	Kollagen IV; Gelatine; Elastin; Fibronektin
Membran- Typ- MMPs	MT- MMP-1 MMP-14	66000	56000	Kollagen I, II, III; Elastin; Gelatine; Fibronektin; Laminin; Vitronektin; Proteoglykan; MMP-2, -13
	MT- MMP-2 MMP-15	72000	Unbekannt	MMP-2; Gelatine; Tenaszin, Laminin; Fibronektin
	MT- MMP-3 MMP-16	64000	52000	Kollagen III; Kasein; Aggrecan; Perlecan
	MT- MMP-4 MMP-17	Unbekannt	Unbekannt	Pro- MMP-2, -13
	MT- MMP-5 MMP-24			Unbekannt
	MT- MMP-6 MMP25			

Tab.2: Familie der Matrixmetalloproteinase und ihr jeweiliges Substratprofil (verändert nach 22, 99, 119).

Auf Grund ihrer destrukturierenden Potenz müssen die Metalloproteinasen auch auf zellulärer Ebene kontrollierbar bleiben. Die größte Bedeutung für die In-vivo-Regulation kommt dabei den „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases“ (TIMP) zu (117). Auch eine Hemmung durch unspezifische Proteaseinhibitoren wie α 2-Makroglobulin (8) und Heparin wurde beschrieben. Ebenfalls ist eine Hemmung durch Autodegradation bekannt (13).

Bisher wurden 4 verschiedene TIMP-Isoformen (TIMP-1 bis TIMP-4) aus menschlichen Zellen sequenziert und kloniert. TIMP-1, ein 28,5- kDa Glykoprotein und TIMP-2, ein nicht glykolisiertes Protein von 21-kDa, werden durch viele Zelltypen produziert und können in vielen Geweben nachgewiesen werden. Den vier Isoformen ist eine Struktur aus sechs durch Disulfidbrücken verbundenen Schleifen gemein, die eine inhibitorische N-terminale und eine substratbindende C-terminale Domäne bilden (116).

Die Inaktivierung von MMP-Aktivität durch TIMP beruht auf einer 1:1 stöchiometrischen Komplexbildung, wodurch die katalytische Domäne der MMP verdeckt wird. Die Bindung erfolgt nichtkovalent und irreversibel. Der wichtigste Vertreter TIMP-1 bindet bevorzugt an MMP-1,-2,-3 und-9, TIMP-2 vorwiegend an MMP-2 (13,160).

2 Fragestellung

In der gesunden Muskulatur besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau der extrazellulären Matrix. Diese Balance ist bei der Muskeldystrophie Duchenne gestört. Mit zunehmender Krankheitsdauer kommt es zu einem Ersatz des Muskelgewebes durch Fettgewebe und Fibrose mit einer Kollagen-Typ I-Prädominanz.

In dieser Arbeit wird die Lokalisation und semiquantitative Proteinexpression der Matrix-Metalloproteinasen MMP-1 und MMP-2 und ihren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 im DMD-Muskel im Vergleich zu gesundem Muskelgewebe dargestellt.

Es sollen folgende Fragen beantwortet werden:

Gibt es auf der Proteinebene ein differentes Expressionsmuster der Matrixmetalloproteinasen MMP-1 und MMP-2 und ihren Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 zwischen DMD-Muskulatur und gesunder Muskulatur?

Kann man aus dem Expressionsmuster Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der progredienten Fibrose ziehen?

3 Patienten, Gewebeproben, Material und Methoden

3.1 Patienten

Die Muskelgewebeproben stammen von Patienten, die in der Neuropädiatrie der Charité-Kinderklinik, Campus Virchow-Klinikum und in der Kinderklinik des DRK-Westend behandelt wurden. Die Muskelbiopsien wurden zu diagnostischen Zwecken nach Aufklärung und Einverständniserklärung der Patienten, bzw. ihrer Eltern entnommen.

Die Diagnose wurde anhand des klinischen Befundes, des stark erhöhten CK-Wertes im Serum, des immunhistologischen Befundes des Muskels und der molekulargenetischen Untersuchung gesichert.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Immunhistochemie Muskelproben von 18 Patienten mit einer DMD im Alter von zwei bis zwölf Jahren untersucht. Als normale Kontrollen wurden zwölf Gewebeproben von Patienten verwendet, bei denen der Verdacht auf eine Muskelerkrankung nicht bestätigt werden konnte (zwei-15 Jahre).

Mit der Western-Blot Methode wurden fünf Muskelproben von Patienten mit einer DMD im Alter von vier bis zehn Jahren und fünf gesunde Patienten untersucht.

Tab.3: Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne in der Immunhistochemie:

Patient	Alter	Histologie*	Genetik**	Muskel
DMD 1	4 Jahre	Dys III negativ	Del Ex 3-12	M. quad. fem.
DMD 2	5 Jahre	Dys I+II negativ	Punktmutation Ex 32	M. quad. fem.
DMD 3	6 Jahre	negativ	Del Ex 46-48	M. semimembranosus
DMD 4	8 Jahre	negativ	Del. Ex 48-53	M. quad. fem.
DMD 5	9 Jahre	negativ	keine Deletion	M. quad. fem.
DMD 6	8 Jahre	negativ	Del. Ex 46-47	M. satorius
DMD 7	6 Jahre	Dys I+III negativ	Del. Ex 51	M. quad. fem.
DMD 8	9 Jahre	negativ	Del. Ex 45	M. quad. fem.
DMD 9	9 Jahre	negativ	keine Deletion	paraspinale M.
DMD 19	4,5 Jahre	negativ	n. u.	M. quad. fem.
DMD 11	12 Jahre	negativ	Del. Ex 45	M. quad. fem.
DMD 12	2,5 Jahre	negativ	Del. Ex 49-50	M. quad. fem.
DMD 13	7 Jahre	negativ	Del. Ex 46-47	M. quad. fem.

DMD 14	10 Jahre	negativ	Del. Ex 46-50	M. quad. fem.
DMD 15	4,5 Jahre	negativ	Dupl. 46- 47	M. quad. fem.
DMD 16	3 Jahre	negativ	keine Deletion	M. quad. fem.
DMD 17	4,5 Jahre	negativ	keine Deletion	M. quad. fem.
DMD 18	4 Jahre	negativ	Del. Ex 48- 51	M. quad. fem.

* Immunhistologischer Antikörpernachweis mit Dystrophin- Antikörper 1,2,3

** Multiplex- PCR, mit der 98% der Deletionen in 20 Exons nachgewiesen werden können

Abkürzungen: DMD= Muskeldystrophie Duchenne, Dys= Dystrophin, Del.= Deletion, Ex= Exon, Dupl.= Duplikation, n. u.= nicht untersucht, M. quad. fem.= Musculus quadriceps femoris, M. satorius= Musculus satorius.

Tab.4: Gesunde Kontrollpatienten in der Immunhistochemie:

Patient	Alter	Muskel	Geschlecht
Kontrolle 1	6 Jahre	M. obl. int.	m
Kontrolle 2	2 Monate	M. rect. abd.	w
Kontrolle 3	13 Jahre	M. obl. ext.	w
Kontrolle 4	15 Jahre	M. obl. ext..	m
Kontrolle 5	2 Jahre	M. rect. abd.	w
Kontrolle 6	4 Jahre	M. rect. abd.	m
Kontrolle 7	9 Jahre	M. rect. abd.	w
Kontrolle 8	2 Jahre	M. obl. ext.	m
Kontrolle 9	6 Jahre	M. obl. ext..	m
Kontrolle 10	2 Jahre	M. rect. abd.	m
Kontrolle 11	2 Jahre	M. quad. fem.	w
Kontrolle 12	13 Jahre	M. quad. fem.	m

Abkürzungen: M. obl. int.= musculus obliquus internus abdominis, M. rect. abd.= Musculus rectus abdominis, M. quad. fem.= Musculus quadriceps femoris, m= männlich, w= weiblich

Tab.5: Patienten mit Muskeldystrophie Duchenne im Western-Blot:

Patient	Alter	Histologie*	Genetik**	Muskel
DMD 1	8 Jahre	negativ	keine Deletion	M. satorius
DMD 2	4,5 Jahre	negativ	Del. Ex 49-50	M. vastus lat.
DMD 3	7 Jahre	Dys I+III negativ	Del. Ex 7-39	M. quad. fem.
DMD 4	10 Jahre	negativ	keine Deletion	M. tensor
DMD 5	5 Jahre	negativ	Del. Ex 46-51	M. tensor

* Immunhistologischer Antikörpernachweis mit Dystrophin-Antikörper 1,2,3

** Multiplex-PCR, mit der 98% der Deletionen in 20 Exons nachgewiesen werden können

Abkürzungen: DMD= Muskeldystrophie Duchenne, Dys= Dystrophin, Del.= Deletion, Ex= Exon, M. vast. lat.= Musculus vastus lateralis, M. quad. fem.= Musculus quadriceps femoris, M. satorius= Musculus satorius.

Tab.6: Gesunde Kontrollpatienten im Western-Blot:

Patient	Alter	Muskel	Geschlecht
Kontrolle 1	15 Jahre	M. quad. fem.	w
Kontrolle 2	16 Jahre	M. quad. fem.	w
Kontrolle 3	15 Jahre	M. quad. fem.	w
Kontrolle 4	15 Jahre	M. quad. fem.	m
Kontrolle 5	14 Jahre	M. quad. fem.	m

Abkürzungen: M. quad. fem.= Musculus quadriceps femoris, m= männlich, w= weiblich

3.2 Gewebeproben

Die Muskelproben wurden durch eine Feinnadelbiopsie oder eine offene Biopsie nach Standardmethoden entnommen (35). Um Gefrierartefakte zu vermeiden, wurden die Präparate sofort in flüssigem Methylbutan, dann in flüssigem N₂ kryofixiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

3.3 Antikörper

Für die Immunhistochemie wurden folgende Antikörper (*monoklonal, **polyklonal) verwendet:

Antikörper	Host	Clone	Firma	Verdünnung
Anti- h MMP-1**	Kaninchen	71996332	Novus Molecular	1:100
Anti- h MMP-2**	Kaninchen	196158	Novus Molecular	1:100
Anti- h TIMP-1**	Kaninchen	22296193	Novus Molecular	1:100
Anti- h TIMP-2**	Kaninchen	T2-101	Novus Molecular	1:100
Mouse- anti-Rabbit-AK*	Maus	M0737	Dako	1:50
Rabbit- anti-Mouse-AK**	Kaninchen	Z 0259	Dako	1:20
APAAP-Komplex*	Maus	D 0651	Dako	1:50
Anti-h MMP-1**	Kaninchen	H00004312D01P	Novus biologicals	1:100
Anti-h MMP-2**	Kaninchen	NB200-193	Novus biologicals	1:100
Anti-h TIMP-1**	Kaninchen	H00004312D01P	Novus biologicals	1:100
Anti-h TIMP-2**	Kaninchen	NB6001481	Novus biologicals	1:10

Tab.7: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie.

Folgende monoklonale Antikörper wurden zur Detektion auf der Nitrocellulose im Western-Blot eingesetzt:

Antikörper	Host	Clone	Firma	Verdünnung
Anti-h MMP-1	Maus	41-1E5	Calbiochem	1:100
Anti-h MMP-2	Maus	CA 4001	Quartett	1:100
Anti-h TIMP-1	Maus	7-6C1	Calbiochem	1:100
Anti-h TIMP-2	Maus	T2 101	Calbiochem	1: 100
MMP-1-Enzym	Mensch	PF067	Oncogene	1:10
MMP-2-Enzym	Mensch	PF023	Oncogene	1:10
TIMP-1-Enzym	Mensch	PF019	Oncogene	1:50
TIMP-2-Enzym	Mensch	PF020	Oncogene	1:50
Anti-IgG Peroxidase	Ziege	115 H 8995	Sigma	1:3000, 1:50

Tab.8: Verwendete Antikörper im Western-Blot.

3.4 Lösungen

3.4.1 APAAP- Methode

Tris- HCl- Puffer (0,5 M): 60,55 g/l Trishydroxymethylaminomethan mit 25% HCl auf pH= 7,6 bzw. 8,7 einstellen

NaCl- Stammlösung (1,5 M): 87,66 g/l NaCl auf 1l Aqua dest.

Spülpuffer:
 100 ml Tris- HCl- Puffer (0,5 M)
 100 ml NaCl- Stammlösung
 800 ml Aqua dest.

Entwicklungslösung:

A:	62,5 ml	Propandiol
	175 ml	Tris- HCl- Puffer (pH= 8,7)
	0,1 g	Levamisole
B:	0,12 g	Naphthol- AsBi- Phosphat
	1,7 ml	Dimethylformamid
C:	0,05 g	Natrium- Nitrit
	1,25 ml	Aqua dest.
	500 µl	Neufuchsin 5% (in 2 N HCl gelöst)

C mit A mischen, dann B dazu geben.
 Entwicklungslösung filtrieren.

Hämalaun:

2,5 g	Hämatoxylin
0,5 g	Natriumjodat
125 g	Aluminiumkaliumsulfat- dodecahydrat, gelöst in 2,5 l Aqua dest.
125 g	Chloralhydrat
2,5 g	Citronensäure

(4 Wochen gereift bei RT)

3.4.2 Western-Blot

<u>Polyacrylamidgele:</u>	10% Trenngel	15% Trenngel	4% Sammelgel
1 M Tris (pH 8,8)	34,0%	34,0%	-
1 M Tris (pH 6,8)	16,0%	-	-
30% Acrylamid/ 0,4% Bisacrylamid	33,0%	50,0%	13,0%
Aqua dest.	28,5%	23,4%	63,0%
10% SDS	1,0%	1,0%	1,0%
5% TEMED	1,6%	1,6%	2,0%
0,8% APS	2,0%	2,0%	5,0%

<u>Probenpuffer (pH 8,3):</u>		
	130 mM	Tris- HCl (pH 6,8)
	5,5 mM	SDS (0,158g)
	200 mM	DTT (3,08g)
	26%	Glycerol (26 ml 100%)
	100 µl	5% Bromphenolblau

<u>Elektrophorese-Puffer (pH 8,3)</u>		
	3,02 g	Tris/ Base
	14,2 g	Glycin
	1,0 g	SDS
	ad	
	1000 ml	Aqua dest.

<u>Blot-Puffer (pH 8,3):</u>		
	190 mM	Glycin
	25 mM	Tris- Base
	10%	Methanol

<u>PBS-Tween (pH 7,4):</u>		
	2,73 g	KH ₂ PO ₄
	6,6 g	Na ₂ HPO ₄ x 1 H ₂ O
	35,0 g	NaCl
	0,5 ml	Tween 20
	ad	
	5000 ml	Aqua dest.

<u>Blockierungspuffer (2%):</u>	0,1 ml	Tween 20
	2g	Magermilchpulver
	ad	
	100 ml	PBS- Puffer

3.5 Geräte und Chemikalien

3.5.1 Geräte

Biofuge Piko	Fa. Heraeus
Cryostat	Fa. Reichert- Jung
Electrophoresis Power Supply	Fa. Consort
Elektronenmikroskop (Typ EM 10)	Fa. Zeiss
Elektrophoresekammer	Fa. Hoefer
Färbemodul Bench Mark ICH/ISH	Fa. Ventana Medical Systems
Fastblot B33	Fa. Biometra
Filterpapier	Fa. Biorad
Geltrockner	Fa. Biorad
Hand- Homogenisator	Fa. Neo Lab
Lichtmikroskop (Typ BX 50)	Fa. Olympus
Nitrocellulose- Membran (0,45 µm)	Fa. Biorad
Power Pack P25	Fa. Biometra
X- OMAT UV- Film	Fa. Kodak

3.5.2 Chemikalien

Aceton	Fa. Merck
Acrylamid	Fa. Boehringer
Albumin Bovine	Fa. Sigma, Fa. Merck
Aluminiumkaliumsulfat- dodecahydrat	Fa. Merck
Ammoniumperoxidsulfate (APS)	Fa. Sigma
Aquatex	Fa. Merck
BCL- Proteinbestimmung	Fa. Pierce
BIO-RAD Dual color	FA. Hemel Hempstead
Bisacylamid	Fa. Serva
Bromphenolblau	Fa. Serva
Chloralhydrat	Fa. Merck

Citronensäure	Fa. Merck
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat z. A.	Fa. Merck
DTT (1,4 Dithiothreitol)	Fa. Sigma
Glycerin	Fa. Merck
Hämatoxylin (C ₁₆ H ₁₄ O ₆)	Fa. Merck
HCl	Fa. Merck
iVIEW DAB Detection Kit	Fa. Ventana Medical Systems
Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Merck
Lauryl-Sulfate (SDS)	Fa. Sigma
Levamisole (C ₁₁ H ₁₂ N ₂ SxHCL)	Fa. Sigma
Magermilchpulver	Fa. Glücksklee
Methanol	Fa. Merck
N,N-Dimethylformamid	Fa. Merck
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Fa. Biorad
Natriumchlorid	Fa. Merck
Naphthol-AsBi-Phosphat	Fa. Sigma
Natrium- Nitrit	Fa. Merck
Natriumjodat	Fa. Merck
Neufuchsin	Fa. Sigma
Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Tween 20)	Fa. Sigma
Ponceaurot S	Fa. Sigma
Propandiol (C ₄ H ₁₁ NO ₂)	Fa. Merck- Schuchardt
Rabbit-Normalserum	Fa. Dako
Serva Blau R	Fa.Serva
Sulfosalicylsäure	Fa. Janssen Chimica
Trichloressigsäure	Fa. Merck
Tricine	Fa. Biomol
Tris-Base	Fa. Sigma
Trishydroxymethylaminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Fa. Merck
Western breeze	Fa. Novex

3.6 Methoden

3.6.1 Immunhistochemische Untersuchungen

Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode

Die APAAP-Technik (26) zählt zu den indirekten Komplexmethoden und ist eine der sensitivsten immunhistochemischen Verfahren. Durch den Einsatz stabiler Immunkomplexe wird hierbei die natürliche Affinität von Antikörpern gegenüber ihrem Antigen genutzt.

Der Primärantikörper bindet zunächst an das im Gewebe liegende Antigen. Abhängig davon, aus welchem Tier der Primärantikörper gewonnen wurde, muß ein Brückenantikörper eingesetzt werden, damit der APAAP-Komplex binden kann (125). Wird anstelle eines primären monoklonalen Maus-Antikörpers ein primärer polyklonaler Antikörper einer anderen Spezies (z.B. Kaninchen) eingesetzt, ist eine sogenannte „APAAP-Mausifikation“ erforderlich, da der Brücken-Antikörper immer gegen die Maus reagiert. Dies wird unter „Zwischenschaltung“ einer Doppelbrücke (z.B. Maus-anti-Kaninchen-Antikörper) erreicht. Mit dem nun folgenden Brücken-Antikörper (Kaninchen-anti-Maus-Antikörper) ist der Antikörperkomplex für die APAAP-Methode einsetzbar.

Der APAAP-Komplex besteht aus monoklonalen Maus-IgG-Antikörpern gegen intestinale alkalische Phosphatase, welche spezifisch mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert sind (125). Durch eine Substrat-Chromogen-Lösung, die z.B. Neufuchsin und Naphthol-AsBi-Phosphat enthält, kann die alkalische Phosphatase sichtbar gemacht werden. Es entsteht ein rotes Reaktionsprodukt.

Durch wiederholte Applikation des Brücken-Antikörpers oder des APAAP-Komplexes lässt sich das Farbsignal intensivieren. Die für die Konjugation eines Komplexes verwendete alkalische Phosphatase wird aus Kälberdarm gewonnen und hat ein Molekulargewicht von 140 kD. Durch den Zusatz von Levamisole wird die endogene (humane) alkalische Phosphatase gehemmt. Die Inkubation mit Normalserum dient zur Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine im Untersuchungsmaterial und damit ebenfalls der Verhinderung von unspezifischen Anfärbungen.

APAAP-Methode an Gefrierschnitten

Aus den gefrorenen Muskelbiopsaten wurden Gefrierschnitte mit einer Schichtdicke von 6 μm am Kryostaten gefertigt und auf unbeschichtete Objektträger gebracht. Danach wurden diese für einige Minuten luftgetrocknet, für 5 min. in Aceton fixiert und noch einmal 5 min. luftgetrocknet. Bis zur histologischen Verwendung konnten diese bei -80°C aufbewahrt werden.

Zur histologischen Aufarbeitung wurden die Kryostatschnitte bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet, 5 min. in Aceton fixiert und 2-3 x 5 min. in Spülpuffer gespült. Dann erfolgte die Färbung per Hand in folgender Reihenfolge:

1. Inkubation mit polyklonalem Primärantikörper (Kaninchen-AK) in entsprechender Verdünnung (Verdünnung erfolgt mit 1%-igem Rinderalbumin) für 3h bei 4°C .
2. Spülen in Spülpuffer 2 x 5 min..
3. Inkubation mit Doppelbrückenantikörper (Maus-anti-Kaninchen-AK; Verdünnung 1:50 mit Spülpuffer) für 30 min. bei RT.
4. Spülen in Spülpuffer 2 x 5 min..
5. Inkubation mit Kaninchen-anti-Maus-Brückenantiserum (Verdünnung 1:20 mit 10%-igem Rabbitnormalserum).
6. Spülen in Spülpuffer 2 x 5 min..
7. Inkubation mit APAAP- Komplex für 30 min. bei RT (Verdünnung 1:50 mit Spülpuffer).
8. Spülen in Spülpuffer 2 x 5 min..
9. Entwicklung in frisch angesetzter Entwicklungslösung für 3- 5 min. bei RT.
10. Spülen in Spülpuffer 3 x 5 min..
11. Kernfärbung mit Hämalaun 1-2 min..
12. Kurzes Bläuen in Ammoniakwasser und danach ca. 5-10 min. in Aqua dest..
13. Eindecken mit wässrigem Eindeckmedium (Aqua tex[®]).

Mit Hilfe von Verdünnungsreihen wurden die Optimalkonzentrationen, welche zu maximalen und reproduzierbaren Färbeergebnissen bei geringer oder fehlender Hintergrundfärbung führten, bestimmt. Für alle eingesetzten Primärantikörper wurde eine Verdünnung von 1:100 ermittelt. In Untersuchungsreihen wurden dann die Inkubationszeiten und Entwicklungszeiten für die einzelnen Antikörper systematisch ermittelt, um das Färbeergebnis zu optimieren.

Zur Methodenkontrolle wurde bei jeder Immunhistologie MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 positives, fibrotisches Lebergewebe mit untersucht. Unspezifische Anfärbungen konnten durch Färbereihen ohne primären Antikörper ausgeschlossen werden.

Enzymmarkierte Streptavidin-Biotin-Methode an Gefrierschnitten

Nach Etablierung der Antikörper mit Verdünnungsreihen am Färbeautomaten (Bench Mark ICH/ISH Färbemodul) erfolgte der Antikörpernachweis bei einem Teil der Proben automatisiert unter Verwendung des BMK iVIEW DAB Detection Kit (Venta Medical System).

Hierbei wurde die immunhistochemische enzymmarkierte Streptavidin-Biotin-Technik (LSAB-Methode) angewandt, welche wie die APAAP-Methode zu den indirekten immunhistochemischen Nachweisverfahren gehört und ebenfalls sehr sensitiv ist.

Dabei wird als Erstes das gesuchte Antigen mit einem optimal verdünnten unkonjugierten Primärantikörper beschichtet. Es folgt die Inkubation mit dem sekundären Brückenantikörper, welcher mit dem Vitamin Biotin gekoppelt ist und an den Primärantikörper bindet. Im dritten Schritt bindet enzymmarkiertes Streptavidin an das Biotin des Brückenantikörpers. Die Reaktion wird schließlich mit dem Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) visualisiert. Das entstandene Reaktionsprodukt ist braun.

Die Färbung im Färbeautomaten erfolgte nach einem standardisierten Protokoll in folgenden Schritten:

1. Aufheizen des Objektträgers bis 42°C
2. Inkubation mit iVIEW Inhibitor für 2 min..
3. Spülen in Spülpuffer.
4. Inkubation mit polyklonalem Primärantikörper (Kaninchen-AK) für 32 min..
5. Spülen in Spülpuffer.
6. Inkubation mit Brückenantikörper (biotynilierter Sekundärantikörper) iVIEW-Biotin-Ig für 8 min..
7. Spülen in Spülpuffer.
8. Inkubation mit iVIEW SA-HRP (Streptavidin-Horseradish Peroxidase) für 8 min..
9. Spülen in Spülpuffer.

10. Inkubation mit iVIEW DAB (Chromogen) und iVIEW H₂O₂ für 8 min., LCS (Liquid Coverslip[®] zur präzisen Kontrolle der Reaktionskinetik) auftragen.
11. Spülen mit Waschlösung
12. iVIEW Copper (verstärkt Reaktion), Inkubation 4 min.
13. Spülen mit Waschlösung
14. Kernfärbung mit Hämalaun
15. Spülen mit Waschlösung
16. Inkubation mit Bluing Reagent (Bläungsmittel) für 2 min., LCS auftragen
17. Spülen mit Waschlösung

3.6.1.1 Lichtmikroskopische Auswertung und Dokumentation

Die Beurteilung der immunhistochemischen Färbung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Typ: Zeiss Elektronenmikroskop Typ EM 10 und Olympus BX 50). Die Präparate wurden nach unten stehendem semiquantitativen Graduierungsschema von zwei unabhängigen Untersuchern auf immunhistologische Signale für MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 untersucht (Auswertung in Anlehnung an [78, 68]). Wichtige Ergebnisse wurden mit dem Fotomikroskop dokumentiert.

((+))	sehr schwach
(+)	schwach
+	mäßig ausgeprägt
++	ausgeprägt
+++	stark ausgeprägt

Tab.9: Graduierung der visuellen Beurteilung

3.6.2 Western-Blot

In der Western-Blot-Untersuchung können einzelne Proteine aus Gewebelysaten nach ihrer Größe aufgetrennt und über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden.

Die Gel-Matrix besteht aus einem Gemisch von Acrylamid und Bisacrylamid. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale lange Polymere, die durch Bisacrylamid vernetzt werden. TEMED dient dabei als Katalysator und Ammoniumperoxidsulfat (APS) als Radikalbildner. Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine und verleiht diesen durch die Sulfatgruppen eine negative Ladung, so daß die Laufgeschwindigkeit der Proteine nur von der relativen Molekülmasse abhängig ist.

Um eine schärfere Bandentrennung zu erhalten, besitzt das Sammel-Gel oberhalb des Trenn-Gels größere Poren und einen anderen pH-Wert. Der dann folgende elektrophoretische Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen. Um einen spezifischen Nachweis von Antigenen zu ermöglichen, müssen noch alle freien Bindungsstellen der Membran mit einem nicht durch die Antikörper erkennbaren Protein, z. B. mit fettfreiem Milchpulver, geblockt werden. Damit nun der Antigen- Antikörperkomplex sichtbar gemacht werden kann, muß der Antikörper mit einem Enzym gekoppelt werden, welches eine Farbreaktion auslösen kann.

3.6.2.1 Homogenisation der Biopsien

Das Resektatgewebe mit einem Feuchtgewicht zwischen 12-50 mg wurde auf einer Feinwaage gewogen, in einer Petrischale auf Trockeneis mit einem Skalpell zerkleinert und in einem vorgekühlten Glashomogenisator auf Eis mit 1%-igem SDS (=Lysepuffer) für 2-3 Minuten homogenisiert. Der Lysepuffer wurde im Verhältnis 1:2 zum Gewebe hinzugegeben. Zur Inaktivierung unspezifischer Proteasen erfolgte das Erhitzen des Gemisches in einem Eppendorfgefäß auf 95°C für 5 min. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 12.000 x g und 4°C (Kühlzentrifuge) konnte der Überstand abpipettiert, in Eppendorfgefäßen aliquotiert und bei 4°C gelagert oder bei -20°C eingefroren werden. Das Pellet wurde verworfen.

3.6.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Gesamtproteins des Homogenats erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Reagent Kits von Pierce. Hierbei wird die Absorption der Proteinlösungen bei 600 nm in einem Spektralphotometer gemessen und der Proteingehalt nach der Biuret-Methode ermittelt. Aus den Werten einer seriellen Verdünnung von Serumalbumin läßt sich eine Eichkurve erstellen, anhand derer sich die Proteinkonzentrationen der eigenen Proben errechnen läßt.

Nach der Proteinbestimmung und dem Angleichen der Proteinmenge der Proben untereinander mit 1%-igem SDS wurde den Proben eine bestimmte Menge (1/4 ihrer Menge) eines vierfach konzentrierten Probenpuffers zugeführt. Die Muskelproben wurden noch einmal gemischt, 5 min. bei 95°C erhitzt und 5 min. bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert.

3.6.2.3 SDS-PAGE Gel Elektrophorese nach Laemmli

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Polypeptiden und Proteinen nach ihrer Molekülgröße durch den Molekularsiebeffekt der Acrylamidgele. Hierfür ist das Protokoll von Laemmli (90) Standard geworden.

Nach Vorbereiten der Gelkammern wurde ein 10 oder 15%-iges engporiges Trenngel mit einem darüberliegenden großporigen 4%-igen Sammel-Gel (pH 6,8) gegossen und die Proben mit 40 µg Protein in die Taschen des Gels pipettiert.

Zur Ermittlung der Molekulargewichte wurde bei jeder Gel-Elektrophorese ein Proteinstandard aufgetragen. Für die Gele wurde der Proteinstandard BIO-RAD Dual color verwendet. Die Proteintrennung im Sammelgel erfolgte bei 80 V und wurde dann bei 110 V weitergeführt. Die Gel-Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

3.6.2.4 Semidry-Elektroblotting nach Kyhse-Andersen

Nach beendeter SDS-Page konnte nun durch das Semidry-Elektroblotting nach Kyhse-Andersen (81) der Proteintransfer auf Nitrocellulose erfolgen. Eine bestimmte Anordnung des Gelsandwich muß dabei eingehalten werden: Die untere Graphitplatte bildet die Anode, auf die ein in Anodenpuffer I getränktes Filterpapier gelegt wird. Dann folgt ein weiteres Filterpapier und die Nitrocellulose (beide in Anodenpuffer II getränkt). Hierauf liegt das Gel, gefolgt von zwei in Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren. Die Kathodengraphitplatte wird zum Schluß aufgelegt. Der

Transfer wurde für 45 min. bei 40 mA/Gel durchgeführt. Das Ergebnis kann mit Ponceau-Rot überprüft werden. Eine Entfärbung ist mit PBS-Tween möglich.

3.6.2.5 Immunmarkierung der nitrocellulosemembran-gebundenen Proteine

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die geblottete Nitrocellulosefolie für ca. 30 min. bei Raumtemperatur in einer Magermilchlösung geblockt, dann in PBS-Tween gespült und für 1h bei 4°C mit dem spezifischen Primärantikörper inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS-Tween für je 10 min.. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (anti-mouse IgG, welches gegen den Primärantikörper gerichtet ist und mit Peroxidase gekoppelt ist) für 30 min. auf die Nitrocellulose gegeben. Überschüssige und unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween entfernt, um bei der Entwicklung so wenig Hintergrund wie möglich zu erhalten.

3.6.2.6 Chemilumineszenz-Entwicklung

Zur Visualisierung der Ergebnisse auf der Nitrocellulose wurde die gebrauchsfertige Chemilumineszenz-Lösung (Western Breeze) von der Firma Novex verwendet. Hierzu wurden 2,375 ml des CDP-Star-Substrates mit 0,125 ml Nitro-Block II-Lösung vermischt und die Nitrocellulose darin 5 min. entwickelt.

Zuletzt wurde die Nitrocellulose getrocknet auf das Filmmaterial (Kodak X-Omat DS) gelegt. Antikörperspezifische Signale belichten den Röntgenfilm, der in einem automatisierten Verfahren entwickelt wird (45compact Protect Gerätebau GmbH, Deutschland) (Protokoll modifiziert nach 143).

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Immunhistochemie

4.1.1 Histologische Merkmale der untersuchten Muskeln

Die DMD-Muskulatur zeigte neben normalen Fasern kleine atrophische Fasern, Einzelfasernekrose, sowie hypertrophische Fasern mit zentralen Zellkernen als Ausdruck von Regeneration und Fasersplitterung. Es findet sich eine Zunahme der extrazellulären Matrix mit Proliferation des endo- und perimysialen Bindegewebes und Sklerolipomatose (siehe Abb. 7,8 und 9). In der immunhistologischen Anfärbung mit Dystrophin I, II, III zeigte sich in der untersuchten DMD-Muskulatur eine deutliche Dystrophinreduktion bzw. keine Dystrophinexpression (nicht abgebildet).

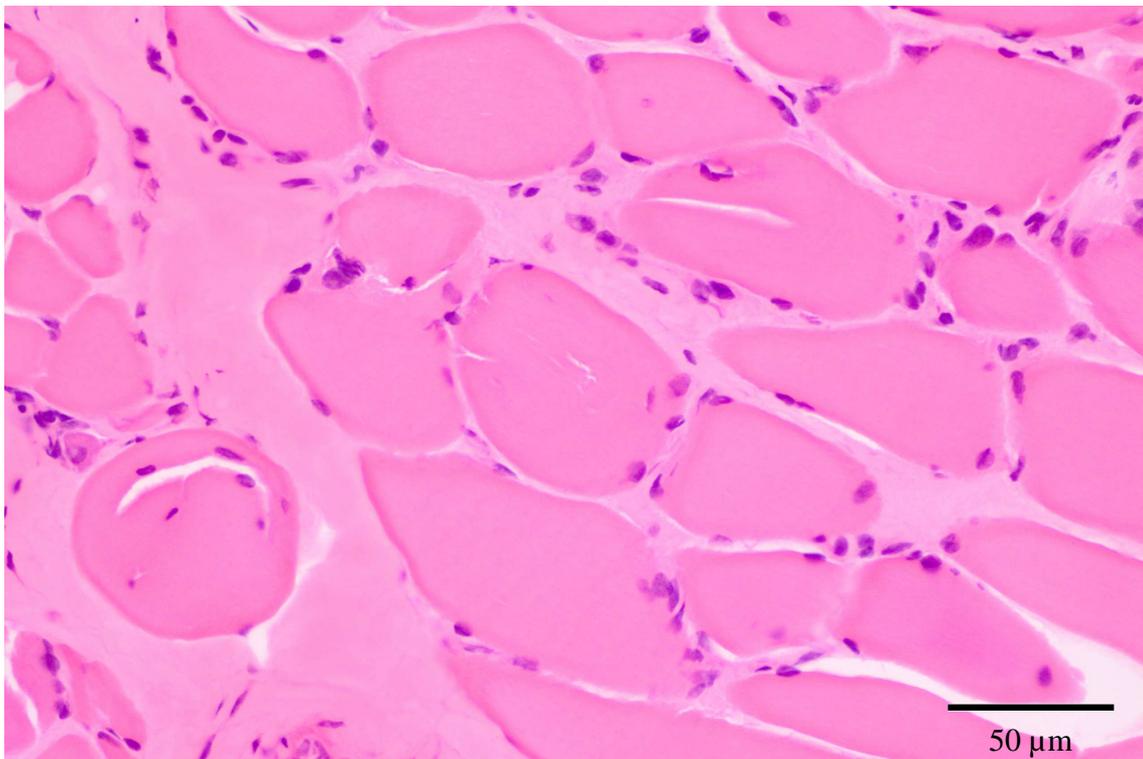


Abb.7: DMD-Muskel: Irreguläre Kalibervariationen mit Abrundung der Muskelfaserquerschnitte und Fasersplitting. Einige Fasern weisen binnenständige Kerne auf. Die Muskelfasern sind von Bindegewebe umlagert. HE-Färbung, Vergrößerung x400.

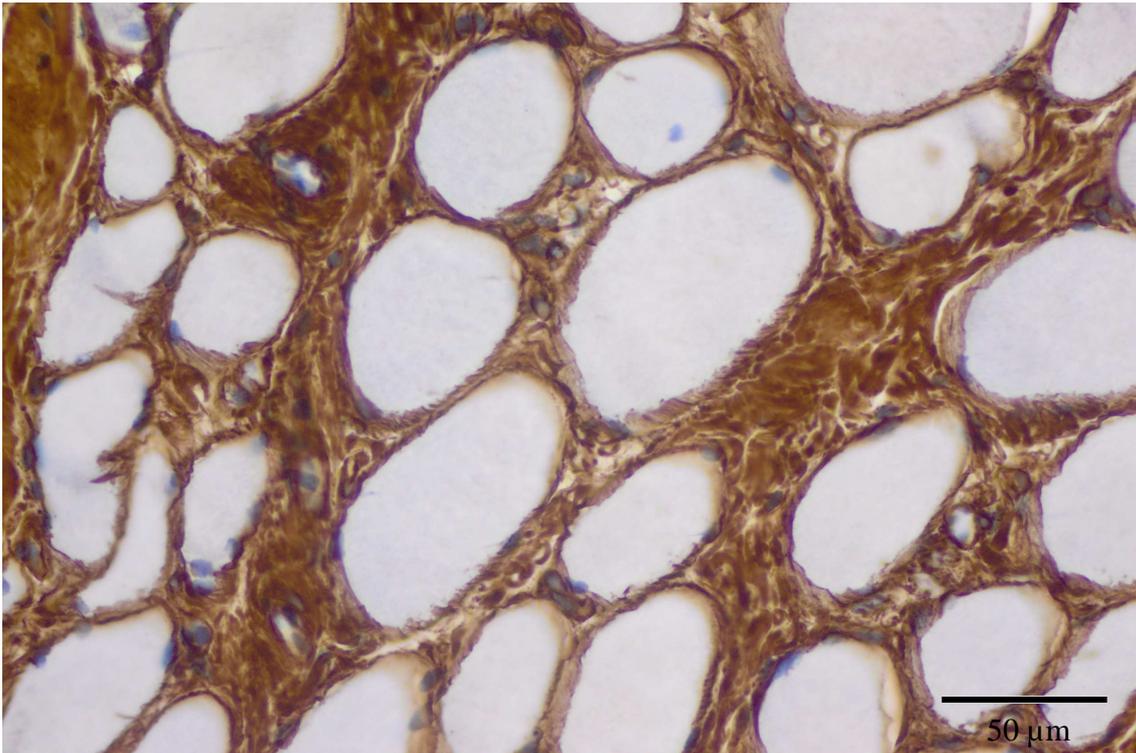


Abb.8: DMD-Muskel: Kollagen VI-Färbung: zur Darstellung kommt die deutliche Vermehrung der extrazellulären Matrix (braun) mit Faserabrundungen und Kalibervariationen. Vergrößerung x400.

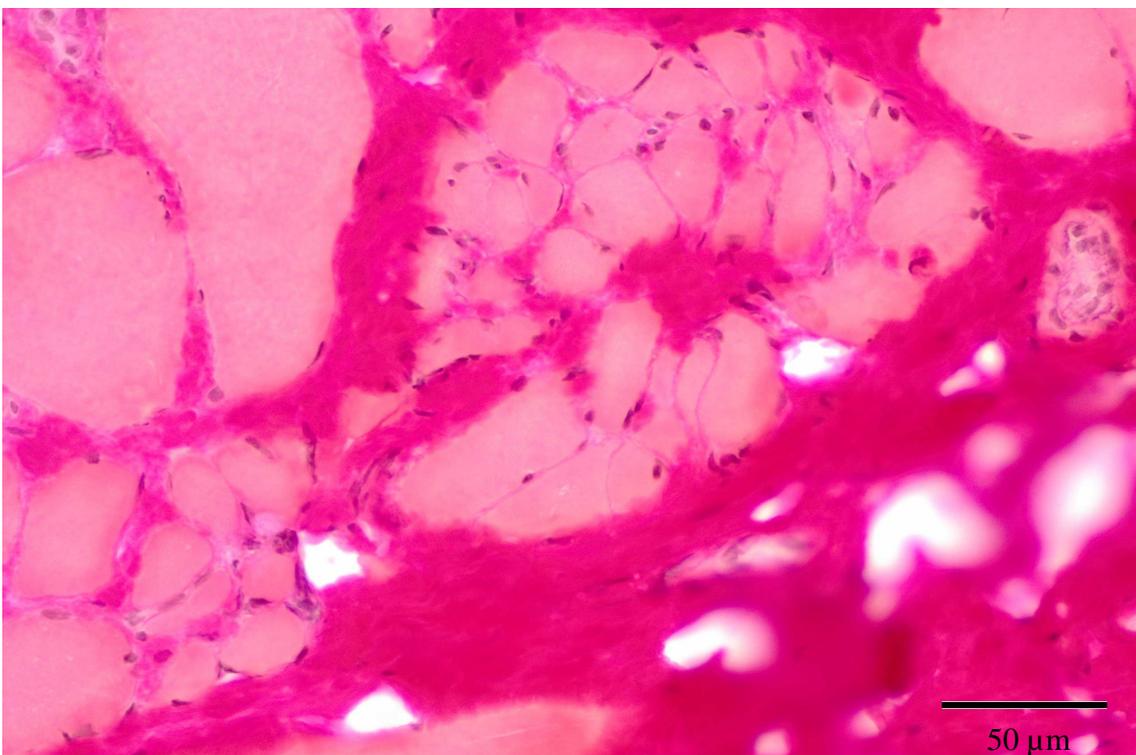


Abb.9: DMD-Muskel: Elastica van Gieson Färbung zur Darstellung des fibrotischen Gewebes (kaminrot). Vergrößerung x400.

4.1.2 MMP-1

MMP-1 wurde in allen Muskelproben exprimiert.

Bei der DMD ist MMP-1 in 7/13 Biopsien sehr schwach bis schwach ausgeprägt (*siehe Abb. 12*) und in 6/13 Muskelproben mäßig ausgeprägt bis ausgeprägt (*siehe Abb. 10 und 11*) nachweisbar.

Bei den gesunden Kontrollbiopsien verhielt sich das Färbeverhalten ebenfalls uneinheitlich: in 5/8 Fällen ist die MMP-1 Expression mäßig ausgeprägt und in 3/8 Biopsien sehr schwach bis schwach nachweisbar (*siehe Abb. 13*).

In allen untersuchten Muskelproben konnte eine positive Immunreaktivität für die interstitielle Kollagenase um meist fusiforme Zellen lokalisiert werden. Auf Grund der Lokalisation und Form dieser Zellen ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um endomysial gelegene Fibroblasten handelt. Eine diffuse Anfärbung des Bindegewebes findet ebenfalls statt.

In der DMD- Muskulatur ist MMP-1 hauptsächlich im Bereich degenerierender Muskelfasern nachweisbar. Zusätzlich wird MMP-1 entlang des Sarkolemms einzelner Muskelfasern sezerniert. In der gesunden Kontrollmuskulatur zeigt sich vor allem eine perimysiale und weniger eine endomysiale Anfärbung. In allen Fällen geht eine erhöhte MMP-1-Produktion auch von den Endothelzellen intramuskulärer Kapillaren aus.

Die Befunde sprechen dafür, dass die MMP-1-Expression bei den DMD-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpatienten nicht relevant erhöht ist.

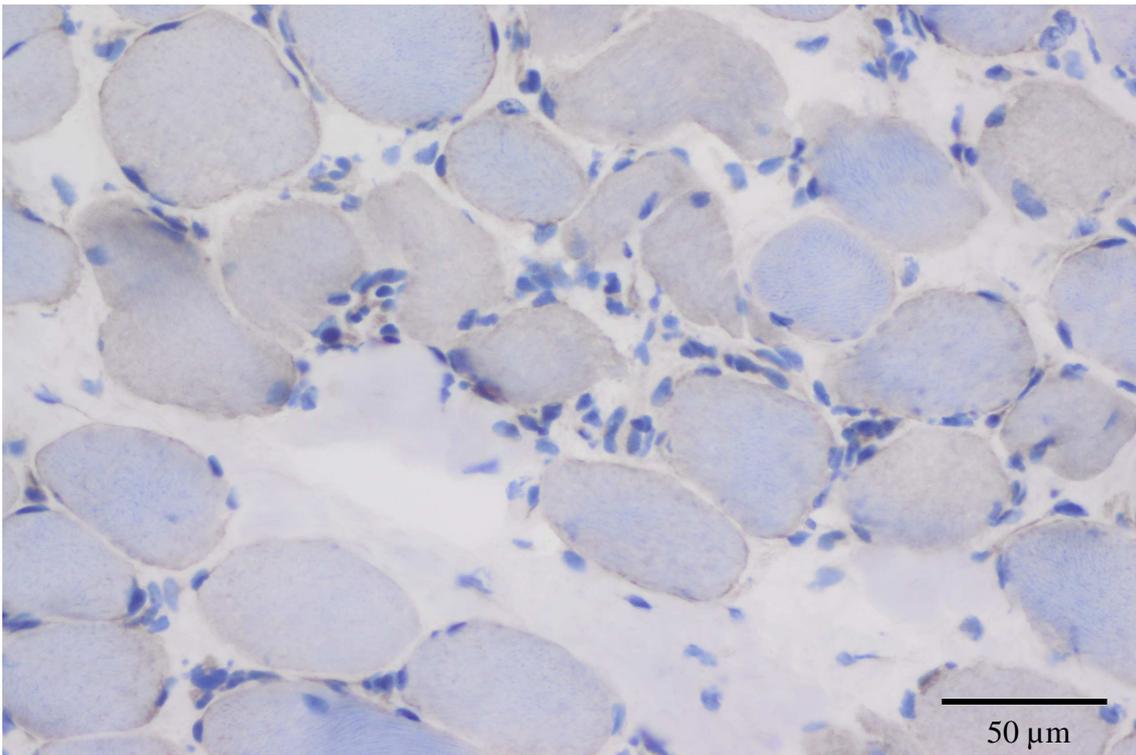


Abb.10: DMD-Muskel: Immunhistochemische Färbung mit **MMP-1**-Antikörper. Positive Immunreaktivität für die interstitielle Kollagenase um meist fusiforme Zellen der extrazellulären Matrix und entlang der Basalmembranen, x400.

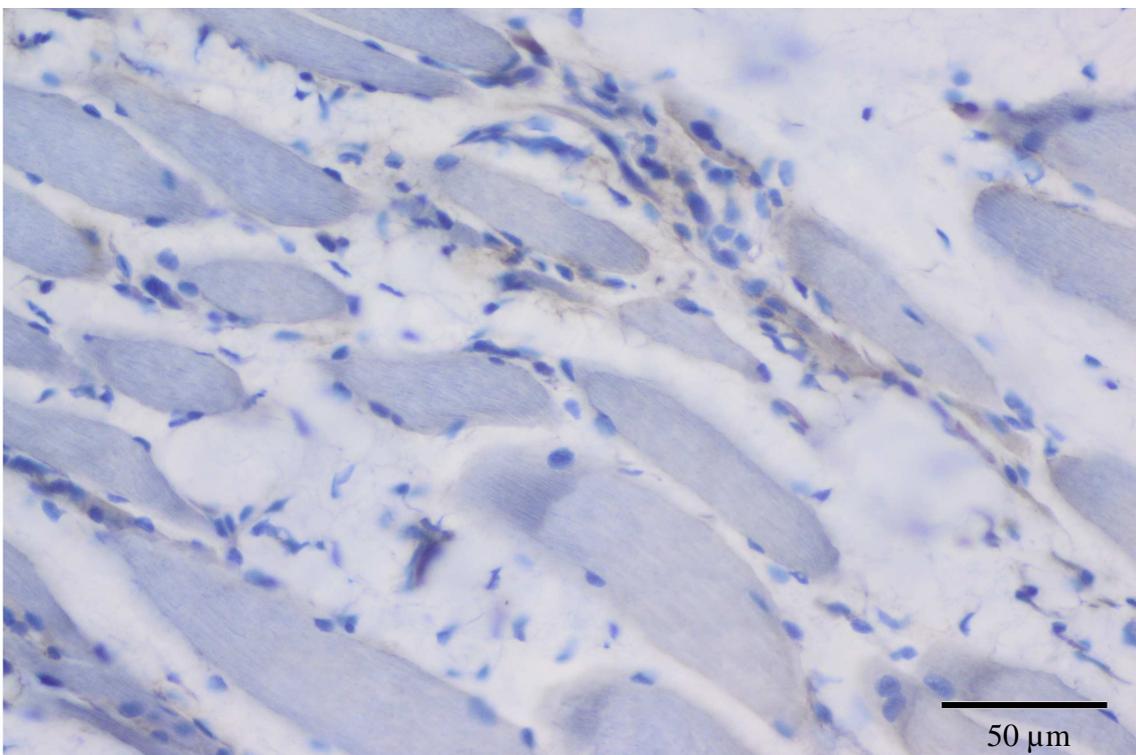


Abb.11: DMD-Muskel: Immunhistochemische Färbung mit **MMP-1**-Antikörper. Positive Immunreaktivität für die interstitielle Kollagenase um meist fusiforme Zellen und diffuse Anfärbung der extrazellulären Matrix, x400.

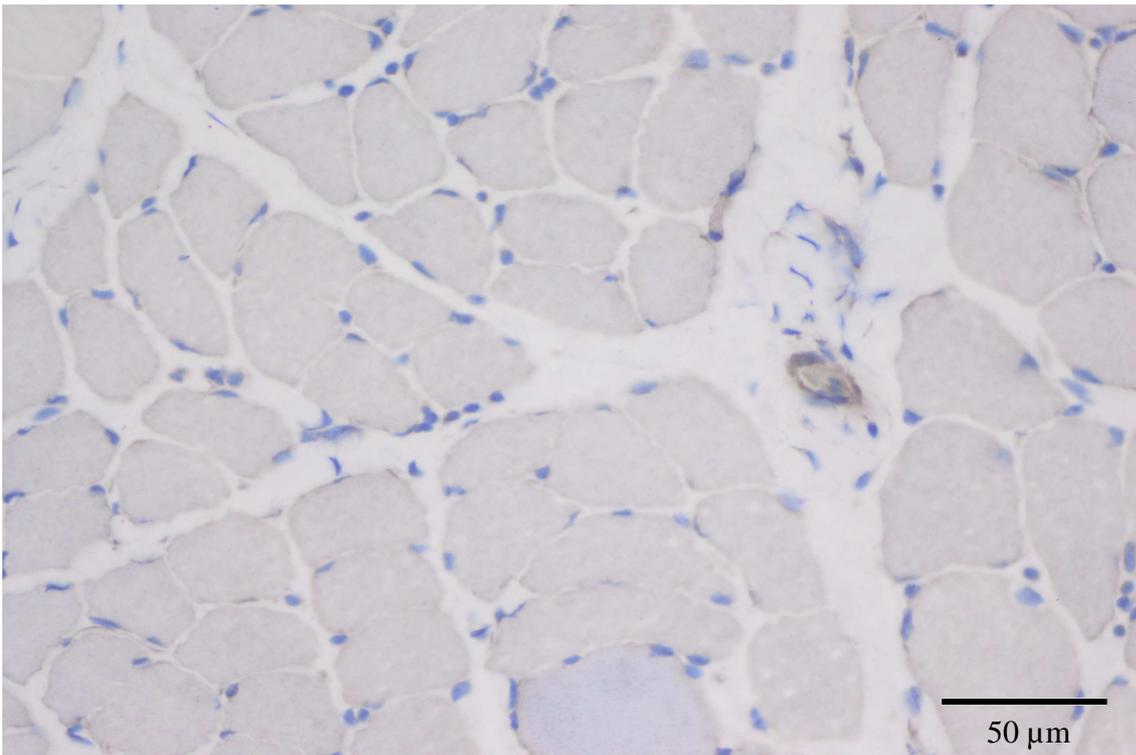


Abb.12: DMD-Muskel: Immunalkalische Phosphatase Färbung mit **MMP-1**-Antikörper. Erhöhte MMP-1-Produktion auch von den Endothelzellen intramuskulärer Kapillare. Vergrößerung x400.

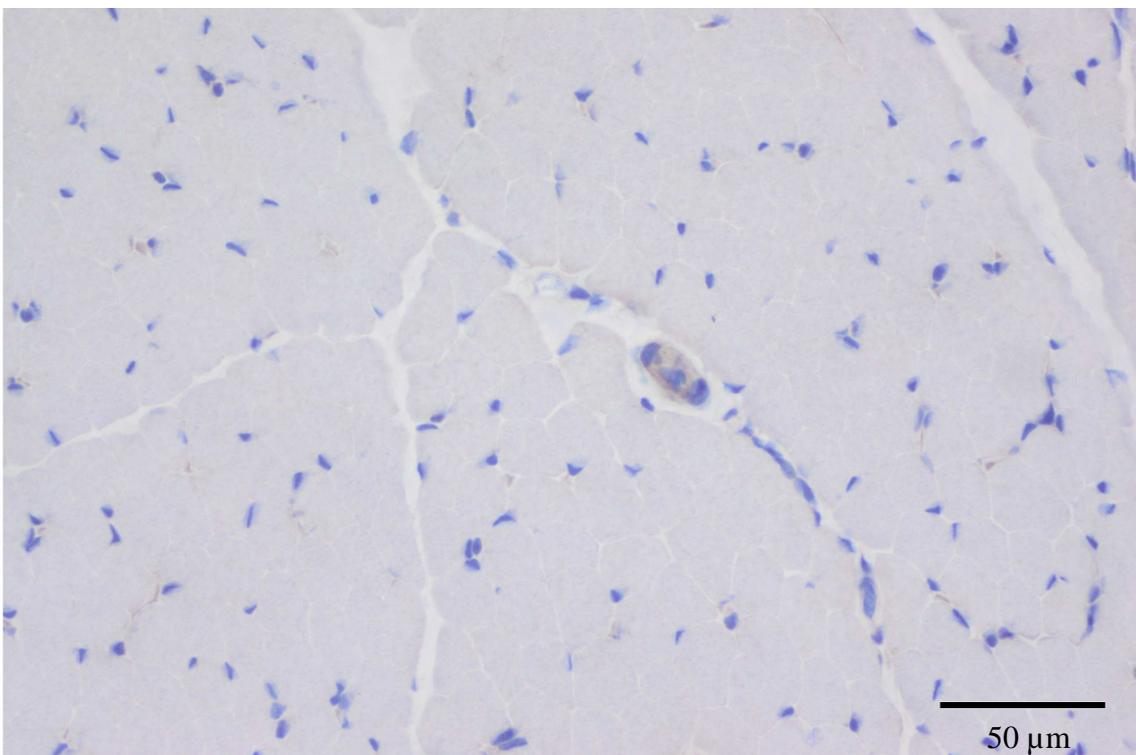


Abb.13: gesunder Kontrollmuskel: Immunhistochemische Färbung mit **MMP-1**-Antikörper. Anfärbung einzelner Zellen der extrazellulären Matrix, x400.

4.1.3 MMP-2

MMP-2 war in allen Muskelproben nachzuweisen.

Die MMP-2 Expression ist bei den DMD-Patienten in 5/15 Fällen schwach ausgeprägt nachweisbar und in 10/15 Fällen mäßig ausgeprägt bis stark ausgeprägt nachweisbar (siehe Abb. 14 und 15).

Im Gegensatz dazu ist MMP-2 in den gesunden Kontrollen in allen Biopsien nur sehr schwach bis schwach nachweisbar (siehe Abb. 16).

Im Vergleich zur interstitiellen Kollagenase ist MMP-2 zellständiger um überwiegend Fibroblasten in der extrazellulären Matrix verteilt. Es ist dabei sowohl endo- als auch perimysial nachweisbar.

Es wird gezeigt, dass in normaler Muskulatur eine geringe natürliche MMP-2 Expression vorhanden ist, jedoch die Expression in der DMD-Muskulatur heraufreguliert ist.

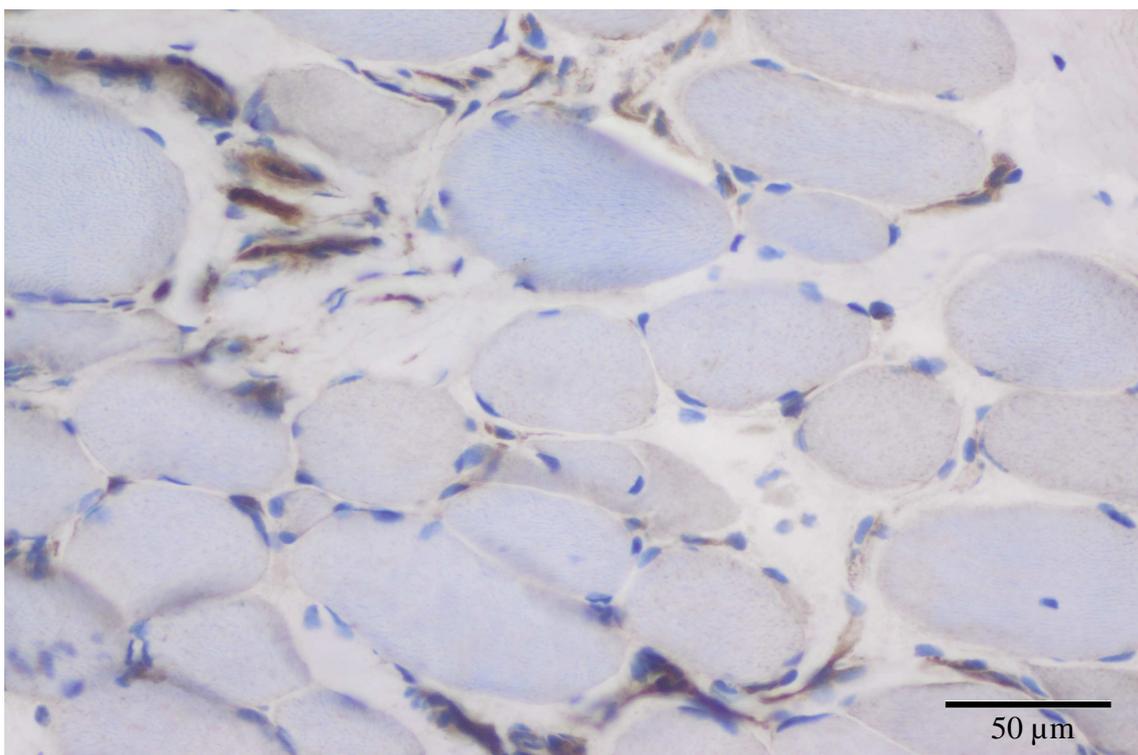


Abb.14: DMD-Muskel: Immunhistochemische Färbung mit **MMP-2**-Antikörper. Im Vergleich zur gesunden Muskulatur ist bei den DMD-Patienten MMP-2 stärker exprimiert, x 400.

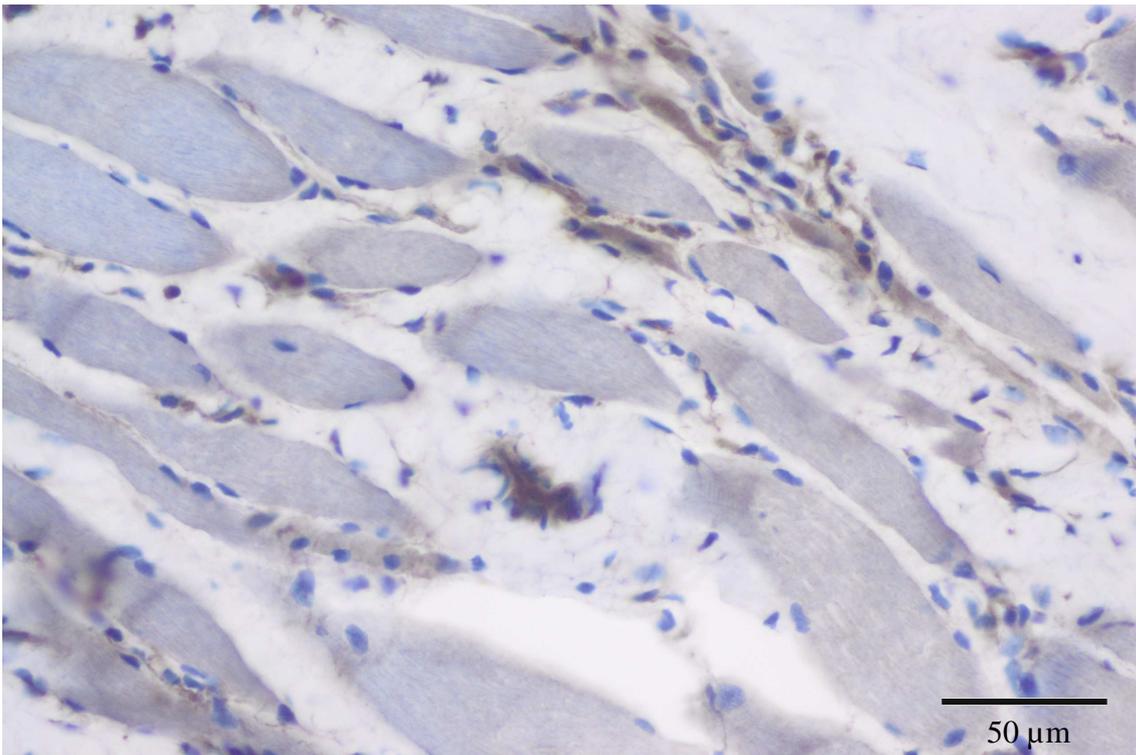


Abb.15: DMD-Muskel: Immunhistochemische Färbung mit **MMP-2**-Antikörper. Anfärbung vermehrter MMP-2 positiver Zellen im Bereich zellulärer Infiltrate, x 400:

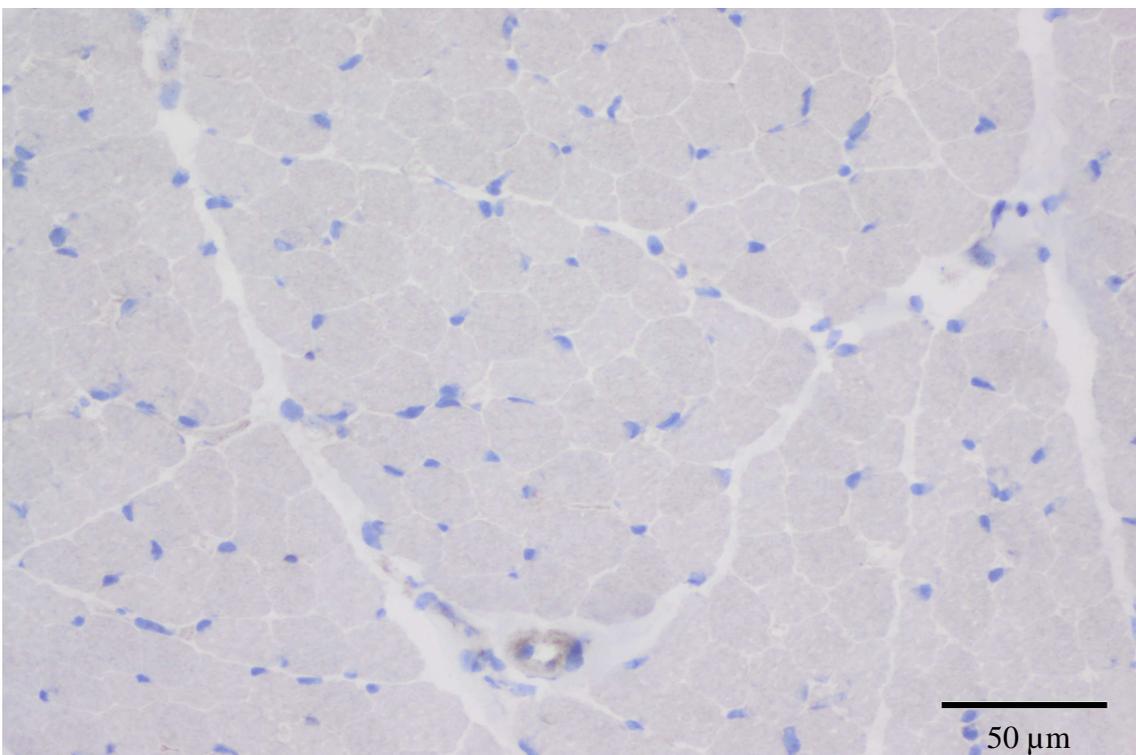


Abb.16: gesunde Kontrollmuskulatur: Immunhistochemische Färbung mit **MMP-2**-Antikörper. Nur sehr schwacher Nachweis von MMP-2 positiven Zellen, x400.

4.1.4 TIMP-1

TIMP-1 war in allen untersuchten Muskelbiopsien vorhanden.

TIMP-1 ist bei der DMD in 4/16 Fällen mäßig ausgeprägt bis ausgeprägt und in 12/16 Fällen ausgeprägt bis stark ausgeprägt (*siehe Abb. 17 und 18*) nachweisbar.

Bei den gesunden Kontrollmuskeln findet man in allen Fällen mäßig ausgeprägte Signale (*siehe Abb. 19*). TIMP-1 war sowohl endo- als auch perimysial nachweisbar.

Die spezifischen TIMP-1-Signale sind bei den DMD-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollmuskulatur verstärkt.

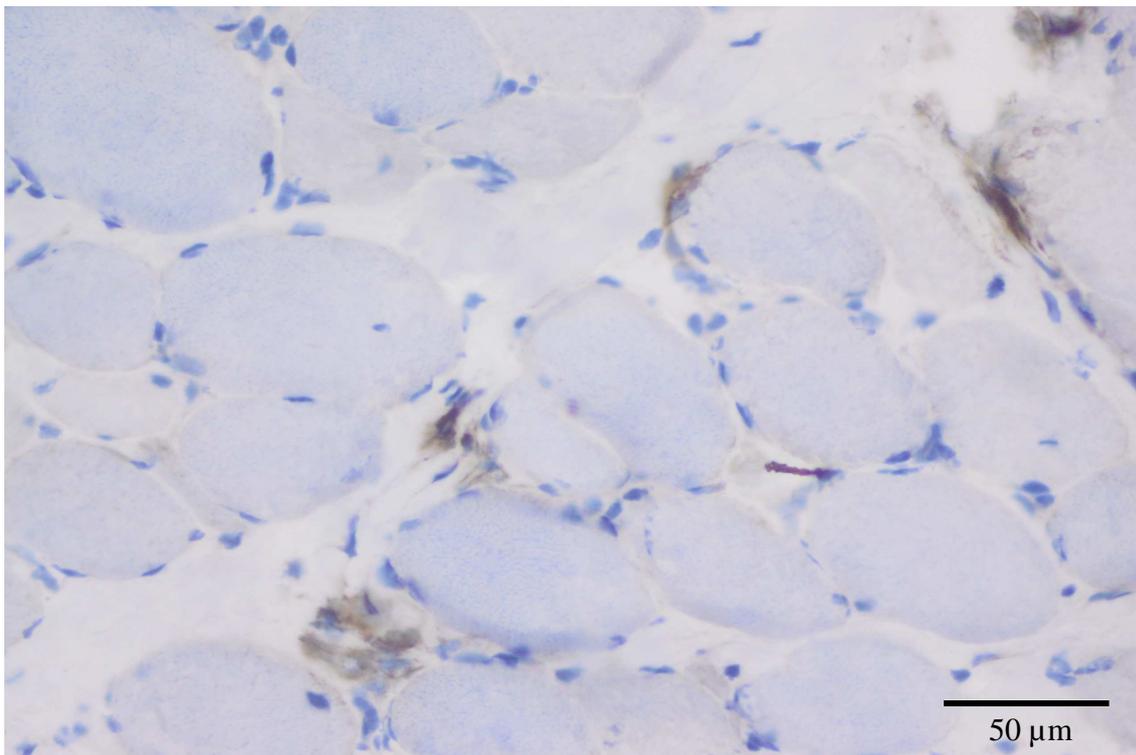


Abb.17: DMD-Muskel: Immunhistochemische Färbung mit **TIMP-1**-Antikörper. TIMP-1-spezifische Signale sind bei Patienten mit DMD stärker nachweisbar als in der gesunden Muskulatur, x 400.

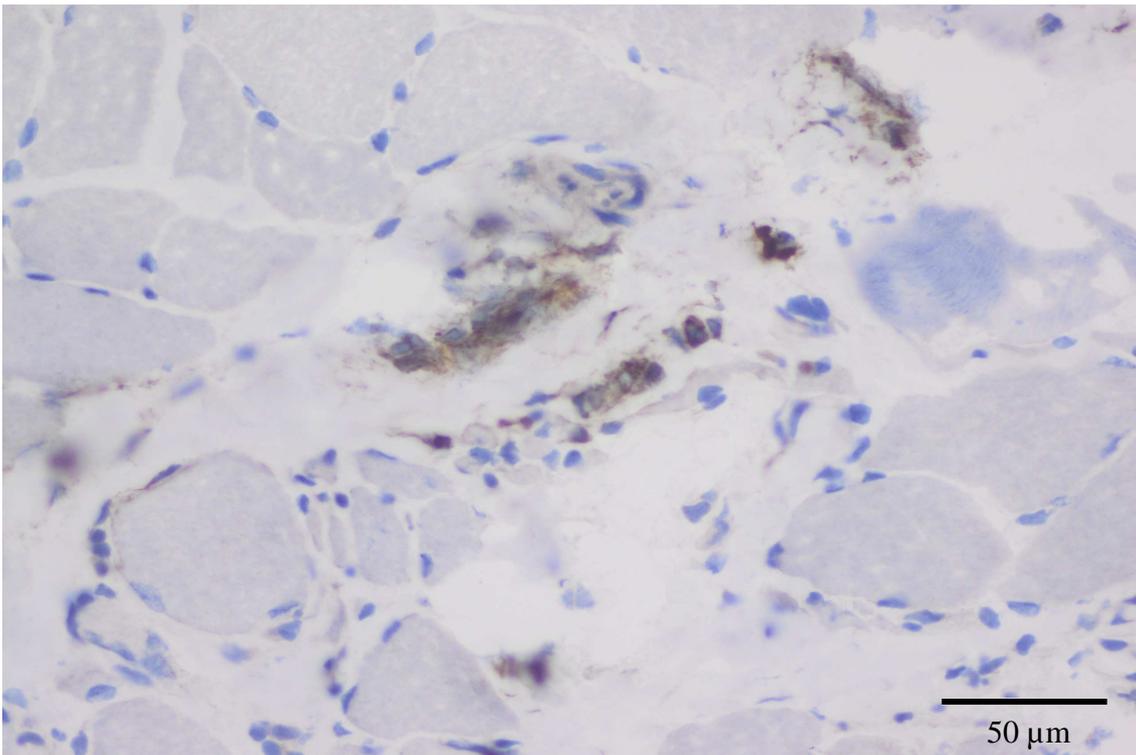


Abb.18: DMD-Muskel: Immunhistochemische Färbung mit **TIMP-1**-Antikörper, x400.

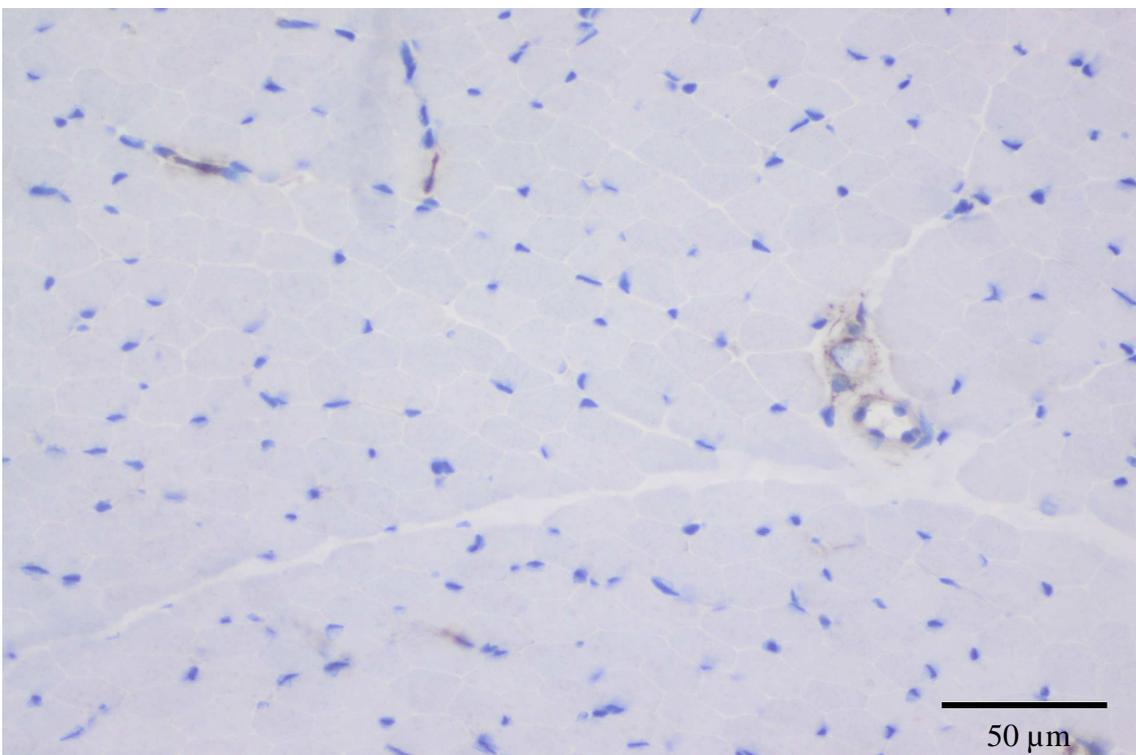


Abb.19: gesunde Kontrollmuskulatur: Immunhistochemische Färbung mit **TIMP-1**-Antikörper. Darstellung weniger endo-und perimysial gelegener Zellen, x400

4.1.5 TIMP-2

TIMP-2 war in allen untersuchten Muskelproben nachweisbar.

TIMP-2 ist bei der DMD mäßig ausgeprägt bis ausgeprägt nachweisbar (siehe Abb. 20 und 21) und bei der gesunden Kontrollmuskulatur sehr schwach bis schwach nachweisbar (siehe Abb. 22).

Im Vergleich zu TIMP-1 sind die Signale für TIMP-2 sowohl bei der DMD als auch bei der gesunden Kontrolle weniger stark ausgeprägt.

TIMP-1 ist, wie MMP-2, eher zellständig perimysial und endomysial nachweisbar.

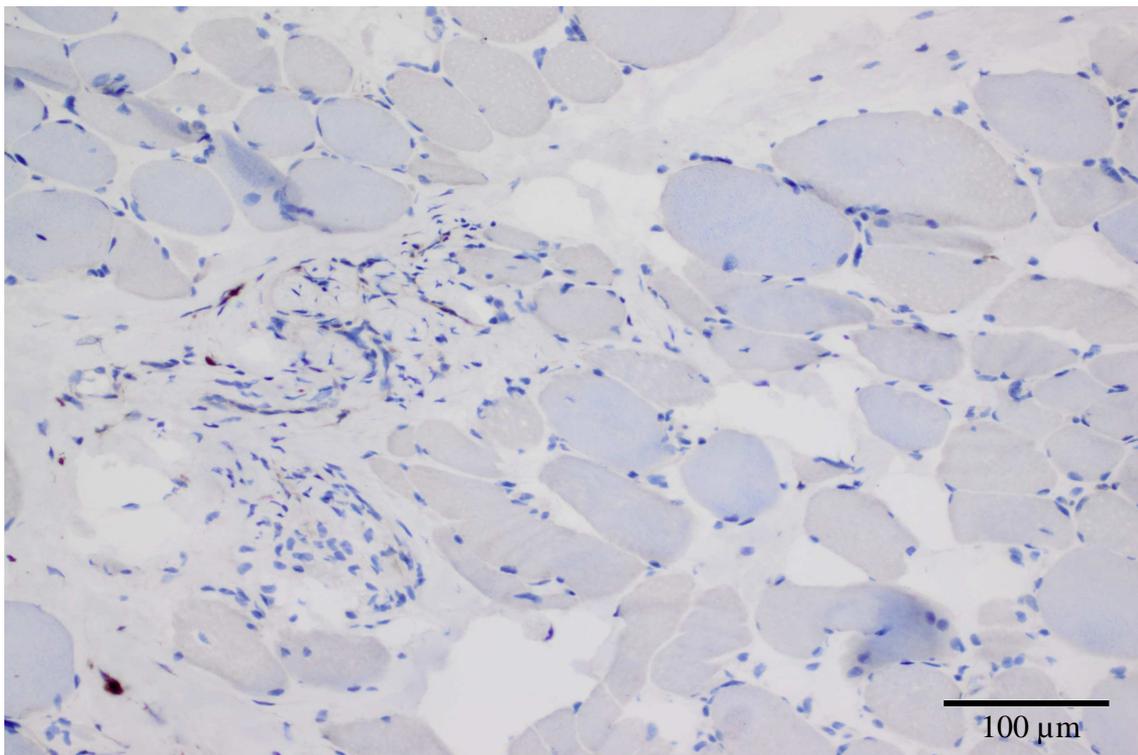


Abb.20: DMD-Muskel: Immunhistochemische Färbung mit **TIMP-2**-Antikörper. Eher zellständige Anfärbung von **TIMP-2**, x 200.

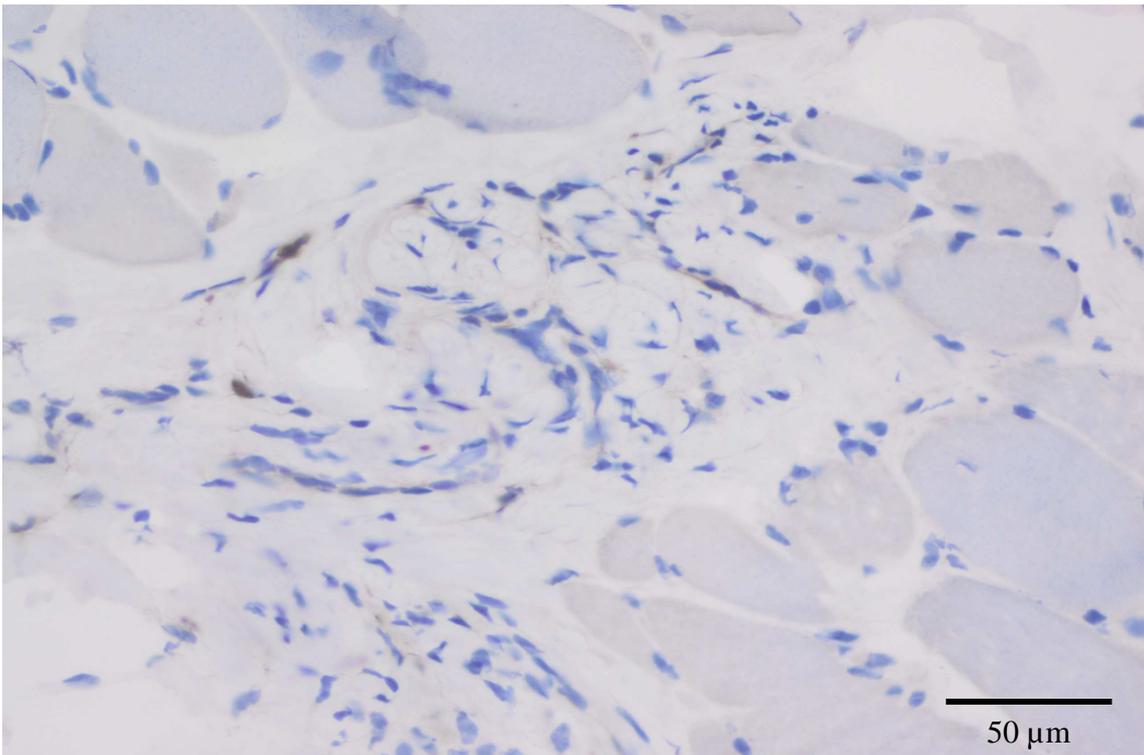


Abb.21: DMD-Muskel: Immunhistochemische Färbung mit **TIMP-2**-Antikörper, x 400.

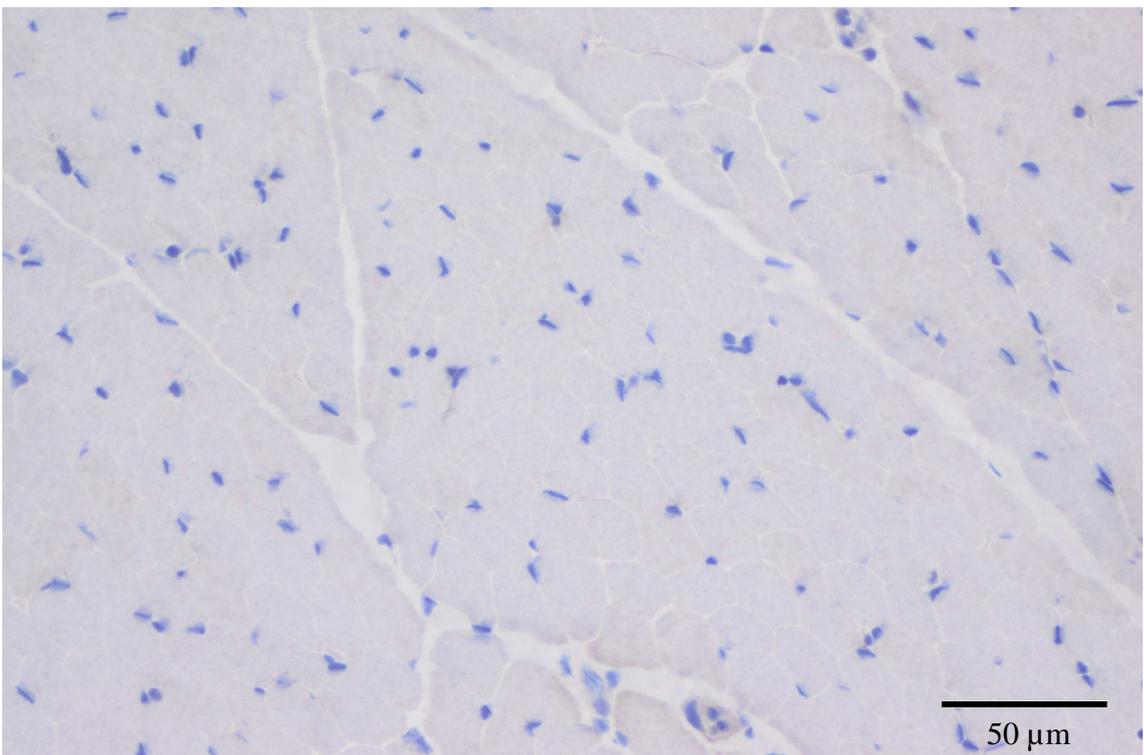


Abb.22: gesunde Kontrollmuskulatur: Immunhistochemische Färbung mit **TIMP-2**-Antikörper. Die **TIMP-2**-Expression ist bei den gesunden Kontrollpatienten weniger ausgeprägt als bei der DMD-Muskulatur, x 400.

4.1.6 Zusammenfassung der visuellen Auswertung

Patient	MMP-1	MMP-2	TIMP-1	TIMP-2
DMD 1	+	++	++	+
DMD 2	++	+++	+++	+
DMD 3	(+)	+++	++	+
DMD 4				++
DMD 5	++	++	+++	
DMD 6	(+)	+	++	
DMD 7	(+)	+	+++	
DMD 8	(+)	+	++	
DMD 9	+	+	+++	
DMD 10	++	(+)	++	
DMD 11	((+))-(+)	(+)	+++	
DMD 12	((+))		++	
DMD 13	(+)		++	
DMD 14	+	+++		
DMD 15		(+)	+	
DMD 16		(+)	+++	
DMD 17		(+)	++	
DMD 18		+	+++	
K 1	+	((+))-(+)	+	
K 2	+	((+))-(+)	+	
K 3	+	((+))-(+)	+	
K 4	+	((+))-(+)	+	
K 5	+	((+))-(+)	+	
K 6		((+))-(+)	+	
K 7		((+))-(+)	+	
K 8		((+))	+	
K 9	((+))-(+)	((+))-(+)	+	
K 10	((+))	((+))-(+)		
K 11	((+))-(+)	((+))-(+)	+	((+))
K 12				(+)

Tab. 10: Immunreaktivität von MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 in DMD- Muskulatur, pathologischer Kontrollmuskulatur und gesunder Kontrollmuskulatur.

Graduierung der visuellen Beurteilung: ((+))=sehr schwach, (+)=schwach, +=mäßig ausgeprägt, ++ ausgeprägt, +++ stark ausgeprägt nachweisbar.

4.2 Ergebnisse der Western-Blot-Analyse

MMP-1 ist in allen untersuchten Biopsien anhand einer Bande mit einem Molekulargewicht von 52 kDa nachzuweisen, welche dem Proenzym Pro-MMP-1 entspricht. Das aktive Enzym bei einer Bande von 43 kDa konnte nicht nachgewiesen werden. Zwei von drei Muskelproben der gesunden Muskulatur zeigen eine stärkere Proteinexpression von MMP-1 im Vergleich zu der DMD-Muskulatur (siehe Abb. 23).

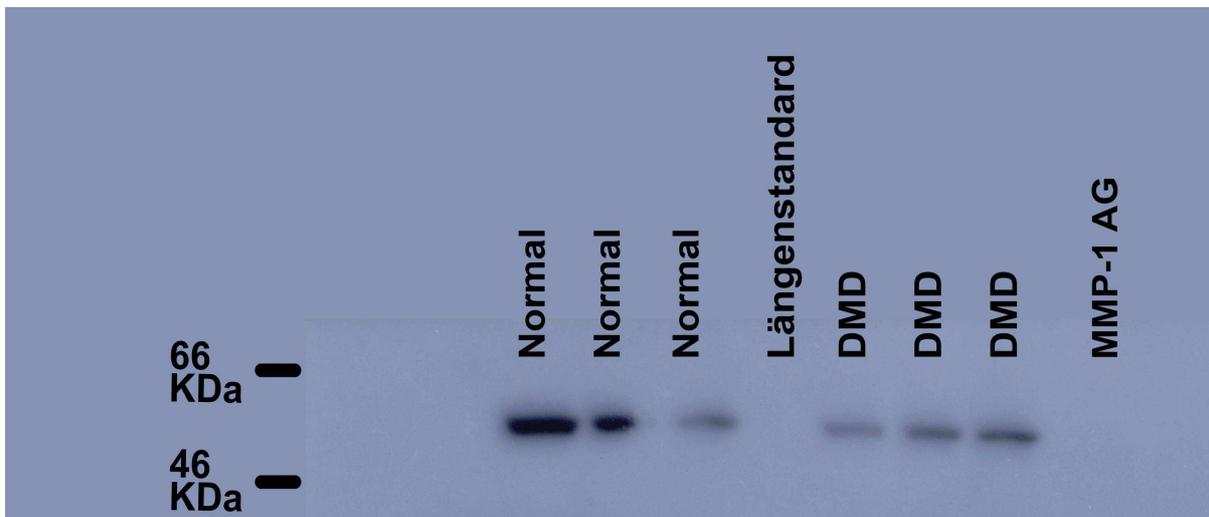


Abb.23: Western-Blot-Analyse der gesunden Muskulatur im Vergleich zur DMD-Muskulatur mit Anti-h-MMP-1. Die MMP-1-Expression ist bei den gesunden Kontrollpatienten (Spur 1-3) stärker ausgeprägt als bei der DMD-Muskulatur (Spur 5-7).

MMP-2 wird als inaktives Proenzym Pro-MMP-2 mit einem Molekulargewicht von 72 kDa und als aktive Form des Enzyms bei 62/66 kDa exprimiert.

Hier zeigt sich eine eindeutig erhöhte Proteinexpression bei der DMD- Muskulatur im Vergleich zur gesunden Muskulatur.

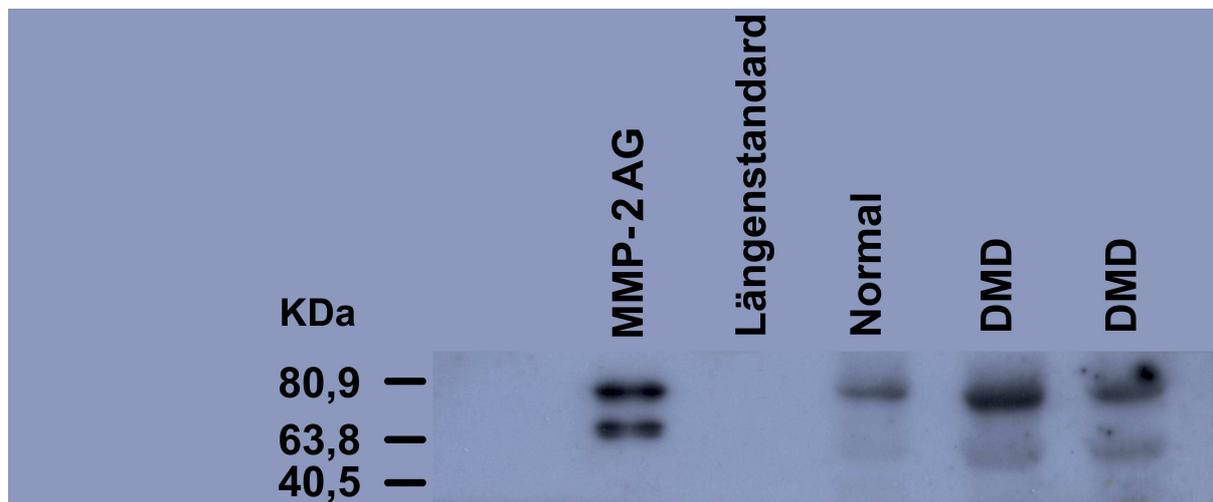


Abb. 24: Western-Blot-Analyse mit Anti-h-MMP-2. Die MMP-2- Expression ist in der Normalkontrolle (Spur 3) weniger ausgeprägt als bei der DMD-Muskulatur (Spur 4+5).

Bei **TIMP-1** findet sich eine Bande bei einem Molekulargewicht von 28,5 kDa. In allen drei untersuchten Muskelproben von DMD-Patienten ist eine deutliche Proteinexpression vorhanden. Die Proteinexpression bei der gesunden Muskulatur ist allen vier Fällen nur gering ausgeprägt. Die DMD- Muskulatur zeigt eine gesteigerte Proteinexpression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

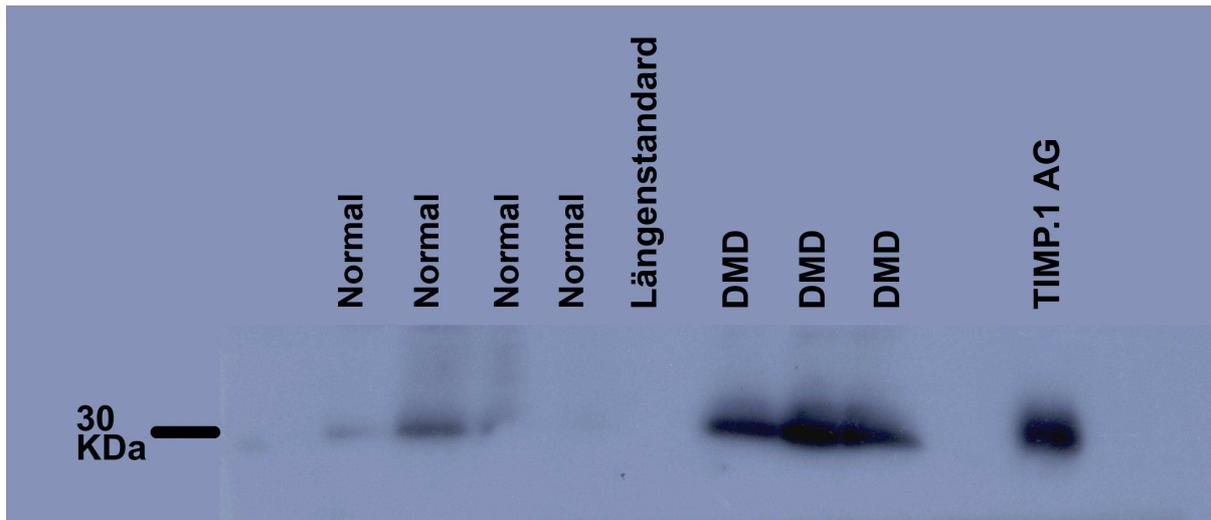


Abb.25: Western-Blot-Analyse mit Anti-h-TIMP-1. Die TIMP-1-Expression ist bei den gesunden Kontrollpatienten (Spur 1-4) weniger ausgeprägt als bei der DMD-Muskulatur (Spur 6-8).

Für TIMP-2 konnten trotz vieler Probeläufe, in denen die Gewebekomposition, die Proteinmenge, die primären Antikörper und Gele für die Elektrophorese variiert wurden, keine eindeutigen Signale erzeugt werden.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle von MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 bei der DMD

Bei der DMD kommt es zu einer massiven Zunahme der EZM. Durch den dystrophischen Prozeß kommt es besonders zu einer vermehrten Ablagerung von Kollagen Typ I und III, von Zytokinen und Interleukinen (150). Die Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren sind dabei ein wichtiger Regulationsmechanismus.

In Studien an anderen Organfibrosen wurde ersichtlich, dass die Expression der Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren zugunsten von TIMP-1 verschoben ist und somit eine zumindest relative „MMP-1-Schwäche“ entsteht. Für MMP-2 und TIMP-2 wurde bei verschiedenen fibrotischen Prozessen eine gesteigerte Expression beschrieben (63,72,57).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Matrixmetalloproteinasen 1 und 2 und deren Inhibitoren TIMP-1 und -2 mittels Immunhistochemie und Western-Blot-Analyse auf der Proteinebene untersucht. Dabei sollte geprüft werden, ob es bei der Muskeldystrophie Duchenne Hinweise dafür gibt, dass ähnlich wie bei anderen Organfibrosen neben der gesteigerten Fibrogenese auch eine inadäquate Fibrolyse im Krankheitsprozeß eine wichtige Rolle spielt.

5.1.1. MMP-1 bei DMD

MMP-1 zählt zu der Gruppe der Kollagenasen. Nur diese sind in der Lage, natives Kollagen Typ I und Typ III, welches in der DMD-Muskulatur stark vermehrt ist, bei neutralem pH zu hydrolisieren. Zur Aktivierung von Pro-MMP-1 werden Plasmin und MMP-3 benötigt. Als wichtige Inhibitoren der MMP-1-Expression wurden neben TIMP-1 und LIMP (large inhibitor of metalloproteinase), TGF- β 1 nachgewiesen (152). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß MMP-1 in der Muskulatur von DMD-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollmuskulatur sowohl in der Immunhistologie als auch in der Western-Blot-Analyse trotz der gesteigerten Kollagensynthese im DMD-Muskel nicht heraufreguliert ist. In der Western-Blot-Analyse erscheint die MMP-1-Proteinexpression bei der DMD-Muskulatur sogar weniger ausgeprägt.

MMP-1 ist in allen untersuchten Muskelproben vorhanden. Es ist dabei hauptsächlich entlang des Sarkolemmes und um meist fusiforme Zellkerne zu finden. Diese

Beobachtung wird unterstützt durch Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, daß MMP-1 von Fibroblasten synthetisiert wird (161).

Von den wenigen Arbeitsgruppen, die sich bisher mit der Expression der MMPs bei Muskelerkrankungen beschäftigt haben, haben Kieseier et al. (82) die Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren bei entzündlichen Myopathien untersucht. Die Autoren berichten von einer gesteigerten Expression von MMP-1 bei den entzündlichen Myopathien im Vergleich zur DMD-Muskulatur. Dies zeichnet sich auch in unseren Ergebnissen (Daten nicht veröffentlicht) ab und könnte ausschlaggebend für die meist fehlende progrediente Muskelfibrose bei der Myositis sein.

Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen konnten Kieseier et al. (82) MMP-1 weder in der Immunhistochemie noch in der Western-Blot-Analyse im DMD-Muskel nachweisen. Jedoch wurde in dieser Studie nur ein 6-jähriger Patient mit DMD untersucht und ein Vergleich zur normalen Muskulatur ist nicht erfolgt.

Auch bei unseren Untersuchungen gab es Muskelproben von DMD-Patienten mit sehr schwachen MMP-1-Signalen (davon auch zwei sechsjährige Patienten), so dass es als Hypothese denkbar wäre, dass die Matrixmetalloproteinasen in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium ein unterschiedliches Expressionsmuster zeigen. Ein Beispiel einer im Krankheitsverlauf unterschiedlichen Expression von MMP-1 haben Kuroda et al. (89) berichtet. Sie haben eine Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und der *MMP-1*-Expression in *In-vitro*-Studien an Fibroblastenkulturen von Patienten mit systemischer Sklerose beobachtet. Die systemische Sklerose stellt eine chronisch entzündliche Bindegewebserkrankung dar, die ebenfalls mit Akkumulation von Kollagen Typ I und III einhergeht. Hierbei zeigte sich in den frühen Krankheitsstadien eine vermehrte *MMP-1*-Genexpression, die im Krankheitsverlauf (Krankheitsdauer zwei-vier Jahre) deutlich schwächer wurde, um dann im fortgeschrittenen Stadium (Krankheitsverlauf > sechs Jahre) im Vergleich zu gesunden Fibroblasten kein verändertes Expressionsmuster aufzuweisen. Für die DMD haben Bernasconi et al. (12) gezeigt, dass die erhöhten *mRNA*-Werte für *TGF-β1* in dystrophischer Muskulatur vom Krankheitsstadium abhängig sind. Es wäre denkbar, dass auch der Expressionsgrad von MMP-1 bei DMD-Patienten vom Krankheitsstadium abhängig ist, da *TGF-β1* ein potenter Inhibitor für MMP-1 ist. Auf Grund der geringen Fallzahlen läßt sich an Hand unserer Ergebnisse jedoch eine Abhängigkeit vom

Krankheitsstadium nicht nachvollziehen, obwohl auch Patienten im Alter von zwei bis zehn Jahren untersucht wurden. Andererseits ist es auch möglich, dass aufgrund der geringen Anfärbung kein relevanter Unterschied in der Immunhistologie nachweisbar ist.

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie von Zanotti et al. (166) wurde neben anderen Komponenten der EZM ebenfalls MMP-1 an DMD-Muskulatur (14 Patienten zwischen zwei und zwölf Jahren) im Vergleich zur gesunden Muskulatur (sechs Patienten zwischen eins und sechs Jahren) untersucht. Hier war sowohl in der Immunhistochemie als auch im Western-Blot die MMP-1 Expression im DMD-Muskel ausgeprägter als in der gesunden Kontrollmuskulatur. Die Hochregulation von MMP-1 im DMD-Muskel auf Proteinebene entspricht nicht unseren Ergebnissen. Die *mRNA*-Expression war bei Zanotti et al. (166) in der DMD-Muskulatur im Vergleich zur gesunden Muskulatur jedoch nicht erhöht, welches unsere Ergebnisse wiederum unterstützt. Die Autoren diskutieren hier Unterschiede in der Stabilität und des Umsatzes zwischen Protein und Transkript.

Unsere Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen an anderen Organfibrosen überein. Milani et al. (107) haben die Expression von *MMP-1* mittels *in-situ* Hybridisierung an humanem Lebergewebe untersucht. Es war keine Expression der *mRNA* für MMP-1 in dem zirrhotischen Lebergewebe nachweisbar. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die Expression von *MMP-1* in fibrosierender Leber unter der Nachweisbarkeitsgrenze der *in-situ* Hybridisierung herabreguliert ist. Untersuchungen an kultivierten Lungenfibroblasten haben gezeigt, dass bei chronischer Hypoxie, welche eine große Rolle bei der Lungenfibroseentstehung spielt, im Vergleich zur Normoxie TGF- β vermehrt gebildet wird und die MMP-1-Aktivität dadurch reduziert wird (130). Auch bei der systemischen Sklerose, die durch Fibrose und Gefäßveränderungen charakterisiert ist, zeigt sich eine verminderte *MMP-1*-Aktivität (153). Sato et al. (141) konnten aufzeigen, dass spezifische IgG anti-MMP-1-Antikörper bei der Hemmung der Kollagenaseaktivität eine Rolle spielen.

In der dystrophischen Muskulatur von DMD-Patienten kommt es zu einer Akkumulation des endo- und perimysialen Kollagens Typ I und III sowie weniger ausgeprägt von Kollagen Typ IV und V (150). Da nur die Kollagenasen in der Lage sind, diese Kollagene abzubauen, müsste neben der gesteigerten Kollagensynthese auch die Expression von MMP-1 hochreguliert werden, um der progredienten

Fibrogenese entgegenzuwirken. Die nicht gesteigerte Expression von MMP-1 mit dem unzureichenden Abbau der fibrillären Kollagene kann daher neben der gesteigerten Fibrogenese bei der Muskeldystrophie Duchenne ein wichtiger Grund für die progrediente Muskelfibrose sein.

5.1.2 MMP-2 bei DMD

MMP-2 ist wie MMP-9 eine Typ IV-Kollagenase (Gelatinase), welche denaturierte Kollagene (Gelatin), aber auch natives Kollagen Typ IV und V, Fibronectin und Elastin abbauen (62). Aimes und Quigley (2) haben gezeigt, dass MMP-2, wie die Kollagenasen, in geringer Menge auch natives, interstitielles Kollagen Typ I degradieren kann. In der Skelettmuskulatur wird MMP-2 von Satellitenzellen synthetisiert und sezerniert (79); des Weiteren wird es durch viele verschiedene Zellen des Bindegewebes und von Tumoren gebildet.

MMP-2 wird unter anderem von MT1-MMP aktiviert (18). Im Gegensatz zu anderen MMP bildet es mit seinem Hauptantagonisten TIMP-2 einen Komplex, den LIMP (Large Inhibitor of Metalloproteinase), der zusätzlich eine hemmende Wirkung auf MMP-1 hat (87).

Eine Heraufregulation von MMP-2 wurde in verschiedenen Studien in Zusammenhang mit regenerativen Prozessen beschrieben. MMP-2 degradiert die wichtigsten Bestandteile der Basallamina (Kollagen Typ IV und Laminin), eine Barriere, die Myoblasten während ihrer Entwicklung und Regeneration durchbrechen müssen. Außerdem ist es aktiv an der Invasion von neuen Blutgefäßen in das Gewebe beteiligt (123). Kherif et al. (79) konnten einen Zusammenhang zwischen der MMP-2-Expression und der Regeneration neuer Muskelfasern beobachten. Ihre Untersuchungen an kultivierten myogenen C2C12-Zellen und mdx-Muskulatur lassen vermuten, daß die Heraufregulation von MMP-2 auf der *mRNA*-und Proteinebene mit der Regeneration der Skelettmuskulatur, also mit einer myogenen Zellproliferation, Migration und Fusion myogener mononukleärer Stammzellen, die zu Muskelfasern heranreifen, positiv korreliert.

Mittels Immunhistologie konnte in unseren Versuchen eine starke Expression von MMP-2 auf der Proteinebene in dystropher Muskulatur aufgezeigt werden. Hierbei findet eine zellständige Anfärbung der EZM statt, aber keine Anfärbung der Myozyten. Im Gegensatz dazu ist bei den gesunden Kontrollmuskeln nur eine geringe Expression zu finden. Diese Ergebnisse konnten in der Western-Blot-Analyse bestätigt werden.

Auch auf der *mRNA*-Ebene konnte in der [³⁵S] *in situ* Hybridisierung eine quantitativ gesteigerte *MMP-2*-Expression bei DMD-Muskulatur aufgezeigt werden (110). Sowohl die Anzahl an *MMP-2* positiven Zellen als auch die Expressionsstärke waren hier signifikant höher als in den gesunden und pathologischen Kontrollmuskeln. Die Expression erfolgte dabei größtenteils in Fibroblasten. Endothelzellen und Satellitenzellen zeigten kaum Hybridisierungssignale.

Choi et al. (23) untersuchten *MMP-2* an Muskelgewebe von Patienten mit entzündlichen Myopathien und DMD und kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Mittels densitometrischer Semiquantifikation der gelatinolytischen Aktivität und immunhistologisch konnten sie zeigen, daß *MMP-2* und *MMP-9* sowohl bei den inflammatorischen Myopathien als auch bei den drei DMD-Patienten im Vergleich zur gesunden Muskulatur heraufreguliert ist. Singh et al. (147) konnten in gesunder Skelettmuskulatur eine *MMP-2*-Aktivität nur in der RT-PCR und der Zymographie nachweisen, nicht jedoch in der Immunhistologie, in der wir für die gesunde Skelettmuskulatur auch nur sehr schwache Signale erhielten.

Zanotti et al. (166) konnten im DMD-Muskel mittels Immunhistochemie und RT-PCR ebenfalls eine Hochregulation von *MMP-2* nachweisen.

Ein vergleichbares Expressionsmuster ist in Untersuchungen an fibrotischer Leber zu erkennen. *MMP-2* hat dort ein mit unseren Ergebnissen vergleichbares Expressionsmuster (62). Während in der Leber gesunder Probanden in der *in-situ* Hybridisierung keine Signale nachweisbar waren, zeigte sich die stärkste Expression in zirrhotischer Leber mit erhöhter entzündlicher Aktivität. In humaner Leber waren überwiegend mesenchymale Zellen Quelle von *MMP-2* anzufinden. Ähnliches gilt für die Lungenfibrose, bei der es sowohl in der frühen entzündlichen Phase, als auch während des fibrotischen Umbaus zum Anstieg von *MMP-2* kommt (25).

Die gesteigerte Expression von *MMP-2* wird auch bei DMD im Zusammenhang mit der Regeneration von Muskelfasern gesehen. Die erhöhte *MMP-2*-Expression würde jedoch einen vermehrten Abbau seiner Substrate bei der DMD vermuten lassen. Stattdessen kommt es aber zu einer Zunahme von Kollagen Typ IV und V, die durch eine relative Insuffizienz des Abbaus im Verhältnis zur Synthese erklärbar wäre.

5.1.3 TIMP-1 bei DMD

Die proteolytische Aktivität der Metalloproteinasen wird von den TIMP kontrolliert. Deshalb ist es in jedem Fall erforderlich, die Expression der spezifischen MMP-Gewebshemmer in die Betrachtung mit einzubeziehen. Sie tragen zur Bewahrung der Balance zwischen Matrixdestruktion und -formation bei. Der am meisten verbreitete Vertreter ist TIMP-1, welcher von fast allen mesenchymalen Zellen, einschließlich Fibroblasten und Makrophagen, synthetisiert wird.

Neben ihrer antiproteolytischen Fähigkeit haben die TIMP auch wachstumsfördernde Effekte; sie können unter anderem Zellwachstum- und Differenzierung, Endothelproliferation, Angiogenese und Apoptose beeinflussen (140,167).

TIMP binden an die aktive Form der MMP und bilden mit ihnen einen non-kovalenten Komplex im stöchiometrischen Verhältnis 1:1, um so ihre Aktivität zu hemmen. Alle bisher identifizierten MMP werden durch TIMP gehemmt. TIMP-1 bindet dabei bevorzugt an MMP-1 und MMP-3, wohingegen TIMP-2 sich bevorzugt an MMP-2 anlagert. In allen bei uns untersuchten Muskelpäparaten ist TIMP-1 nachweisbar. Bereits im gesunden Muskel findet sich eine deutliche Expression von TIMP-1. In der DMD-Gruppe ist TIMP-1 im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe gesteigert. Dieses Ergebnis deckt sich mit verschiedenen Untersuchungen an unterschiedlichen fibrotischen Geweben, wie Leberzirrhose, Lungenfibrose und Nephropathie. Untersuchungen an fibrotischen Rattenlebern (62) zeigten eine sehr frühe *TIMP-1*-Expression, weit vor Beginn einer nachweisbaren *MMP-2*-Expression. Die Autoren vermuten ihre Funktion darin, einer akzidentellen Aktivierung von MMP im Zuge der Gewebsschädigung entgegenzuwirken. Auch in menschlich zirrhotischer Leber fanden sie eine stark gesteigerte *TIMP-1*-Expression, vor allem in den α -SMA positiven Zellen.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Ruiz et al. (139), welche TIMP-1 an experimenteller Lungenfibrose untersuchten. Hier ging die erhöhte Expression von TIMP-1 der Akkumulation der Kollagene voraus und stieg parallel zur Fibroseentwicklung an. Auch bei den meisten progressiven Nierenerkrankungen, die mit einer Fibrose einhergehen, ist TIMP-1 in erhöhtem Maße nachweisbar (83). In Studien an Wildtyp-Mäusen mit einseitiger Uretherobstruktion und Proteinurie war die TIMP-1-Expression deutlich erhöht. Kieseier et al. (82) konnten im Gegensatz zu unseren Ergebnissen keinen signifikanten Unterschied der TIMP-1-Expression zwischen DMD- und Myositispatienten (Daten nicht veröffentlicht) feststellen. Jedoch

ist in dieser Studie auch nur ein DMD-Patient in der Kontrollgruppe untersucht worden. Ein Vergleich zur Normalmuskulatur ist dort nicht erfolgt.

Die erhöhte TIMP-1-Expression hemmt insbesondere die enzymatische Aktivität von MMP-1 und trägt damit ebenfalls zu der Matrixakkumulation bei.

5.1.4 TIMP-2 bei DMD

TIMP-2 ist ebenfalls ein potenter Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen, der bevorzugt MMP-2 sowohl in der latenten, als auch in der aktiven Form durch Komplexbildung hemmt. Des Weiteren kann TIMP-2 mit pro-MMP-2 einen Komplex bilden, den LIMP (large inhibitor of metalloproteinases), der als Inhibitor von MMP-1, -2, und -3 fungiert (87,20). Dieser Komplex wirkt jedoch auch synergistisch mit MMP-2, da er auch eine proteolytische Aktivität nach Aktivierung aufweist (49,151).

In der immunhistologischen Untersuchung war TIMP-2 in allen untersuchten Muskelpräparaten nachweisbar. Jedoch ist die Proteinexpression von TIMP-2 bei der DMD im Vergleich zur gesunden Muskulatur gesteigert. Diese immunhistologischen Befunde decken sich mit den Ergebnissen der Untersuchung der mRNA-Expression mittels [³⁵S] *in-situ* Hybridisierung. Sowohl in der immunhistologischen Untersuchung als auch in der *in situ* Hybridisierung zeigen vor allem nichtmyogene Zellen Signale für TIMP-2. Bei der DMD wurde anhand der *in-situ* Hybridisierung eine Kolo-kalisation von TIMP-2 und MMP-2 mRNA-Expression in Fibroblasten in der Muskulatur nachgewiesen (110,109). Diese Kolo-kalisation ist die Voraussetzung für die Bildung von LIMP-Komplexe.

Die MMP-2 und TIMP-2 -Expression ist bei der DMD gesteigert, wodurch auch eine erhöhte Konzentration von LIMP bestehen könnte. Dies könnte neben TGF- β ein weiterer Faktor sein, der MMP-1 hemmt und zu einer Beeinträchtigung der fibrolytischen Kapazität führt, die insbesondere den Abbau der fibrillären Kollagene betrifft.

5.2 Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteinexpression

Western-Blot ist eine effektive Methode, um spezifische Antigene in einem komplexen Proteingemisch zu identifizieren. Hierbei können einzelne Proteine aus Gewebelysaten, Viruspräparationen oder Gesamzellproteine in einer Polyacrylamidmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt werden und über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden.

In unseren Versuchen war die Etablierung des Western-Blots zur Darstellung der Proteinexpression aufgrund zunächst fehlender, bzw. inkonstanter Signale erschwert. Erst nach sehr vielen Probeläufen, in denen die Gewebehomogenisation, die Proteinmenge, die primären Antikörper und Gele für die Elektrophorese variiert wurden, ist es uns gelungen, für MMP-1,-2 und TIMP-1 eindeutige Signale mit geringer Hintergrundfärbung nachzuweisen. Für TIMP-2 konnten im Westernblot in unseren Experimenten keine eindeutigen Signale erzeugt werden.

Um die funktionelle Relevanz dieser Proteine zu beleuchten, erscheint es sinnvoll, weitere Untersuchungen wie z.B. die Zymographie zur Messung der gelatinolytischen Aktivität der Proteasen zur Validierung der Ergebnisse anzuschließen, da auf Grund der geringen Fallzahlen unsere Ergebnisse in der Western-Blot-Analyse nur einen Anhalt für die Proteinexpression von MMP-1,-2 und TIMP-1 geben können.

Probleme bei der Darstellung der Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren im Western-Blot zeigen auch Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen. Kieseier et al. (82) untersuchten MMP-1,-9 und TIMP-1 mittels PCR, Zymographie, Western-Blot, immunhistochemisch und im ELISA. MMP-1 konnte dort weder im Western-Blot noch in der Immunhistologie bei der Muskeldystrophie Duchenne im Vergleich zu anderen Muskelerkrankungen nachgewiesen werden. Balzerzak et al. (9) konnten zwar Signale des anti-MMP-2-Antikörpers bei boviner Skelettmuskulatur erreichen, allerdings nur, wenn das Kulturmedium der intramuskulären Fibroblasten 30-fach konzentriert wurde. Bei Skelettmuskelhomogenaten ließen sich keine Signale erzielen. Hier erschien die Zymographie, welche bei unkonzentrierten Gewebeextrakten durchaus MMP-2-Aktivität zeigte, erheblich sensitiver zu sein. Probleme bei der Darstellung der Proteinexpression von TIMP-1 hatten Kim et al. (83) bei Untersuchungen an fibrotischem Nierengewebe. Das Expressionsmuster des anti-TIMP-1-Antikörpers zeigte hier keinen Unterschied zu den Hintergrundsignalen des zweiten Antikörpers.

Auch Zanotti et al. (166) konnten MMP-1, MMP-9 und TIMP-1 im Western-Blot weder in der DMD-Muskulatur noch in der gesunden Kontrollmuskulatur nachweisen.

Gründe für die erschwerte Darstellung der Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren in der Western-Blot-Analyse dürften einerseits die nicht ausreichende Antikörperspezifität und die Gewebeaufbereitung sein. Andererseits wäre es auch denkbar, dass diese Proteine aufgrund der geringen Menge und der kurzen Halbwertszeit bei einzelnen Patienten unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

5.3 Schlußfolgerung

In der immunhistologischen Untersuchung war die Proteinexpression von MMP-1 im DMD-Muskel im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nicht erhöht und von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 gesteigert. Anhand der Western-Blot-Untersuchung konnten wir diese Ergebnisse für MMP-1, MMP-2 und TIMP-1 bestätigen. Dies ist auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der quantitativen *mRNA*-Bestimmung (110).

Sowohl TIMP-1, als auch LIMP hemmen die MMP-1-Synthese. Diese verminderte fibrolytische Kapazität ist wahrscheinlich ein wichtiger Faktor für die bekannten quantitativen und qualitativen Veränderungen der EZM bei der Muskulatur von DMD-Patienten. Insbesondere die überproportionale Ablagerung der fibrillären Kollagene Typ I und III sind offenbar durch eine gestörte Fibrolyse bei fortdauernder Fibrogenese bedingt. Reinhold (135) konnte mittels [³⁵S] *in-situ*-Hybridisierung zeigen, dass der gesteigerten *mRNA*-Expression von *TIMP-2* eine noch deutlichere Steigerung der *mRNA*-Expression von *MMP-2* gegenüber steht. Die Fibrose lässt sich daher nicht nur durch einen Überschuss der Inhibitoren erklären. Es wird diskutiert, dass das Ungleichgewicht zwischen MMP-2 und TIMP-2 mit einem Überschuss an freier MMP-2 beim Remodeling der EZM eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der DMD spielt (135).

Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eine Imbalance zwischen dem Matrixaufbau und der Hemmung des Matrixabbaus zur Fibroseentwicklung beiträgt und sowohl eine vermehrte Synthese als auch eine Störung der Matrixdegradation pathophysiologisch bedeutsam sein können.

5.4 Aussichten

Bisher stehen noch immer keine kurativen Behandlungsmöglichkeiten für die Muskeldystrophie Duchenne zur Verfügung.

Nach der Identifizierung des DMD-Gens vor über 20 Jahren hat es einen großen Fortschritt in der Therapieforschung der DMD gegeben. Seitdem wurden unterschiedlich erfolgreiche Strategien zur Behandlung der DMD in ersten klinischen Studien und Experimenten am Tiermodell erzielt. Mit den gen- und zellbasierten Therapien wird versucht, das fehlende oder verkürzte Protein zu ersetzen, wobei hier eine Vielzahl von technischen Hürden eine breite Anwendung in näherer Zukunft nicht erwarten lässt. Neben immunologischen Antworten auf die viralen Vektoren, Myoblasten und das neu synthetisierte Dystrophin wurde von schweren Nebenwirkungen und einer instabilen Expression des Dystrophins berichtet. Die pharmakologische Therapie zielt auf die pathogenetischen Sekundärphänomene, wie z. B. die Inflammation, ab (Übersicht bei 45,21).

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Hypothese, daß eine veränderte Aktivität der Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren mit einer gestörten Homöostase im Matrixstoffwechsel zur Entstehung der Fibrose der DMD-Muskulatur beiträgt.

Eine therapeutische Beeinflussung der Fibrose konnte tierexperimentell bei anderen Organfibrosen bereits aufgezeigt werden. Demeule et al. (32) konnten bei verschiedenen Gehirntumoren *in-vitro* nachweisen, daß Bestandteile des grünen Tees, wie „green tea polyphenole“ (GTP) die Aktivität von pro-MMP-2, MMP-9 und MMP-12 hemmen können. Es wäre durchaus vorstellbar, daß GTP auch bei inflammatorischen Erkrankungen, die mit einer erhöhten Aktivität von MMP-2 einhergehen, eine Wirksamkeit zeigt. Bei der experimentellen Lungenfibrose zeigte eine Behandlung mit Batimastat durch die Reduktion von MMP-2, MMP-9 und TIMP-1 eine positive Wirkung (25). Bei der experimentellen Leberfibrose konnte ein antifibrogenetischer Effekt durch Supprimierung von TIMP-1 und Kollagen- α_1 durch Silymarin am wahrscheinlichsten durch die Herunterregulation von TGF β 1-mRNA aufgezeigt werden (73).

Bei der mdx-Maus konnte ein positiver Effekt für bestimmte Bestandteile des grünen Tees (EGCG) nachgewiesen werden (34). Auch führte die Gabe von TGF- β -neutralisierenden Antikörpern (1D11) bei mdx-Mäusen zu einer Verbesserung der Lungenfunktion und der Muskelkraft, jedoch wurde dabei in einer anderen Studie

eine deutliche Zunahme der entzündlichen Veränderungen beobachtet (122). Eine Beeinflussung der Sekundärphänomene der DMD wäre auch durch Hemmung von TIMP-1 und TGF- β 1 mittels Antisense-Oligonukleotiden denkbar.

6 Zusammenfassung

Die Muskeldystrophien bilden eine Gruppe von klinisch und genetisch heterogenen Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal ein degenerativer Abbau der quergestreiften Muskulatur mit einer fortschreitenden Muskelschwäche ist. Die häufigste Form der Muskeldystrophien ist die Muskeldystrophie Duchenne mit einer Inzidenz von 1:3500 männlichen Lebendgeborenen. Diese Kinder fallen durch eine zunehmende Muskelschwäche auf. Es kommt zu einem Gehverlust ab dem zehnten bis zwölften Lebensjahr. Unbehandelt verstirbt die Mehrheit der Patienten um das 20. Lebensjahr an einer Ateminsuffizienz.

Bei der Muskeldystrophie Duchenne kommt es durch Mutationen im *Dystrophin-Gen* zu einem hochgradigen Mangel oder zum Fehlen von Dystrophin an der Muskelzellmembran. Dies führt histologisch zu degenerativen Veränderungen der Skelettmuskulatur, die neben Fasernekrosen-und Regeneraten eine progrediente endo- und perimysiale Fibrose zur Folge haben. Bei der Zunahme der extrazellulären Matrix (EZM) steht die Akkumulation der fibrillären Kollagene I-III im Vordergrund. Diese Organfibrose kann einerseits durch eine überproportionale Ablagerung von Kollagenen verursacht werden, andererseits kann auch ein gestörter Matrixabbau (Fibrolyse) zu einer Akkumulation von fibrösem Gewebe führen.

Die ersten Mitglieder der Matrix-Metalloproteinasen wurden 1962 von Gross und Lapière entdeckt (58). Seitdem sind mehr als 20 Enzyme identifiziert worden (162). Die zinkabhängigen Metalloproteinasen haben ein breites Substratspektrum und sind gemeinsam in der Lage, die gesamten Komponenten der EZM zu hydrolisieren, wobei hauptsächlich die Kollagenasen für den Abbau der fibrillären Kollagene (I-III) verantwortlich sind. Die Aktivität der MMP wird u.a. durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, durch Zell-Matrix-Interaktionen und Zell-Zell-Interaktionen stimuliert und durch deren spezifischen Inhibitoren, den „tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases“ gehemmt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Proteinexpression von MMP-1, -2 und den Inhibitoren TIMP-1 und -2 im DMD-Muskel mittels Immunhistochemie und Western-Blot. Die Expressionsmuster sprechen dafür, dass MMP-1 u. a. durch vermehrt gebildetes TIMP-1 und TIMP-2 gehemmt wird und dadurch der vermehrten Synthese von Kollagen Typ I und III nicht suffizient entgegen gewirkt werden kann. Die gesteigerte Aktivität von MMP-2 fördert zudem durch das Aufbrechen von

Basalmembranen den Gewebeumbau, wodurch die Homöostase der extrazellulären Matrix weiter verändert wird. Die Ergebnisse waren in Übereinstimmung mit Studien bei anderen Organfibrosen, die eine gesteigerte Expression von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 und eine geringere Expression von MMP-1 ergaben.

Es erscheint sinnvoll, antifibrotisch wirksame Medikamente/ Substanzen in die therapeutischen Überlegungen mit einzubeziehen.

7 Literatur

1. Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 1993;3:283-291.
2. Aimes RT, Quigley JP. Matrix Metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. *J Biol Chem* 1995;270:5872-5876.
3. Amalfitano A, Parks RJ. Separating fact from fiction: assessing the potential of modified adenovirus vectors for use in human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2002;2:111-133.
4. Arahata K, Ishihara T, Kamakura K, et al. Mosaic expression of dystrophin in symptomatic carriers of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1989;320:138-142.
5. Arahata K. Muscular dystrophy. *Neuropathology* 2000;20:S34-41. Review.
6. Baban D, Davies KE. Microarray analysis of mdx mice expressing high levels of utrophin: therapeutic implications for dystrophin deficiency. *Neuromusc Disord* 2008;18:239-247.
7. Bach JR, Martinez D. Duchenne muscular dystrophy: continuous non-invasive ventilatory support prolongs survival. *Respir Care* 2011;56:744-750.
8. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell. Sci* 2002;115:3719-3727.
9. Balcerzak D, Querengesser L, Dixon WT, Baracos VE. Coordinate expression of matrix-degrading proteinases and their activators and inhibitors in bovine skeletal muscle. *J Anim Sci* 2001;79:94-107.
10. Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 1999;104:375-381.
11. Batchelor CL, Winder SJ. Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* 2006;16:198-205.
12. Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest* 1995;96:1137-1144.
13. Birkedal-Hansen H. Proteolytic removal of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:728-735.

14. Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, et al. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 1988;54:447-452.
15. Bushby KM, Thambyayah M, Gardner-Medwin D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet* 1991;337:1022-1024.
16. Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989;338:259-262.
17. Call JA, Voelker KA, Wolff AV, et al. Endurance capacity in maturing mdx mice is markedly enhanced by combined voluntary wheel running and green tea extract. *J Appl Physiol* 2008;105:923-932.
18. Cao J, Sato H, Takino T, Seiki M. The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994;370:61-65.
19. Carpenter JL, Hoffman EP, Gorospe JR. Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am J Pathol* 1989;135:909-919.
20. Cawston TE, Curry VA, Clark IM, Hazleman BL. Identification of a new metalloproteinase inhibitor that forms tight-binding complexes with collagenase. *Biochem J* 1990;269:183-187.
21. Chakkalakal JV, Thompson J, Parks RJ, Jasmin BJ. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. *FASEB J* 2005;19:880-91.
22. Consolo M, Amoroso A, Spandidos DA, Mazzarino MC. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease. *Int J Mol Med* 2009;24:143-152. Review.
23. Choi YC, Dalakas MC. Expression of matrix metalloproteinases in the muscle of patients with inflammatory myopathies. *Neurology* 2000;54:65-71
24. Cooper BJ. Animal models of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Br Med Bull* 1989;45:703-718.
25. Corbel M, Caulet-Maugendre S, Germain N, Molet S, Lagente V, Boichot E. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat. *J Pathol* 2001;193:538-545.
26. Cordell JL, Falini B, Erber W, et al. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-229.

27. Coulton GR, Curtin NA, Morgan JE, Partridge TA. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: II. Contractile properties. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1988;14:299-314.
28. D'Amore PA, Brown RH Jr, Ku PT, et al. Elevated basic fibroblast growth factor in the serum of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 1994;35:362-365.
29. Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, et al. Utrophin- dystrophin- deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1997;90:717-727. (b)
30. Deconinck AE, Tinsley J, DeBacker F, et al. Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin- deficient muscles of mice. *Nature Med* 1997;3:1216-1221.
31. Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypothesis. *Pediatr Neurol* 2007;36:1-7 Review.
32. Demeule M, Brossard M, Page M, Gingras D, Beliveau R. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* 2000;16:1478:51-60.
33. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletion and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 1989;45: 835-847.
34. Dorchies OM, Wagner S, Buettler TM, Rugg UT. Protection of dystrophic muscle cells with polyphenols from green tea correlates with improved glutathione balance and increased expression of 67LR, a receptor for (-)-epigallocatechin gallate. *Biofactors* 2009;35: 279-294.
35. Dubowitz V. Muscle biopsy. A practical approach. Baillière Tindall, London. 1985.
36. Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 2000;15:290-301.
37. Emery A, Muntoni F. Duchenne Muscular dystrophy. 3. Aufl. Oxford University Press, Oxford 2003.
38. Endesfelder S, Bucher S, Kliche A, Reszka R, Speer A. Transfection of normal primary human skeletal myoblasts with p21 and p57 antisense oligonucleotides to improve their proliferation: a first step towards an alternative molecular therapy approach of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Med* 2003;81:355.

39. 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* 2005;83:64-71.
40. Endesfelder S, Krahn A, Kreuzer KA, Lass U, Schmidt CA, Jahrmarkt C, von Moers A, Speer A. Elevated p21 mRNA level in skeletal muscle of DMD patients and mdx mice indicates either an exhausted satellite cell pool or a higher p21 expression in dystrophin. *J Mol Med* 2000;78:569-574.
41. Engel AG. Dystrophinopathies. In: *Myology*, 3rd edition. Inc. New York, McGraw-Hill. 2004.
42. Finkel RS, Read-through strategies for suppression of nonsense mutations in Duchenne/ Becker dystrophy: aminoglycosides and ataluren (PTC124). *J Child neurol* 2010;25:1158-64.
43. Finsterer J, Stollberger C. The heart in human dystrophinopathies. *Cardiology* 2003;99:1-19.
44. Forst R, Forst J. Importance of lower limb surgery in Duchenne muscular dystrophy. *Arch Orthop Trauma Surg* 1995;114:106-111.
45. Foster K, Foster H, Dickson JG. Gene therapy progress and prospects: Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther* 2006;13:1677-85.
46. Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C, Dioguardi N, Grizzi F. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases. *Dig Dis Sci* 2006;51:2248-2256.
47. Gaschen FP, Hoffman EP, Gorospe JR. Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J Neurol Sci* 1992;110:149-159.
48. Goemans NM, Tilinius M, van den Akker JT, et al. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2011;364:1513-1522.
49. Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S, He C. Human 72-kd type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8207-8211.
50. Gorospe JR, Tharp MD, Demitsu T, Hoffman EP. Dystrophin-deficient myofibers are vulnerable to mast cell granule-induced necrosis. *Neuromusc Disord* 1994;4:325-333.

51. Gorospe JR, Tharp MD, Hinckley J, Kornegay JN, Hoffman EP. A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs, and mice. *J Neurol Sci* 1994;1:44-56.
52. Gotis-Graham, I. & McNeil, H.P. Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis Rheum* 1997;40:479-489.
53. Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1997;90:729-738.
54. Grain L, Cortina-Borja M, Forfar C, Hilton-Jones D, Hopkin J, Burch M. Cardiac abnormalities and skeletal muscle weakness in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies and controls. *Neuromusc Disord* 2001;11:186-191.
55. Graninger W, Wintersberger W, Meron G, Smolen J, Toifl K, Vormittag W. Molekularbiologische Diagnostik und Deletionsnachweis bei Duchennscher Muskeldystrophie. *Wien Klin Wochenschr* 1991;103:207-209.
56. Greenstein RM, Reardon MP, Chan TS, Middleton AB, Mulivor RA, Greene AE, Coriell LL. An (X;11) translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy. *Cytogenet Cell Genet* 1980;27:268.
57. Gress TM, Müller- Pillasch F, Lerch MM. Balance of expression of genes coding for extracellular matrix proteins and extrazellular degrading proteases in chronic pancreatitis. *Z. Gastroenterol* 1994;32:221-225.
58. Gross J, Lapière CM: Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci.* 1962;48:1014-1022.
59. Grunewald S, Speer A, Ackermann J, Koch I. Petri net modelling of gene regulation of the duchenne muscular dystrophy. *Biosystems* 2008;92:189-205.
60. Hartung HP, Poeure W, Reichmann H. Muskeldystrophien. In: *Prinzipien der Neurologie*. 6th edition. London, McGraw- Hill. 1999. 1447-1452.
61. Hebda PA, Collins MA, Tharp MD. Mast cell and myofibroblast in wound healing. *Dermatol Clin* 1993;11:685-696. Review.
62. Herbst H, Schuppan D, Milani S. Fibrogenese und Fibrolyse in der Leber. *Verh Dtsch Ges Path* 1995;79:15-27.
63. Herbst H, Wege T, Milani S. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 1997;150:1647-1659.

64. Hodgson S, Hart K, Abbs S, et al. Correlation of clinical and deletion data in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Med Genet* 1989;26:682-693.
65. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987;51:919-928.
66. Hoffman EP, Knudson CM, Campbell KP, Kunkel LM. Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle. *Nature* 1987;330:754-758.
67. Hoogerwaard EM, Bakker E, Ippel PF, et al. Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in The Netherlands: a cohort study. *Lancet* 1999;353:2116-2119.
68. Iannaccone S, Quattrini A, Smirne S, et al. Connective tissue proliferation and growth factors in animal models of Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1995;128:36-44.
69. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992;355:696-702.
70. Infante JP, Huszagh VA. Mechanisms of resistance to pathogenesis in muscular dystrophies. *Mol Cell Biochem* 1999;195:155-167. Review.
71. Ionasescu V, Ionasescu R. Increased collagen synthesis by Duchenne myogenic clones. *J Neurol Sci* 1982;54:79-87.
72. Iredale JP. Tissue inhibitor of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 1997;29:43-54.
73. Jia JD, Bauer M, Cho JJ, et al. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. *J Hepatol* 2001;35:392-398.
74. Judge DP, Kass DA, Thomsons WR, Wagner KR. Pathophysiology and therapy of cardiac dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Cardiovasc Drugs* 2011;11:287-294.
75. Kaido M, Arahata K, Hoffman EP, Nonaka I, Sugita H. Muscle histology in Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerv* 1991;14:1076-1073.
76. Karpati G, Adjukovic D, Arnold D. Myoblast transfer in duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1993;34:8-17.
77. Karpati G, Carpenter S. The deficiency of a sarkolemmal cytoskeletal protein (dystrophin) leads to the necrosis of skeletal muscle fibers in Duchenne-Becker dystrophy. In: Sellin LC, Libelius R, Thesleff S, eds. *Neuromuscular*

- Junction Elsevier Science 1988:429-436.
78. Kelly BC, Markle LS, Vickers JL, Pettitt MS, Raimer SS, McNeese C. The imbalanced expression of matrix metalloproteinases in nephritic systemic fibrosis. *J Immunol* 2010;185:5486-5494.
 79. Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol* 1999;205:158-170.
 80. Khurana TS, Watkins SC, Chafey P, et al. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 1991;1:185-194.
 81. Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984;10:203-209
 82. Kieseier BC, Schneider C, Clements JM, et al. Expression of specific matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies. *Brain* 2001;124:341-351.
 83. Kim H, Oda T, Lopez-Guisa J, et al. TIMP-1 deficiency does not attenuate interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:736-748.
 84. Knippers R. *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. 1997; 7. Auflage, 229-230.
 85. Knittel T, Saile B, Ramadori G. Fibrogenese: Pathophysiologie und therapeutische Ansätze. *Internist* 1998;39:238-246.
 86. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-517.
 87. Kolkenbrock H, Orgel D, Hecker-Kia A, Noack W, Ulrich N. The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72- kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor. *Eur J Biochem* 1991;198:775-781.
 88. Krag TOB, Gyrd-Hansen M, Khurana TS. Harnessing the potential of dystrophin-related proteins for ameliorating Duchenne's muscular dystrophy. *Acta Physiol Scand* 2001;171:349-358.

89. Kuroda K, Shinkai H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 1997;289:567-572.
90. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
91. Lagunoff D, Rickard A. Evidence for control of mast cell granule protease in situ by low pH. *Exp Cell Res* 1983;144:353-360.
92. Lentze MJ. Pädiatrie: Grundlagen und Praxis. Springer-Verlag-Berlin, 2001.
93. Leonhardt H. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Thieme-Verlag, 6. Auflage, 1981.
94. Li QY, Raza-Ahmad A, MacAulay MA, et al. The relationship of mast cells and their secreted products to the volume of fibrosis in posttransplant hearts. *Transplantation* 1992;53:1047-1051.
95. Lindenbaum RH, Clarke G, Patel C, Moncrieff M, Hughes JT. Muscular dystrophy in an X; 1 translocation female suggests that Duchenne locus is on X chromosome short arm. *J Med Genet* 1979;16:389-392.
96. Love DR, Hill DF, Dickson G, et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 1989;339:55-58.
97. Lu QL, Mann CJ, Lou F, Bou-Gharios G, Morris GE, Xue SA, Fletcher S, Partridge TA, Wilton SD. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 2003;9:1009-1014.
98. Malhotra SB, Hart KA, Klamut HJ, et al. Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 1988;242:755-759.
99. Mandal M, Mandal A, Das S, Chakraborti T, Chakraborti S. Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003;252:305-329.
100. Manlik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Mendell JR. Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Ther Adv Neurol Disord* 2010;3:379-389.
101. Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;23:CD003725.

102. Manzur AY, Kinali M, Muntoni F. Update of the management of Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child* 2008;93:986-990.
103. Maruotti N, Crivellato E, Cantatore FP, Vacca A, Ribatti D. Mast cells in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2007;26:1-4.
104. Matsuo M. Duchenne/Becker muscular dystrophy: from molecular diagnosis to gene therapy. *Brain Dev* 1996;18:167-172. Review.
105. McArdle A, Edwards RH, Jackson MJ. How does dystrophin deficiency lead to muscle degeneration?--Evidence from the mdx mouse. *Neuromuscul Disord* 1995;5:445-456. Review.
106. Mellies U, Dohna-Schwake C, Ragette R, Teschler H, Voit T. Nocturnal noninvasive ventilation of children and adolescents with neuromuscular diseases: effect on sleep and symptoms. *Wien Klin Wochenschr* 2003;115:855-859.
107. Milani S, Herbst H, Schuppan D, et al. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 in genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1994;144:528-537.
108. Melone MA, Peluso G, Petillo O, Galderisi U, Cotrifo R. Defective growth in vitro of Duchenne Muscular Dystrophy myoblasts: the molecular and biochemical basis. *J Cell Biochem* 1999;76:118-132.
109. Moers Av, Möller P, Herbst H, Schuppan D, Hübner C. Expression of mRNA of procollagen type I and procollagen type IV and its cellular localisation in spinal muscular atrophy and Duchenne muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 1996;3/4(Suppl:34).
110. Moers Av, Zwirner A, Reinhold A, et al. Increased mRNA expression of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 2005;109:285-293.
111. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for phenotypic differences between patients bearing partial deletions of DMD locus. *Genomics* 1988;2:90-95.
112. Mortier W. *Muskel-und Nervenerkrankungen im Kindesalter*. Thieme-Verlag-Stuttgart, 1994.
113. Moser H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet* 1984;66:17-40.

114. Mouly V, Aamiri A, Perie S, et al. Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol* 2005;24:128-133.
115. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003;2:731-740.
116. Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M, Docherty AJP. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochem* 1991;30:8097-8102.
117. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:31-41. Review.
118. Murray JM, Davies KE, Harper PS, Meredith L, Mueller CR, Williamson R. Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1982;300:69-71.
119. Nagase H. Activation mechanisms of MMP's. *Biol Chem* 1997;378:151-160.
120. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562-573.
121. Neuromuscular disorders: Gene location. *Neuromusc disord* 2006;16:64-90.
122. Nelson CA, Hunter RB, Quigley LA, et al. Inhibiting TGF- β activity improves respiratory function in mdx mice. *Am J Pathol* 2011;178: 2611-2621.
123. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:960-970. Review.
124. Nicotera P, Orrenius S. Ca²⁺ and cell death. *Ann N Y Acad Sci* 1992;648:17-27. Review.
125. Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. Urban und Fischer Verlag, München, Jena 2000;1. Auflage.
126. Oh CK. Mast cell mediators in airway remodeling. *Chem Immunol Allergy* 2005;87:85-100.
127. Ohlendieck K, Campbell KP. Dystrophin contents 5% of membrane cytoskeleton in skeletal muscle. *FEBS-Lett* 1991;283:230-234.
128. Ohlendieck K, Ervasti JM, Snook JB, Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex is highly enriched in isolated skeletal muscle sarcolemma. *J Cell Biol* 1991;112:135-418.
129. Ohlendieck K. *Molekulare Pathogenese von Muskelerkrankungen*. *Naturwissenschaften* 1996;83:555-565.

130. Papakonstantinou E, Aletras AJ, Roth M, Tamm M, Karakiulakis G. Hypoxia modulates the effects of transforming growth factor-beta isoforms on matrix-formation by primary human lung fibroblasts. *Cytokine* 2003;24:25-35.
131. Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibers from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989;337:176-179.
132. Platenburg G. Exon skipping, a therapy for Duchenne muscular dystrophy. Interview by Guenter Scheuerbrandt. *Acta myol* 2008;27:69-73.
133. Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2001;24:1575-1594.
134. Read AP, Mountford RC, Forrest SM, Kenwrick SJ, Davies KE, Harris R. Patterns of exon deletions in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Hum Genet* 1988;80:152-156.
135. Reinhold A. Bestimmung der mRNA- Expression von MMP-2 und TIMP-2 mittels [³⁵S] in situ Hybridisierung bei Muskeldystrophie vom Typ Duchenne. Diss 2003.
136. Riede UN. Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Aufl., Thieme-Verlag-Stuttgart, 1995.
137. Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:2331-2335.
138. Romero NB, Braun S, Benveniste O, et al. Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 2004;15:1065-1076.
139. Ruiz V, Ordonez RM, Berumen J, et al. Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in xperimental lung fibrosis. *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L1026-L1036.
140. Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res* 1998;8:171-177.
141. Sato H, Takino T, Okada Y, et al. A matrixmetalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994;370:61-65.
142. Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 2003;120:542-547.

143. Schöpfer S. Entwicklung und Validierung eines Verfahrens zur Quantifizierung der Metalloproteinasen-1,-2,-3, sowie ihres Inhibitors TIMP-1 aus Darm- und Lebergeweben bei entzündlichen und fibrosierenden Erkrankungen. Diss 1999.
144. Schuppan D, Herbst H, Milani S. Matrix, matrix synthesis and molecular networks in hepatic fibrosis. In Zern MA, Leid LM Extracellular matrix. Chemistry, biology, and pathobiology with emphasis on the liver. Marcel Dekker. 1993; pp. 201-254.
145. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001;21:351-372.
146. Schuppan D, Strobel D, Hahn EG. Hepatic fibrosis -therapeutic strategies. *Digestion* 1998;59:385-390. Review.
147. Singh A, Nelson-Moon ZL, Thomas GJ, Hunt NP, Lewis MP. Identification of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors type 1 and 2 in human masseter muscle. *Arch Oral Biol* 2000;45:431-440.
148. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989;244:1578-1580.
149. Slater M. Dynamic interactions of the extracellular matrix. *Histol Histopathol* 1996;11:175-180. Review.
150. Stephe HR, Duance VC, Dunn MJ, Bailey AJ, Dubowitz V. Collagen types in neuromuscular diseases. *J Neurol Sci* 1982;53:45-62.
151. Stelter-Stevenson WG, Krutzsch HC, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 1989;264:17374-17378.
152. Suzuki K, Enghild JJ. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990;6:10261-10270.
153. Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakata M, Oishi Y. Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994;103:359-363.
154. Takino T, Sato H, Shingawa A, Seiki M. Identification of the second MT- MMP gene from a human placenta c-DNA library. *J Biol Chem* 1995;270:23013-23020.

155. Taylor PJ, Betts GA, Maroulis S, et al. Dystrophin Gene Mutation Location and the rRisk of Cognitive Impairment in Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* 2010;5:e8803.
156. Tharp MD, Kasper C, Thiele D, Charley MR, Kennerly DA, Sullivan TJ. Studies of connective tissue mast cell-mediated cytotoxicity. *J Invest Dermatol* 1989;93:423-428.
157. Tinsley JM, Potter AC, Phelps SR, Fisher R, Trickett JI, Davies KE. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 1996;384:349-353.
158. Tinsley JM, Fairclough RJ, Storer R, et al. Daily treatment with SMTC1100, a novel small molecule utrophin upregulator, dramatically reduces the dystrophic symptoms in the mdx mouse. *PLoS One* 2011;6:e19189.
159. Wheling M, Spencer MJ, Tidball JG. Anitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J Cell Biol* 2001;155:123-131.
160. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-2154. Review.
161. Woessner JF. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:11-21. Review.
162. Woessner JF. MMPs and TIMPs--an historical perspective. *Mol Biotechnol* 2002;22:33-49. Review.
163. Worton R. Muacular dystrophies: diseases of the dystrophin-glycoprotein complex (comment). *Science* 1995;270:755-756.
164. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 2007;211:19-26.
165. Yilmaz O, Karaduman A, Topaloglu H. Prednisolone therapy in Duchenne muscular dystrophy prolongs ambulation and prevents scoliosis. *Eur J Neurol* 2004;11:541-544.
166. Zanotti S, Gibertini S, Di Blasi C, et al. Osteopontin is highly expressed in severely dystrophic muscle and seems to play a role in muscle regeneration and fibrosis. *Histopathology* 2011;59:1215-1228.
167. Zeng ZS, Guillem JG. Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastases. *Br J Cancer* 1995;72:575-582.

Danksagung

Diese Dissertation entstand an der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie des Otto-Heubner-Centrums für Kinder- und Jugendmedizin der Charité, Campus Virchow-Klinikum und den DRK Kliniken Berlin-Westend, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin. Ich danke allen Mitarbeitern, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Arpad von Moers, der mir das Thema der Doktorarbeit überließ und mir während der ganzen Zeit viel Geduld und Vertrauen entgegen gebracht hat. Seine ausgesprochen freundliche und engagierte Unterstützung trugen entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Bedanken möchte ich mich auch bei Angelika Zwirner. Ihre produktive Unterstützung bei der Laborarbeit war eine wichtige Voraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit.

Insbesondere danke ich natürlich Rüdiger, meinen Eltern und meinen Freunden, die alle auf ihre liebevolle Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Marion Kramer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Bestimmung der Proteinexpression von MMP-1, MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 mittels Immunhistochemie und Western-Blot bei Muskeldystrophie 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.“

18.10.2012

M. Kramer